



HAL
open science

Détermination d'un intervalle de référence d'hématies dans les urines à l'aide d'une méthode automatisée par cytométrie en flux

Nassim Boutouchent

► **To cite this version:**

Nassim Boutouchent. Détermination d'un intervalle de référence d'hématies dans les urines à l'aide d'une méthode automatisée par cytométrie en flux. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04225330

HAL Id: dumas-04225330

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04225330v1>

Submitted on 2 Oct 2023

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2023

N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 03 juillet 2023 par

Nassim BOUTOUCHENT

né le 23/06/1996 à Tizi Ouzou (Algérie)

**Détermination d'un intervalle de référence
d'hématies dans les urines à l'aide d'une méthode
automatisée par cytométrie en flux**

Sous la direction de Madame le Docteur Sophie BOYER

Sous la codirection de Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

Président du jury : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON, PU-PH

Membres du jury : Madame le Professeur Soumeya BEKRI, PU-PH

Madame le Docteur Sophie BOYER, PH

Monsieur le Docteur Thomas GUEUDET, PH

Madame le Docteur Mélanie HANOY, PH

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

ANNEE UNIVERSITAIRE 2022 - 2023
U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : Professeur Loïc FAVENNEC Professeur Agnès LIARD Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Digestive
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Florian CLATOT	CB	Cancérologie – Radiothérapie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale

Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET (<i>disponibilité</i>)	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Franck DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mme Julie GUEUDRY	HCN	Ophthalmologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Florian GUISIER	HCN	Pneumologie
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE (<i>disponibilité</i>)	HCN	Epidémiologie

Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>détachement</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Réanimation médicale
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Sébastien THUREAU	CB	Radiothérapie
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HCN	Rhumatologie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Elodie ALESSANDRI-GRADT	HCN	Virologie
Mr Kévin ALEXANDRE	HCN	Maladies Infectieuses et Tropicales
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mr Damien COSTA	HCN	Parasitologie
Mr Pierre DECAZES	CB	Médecine Nucléaire
Mr Maxime FONTANILLES	GHH	Oncologie Médicale
M. Vianney GILARD (<i>disponibilité</i>)	HCN	Neurochirurgie
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Sébastien MIRANDA	HCN	Médecine Vasculaire
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
M. Abdellah TEBANI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Noémie MARIE	UFR	Communication
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais
Mme Cécile POTTIER-LE GUELLEC	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy **BELLIEN** (PU-PH) Pharmacologie
Mr Thierry **BESSON** Chimie Thérapeutique
Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite) Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS** Biochimie
Mr Abdelhakim **EL OMRI** Pharmacognosie
Mr François **ESTOUR** Chimie Organique
Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH) Parasitologie Mr Jean Pierre **GOULLE** (Professeur émérite) Toxicologie
Mme Christelle **MONTEIL** Toxicologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH) Microbiologie
Mme Malika **SKIBA** Pharmacie galénique
Mr Rémi **VARIN** (PU-PH) Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie **VAUGEIS** Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE** Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Margueritta **AL ZALLOUHA** Toxicologie
Mme Cécile **BARBOT** Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric **BOUNOURE** Pharmacie Galénique
Mr Thomas **CASTANHEIRO MATIAS** Chimie Organique
Mr Abdeslam **CHAGRAOUI** Physiologie Mme Camille **CHARBONNIER (LE CLEZIO)** (MCU-PH) Statistiques Mme Elizabeth **CHOSSON** Botanique
Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB** Législation pharmaceutique et économie de la santé Mme Cécile **CORBIERE** Biochimie
Mme Sandrine **DAHYOT** (MCU-PH) Bactériologie
Mme Isabelle **DUBUC** Pharmacologie
Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH) Parasitologie
Mme Nejla **EL GHARBI-HAMZA** Chimie analytique
Mr Chervin **HASSEL** Virologie
Mme Maryline **LECOINTRE** Physiologie

Mme Hong **LU** Biologie
Mme Marine **MALLETER** Biologie Cellulaire
M. Jérémie **MARTINET** (MCU-PH) Immunologie
M. Romy **RAZAKANDRAINIBÉ** Parasitologie
Mme Tiphaine **ROGEZ-FLORENT** Chimie analytique
Mr Mohamed **SKIBA** Pharmacie galénique

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Caroline **BERTOUX** Pharmacie officinale
Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ** Pharmacie officinale
M. Damien **SALAUZE** Pharmacie industrielle

PAU-PH

M. Pierre **BOHN** Radiopharmacie
M. Mikaël **DAOUPHARS** Pharmacie

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN** Anglais

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

M. Eric **BARAT** Pharmacie
M. Paul **BILLOIR** Hématologie
Mme Marine **CAVELIER** Pharmacologie
M. Thomas **DUFLOT** Pharmacologie
M. Guillaume **FEUGRAY** Biochimie Générale
M. Henri **GONDÉ** Pharmacie
M. Romain **LEGUILLON** Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Valentin **PLATEL** Pharmacologie
M. Nicolas **VAUTRIN** Bactériologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT

M. Abdelmounaim **MOUHAJIR** Informatique Bio-informatique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT** Chimie Générale et minérale

Mr Thierry **BESSON** Chimie thérapeutique

Mr Abdeslam **CHAGRAOUI** Physiologie

Mme Elisabeth **CHOSSON** Botanique

Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB** Législation et économie de la santé
Mme Isabelle **DUBUS** Biochimie

Mr Abdelhakim **EL OMRI** Pharmacognosie

Mr François **ESTOUR** Chimie organique

Mr Loïc **FAVENNEC** Parasitologie

Mme Christelle **MONTEIL** Toxicologie

Mme Martine **PESTEL-CARON** Microbiologie

Mr Mohamed **SKIBA** Pharmacie galénique

Mr Rémi **VARIN** Pharmacie clinique

M. Jean-Marie **VAUGEUIS** Pharmacologie

Mr Philippe **VERITE** Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

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

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Pascal BOULET	UFR	Médecine générale
Mr Emmanuel HAZARD	UFR	Médecine Générale
Mr Emmanuel LEFEBVRE	UFR	Médecine Générale
Mme Elisabeth MAUVIARD	UFR	Médecine générale
Mme Lucille PELLERIN	UFR	Médecine Générale
Mme Yveline SEVRIN	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Julien BOUDIER	UFR	Médecine Générale
Mme Laëtitia BOURDON	UFR	Médecine Générale
Mme Elsa FAGOT-GRIFFIN	UFR	Médecine Générale
Mme Ségolène GUILLEMETTE	UFR	Médecine Générale
Mr Frédéric RENOU	UFR	Médecine Générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul **MULDER** (phar) Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med) Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mr Jonathan **BRETON** (med) Nutrition

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079) Mme Carine **CLEREN** (med)
Neurosciences (Néovasc)

M. Sylvain **FRAINEAU** (med) Physiologie (Inserm U 1096)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (med) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mme Rachel **LETELLIER** (med) Physiologie

Mr Antoine **OVRARD-PASCAUD** (med) Physiologie (Unité Inserm 1076) Mr Frédéric **PASQUET** Sciences du langage, orthophonie

Mme Anne-Sophie **PEZZINO** Orthophonie

Mme Christine **RONDANINO** (med) Physiologie de la reproduction

Mr Youssan Var **TAN** Immunologie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med) Biochimie (UMR 1079)

DIRECTEUR ADMINISTRATIF : M. Jean-Sébastien **VALET**

*HCN - Hôpital Charles Nicolle
CB - Centre Henri Becquerel
SJ - Saint Julien Rouen*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME
CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

Table des matières

INTRODUCTION	1
BIBLIOGRAPHIE	2
1. FORMATION ET COMPOSITION DE L'URINE CHEZ L'HOMME.....	2
1.1. <i>L'appareil urinaire : siège de la formation et de l'excrétion de l'urine</i>	2
1.2. <i>Composition de l'urine</i>	6
2. METHODES D'ANALYSE DES URINES AU LABORATOIRE.....	12
2.1. <i>Echantillonnage urinaire</i>	12
2.2. <i>La bandelette urinaire</i>	12
2.3. <i>La cytologie urinaire</i>	15
3. L'HEMATURIE MICROSCOPIQUE.....	22
3.1. <i>Définition et terminologies</i>	22
3.2. <i>Prévalence de l'hématurie microscopique</i>	22
3.3. <i>Principales causes d'hématurie microscopique</i>	23
3.4. <i>Point sur les recommandations de prise en charge d'une HMA</i>	24
3.5. <i>Intervalles de référence d'hématies dans les urines</i>	25
3.6. <i>Apport de la morphologie érythrocytaire dans la détermination de l'origine d'une hématurie</i>	27
OBJECTIFS DE L'ETUDE	30
MATERIELS & METHODES	31
1. DEFINITIONS ET TERMINOLOGIES.....	31
2. MATERIELS.....	31
3. METHODES.....	32
3.1. <i>Analyse urinaire</i>	32
3.2. <i>Détermination d'un intervalle de référence</i>	34
3.3. <i>Autres analyses statistiques</i>	35
RESULTATS	36
1. DETERMINATION D'UN INTERVALLE DE REFERENCE.....	36
1.1. <i>Sélection des valeurs de référence</i>	36
1.2. <i>Caractéristiques des sujets de référence</i>	38
1.3. <i>Conditions pré-analytiques des échantillons urinaires</i>	39
1.4. <i>Distribution des éléments urinaires</i>	39
1.5. <i>Mise en évidence et élimination des valeurs aberrantes « outliers »</i>	43
1.6. <i>Détermination des intervalles de référence</i>	44
2. EVALUATION DE L'INTERVALLE DE REFERENCE.....	45
3. EVALUATION DES PARAMETRES DE MORPHOLOGIE ERYTHROCYTAIRE.....	46
DISCUSSION	48
CONCLUSION	54
REFERENCES	55
ANNEXES	61
SERMENT DE GALIEN	64

Table des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION ANATOMIQUE DE L'APPAREIL URINAIRE CHEZ L'HOMME.....	2
FIGURE 2 : STRUCTURE GLOMERULAIRE RENALE	3
FIGURE 3 : FORMATION DE L'URINE PAR FILTRATION, REABSORPTION ET SECRETION	4
FIGURE 4 : REPARTITION DES COMPOSES DITS « MAJEURS » DANS L'URINE.....	6
FIGURE 5 : CELLULES DU TRACTUS URINAIRE VISUALISEES PAR MICROSCOPIE OPTIQUE (x100)	9
FIGURE 6 : ASPECT MICROSCOPIQUE ET SCHEMATIQUE DE CRISTAUX DANS L'URINE	10
FIGURE 7 : OBSERVATION D'UN CYLINDRE HYALIN AU MICROSCOPE OPTIQUE (x100).....	11
FIGURE 8 : PRINCIPE DE MESURE PAR REFLECTANCE PAR L'UC-1000 (SYSMEX, FRANCE)	13
FIGURE 9 : GRILLE DE COMPTAGE EN MICROSCOPIE OPTIQUE D'HEMATIES DANS LES URINES.....	15
FIGURE 10 : PRINCIPE DE NUMERATION CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE SUR L'UF-4000	17
FIGURE 11 : ANALYSE DES SIGNAUX PERMETTANT LE CLASSEMENT DES PARTICULES PAR L'UF-4000. ...	19
FIGURE 12 : SCATTERGRAMS DE DIFFERENTES POPULATIONS DU PARAMETRE « RBC- INFO »	21
FIGURE 13 : PRINCIPALES CAUSES D'HEMATURIE MICROSCOPIQUE	23
FIGURE 14 : IMAGES ET SCHEMA D'HEMATIES DYSMORPHIQUES	28
FIGURE 15 : DIAGRAMME DE L'ETUDE	37
FIGURE 16 : DISTRIBUTION DES VALEURS/ μ L D'HEMATIES, DE CYLINDRES ET DE CELLULES EPITHELIALES PAR FREQUENCE ET SELON LE SEXE	41
FIGURE 17 : DIAGRAMMES EN VIOLON DES VALEURS DE REFERENCE (N/ μ L) DES HEMATIES, DES CELLULES EPITHELIALES (CE) ET DES CYLINDRES (CYL).	42

Table des tableaux

TABEAU 1 : DEFINITION D'HM ET CRITERES MOTIVANT UNE EXPLORATION COMPLEMENTAIRE ET DE SUIVI DES PATIENTS SELON LES PAYS	25
TABEAU 2 : CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES DES SUJETS DE REFERENCE ET SERVICES DE PROVENANCE DES ECHANTILLONS EN FONCTION DE L'AGE	38
TABEAU 3 : DELAI D'ANALYSE DES ECHANTILLONS URINAIRES DU GROUPE DE REFERENCE PAR RAPPORT A L'HEURE DE PRELEVEMENT	39
TABEAU 4 : FREQUENCE DE DISTRIBUTION DES HEMATIES DANS L'URINE DANS NOTRE GROUPE DE REFERENCE	40
TABEAU 5 : MOYENNES OBSERVEES A PARTIR DES ECHANTILLONS DE REFERENCE DES HEMATIES (GR) ET DES CELLULES EPITHELIALES (CE)	43
TABEAU 6 : ESTIMATION DES INTERVALLES DE REFERENCE ET DES INTERVALLES DE CONFIANCE DES HEMATIES/μL DANS L'URINE DANS NOTRE GROUPE D'ECHANTILLONS DE REFERENCE ET PAR SOUS- GROUPE EN FONCTION DU SEXE	44
TABEAU 7 : TABLEAUX DE CONTINGENCE ENTRE LA PRESENCE OU NON D'UNE PROTEINURIE SELON DEUX SEUILS D'HEMATURIE : 10 ET 20 HEMATIES /μL	45
TABEAU 8 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES HEMATIES DANS LES ECHANTILLONS PRESENTANT UNE HEMATURIE SUPERIEURE A 20 HEMATIES /μL	47

Liste des abréviations

A/C : ratio Albuminurie sur Créatininurie

AUA : *American Urological Association*

BFG : Barrière de Filtration Glomérulaire

BU : Bandelette Urinaire

CE : Cellules Epithéliales

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMF : Cytométrie en Flux

CR : *Core Channel*

DSS : *Depolarized Side Scatter Light*

ET : Ecart-Type

FSC : *Forward Scatter*

GR : Globule Rouge

HM : Hématurie Microscopique

HMA : Hématurie Microscopique Asymptomatique

HPF : *High Powered Field*

IC : Intervalle de Confiance

P/C : ratio Protéinurie sur Créatininurie

PRO : Protéine

SF : Surface Channel

SFL : *Side Fluorescence Light*

TCP : Tube Contourné Proximal

TU : Tractus Urinaire

UP : Urine Primitive

URD : *Urinary Red blood cell Distribution*

INTRODUCTION

Sous le terme « d'uroscopie », l'examen de l'urine était considéré par les médecins de l'antiquité comme un reflet du fonctionnement interne du corps et témoin de différentes maladies (1). Par exemple, Hippocrate (460-355 av. J.-C.) dans ses « Aphorismes », décrit des bulles à la surface de l'urine fraîche comme un signe de maladie rénale de longue durée. Plus tard, Theophilus Protospatharius, un médecin du septième siècle qui a écrit le premier manuscrit consacré exclusivement à l'urine « *De Urinis* », a déterminé que le chauffage de l'urine précipitait les protéines, documentant ainsi la protéinurie comme un état pathologique. Ces exemples montrent que l'analyse d'urine a été un des premiers tests mis au point dans l'histoire de la médecine, qu'elle a été utilisée il y a plusieurs milliers d'années et à ce jour continue d'être un outil en médecine humaine.

Chez l'Homme, l'urine excrétée apporte un ensemble d'informations biologiques qui aident dans la compréhension de l'état physiologique ou pathologique d'un individu. L'acquisition de ces informations se voit de plus en plus évoluer dans les différents aspects de l'analyse urinaire. Par exemple, la numération des éléments dans l'urine qui jusqu'alors était effectuée par microscopie optique a évolué grâce à l'application de nouvelles méthodes de mesure comme la cytométrie en flux (CMF). En effet, ces techniques quantitatives automatisées ont amélioré la précision et l'exactitude du comptage des éléments urinaires par rapport à la microscopie optique et permettent une cadence de passage élevée (2,3). L'avènement de ces méthodes crée donc un besoin de revoir les intervalles de référence physiologiques qui jusqu'ici ont été définis à l'aide de la microscopie optique. Ce travail s'inscrit donc dans l'optique de définir des intervalles de référence, en particulier des hématies lors d'une analyse urinaire par méthode de cytométrie en flux à l'aide de l'automate UF-4000 (Sysmex, Japon).

BIBLIOGRAPHIE

1. Formation et composition de l'urine chez l'Homme

1.1. L'appareil urinaire : siège de la formation et de l'excrétion de l'urine

L'arbre urinaire est constitué de quatre composants anatomiques essentiels (4,5) (Figure 1) : deux reins situés au niveau du rétro-péritoine qui sécrètent l'urine, deux uretères qui conduisent l'urine des reins vers la vessie et un urètre qui permet l'excrétion de ce fluide biologique en dehors du corps.

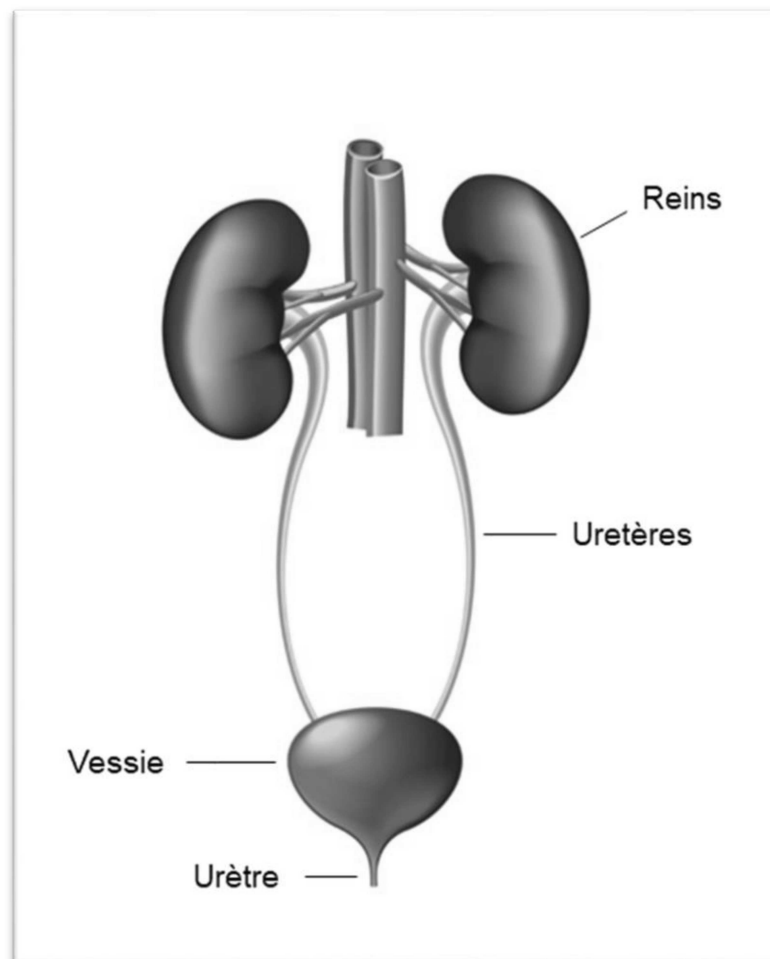


Figure 1 : Représentation anatomique de l'appareil urinaire chez l'Homme

(Image issue de anatomiehumaine.net)

1.1.1. Échanges au niveau glomérulaire

Le siège de la formation de l'urine sont les reins au niveau d'unités fonctionnelles appelées « néphrons », eux-mêmes constitués de deux grandes parties, le glomérule et le système tubulaire (Figure 2). La vascularisation du glomérule se fait par un « peloton vasculaire » qui forme un système porte d'artérioles afférentes et efférentes permettant la filtration du sang (6). A l'interface entre le capillaire glomérulaire et la chambre urinaire, la barrière de filtration glomérulaire (BFG) est la structure au travers de laquelle le plasma est filtré pour former un premier fluide appelé « urine primitive » (UP). Cette barrière est constituée de cellules endothéliales glomérulaires, d'une membrane basale glomérulaire et de cellules épithéliales viscérales. L'ensemble des éléments histologiques formant la BFG permet de former un maillage disposant d'une sélectivité à la fois de taille et de charge vis-à-vis des substances plasmatiques (7).

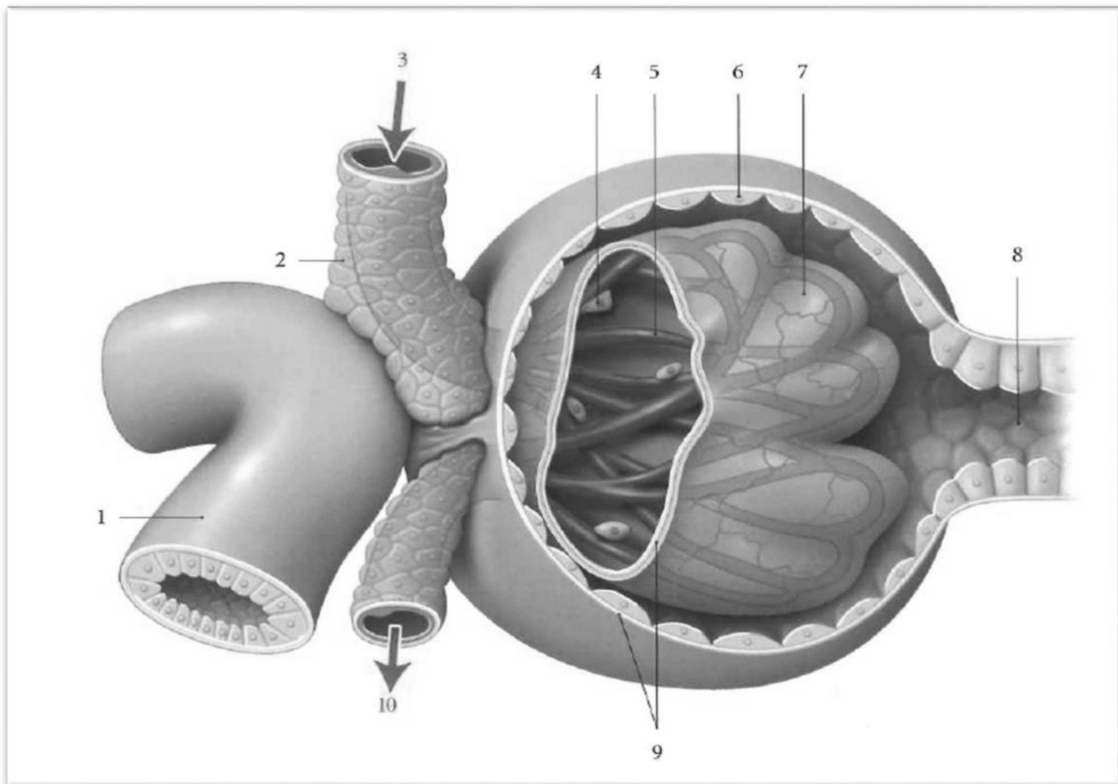


Figure 2 : Structure glomérulaire rénale (Schéma issu de KAMINA 2ème édition, 2009)

1. Tubule contourné distal ; 2. Cellules juxta-glomérulaires ; 3. Artériole afférente ; 4. Cellules mésangiales ; 5. Réseau capillaire glomérulaire ; 6. Capsule du glomérule ; 7. Podocyte ; 8. Tubule proximal ; 9. Membrane basale ; 10. Artériole efférente

La formation de l'UP fait intervenir deux principes physico-chimiques découlant des descriptions anatomiques et histologiques précédentes qui sont l'ultrafiltration (ou convection) et la diffusion (Figure 3). La convection est le phénomène majoritaire de la filtration glomérulaire. Ce mécanisme va concerner essentiellement les molécules de petite taille et les électrolytes (8). Les facteurs influençant la filtration glomérulaire sont : les différences de pressions hydrostatique et oncotique entre le capillaire et la chambre urinaire, le débit sanguin glomérulaire, la perméabilité et la surface glomérulaire ainsi que le tonus des artérioles afférentes et efférentes (6,8). À l'état physiologique, l'eau, les électrolytes ainsi que les molécules dissoutes de petite taille passent librement la BFG avec un rapport de concentration entre le plasma et l'UP proche de 1 (8), les plus grosses molécules passant en fonction de leur taille et de leur charge électrique. La BFG est imperméable aux éléments figurés du sang (hématies, leucocytes, etc...), aux macromolécules, aux lipides et aux protéines plasmatiques excédant une masse moléculaire d'environ 68 KDa (4,7).

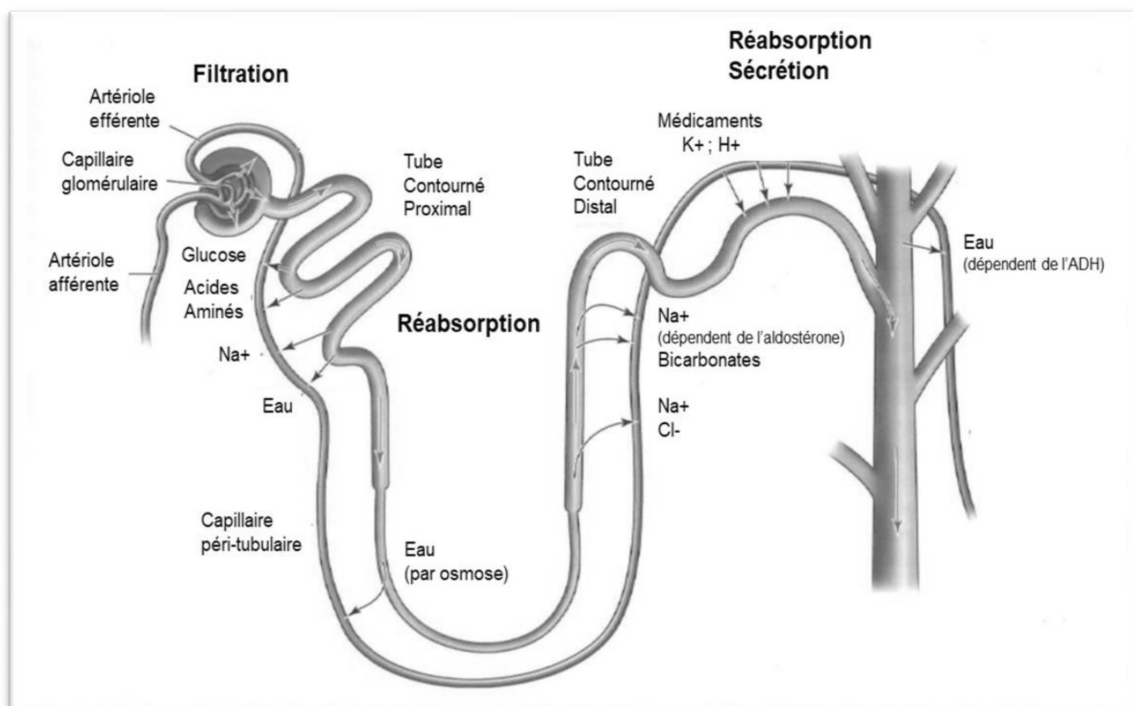


Figure 3 : Formation de l'urine par filtration, réabsorption et sécrétion

(Schéma issu de *The Massage Connection Anatomy and physiology: Lippincott Williams&Wilkins, 2004*)

1.1.2. Échanges au niveau tubulaire

L'UP va cheminer le long du système tubulaire pour subir une série de mécanismes complexes de réabsorption et de sécrétion tubulaire qui aboutiront à la formation de l'urine excrétée dans les calices. Le tube contourné proximal (TCP) est le siège de la plupart des réabsorptions notamment d'eau, d'électrolytes et de non-électrolytes (acides aminés, glucose, etc). La réabsorption tubulaire est assurée par des mécanismes de transport passif ou actif (nécessitant la consommation d'énergie pour déplacer les substances contre un gradient électrochimique). On peut citer le sodium, le potassium, le calcium et le phosphate comme exemples de substances réabsorbées par un mécanisme actif au niveau tubulaire. A l'inverse, l'urée, l'eau et le chlorure sont eux réabsorbés par un mécanisme passif. La sécrétion tubulaire est un phénomène actif qui a lieu tout au long du tubule rénal et va assurer le transport des substances vers la lumière du tubule. Il va concerner par exemple, les ions hydrogène (H⁺), le potassium (K⁺), l'urée ou encore la sécrétion de substances exogènes comme les médicaments (4–6,8).

Chez l'adulte sain, le volume urinaire excrété par jour varie entre 1,2 et 1,5 L (4). De plus, il existe une grande variabilité inter-individuelle physiologique dans le volume urinaire ainsi que dans la capacité de concentration de l'urine (9,10). La formation de l'urine et sa composition sont également sous contrôle hormonal, qui représente un élément majeur de la régulation. Par exemple :

- l'Aldostérone qui a pour rôle de réguler la réabsorption de sodium et donc indirectement la volémie ainsi que l'excrétion de potassium (11)
- l'Arginine-Vasopressine qui régule la réabsorption d'eau au niveau du tube contourné distal et du tube collecteur notamment par augmentation de la perméabilité à l'eau.

1.2. Composition de l'urine

L'urine est un fluide biologique dont la composition varie tout au long de la journée selon les apports alimentaires, lors d'un exercice physique ou encore par la présence de médicaments. Cette variation est aussi dépendante de facteurs inter-individuels comme l'âge, le sexe et l'origine ethnique (12).

1.2.1. Composition physico-chimique et organique de l'urine

a- Electrolytes et composés organiques

La composition de l'urine en fait une matrice biologique complexe. En 2013, Bouatra *et al.* décrivent plus de 2 500 métabolites (sucres, acides aminés, acyl-carnitines, lipides, ...) répertoriés dans une base de données « *The Urine Metabolome Database* », qui constituent le métabolome urinaire de sujets présumés sains (12). Dans l'ensemble, en termes de proportions, les ions potassium, sodium et chlore constituent 85% des solutés présents dans l'urine. Parmi les autres composés, 11 sont dits « majeurs » ($[C] > 1\text{mM}$) et leurs proportions sont exposées dans la figure 4 (13).

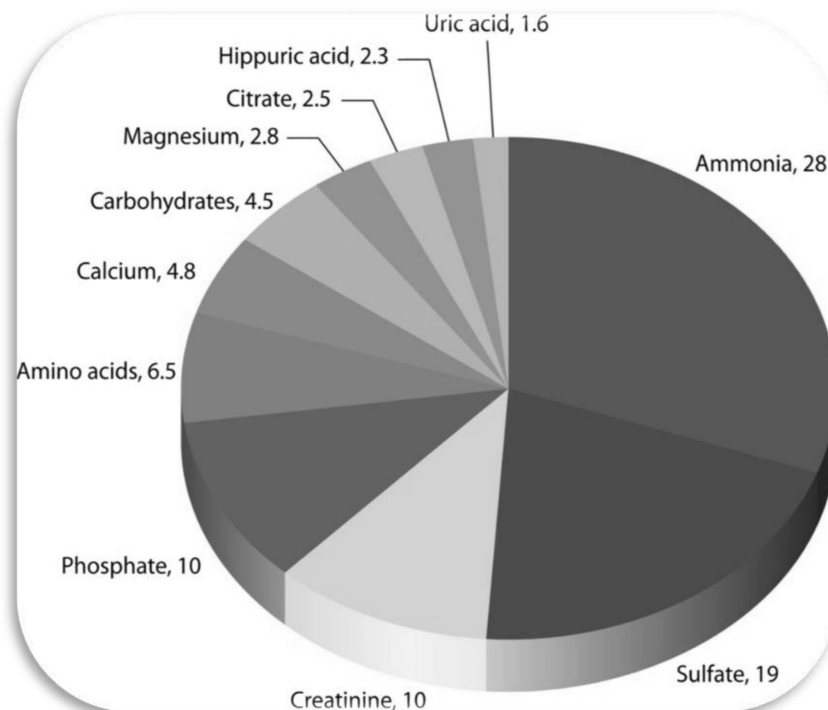


Figure 4 : Répartition des composés dits « majeurs » dans l'urine

(Image issue de Reitzer *et al.* 2020). Les valeurs des composés sont exprimées en mM.

Concernant les protéines retrouvées dans les urines à l'état physiologique, leur excrétion n'excède pas un seuil de 150 mg/dL. Ces protéines sont de faible poids moléculaire et représentent majoritairement la protéine de Tamm-Horsfall (14). Une protéinurie est alors définie par une excrétion supérieure ou égale à 150 mg/dL et dans les cas les plus fréquents signe une dysfonction rénale (15). Ce phénomène est induit par différents mécanismes :

- une altération de la BFG
- une altération tubulaire résultant en l'excrétion importante de protéines de faible poids moléculaire
- une filtration des protéines plasmatiques en raison d'une concentration plasmatique trop élevée.

Dans le cas le plus fréquent, la protéine prédominante lors d'une protéinurie est l'albumine (15). D'autres protéines peuvent être retrouvées dans les urines et sont utilisées comme biomarqueurs urinaires d'une pathologie tubulaire. Il s'agit de la « *retinol binding protein* », l' α -1-microglobuline, la β -2-microglobuline ainsi que les chaînes légères libres des immunoglobulines (16). Par ailleurs, en plus d'être un biomarqueur de dysfonction rénale, il est à noter que le degré de la protéinurie après une transplantation rénale est un facteur prédictif de la survie du greffon et du patient (17).

Concernant la présence d'albumine dans l'urine en conditions physiologiques, son excrétion n'excède pas les 10 mg/j et le ratio Albuminurie/Créatininurie (A/C), lui, est inférieur à 29 mg/g de créatinine. Il est à noter que cette valeur peut être impactée par des conditions telles que l'exercice physique, la fièvre ou encore l'infection urinaire (16). L'albuminurie est définie par l'augmentation du ratio A/C au-delà de 30mg/g de créatinine (18). On distingue selon ce ratio plusieurs niveaux :

- la micro-albuminurie avec A/C compris entre 30-300 mg/g de créatinine
- la macro-albuminurie avec A/C supérieur à 300 mg/g de créatinine

L'albuminurie est un des biomarqueurs urinaires les plus utiles dans la maladie rénale chronique (19).

Un marqueur biologique est une observation biologique qui prédit un critère d'évaluation cliniquement pertinent (20). Plusieurs biomarqueurs urinaires ont été développés au fil des années qui signeraient une dysfonction rénale parfois même précédant l'atteinte fonctionnelle. Globalement, l'albuminurie et plus largement, la protéinurie, restent des marqueurs urinaires « conventionnels » robustes dans le dépistage, le diagnostic et le suivi de la maladie rénale (15,21).

b- pH urinaire

La régulation du pH par le rein constitue un système tampon essentiel dans le maintien d'un pH sanguin physiologique. Cette régulation passe par la réabsorption des bicarbonates filtrés au niveau du TCP et l'excrétion de la charge acide (4,8). Le rein est capable d'élaborer une urine avec une large gamme de variations de pH lorsqu'il est sollicité, allant d'un pH de 5 à 8 ($[H^+]$ de 10 nM à 10 μ M) (22). Les variations du pH chez un sujet, en plus d'être rythmées par un cycle circadien, dépendent de plusieurs facteurs, notamment alimentaires et hormonaux (23). Des variations chroniques du pH urinaire ont été rapportées dans la littérature avec un impact sur la formation de cristaux d'acide urique ou encore comme facteurs de risque de cancer de la vessie (24,25).

1.2.2. Composition cellulaire de l'urine

Plusieurs types cellulaires peuvent être retrouvés dans l'urine. Dans la majorité des cas, ils proviennent du tractus urinaire (TU) ou d'une contamination proximale vaginale (4).

a- Erythrocytes et leucocytes

Si la BFP est imperméable aux éléments figurés du sang, il est néanmoins possible d'observer la présence de leucocytes et d'hématies dans les urines. A l'état physiologique, 1 à 2 hématies/HPF (HPF : *High Powered Field* = champ à fort grossissement x100) et moins de 2 leucocytes/HPF peuvent être retrouvés dans l'urine (4).

b- Cellules épithéliales du tractus urinaire

Plusieurs cellules provenant du tractus urinaire peuvent être visualisées dans un sédiment urinaire. La figure 5 montre un exemple de cellules retrouvées dans l'urine. La présence de cellules épithéliales (CE) à l'état physiologique serait le reflet de la desquamation et du renouvellement de l'épithélium du TU (4,26). Pour exemple on peut citer :

- les cellules épithéliales rénales tubulaires
- les cellules épithéliales transitionnelles ou cellules urothéliales, qui sont des cellules tapissant le bassinet, les uretères et la vessie.

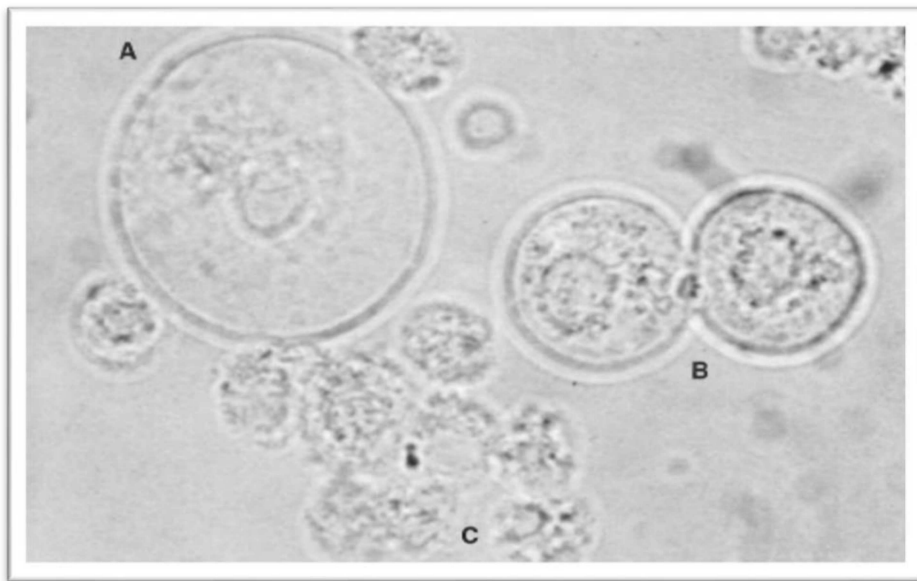


Figure 5 : Cellules du tractus urinaire visualisées par microscopie optique (x100)

(Image issue de : textbook of urinalysis and body fluids. Burlington, 2020)

A. Cellules épithéliales transitionnelles ; **B.** Cellules épithéliales rénales tubulaires ; **C.** Leucocytes

La modification qualitative et l'augmentation quantitative des cellules épithéliales signent un état pathologique (inflammation, pathologie infectieuse ou tumorale). Néanmoins il est difficile de distinguer tous les types cellulaires à l'aide de la microscopie optique. De plus, la sensibilité de cette méthode est mise à défaut lors de pathologie tumorale de bas grade (26).

1.2.3. Autres éléments figurés urinaires

D'autres types d'éléments peuvent être retrouvés dans les urines :

- les cristaux qui se forment lorsque l'urine se retrouve saturée en composés cristallisants. Plusieurs types de cristaux urinaires comme les cristaux d'urates amorphes ou encore les cristaux de sulfate de calcium n'ont que peu d'intérêt clinique. Néanmoins, d'autres types de cristaux, comme ceux de cystine, tyrosine et leucine peuvent se former dans le tractus urinaire signant un état pathologique (pathologie métabolique, calculs urinaires, intoxication médicamenteuse, ...). Par exemple, l'observation de cristaux de cystine, qui ont une forme hexagonale, signe une pathologie en rapport avec l'augmentation de cystine dans les urines comme dans la cystinurie congénitale (Figure 6). Ces différents types de cristaux peuvent être identifiés par leur apparence à la microscopie optique ainsi que par leurs propriétés de solubilité (4). La figure 6 montre un exemple de l'aspect microscopique et schématique de certains cristaux.

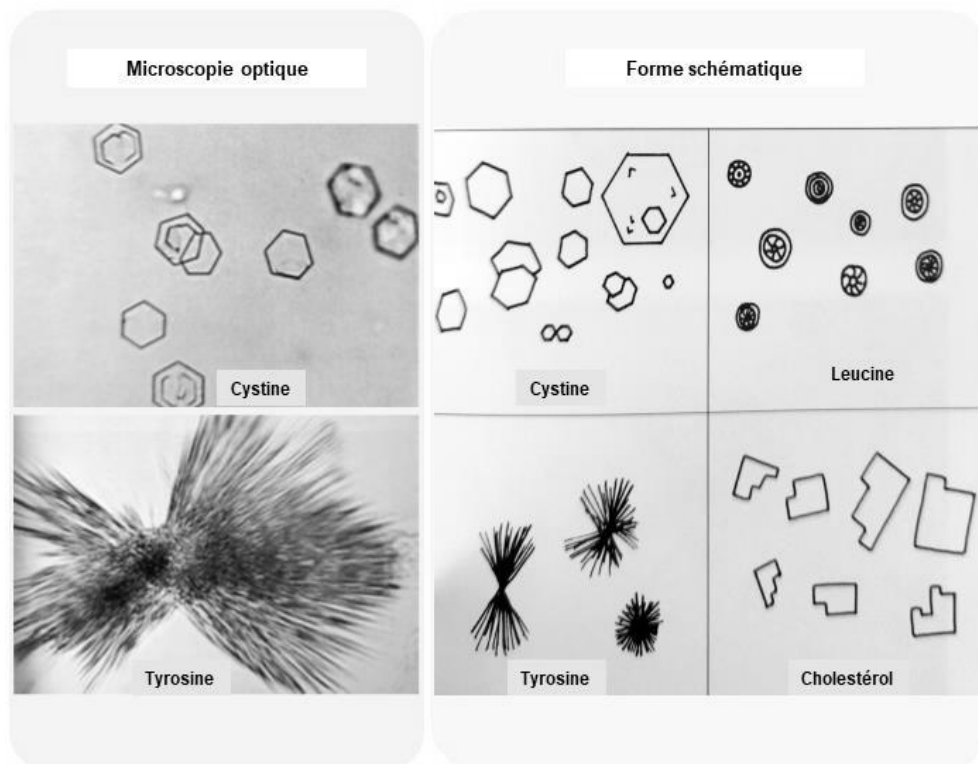


Figure 6 : Aspect microscopique et schématique de cristaux dans l'urine

(Schéma à partir de *textbook of urinalysis and body fluids*. Burlington, 2020)

- les cylindres ou « *Casts cells* » sont des éléments cylindriques élancés avec deux parois plus ou moins parallèles. L'observation morphologique des cylindres et la description de leur contenu peuvent révéler des pathologies rénales ou des modifications physiopathologiques. Ces cylindres se forment à partir de la précipitation d'une mucoprotéine présente dans les urines, la protéine de Tamm-Horsfall (4). Les cylindres dits « hyalins » sont incolores, transparents et dont la matrice contient moins de 3 éléments cellulaires. *A contrario*, les cylindres non hyalins sont constitués de plus de 3 éléments cellulaires. Le cylindre prend alors le nom de l'élément cellulaire l'entourant, comme un cylindre hématique (hématies) ou encore un cylindre granuleux (leucocytes). Un exemple de cylindre hyalin est présenté dans la figure 7.

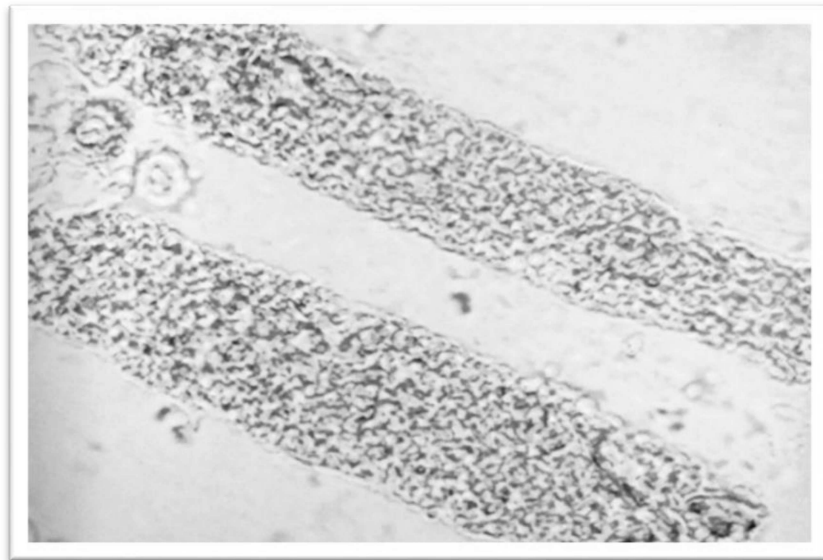


Figure 7 : Observation d'un cylindre hyalin au microscope optique (x100)

(Image issue de textbook of urinalysis and body fluids. Burlington, 2020)

2. Méthodes d'analyse des urines au laboratoire

2.1. Echantillonnage urinaire

Différents types d'échantillons urinaires peuvent être recueillis et conditionnent l'interprétation de l'analyse urinaire. On peut classer un échantillon urinaire selon son mode de prélèvement et par le moment de son recueil. Le choix d'une méthode de recueil va être conditionné par l'hypothèse diagnostique. Le recueil du milieu de jet urinaire est la méthode non invasive la plus fréquemment utilisée par les laboratoires de biologie médicale. Ce type d'échantillon est essentiellement utilisé dans l'examen cytobactériologique des urines, dans la réalisation de bandelette urinaire (BU) et pour différents autres tests biochimiques de routine. D'autres analyses urinaires nécessitent un échantillonnage d'urine différent. Par exemple, l'évaluation de certains biomarqueurs urinaires comme la protéinurie et l'albuminurie nécessite un recueil sur 24h (27). Néanmoins, il est important de souligner que devant les inconvénients d'un recueil urinaire sur 24h, ces paramètres se voient de plus en plus remplacés par des ratios : protéinurie/créatininurie (P/C), Albuminurie/Créatininurie (A/C). En effet, ces ratios présentent l'avantage de pouvoir être réalisés à partir d'urine ponctuelle (21,28,29).

2.2. La bandelette urinaire

La bandelette urinaire (BU) est une des premières étapes de l'analyse urinaire après la visualisation de l'aspect macroscopique de l'urine (30). C'est une bande qui dispose de plusieurs zones réactives permettant de rechercher d'une manière qualitative ou semi-quantitative des biomarqueurs urinaires. Un changement de couleur survient en présence d'un substrat présent dans l'urine. Plusieurs bandelettes sont disponibles, elles diffèrent dans le nombre de paramètres évalués et parfois dans leurs performances. Nous présentons les bandelettes MEDITAPE UC-12S (BU 12S) et UC-10S (BU 10S) (Sysmex, Japon) qui seront utilisées dans notre étude. Il est à noter qu'à la différence de l'UC-12S, la bandelette urinaire UC-10S n'inclut pas la détection de l'albumine et de la créatinine.

La BU 12S permet d'évaluer un total de 12 paramètres incluant, la créatinine, l'albumine, les leucocytes, l'urobilinogène, le sang, la bilirubine totale, les cétones, le glucose, les protéines (PRO), les nitrites, le pH et la gravité spécifique. De plus, ces mesures permettent de déduire d'une façon semi quantitative les ratios A/C et P/C. Les principales interférences notables issues de l'étude interne du constructeur pouvant influencer sur le résultat sont présentées dans l'annexe 1. Concernant ces interférences, les médicaments sont souvent la cause de faux positifs. Les psychotropes par exemple, peuvent positiver des paramètres tels que l'urobilinogène, la bilirubine ou encore le glucose. Au contraire, la présence d'acide ascorbique est souvent incriminée comme risque de faux négatif pour la détection du glucose, de la bilirubine ou encore d'une hématurie. Pour l'albuminurie et la protéinurie, les pH extrêmes ainsi que la variation de la gravité spécifique peuvent induire un risque de résultat faussement négatif ou positif.

La lecture de la BU peut se faire de manière visuelle ou à l'aide d'un automate de mesure, par exemple, l'automate UC- 1000 (Sysmex, Japon). La mesure repose sur le principe de la réflectance. Plus précisément, une caméra mesure la quantité de lumière réfléchie par chaque cible de la bandelette lorsqu'elle est exposée à une lumière incidente. La quantité de lumière réfléchie est dépendante de la variation de couleur de la cible et de son intensité (Figure 8).

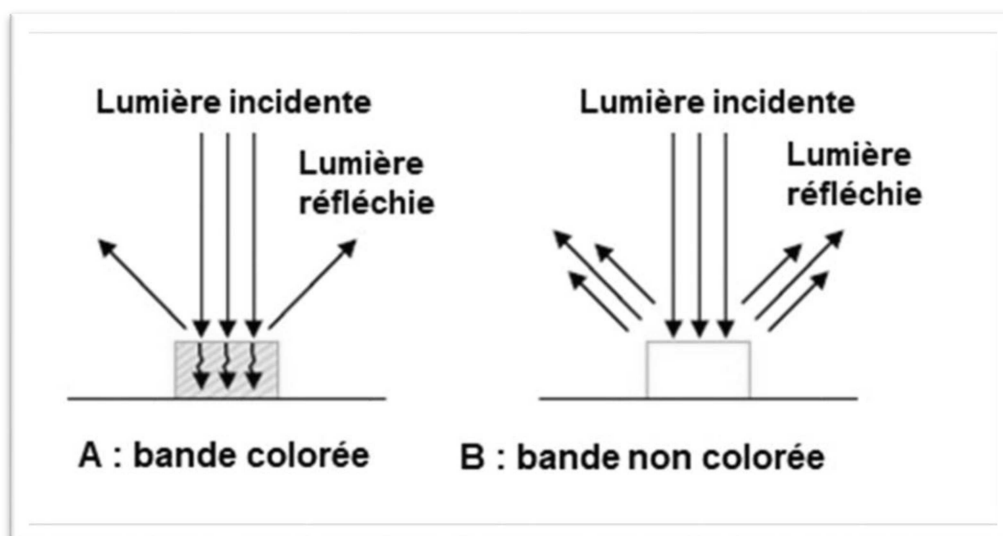


Figure 8 : Principe de mesure par réflectance par l'UC-1000 (Sysmex, France)

Les performances des bandelettes fournies par le constructeur sont les suivantes. Le taux de corrélation des paramètres évalués par la bandelette comparativement aux méthodes de référence de mesure de chaque biomarqueur est excellent pour l'ensemble des paramètres évalués. Pour l'albuminurie, la protéinurie et la créatininurie les taux de concordance sont respectivement de 90,7%, 96,4%, 94,3%. Il est important de souligner que la bandelette urinaire est un test de screening, ce qui signifie que ce test doit avoir une bonne valeur prédictive négative dans la population où elle s'applique et qu'une valeur positive du test ne doit pas porter un diagnostic mais être une porte d'entrée à une exploration clinico-biologique. Dans la littérature, plusieurs études ont évalué les performances de bandelettes urinaires associées à une lecture automatisée (31–33). Globalement, ces études montrent des performances tout à fait satisfaisantes pour l'ensemble des paramètres évalués. Pour la détection de la protéinurie et l'albuminurie, l'étude de Oyaert *et al.* (32) rapporte respectivement une sensibilité/spécificité de 94,2 / 88,2% et de 81,8 / 89,2%. De plus, l'étude de Currin *et al.* (33) a mesuré les performances du rapport A/C de la bandelette UC-12S avec une lecture automatisée par l'UC-1000 comme marqueur de dysfonction rénale, comparé aux techniques usuelles de mesure quantitative. Les auteurs rapportent une sensibilité de 79% et une spécificité de 83,5% ainsi que très peu de faux négatifs (17/700 ; 2%), faisant de ce test un outil de dépistage et de screening performant. Il est par ailleurs intéressant de noter que les auteurs rapportent un taux plus élevé d'hématurie dans le groupe ayant un rapport A/C supérieur à 30 mg/g de créatinine.

En plus des marqueurs de dysfonction rénale, la BU fournit plusieurs autres informations. Des exemples de pathologies pour lesquelles un ou plusieurs paramètres sont détectés positifs par la bandelette urinaire sont listés dans l'annexe 2. Néanmoins, à lui seul, un paramètre détecté nécessite une confirmation par une technique quantitative précise avant d'entreprendre une investigation clinico-biologique.

2.3. La cytologie urinaire

La cytologie urinaire est un examen indispensable dans l'analyse urinaire et qui permet la caractérisation qualitative et quantitative des différents éléments cellulaires. Globalement, deux grandes méthodes sont actuellement disponibles pour la numération et la caractérisation des éléments cellulaires, des cristaux et des cylindres : la méthode par microscopie optique (manuelle ou automatisée) et les méthodes sur automates de CMF.

2.3.1. La cytologie par microscopie optique manuelle

Cette méthode consiste en un compte manuel des éléments présents dans l'urine à l'aide d'un microscope et d'un hématimètre (cellules de Kova, cellules de Malassez, etc.). Elle est de moins en moins utilisée par les laboratoires de biologie médicale car elle consomme beaucoup de temps technique et ne permet pas une grande cadence dans l'analyse des prélèvements. Néanmoins, cette méthode présente l'avantage d'avoir un coût inférieur aux méthodes automatisées et demeure à ce jour le « *Gold Standard* » dans la numération et la caractérisation des éléments dans les urines.

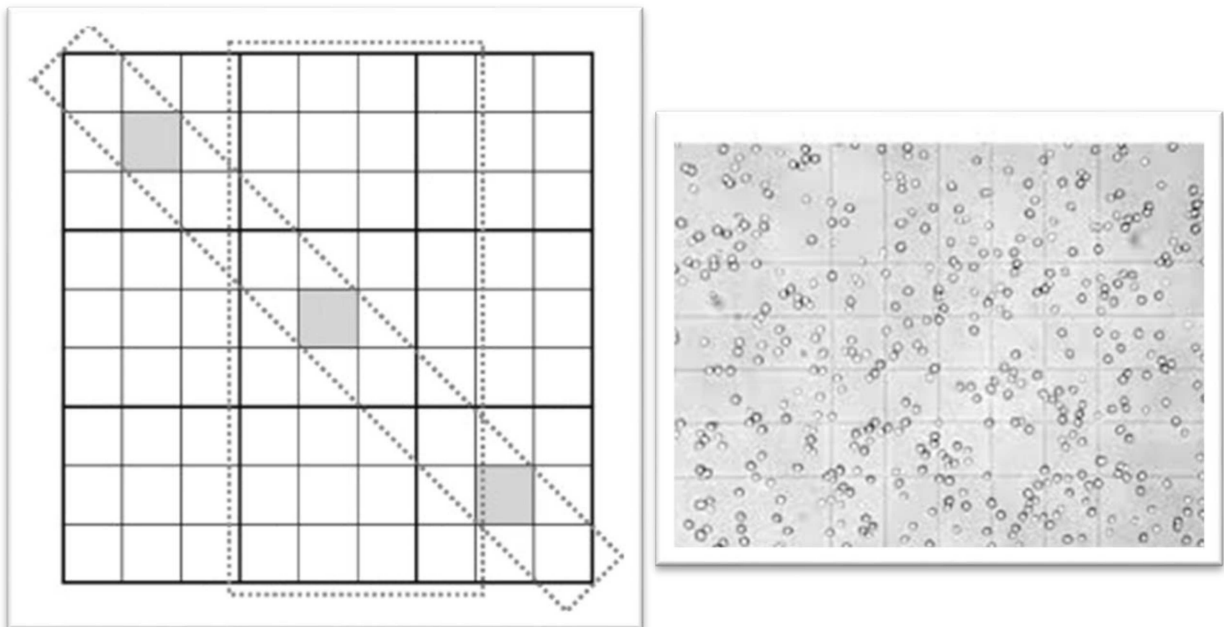


Figure 9 : grille de comptage en microscopie optique d'hématies dans les urines

En pratique cette méthode consiste à :

- Homogénéiser l'échantillon et le diluer si besoin
- Ajouter un colorant pour mieux différencier les types cellulaires. Par exemple, le cristal violet permet la coloration du noyau cellulaire en violet afin de différencier les cellules nucléées des hématies.
- Réaliser une prise d'essai d'un volume défini d'échantillon en fonction de la chambre de comptage utilisée
- Compter les éléments sur la grille selon les modalités de chaque cellule (Figure 9).

En plus d'être chronophage, les différentes étapes de préparation de la cellule de comptage ainsi que la variabilité intra-essai et inter-opérateurs ajoutent à cette méthode le désavantage d'avoir une haute imprécision dans les échantillons de faible cellularité.

2.3.2. La cytologie par automates de cytométrie en flux

La CMF est une méthode d'analyse qui permet de caractériser et compter des cellules (ou particules) en suspension dans un flux liquidien (34). L'UF-4000 (Sysmex, Japon) est un automate de CMF développé pour l'analyse urinaire. Il permet de compter et de caractériser les cellules et certains éléments, comme les cristaux et les cylindres dans un échantillon urinaire.

Le principe de cette méthode repose sur l'exposition à un faisceau lumineux (laser bleu, $\lambda = 488\text{nm}$) de cellules ou d'éléments en suspension dans un flux liquidien. La diffusion du faisceau laser fournit un signal permettant de déduire des informations comme la taille et le contenu cellulaire. Ainsi, la diffusion de la lumière émise dans l'axe de la source lumineuse (*Forward Scatter*, FSC) renseigne sur la taille, et la diffusion de cette lumière à 90° (*Side Scatter*, SSC) renseigne sur la granularité et la structure cellulaire. L'UF-4000 intègre une nouvelle technologie comparée à son prédécesseur l'UF-1000i, permettant de différencier les globules rouges des cristaux et cela par l'ajout d'un filtre polarisé en aval de la source lumineuse. La lumière dépolarisée diffusée à 90° par les cristaux (DSS : *Depolarized Side Scatter Light*) permet de renseigner sur l'intensité de la

biréfringence des particules permettant cette différenciation (Figure 10). De plus, l'ajout de fluorochromes renseigne sur la présence d'acides nucléiques dans la cellule (*Side Fluorescence Light*, SFL) permettant de différencier les cellules nucléées des hématies.

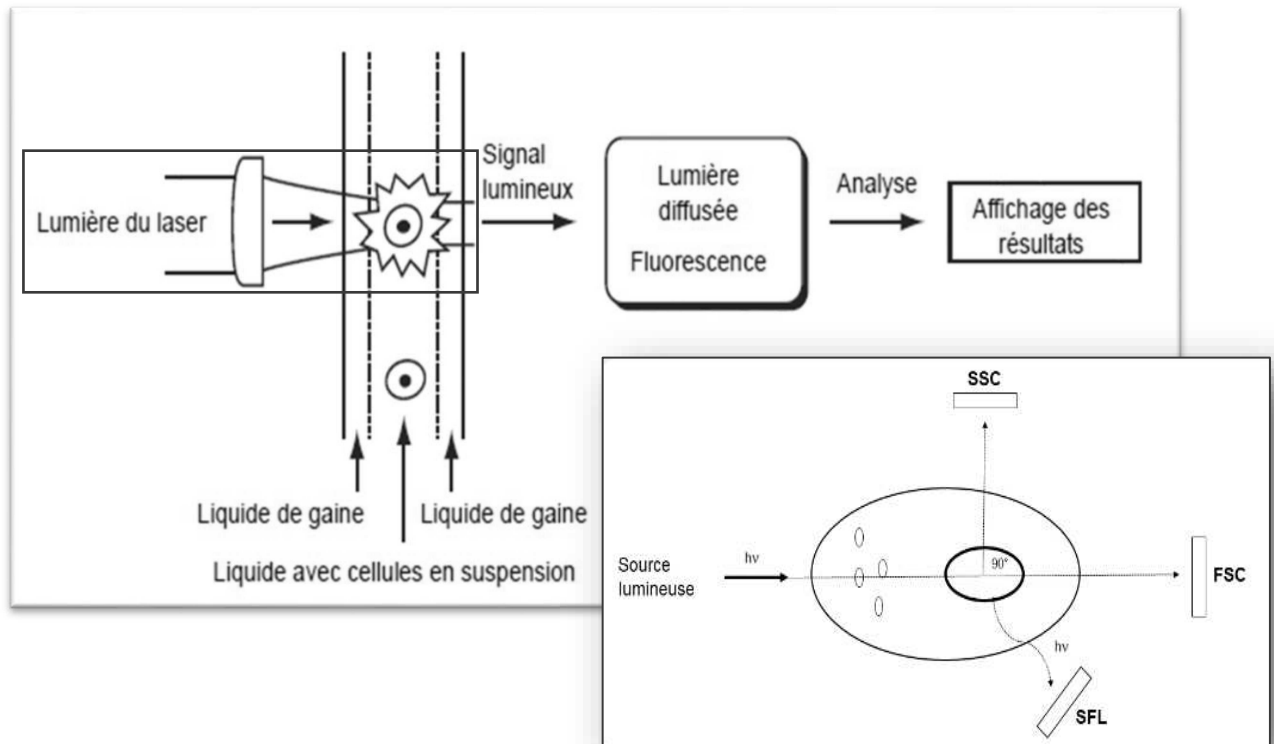


Figure 10 : Principe de numération cellulaire par cytométrie sur l'UF-4000

L'ensemble de ces mesures sont effectuées à l'aide de deux canaux (Figure 11) :

- le canal « *Surface channel, SF* » qui permet la numération de cellules dépourvues d'acides nucléiques telles que les globules rouges (GR) et certains éléments tels que les cristaux.
- le canal « *Core channel, CR* » qui permet la numération de cellules contenant des acides nucléiques comme les globules blancs, les cellules épithéliales ou encore certains microorganismes (bactéries et champignons).

L'analyse urinaire comporte l'aspiration de 450 μ L d'échantillon pour un volume total requis de 2 mL. L'échantillon est ensuite réparti dans les deux canaux d'analyse où

il est dilué au quart. Le diluant va entraîner la perforation des membranes cellulaires afin que le fluorochrome puisse pénétrer dans la cellule et marquer les acides nucléiques. Une étape de chauffage à 38°C précédant l'analyse par CMF est effectué par l'automate. Au total, l'analyse porte sur un volume de 7,8 μL pour les éléments nucléés et pour les GR. Les signaux de lumière diffusée et leur intensité sont captés et traduits. Une fois le signal traduit, les éléments sont répartis en fonction de leur taille et de leur contenu en acides nucléiques générant des scattergrams (Figure 11).

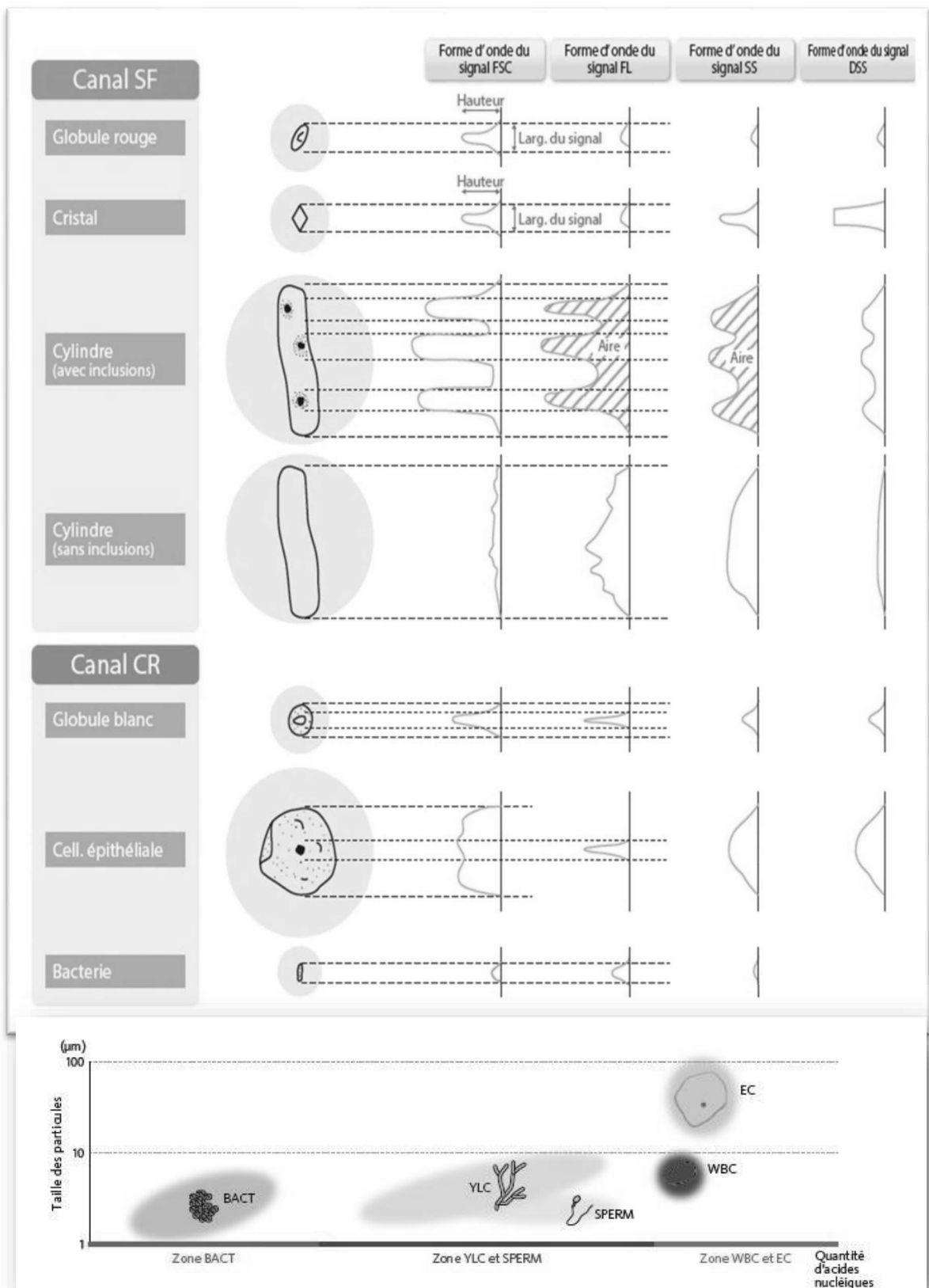


Figure 11 : Analyse des signaux permettant le classement des particules par l'UF-4000

Le débit maximum de passage d'échantillons urinaires est de 80 urines/h. Les limites de blanc des globules blancs et des hématies ainsi que les limites de détection sont de 1/mm³. La plage d'analyse est de 2 à 10 000 GB/mm³ et de 15 à 99 999 GR/mm³. Concernant les interférences, le fournisseur informe que la fiabilité des résultats n'est pas garantie en cas de :

- stockage prolongé des échantillons, les urines n'étant pas stables dans le temps
- échantillons troubles
- échantillons présentant un aspect hémorragique
- échantillons présentant une forte concentration en filaments muqueux
- échantillons contenant une matière fluorescente en raison de l'inclusion de produits chimiques

Deux grands types de paramètres sont mesurés par l'UF-4000 :

- les paramètres évalués et validés, qui ont un apport diagnostique et qui sont actuellement utilisés en routine. Ces paramètres sont : les leucocytes seuls ou en amas, les hématies, les cellules épithéliales (squameuses, non-squameuses, transitionnelles et rondes) et les cellules atypiques. Les cristaux, les cylindres, les bactéries ainsi que les éléments fongiques sont eux aussi des paramètres quantifiés.
- les paramètres de recherche, qui ne sont pas encore validés comme marqueurs biologiques et dont la signification et l'apport restent encore à investiguer. Ainsi le rendu du résultat et son interprétation sont sous la responsabilité du biologiste. En plus de la présence d'hématies lysées, qui représente le plus souvent des artéfacts de la phase pré-analytique, il est intéressant de noter que plusieurs paramètres de recherche concernant la morphologie érythrocytaire dans les urines sont mesurés. Les hématies sont classées en petites hématies (*Small-RBC*), lorsque leur taille est inférieure à 5µm et en grandes hématies (*Large-RBC*), lorsqu'elles sont supérieures à 10µm. Les hématies totales comptées par l'automate représentent

la somme des petites hématies, des grandes hématies et des hématies lysées. Lorsque le nombre d'hématies compté dans les urines est supérieur à 20 hématies/ μL , leur répartition en taille et en forme est rendue par le paramètre « RBC-Info ». La répartition est dite « isomorphe » lorsque leur distribution suggère des hématies non endommagées (RBC-Info ; Isomorphic). Au contraire, la répartition est dite « dysmorphique » lorsque leur distribution est anormale suggérant des anomalies de taille ou de morphologie (RBC-Info ; Dysmorphic). Lorsque la distribution des hématies n'appartient à aucune des deux catégories citées, l'automate rend « RBC-Info, Mixed » (Figure 12). De plus, d'autres paramètres sont mesurés par l'automate comme le paramètre « RBC-Fsc DW », qui représente l'indice de la distribution en taille de 60% de la population des hématies centrée sur la médiane, le paramètre « RBC-P70 Fsc » qui représente un indice de taille des hématies (indice de taille de 70% des hématies les plus petites) ainsi que l'« URD » qui représente le rapport des petites hématies « Small-RBC » sur les hématies non lysées, exprimé en pourcentage (%).

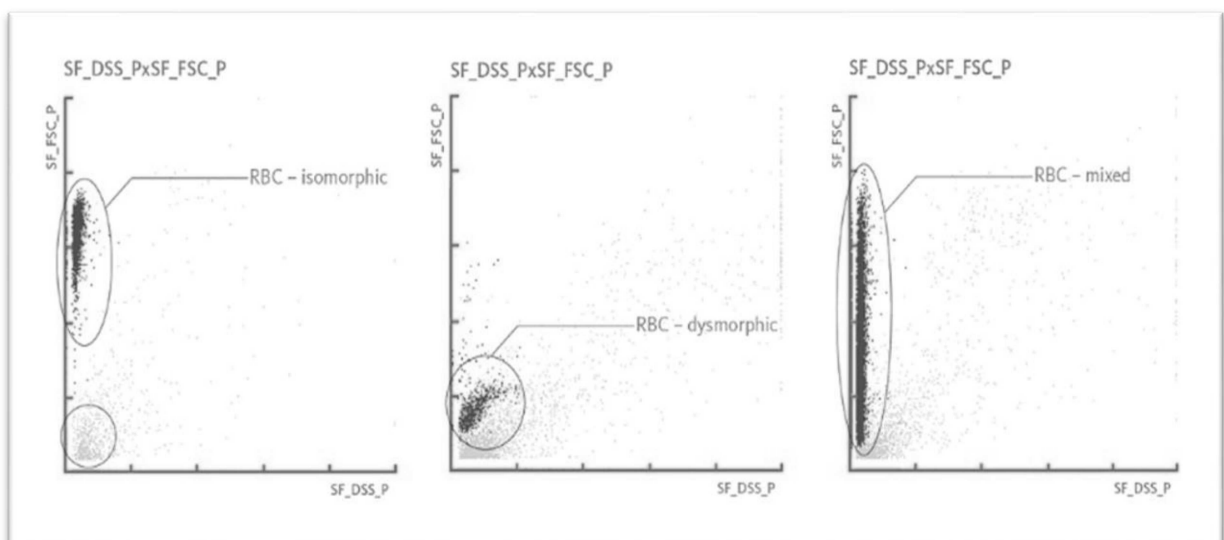


Figure 12 : Scattergrams de différentes populations du paramètre « RBC- Info »

3. L'hématurie microscopique

3.1. Définition et terminologies

L'hématurie est définie par une excrétion anormale d'hématies dans les urines (35).

On distingue deux types d'hématurie :

- l'hématurie macroscopique qui correspond à une excrétion anormale d'hématies dans les urines associée à un changement de la coloration de l'urine vers le rouge. Elle est visible à l'œil nu lors de l'examen macroscopique de l'urine.
- l'hématurie microscopique (HM) ou micro-hématurie correspond à la détection d'une excrétion anormale d'hématies dans un sédiment urinaire ou dans un échantillon urinaire par microscopie optique ou par CMF. En l'absence de tableau clinique évocateur d'une étiologie sous-jacente, l'hématurie microscopique est dite asymptomatique (HMA).

3.2. Prévalence de l'hématurie microscopique

L'hématurie microscopique est souvent retrouvée dans la pratique. Les études sur sa prévalence ont pour la plupart été conduites en Amérique du Nord. L'association d'Urologie américaine (AUA) fait mention d'une prévalence d'hématurie microscopique qui varie de 2,4% à 31,1% (36). Cette variation est dépendante de l'âge, du sexe, de la présence ou non de facteurs de risque de néoplasie et du seuil de définition d'une HM. Lorsqu'elle est isolée et asymptomatique, l'HM est le signe le plus fréquent d'une pathologie urologique néoplasique, notamment le cancer de la vessie (37,38). Mohr *et al.* (39) en 1986, dans une étude observationnelle sur une cohorte de 2697 patients américains retrouvent une prévalence d'HM de 13%. L'incidence d'une pathologie urologique chez ces patients était de 2,3% et moins de 1% d'entre eux présentaient un carcinome de la vessie. Les auteurs rapportent également une tendance à retrouver une atteinte urologique proportionnelle au degré d'hématurie. Ces résultats ont par la suite été confirmés dans plusieurs études observationnelles (38,40). La majorité des recommandations actuelles sur la prise en charge des patients avec une HMA préconisent

une investigation urologique seulement en présence de facteurs de risque de néoplasie comme le tabac, l'âge avancé ou encore l'exposition chimique. La nouvelle mise à jour des recommandations de l'AUA, publiée en 2020, va plus loin en proposant une gradation en risque faible, intermédiaire ou élevé, prenant en compte l'âge, l'importance de l'hématurie, les antécédents et la présence de facteurs de risque de cancer (36).

3.3. Principales causes d'hématurie microscopique

La figure 13 expose les principales causes d'hématurie microscopique (37,41). L'HM est souvent le signe d'une pathologie sous-jacente. Dans certains cas, lorsque l'HM est associée à d'autres signes clinico-biologiques, la pathologie en cause est facilement identifiable (infection urinaire, colique néphrétique, etc). L'HM peut aussi être le signe d'appel isolé et fortuit d'une pathologie grave comme un cancer des voies urinaires. Dans d'autres cas, malgré un bilan approfondi et un interrogatoire exhaustif, aucune étiologie sous-jacente n'est retrouvée.

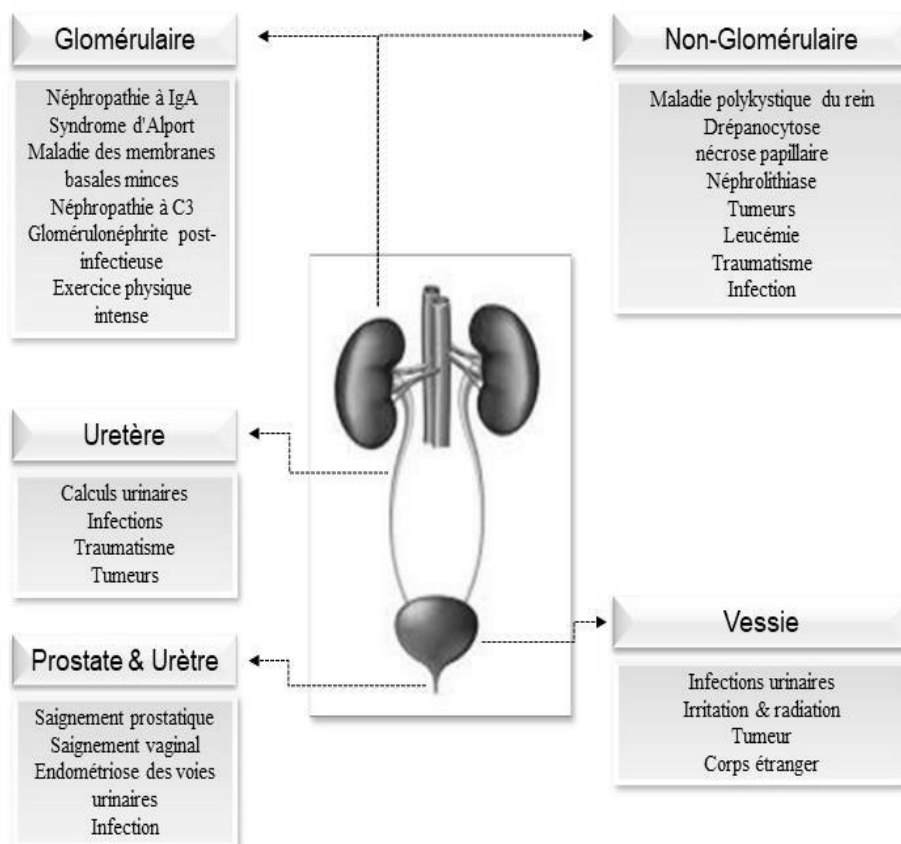


Figure 13 : Principales causes d'hématurie microscopique
(figure à partir de Longo et al. 2021)

3.4. Point sur les recommandations de prise en charge d'une HMA

Les différentes recommandations sur la prise en charge de l'HMA se basent sur la balance coût/efficacité associée au rapport bénéfice/risque d'une exploration complémentaire lors de la découverte d'une HMA. Les explorations recommandées incluent en fonction des pays la réalisation d'une imagerie, notamment une cystoscopie, un uroscanner ou une échographie des voies urinaires, une cytologie urinaire à la recherche de cellules anormales ainsi qu'une recherche biologique de marqueurs de dysfonction rénale (Tableau 1). Le risque de complications de ces examens est faible mais néanmoins gênant pour le patient et présente un coût à leur réalisation. La plupart de ces recommandations débutent par un socle commun qui est la définition d'un seuil d'hématurie microscopique. Le tableau 1 récapitule ces différents seuils ainsi que les critères associés devant motiver une exploration complémentaire à la recherche d'une pathologie rénale ou urologique. Il existe une grande hétérogénéité dans le monde concernant les critères motivant une exploration et un suivi lors d'une HMA. Il est important de noter que les variations observées dans ces recommandations reflètent l'absence d'un niveau de preuve suffisant ainsi que les différences dans les priorités entre les systèmes de santé (37). De plus, selon les pays, différents seuils d'HM sont utilisés, tous établis par microscopie optique et allant de 1 à 5 hématies/ μL . A l'instar de l'hétérogénéité des critères cliniques motivant une exploration et un suivi, ces seuils présentent un faible niveau de preuve et la définition d'hématurie qui en découle se base le plus souvent sur un avis d'expert. Il est à noter que ces seuils de définition représentent des valeurs établies à partir de populations présumées saines et ne représentent pas des seuils diagnostiques. Etant donné le risque pour le patient et les coûts pouvant être engendrés par une prise en charge tardive d'un cancer vésical, le développement et la validation d'une meilleure stratification des risques semblent être des perspectives intéressantes.

Tableau 1 : Définition d'HM et critères motivant une exploration complémentaire et de suivi des patients selon les pays

Pays	Seuil de définition d'une HM	Seuil de l'âge	Imagerie	Cystoscopie	Cytologie urinaire	Suivi de l'HMA
USA (2020) (36)	> 3/HPF sur 1 prélèvement	> 35 ans	Uroscanner	Si âge > 35 ans	Non recommandée	Suivi annuel pendant 2 ans
Canada (2020) (42)	> 3/HPF sur 2 prélèvements	> 35 ans	Uroscanner	Si âge > 35 ans et présence de facteur de risque de cancer vésical (Tabac, exposition chimique, etc.)	Non recommandée	Suivi annuel pendant 2 ans
Japon (2014) (43)	> 5/HPF sur 2 prélèvements	> 50 ans	Echographie	Si âge > 40 ans	Non statuée	Seulement si hématurie macroscopique
Allemagne (2014)	> 3/HPF sur 2 ou 3 prélèvements	> 50 ans	Uroscanner si > 50 ans avec échographie positive	Si âge > 50 ans	Si > 50 ans avec une imagerie négative	
Ecosse (2009) (44)	Non statuée	> 50 ans	Non statuée	Non statuée	Non statuée	Non statuée
UK (2008) (45)	> 1/HPF + 1 test de screening à la BU sur 2 ou 3 prélèvements	> 40 ans	Si > 40 ans. Méthode non spécifiée	Si > 40 ans	Non statuée	Suivi annuel si : signes urinaires, hématurie macroscopique ou HMA persistante
Suède (1999) (46)	Non statuée	Non statuée	Non recommandée	Non recommandée	Non recommandée	Non recommandé

3.5. Intervalles de référence d'hématies dans les urines

3.5.1. Intervalles de référence définis à l'aide de la microscopie optique

Plusieurs études se sont intéressées à la question de la présence physiologique de cellules et de cristaux dans les urines. L'étude d'Addis (47) en 1926 était une des premières à s'intéresser aux valeurs physiologiques d'éléments comme les leucocytes,

les hématies et à la présence de cristaux dans un sédiment urinaire. La population de référence décrite dans cette étude correspond à 74 sujets hommes présumés sains avec une restriction hydrique de 24h appliquée au groupe de référence. Les urines ont été récoltées après un délai de 12h sans miction. Un seuil limite normal de 5 hématies/HPF correspondant à une excrétion de 65 750/12h, est alors proposé. A l'inverse, l'étude de Wright *et al.* (48) en 1959, n'a pas observé d'hématies dans les urines récoltées. Cette étude a inclus des patients présumés sains (lors d'un contrôle médical avant embauche), 5000 hommes et 1000 femmes. L'auteur conclut néanmoins à la présence occasionnelle d'hématies dans les urines, correspondant à moins de 1 hématie/HPF. Par la suite, une revue de la littérature 1990, portant sur 9 études ayant rapporté la présence d'hématies dans les urines, propose une limite de 3 hématies/HPF pour laquelle une HM pourrait être définie (49). Les valeurs d'hématies rapportées par les études citées varient de 1 à 5 hématies /HPF. De plus, il n'apparaît pas de différences dans ces valeurs en fonction du sexe et de la centrifugation de l'urine. Cette revue est à la base de plusieurs recommandations internationales récentes de la prise en charge de l'hématurie chez l'adulte, notamment américaines (36,50), canadiennes (42) et japonaises (43). A notre connaissance, depuis 1990, aucune autre étude n'a cherché à déterminer une valeur de référence d'hématies dans les urines à l'aide de la microscopie optique.

3.5.2. Intervalles de référence définis à l'aide de la CMF

A notre connaissance, il n'existe à ce jour, pas d'intervalle de référence d'hématies défini dans les urines à l'aide d'automates de CMF de nouvelle génération. Actuellement, seulement deux études se sont intéressées aux valeurs de référence d'éléments figurés dans les urines, l'une utilisant un prototype d'automate de CMF, l'UF-1000 (51) et l'autre, publiée en 2007 dans une revue interne au constructeur (Sysmex International Journal) (52). La première étude, de Hyodo *et al.*, décrit un intervalle de référence respectivement pour les hommes et les femmes de 8 et 9 hématies/ μ L et cela sur un groupe de référence de 133 volontaires présumés sains, 92 hommes et 41 femmes. Sachant qu'un facteur de

0.297 peut être utilisé dans la conversion des éléments par HPF en microscopie optique vers un compte par μL par CMF (53), ces résultats correspondent à environ 2 à 3 hématies/HPF. Par la suite, une étude interne au constructeur a inclus 2433 sujets présumés sains, 1319 hommes et 1114 femmes dont la moyenne d'âge était de 53 ans. Les valeurs de référence d'éléments cellulaires ont été déterminées par une méthode de cytométrie en flux à l'aide de l'UF 1000i et les valeurs en dehors de la limite supérieure de mesure ont été exclues. Les limites de référence d'hématies et de cellules épithéliales (CE) chez l'homme et la femme étaient respectivement de 13 et 30 hématies/ μL et de 5 et 45 CE/ μL . Ces intervalles correspondent respectivement à 9 hématies/HPF chez la femme et 4 hématies/HPF chez l'homme. De plus, les auteurs rapportent une augmentation des limites de référence en fonction de l'âge chez les sujets masculins.

3.6. Apport de la morphologie érythrocytaire dans la détermination de l'origine d'une hématurie

L'analyse par microscopie optique de la morphologie érythrocytaire lors d'une hématurie permet de différencier l'origine du trouble (Figure 14). Cette observation a été rapportée pour la première fois en 1979 par Fairley et Birch (54) en comparant les hématies de patients atteints de glomérulopathie avérée par biopsie, aux hématies de patients ayant une pathologie urologique. Les auteurs observent dans cette étude que 95% des patients atteints de glomérulopathie avaient des hématies dysmorphiques. En 1991, Kohler *et al.* (55) apportent une caractérisation plus précise de la dysmorphie érythrocytaire. En effet, il apparaît que les acanthocytes (Figure 14) étaient la forme dysmorphique la plus associée à une glomérulopathie. Par la suite, plusieurs études ont évalué les performances de la microscopie optique dans le diagnostic de la source de l'hématurie (56,57). Globalement, la sensibilité et la spécificité de la présence d'hématies dysmorphiques dans le diagnostic d'une glomérulopathie varient respectivement de 62% à 95% et de 24% à 85% selon le pourcentage d'hématies dysmorphiques retenu. A ce jour, quelle que soit la technique

employée dans l'analyse urinaire, la majorité des recommandations préconisent une évaluation microscopique de la morphologie érythrocytaire afin d'évaluer l'origine de l'HM (3,36,42).

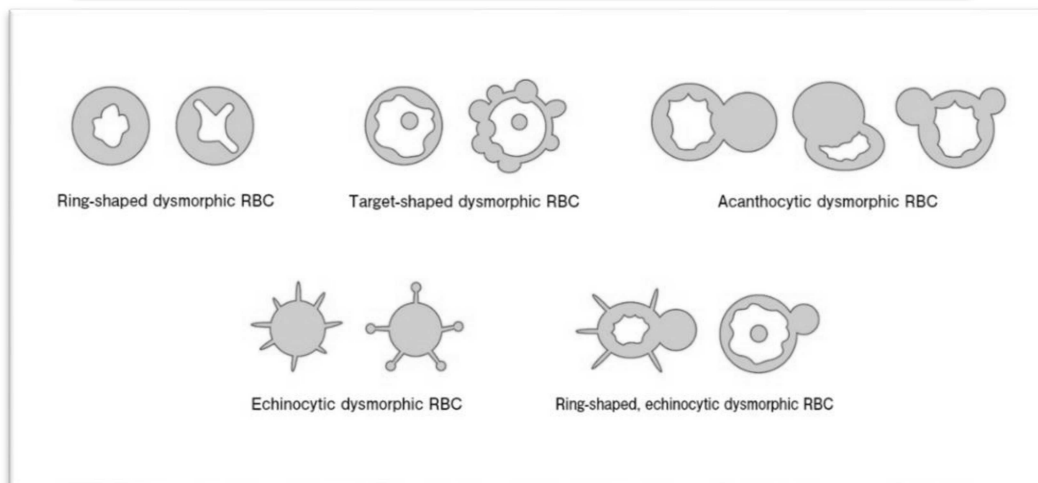
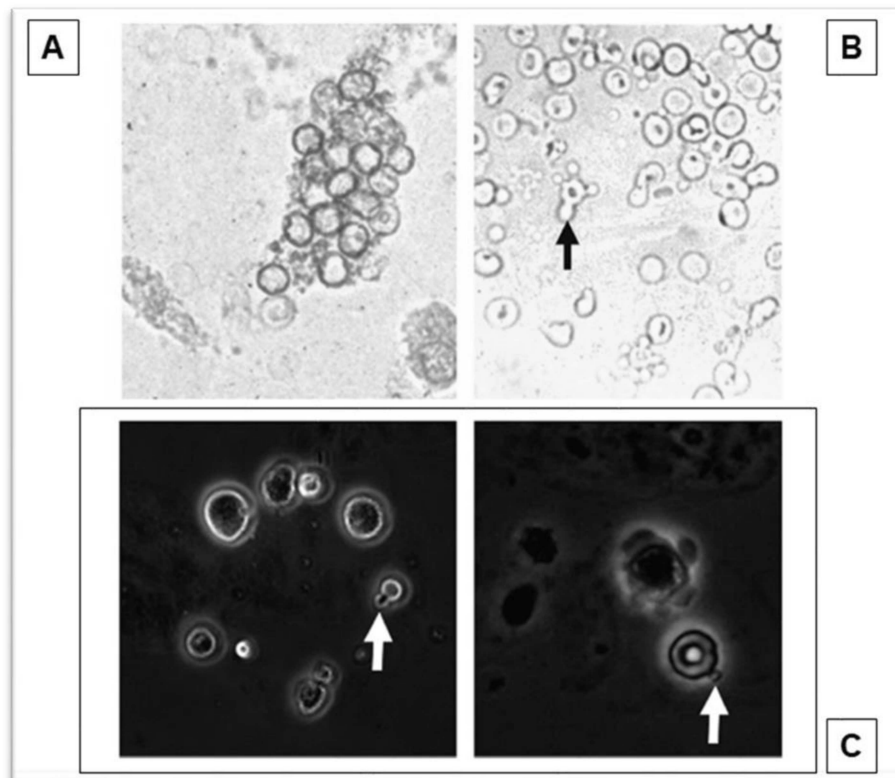


Figure 14 : Images et schéma d'hématies dysmorphiques

(Images issues de saha et al. 2022). La figure A : amas d'hématies dans les urines ; B : acanthocytes. C : acanthocytes vus par microscopie à contraste de phase.

Dans une aire de transition des techniques d'analyse urinaire, passant de la microscopie optique vers des techniques automatisées, l'utilisation des automates de CMF pour discriminer des populations érythrocytaires dysmorphiques est possible (58,59). Récemment, une étude coréenne évalue l'utilisation de paramètres morphologiques des hématies dans les urines à l'aide d'un automate de CMF de 3^{ème} génération (l'UF-5000) et leurs performances dans l'identification de la source de l'hématurie. Ainsi, les paramètres comme l'« URD » (*urinary red blood cells distribution*), les « *small-RBC* » ainsi que le paramètre « *RBC-P70FSC* », permettent de distinguer une origine glomérulaire d'une non-glomérulaire lors d'une HM , avec une excellente sensibilité mais une spécificité moyenne, qui augmente proportionnellement au degré de l'hématurie. Néanmoins, il est important de souligner que la place de ces paramètres et leur utilisation en routine clinique reste encore à établir précisément.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'HM est un marqueur biologique important dans le dépistage et le diagnostic d'une pathologie rénale ou urologique. Actuellement, la numération des éléments, dont les hématies dans les urines, est effectuée au laboratoire de bactériologie à l'aide d'un automate de cytométrie en flux, l'UF-4000 (Sysmex, Japon). Du fait d'une mauvaise corrélation avec la numération manuelle par microscopie optique observée dans les basses valeurs d'hématies lors de la validation de cette méthode, le rendu des hématies se limite à une valeur basse de 25/ μ L. Néanmoins, ce rendu des hématies ne représente pas un intervalle de référence contrairement au seuil limite de 10 leucocytes/ μ L (3).

La norme NF EN ISO 15 189 spécifiant les exigences de qualité et de compétences applicables aux laboratoires de biologie médicale, stipule que les résultats des examens biologiques doivent être associés à des intervalles de référence : « 5.8.3. Le compte rendu doit comprendre, sans y être limité, les renseignements suivants : [...] i) les intervalles de référence biologiques, [...] » (60). En France, la détermination d'un intervalle de référence repose sur des protocoles établis par les experts du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), considéré comme le « *gold standard* » (61). Ces recommandations mentionnent qu'une valeur de référence doit être établie pour chaque laboratoire dans le but d'être représentative de sa population.

Ce travail a donc été réalisé dans le but d'établir un intervalle de référence d'hématies dans les urines de sujets adultes considérés comme normo-rénaux. Dans un second temps, nous avons voulu tester cette limite de référence sur la population globale d'échantillons d'urines reçues au laboratoire sur la période de l'étude. Enfin, nous avons comparé les paramètres de recherche renseignant sur la morphologie des hématies entre les groupes de patients présentant une hématurie associée ou non à un marqueur de dysfonction rénale, comme la protéinurie.

MATERIELS & METHODES

1. Définitions et terminologies

Tout d'abord, il est important d'exposer les terminologies utilisées car elles peuvent être la base d'ambiguïtés dans l'interprétation et l'utilisation des intervalles de référence en routine clinique. Les terminologies qui sont utilisées dans cette étude, sont celles approuvées par la Fédération Internationale de Chimie Clinique et de Médecine de Laboratoire (IFCC-LM), par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et par le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (62,63) :

- une valeur de référence est une valeur mesurée chez un individu de référence. L'ensemble des valeurs de référence mesurées permet d'estimer un intervalle de référence.
- un intervalle de référence est défini comme étant l'intervalle spécifié de la distribution des valeurs obtenues à partir d'une population de sujet sains. Il est généralement défini par un intervalle correspondant à 95% de la population, centré sur la médiane. Il est à noter que dans certains cas, seule une limite de référence est retenue, qui est habituellement la limite haute « x ». Son intervalle de référence sera alors de 0 à x.
- une limite de référence est une valeur dérivée de la distribution de référence et utilisée dans un but descriptif.

2. Matériels

Les échantillons de l'étude ont été obtenus dans le laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen, au cours d'un recueil prospectif d'octobre 2022 à mars 2023 portant sur l'ensemble des urines de milieu de jet acheminées au laboratoire dans le cadre de la routine. Les échantillons urinaires ont été prélevés dans des tubes stériles, BD Vacutainer (BD Franklin lakes, USA), contenant un mélange d'additifs permettant la conservation de

l'urine (acide borique, formate de sodium et le borate de sodium). Les échantillons étaient analysés le jour même du prélèvement après acheminement et conservation à température ambiante (20-25°C).

Pour établir un intervalle de référence d'hématies dans les urines, nous avons inclus les urines présentant une numération normale de leucocytes (< 10 leucocytes/ μ L) et un compte bactérien inférieur à 10 bactéries/ μ L. Ces critères ont été appliqués dans le but de limiter les contaminations de l'urine ainsi que les échantillons provenant d'individus présentant une pathologie inflammatoire du tractus urinaire dont les infections urinaires (64).

Ensuite, nous avons appliqué la limite de référence établie sur le reste des échantillons recueillis, hors groupe de référence et service de Pédiatrie.

Enfin, dans l'objectif de s'intéresser aux paramètres morphologiques évalués par l'automate lors d'une hématurie associée ou non à la présence d'une protéinurie, deux groupes ont été constitués :

- le groupe A incluant les échantillons avec une protéinurie associée à une hématurie de plus de 20 hématies/ μ L
- le groupe B incluant les échantillons sans protéinurie associée une hématurie de plus de 20 hématies/ μ L

Un seuil d'hématurie de 20 hématies/ μ L a été choisi car il représente le seuil pour lequel l'automate communique des informations complémentaires sur la répartition morphologique des hématies, notamment les paramètres « URD », « RBC-Info », « RBC-Fsc DW » et « RBC-P70 Fsc ».

3. Méthodes

3.1. Analyse urinaire

3.1.1. Cytologie urinaire

Les urines ont été analysées par cytométrie en flux à l'aide de l'automate UF-4000

(Sysmex, Japon). Les paramètres relevés étaient le nombre/ μL des hématies, des leucocytes, des cellules épithéliales, des cylindres ainsi que des bactéries.

D'autres paramètres dits de « Recherche », qui concernaient les hématies, ont de même été recueillis :

- le paramètre « RBC-Info » qui renseigne sur la répartition globale, en taille et forme, des hématies
- le paramètre « RBC-P70 Fsc » qui représente un indice de taille des hématies (correspondant à la taille de 70% des hématies les plus petites)
- le paramètre « RBC-Fsc DW » qui est un indice de la distribution de taille de 60% de la population d'hématies centrées sur la médiane
- le paramètre « URD » qui est le rapport des petites hématies « Small-RBC » sur les hématies non lysées, exprimé en pourcentage (%)

3.1.2. Bandelette urinaire

L'analyse par bandelette urinaire (BU) a été effectuée à l'aide des bandelettes MEDITAPE UC-10S ou UC-12S (Sysmex, Japon). Les paramètres évalués par ces bandelettes incluaient les leucocytes, l'urobilinogène, le sang, la bilirubine totale, les cétones, le glucose, les protéines, les nitrites, le pH et la gravité spécifique. En plus de ces paramètres, la bandelette 12S incluait la mesure de l'albumine et de la créatinine permettant de déduire les ratio albumine/créatinine (A/C) et protéine/créatinine (P/C). La lecture a été faite à l'aide de l'automate UC-1000 (Sysmex, Japon) qui permettait de se défaire des biais de lecture visuelle de la BU liés au manipulateur.

Dans notre étude les contrôles internes de qualité (CIQ) étaient passés sur l'UF-4000 trois fois par jour (en début, milieu et fin de série) et les CIQ de l'analyse urinaire par bandelette à une fréquence de 2 fois par jour (début et fin de série). L'ensemble des CIQ comprenaient deux niveaux d'analyse : haut et bas. La validation et la gestion des CIQ a été réalisée selon les règles de Westgard (65).

3.2. Détermination d'un intervalle de référence

3.2.1. Nombre de sujets nécessaires

Selon la méthodologie recommandée par le CLSI, les méthodes statistiques classiques imposent un nombre minimal d'au moins 120 valeurs par classe ou sous-classe de valeurs de référence (66). Néanmoins, lorsque l'effectif des sous classes n'est pas suffisant, cette méthodologie propose des méthodes statistiques alternatives pour l'estimation des intervalles de confiance, comme la méthode « *Robust* » que nous avons utilisée dans ce travail (63). De plus, afin de nous assurer que l'effectif était suffisant pour le calcul des IC, nous avons calculé le ratio de la largeur des IC à 90% et à 95%. Un ratio acceptablement bas était en faveur d'un nombre de sujets de référence suffisant (67).

3.2.2. Constitution d'un groupe de référence et récolte des données

Dans le but d'établir une valeur de référence des éléments figurés, en particulier des hématies dans l'urine, les critères d'exclusion biologiques appliqués étaient les suivants : la présence d'au moins un marqueur biologique positif à la bandelette urinaire (BU), notamment les marqueurs de dysfonction rénale comme la protéinurie, l'albuminurie ou les rapports P/C et A/C lorsqu'ils étaient disponibles. De plus, les urines provenant des services de Pédiatrie ont été exclues. Enfin, les urines provenant des services d'Urologie et de Néphrologie-Hémodialyse-Transplantation n'ont pas été incluses, afin d'exclure de l'analyse des individus ayant pathologie néphrologique ou urologique.

3.2.3. Mise en évidence et élimination des valeurs aberrantes « *outliers* »

Plusieurs méthodes statistiques existent pour mettre en évidence et éliminer des valeurs aberrantes. Nous avons suivi, dans cette étude, la procédure suivante :

- une inspection visuelle de la distribution de fréquence des valeurs d'hématies/ μL et des cellules épithéliales/ μL , permettant d'appréhender l'importance du phénomène.
- une analyse statistique à l'aide de la méthode décrite par Tuckey *et al.* (68), selon la méthodologie recommandée par le CLSI.

3.2.4. Détermination des intervalles de référence et calcul des intervalles de confiance.

Le calcul des intervalles de référence a été établi sur la population de valeurs allant jusqu'au 95^{ème} percentile. En supposant un échantillonnage aléatoire des valeurs de la population de référence, les intervalles de confiance à 90% et 95% des limites de référence ont été calculés par la méthode « *Robust* » avec un rééchantillonnage de $n_i=10000$, décrite par Horn et Pesc (69), qui se base sur un modèle statistique de « *bootstrap* ».

De plus, une estimation des limites de référence a été réalisée lorsque la différence entre les moyennes des paramètres (hématies et cellules épithéliales) des différents sous-groupes étaient statistiquement significatives (pour une probabilité à 5%) (63).

3.3. Autres analyses statistiques

Les données quantitatives ont été analysées sous forme de moyenne et d'écart-type à la moyenne (ET) et les données qualitatives sous forme de pourcentage (%). Le test de Kolmogrov-Smirnov a permis de tester l'hypothèse d'une distribution normale des variables continues, notamment de la distribution des éléments urinaires (hématies, cellules épithéliales et cylindres). Le test de Wilcoxon Mann Whitney nous a permis de comparer les variables continues dont la distribution ne suivait pas une loi normale. En supposant l'indépendance des sous-groupes testés, le test non paramétrique d'ANOVA de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer plusieurs distributions de variables continues. Enfin, le test de χ^2 nous a permis de tester l'indépendance des variables catégorielles.

Tous les tests statistiques étaient bilatéraux et un risque α de 0,05 a été considéré comme significatif. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel MedCalc (22.005, MedCalc software Ltd, Belgium) et les tableaux et graphiques à l'aide du logiciel Prism (version 9.4.0, GraphPad Software, San Diego, Californie, États-Unis)

RESULTATS

1. Détermination d'un intervalle de référence

1.1. Sélection des valeurs de référence

Cette étude a été réalisée sur la période d'octobre 2022 à mars 2023. Durant cette période, nous avons inclus 1003 échantillons d'urines qui présentaient un nombre de leucocytes et de bactéries strictement inférieur à 10 / μ L. Parmi ceux-ci, 482 (48 %) ont été exclus du fait de leur provenance d'un des services suivants : Urologie (n = 27), Néphrologie (n = 98), Transplantation rénale (n = 289), Dialyse (n= 7) et Pédiatrie (n = 61). Parmi les 521 (52%) échantillons restants, un marqueur biologique urinaire lors du screening à la BU était retrouvé pour 297 (57 %) d'entre eux dont 238 (80 %) présentaient au moins un marqueur de dysfonction rénale. Précisément, 81 (63 %) échantillons présentaient une protéinurie positive à la BU 10S et 157 (92 %) un rapport P/C et/ou A/C positif à la BU 12S. L'ensemble de ces échantillons ont été exclus pour la constitution du groupe de référence de patients. Au total, seuls 224 (22 %) échantillons urinaires ont été retenus pour la détermination d'un intervalle de référence. Un diagramme de l'étude est présenté dans la figure 15. Dans un second temps, les échantillons non inclus dans le groupe de référence (hors service de pédiatrie) soit 718 échantillons, ont été utilisés pour tester la limite de référence ainsi que les paramètres de morphologie érythrocytaire en cas d'hématurie microscopique.

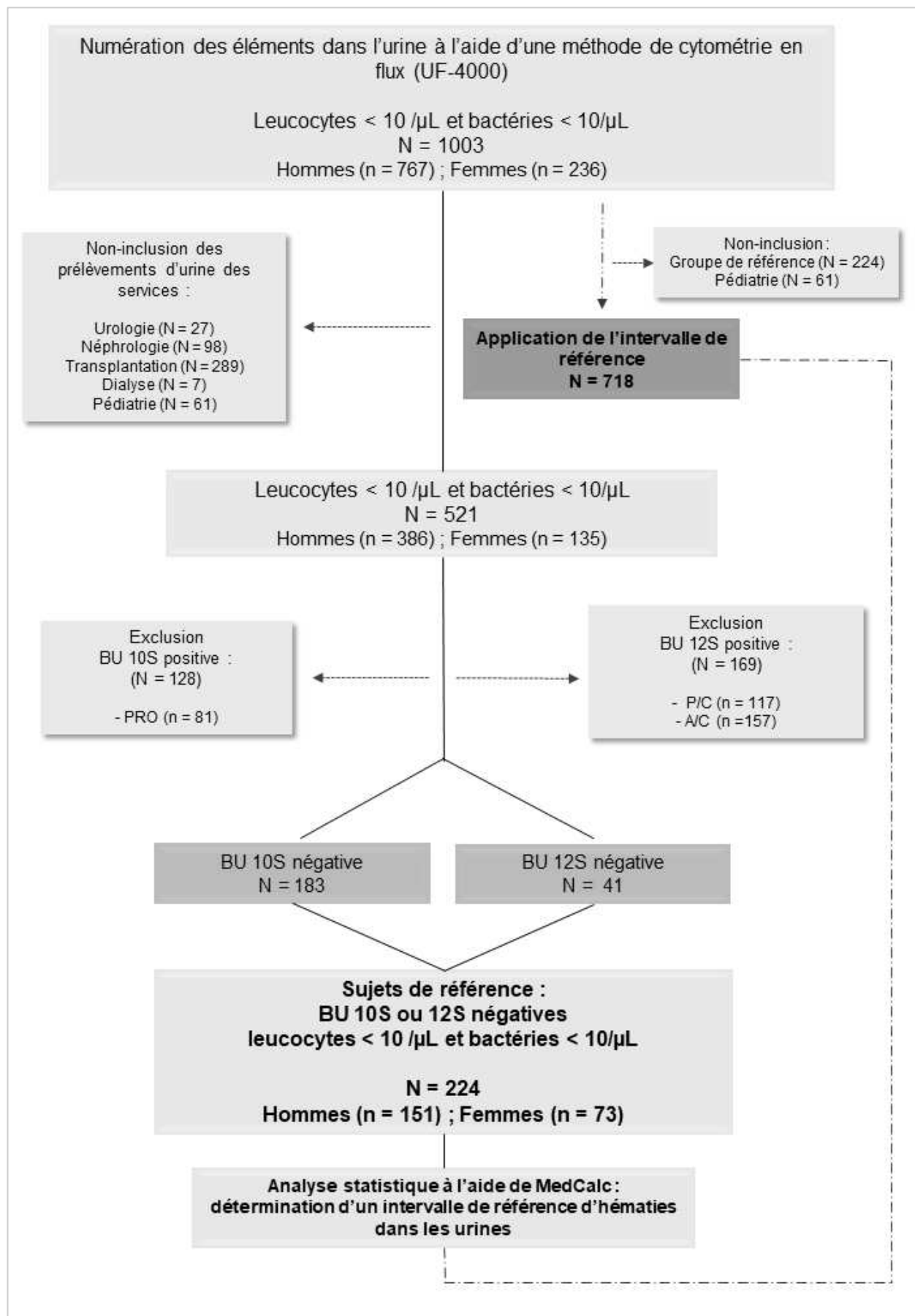


Figure 15 : Diagramme de l'étude

1.2. Caractéristiques des sujets de référence

Les caractéristiques démographiques des sujets de référence ainsi que les services de provenance des échantillons en fonction des différentes tranches d'âge sont présentés dans le tableau 2. Parmi les 224 individus, 151 (67,5 %) étaient de sexe masculin et 73 (32,5%) de sexe féminin, soit un sexe ratio (H/F) de 2. La moyenne et la médiane d'âge étaient respectivement de 56,7 / 60,5 ans chez les hommes et de 57,5 / 61 ans chez les femmes. Environ un tiers des individus étaient âgés de moins de 40 ans. Parmi les 99 sujets âgés de plus de 65 ans, 37 (37%) étaient âgés de plus de 80 ans.

La provenance des échantillons d'urine était majoritairement des services de médecine et seulement un échantillon provenait d'un service de Soins Intensifs. De plus, parmi les services de médecine, le service de Médecine Interne et celui des Urgences étaient les plus représentés avec respectivement 15% (25/169) et 26% (44/169) des échantillons. Les services de Chirurgie et de Soins de Suite Réadaptation représentaient chacun environ 10% de la provenance des échantillons.

Tableau 2 : Caractéristiques démographiques des sujets de référence et services de provenance des échantillons en fonction de l'âge

Nombre de sujets N (%)	Âge			Total
	18 - 39	40-65	> 65	
Hommes	34 (23%)	51 (33%)	66 (44%)	151 (67%)
Femmes	20 (28%)	20 (27%)	33 (45%)	73 (33%)
Services de Médecine	43	61	64	168 (75%)
Services de Réanimation	0	1	0	1 (< 1%)
Service de Chirurgie	0	7	16	23 (10%)
Service de Long Séjour (SSR, SLD, ...)	0	2	19	21 (9%)
Service de Gynécologie-Obstétrique	11	0	0	11 (5%)
Total	54	71	99	224

1.3. Conditions pré-analytiques des échantillons urinaires

Le tableau 3 présente les délais entre l'heure de prélèvement de l'échantillon urinaire et celle de l'analyse par CMF ou par BU. La numération par CMF a été effectuée en moyenne dans les 5 premières heures suivant le prélèvement avec une médiane de 2 heures. Pour l'analyse par BU, la moyenne et la médiane étaient d'environ 5 heures. Les échantillons étaient acheminés et conservés à température ambiante (20-25°C) avant analyse sur tubes boratés, et leur volume était contrôlé.

Tableau 3 : Délai d'analyse des échantillons urinaires du groupe de référence par rapport à l'heure de prélèvement

	Moyenne (h)	Médiane (h)
Délai de passage sur l'UF-4000	4,9 (+/-5.8)	2
Délai de passage sur l'UC-1000	5,4 (+/-3.7)	5

1.4. Distribution des éléments urinaires

La distribution des valeurs d'hématies selon leur fréquence et en fonction du sexe est exposée dans le tableau 4. Concernant la répartition des hématies, les valeurs de référence s'étendaient de 1 à 37 hématies/ μ L. Au total, 14 échantillons avaient des valeurs supérieures à 20 hématies/ μ L (6%) et la fréquence de ces valeurs était très faible, allant de 1 à 3. Nous avons observé une proportion plus importante de sujets de sexe masculin ayant des valeurs supérieures à 20 hématies/ μ L par rapport aux sujets de sexe féminin, soit respectivement 9% et 1%. De plus, la moyenne du nombre d'hématies lysées « *RBC-L* » était très basse, soit 1 hématie/ μ L (+/- 1). Parallèlement, la valeur moyenne du nombre total d'hématies/ μ L était de 7/ μ L (+/- 6) qui correspondait majoritairement à des hématies non lysées « *RBC-NL* » (moyenne de 8 hématies non lysées/ μ L (+/- 5)).

Par ailleurs, la distribution des autres éléments notamment des cellules épithéliales et des cylindres est présentée dans les tableaux en annexe 3. Enfin, l'automate n'a détecté aucune cellule anormale dans l'ensemble des échantillons de référence.

Tableau 4 : Fréquence de distribution des hématies dans l'urine dans notre groupe de référence

Hématies/ μ L	Fréquence		Total
	Hommes	Femmes	
1	3	3	6
2	13	6	19
3	16	14	30
4	17	7	24
5	20	11	31
6	13	7	20
7	9	6	15
8	12	2	14
9	6	3	9
10	5	4	9
11	6	0	6
12	5	2	7
13	4	2	6
14	1	0	1
15	3	0	3
16	1	2	3
17	0	1	1
18	1	1	2
19	2	1	3
20	1	0	1
21	2	0	2
23	2	0	2
24	1	0	1
25	3	0	3
26	1	0	1
27	1	0	1
29	1	1	2
33	1	0	1
37	1	0	1

Les valeurs colorées en rouge sont les outliers identifiés dans le groupe de référence et les valeurs colorées en orange sont les outliers identifiés par sous-groupe en fonction du sexe.

La figure 16 présente les distributions des fréquences des valeurs/ μL des GR, CE et CYL selon le sexe. Aucune de ces distributions n'était gaussienne ($p < 0.0001$). La majorité des échantillons (86 %) présentaient des valeurs inférieures ou égales à 5 / μL de CE et 87% ne présentaient pas de CYL.

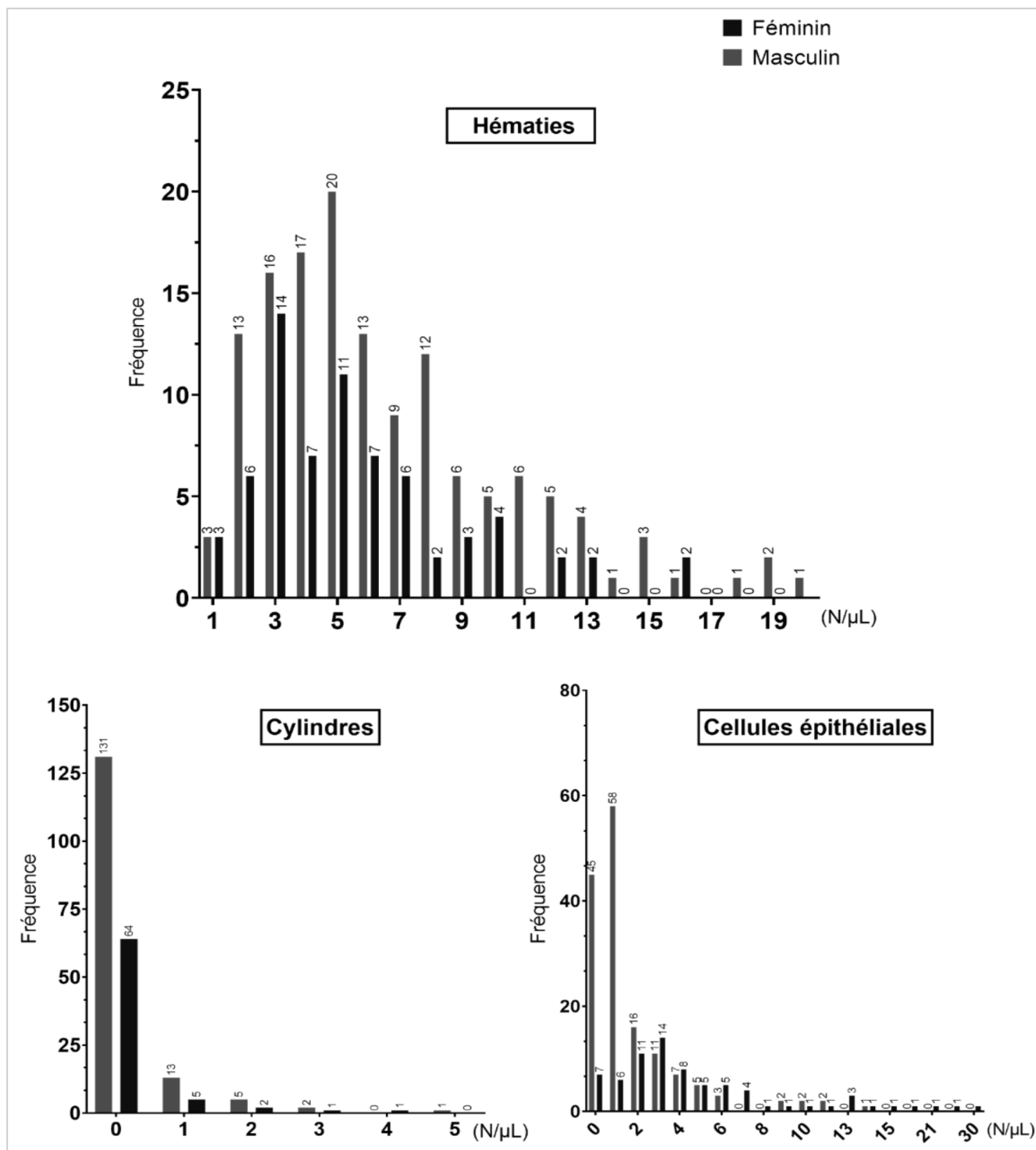


Figure 16 : Distribution des valeurs/ μL d'hématies, de cylindres et de cellules épithéliales par fréquence et selon le sexe

La figure 17 représente la distribution du nombre d'hématies totales/ μL et pour chaque sexe ainsi que des cellules épithéliales et des cylindres dans le groupe de référence. Pour les hématies, la médiane était de $6/\mu\text{L}$ avec un intervalle interquartile de [4-9] et les médianes en fonction du sexe étaient de $6/\mu\text{L}$ [4-10] chez les hommes et de $5/\mu\text{L}$ [3-8] chez les femmes. La moyenne des hématies dans l'ensemble de nos échantillons de référence était de 7 hématies / μL (+/- 6). De manière intéressante, nous n'avons pas observé de différence significative entre les moyennes d'hématies par sous-groupe d'hommes et de femmes, qui étaient respectivement de 8 (+/- 7) et 6 hématies / μL (+/- 6) ($p < 0,05$; $p = 0,05$). Concernant les cylindres et les cellules épithéliales, les médianes étaient respectivement de 0,2 et $1/\mu\text{L}$.

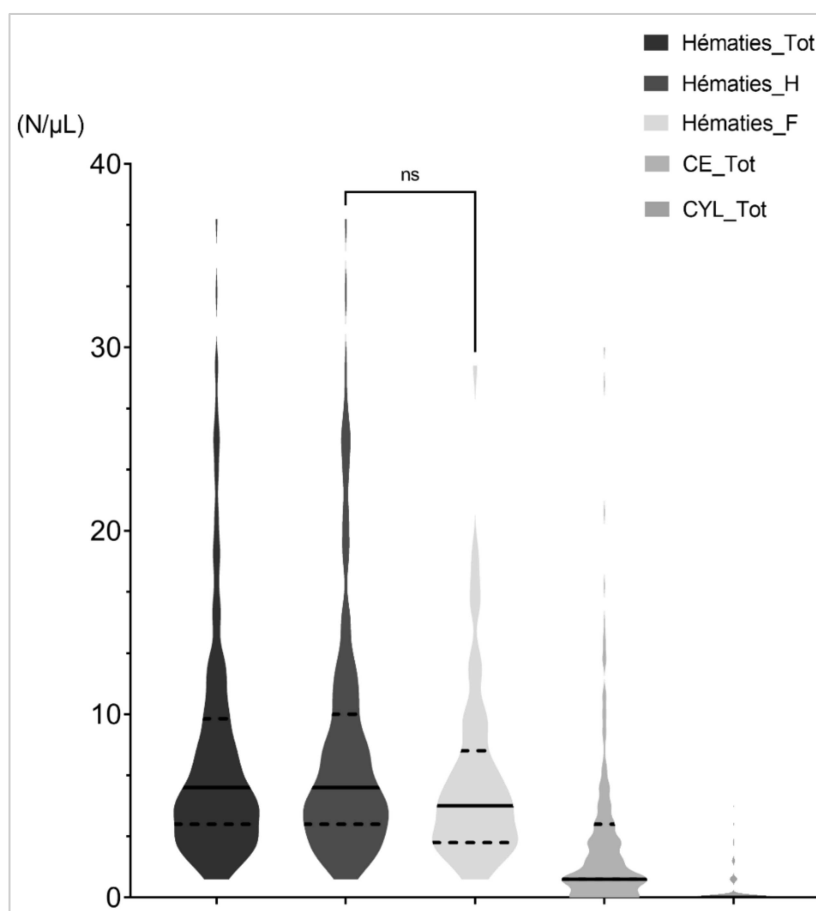


Figure 17 : Diagrammes en violon des valeurs de référence (N/ μL) des hématies, des cellules épithéliales (CE) et des cylindres (CYL)

Une représentation par sous-groupe en fonction du sexe est représentée pour les hématies (H : hommes ; F : femmes). La ligne continue représente la médiane de la distribution et les deux lignes discontinues représentent respectivement de bas en haut, le 1^{er} interquartile et le 3^{ème} interquartile.

Le tableau 5 présente les valeurs moyennes (N/ μ L) selon le sexe et par tranches d'âge des hématies (GR) et des cellules épithéliales (CE). Nous n'avons pas observé de différence significative des moyennes d'hématies selon l'âge ($p > 0,05$; $p = 0,17$). Concernant les autres éléments figurés dans les urines, les moyennes observées de cellules épithéliales et de cylindres dans notre groupe de référence étaient respectivement de 3 CE/ μ L (+/- 2,6) et de 0,4 CYL/ μ L (+/- 0,6). De même, pour l'ensemble de ces paramètres, aucune différence significative n'a été observée dans les différents sous-groupes de sexe et de tranches d'âge ($p > 0.05$).

Tableau 5 : Moyennes observées à partir des échantillons de référence des Hématies (GR) et des cellules épithéliales (CE).

Tranches d'âge	Valeurs moyennes N/ μ L (Ecart-type)			
	Masculin		Féminin	
	GR	CE	GR	CE
> 65	8 (+/- 2)	2 (+/-2)	6 (+/-3)	5 (+/- 3)
18-39	9 (+/- 7)	2 (+/-2)	5 (+/- 6)	3 (+/- 2)
40-65	8 (+/- 4)	2 (+/-1)	8 (+/-6)	8 (+/- 6)
Total	8 (+/- 6)	2 (+/- 2)	6 (+/- 4)	6 (+/-4)

1.5. Mise en évidence et élimination des valeurs aberrantes « *outliers* »

L'analyse visuelle du tableau 4 (p.43) révèle la présence de valeurs élevées ayant néanmoins une fréquence de distribution basse. L'analyse statistique par la méthode de Tuckey (70) nous a permis de mettre en évidence et d'exclure 20 (9%) échantillons présentant des valeurs aberrantes (valeurs colorées en rouge dans le tableau 4). De plus, l'analyse et la mise en évidence des « *outliers* » en fonction du sexe a identifié 14 (9%) échantillons dans le sous-groupe des hommes contre 4 (5%) dans le sous-groupe des

femmes (valeurs colorées en orange dans le tableau 4). Concernant la distribution de cellules épithéliales dans les urines, 16 (6.4%) échantillons contenant des *outliers* ont été mis en évidence par l'analyse statistique (Tableau annexe 3).

Au total, 204 échantillons ont été utilisés pour établir un intervalle de référence d'hématies dans les urines tous sexes confondus. Pour l'estimation de l'intervalle de référence selon le sexe, 137 échantillons d'hommes et 69 de femmes ont été utilisés.

1.6. Détermination des intervalles de référence

Après élimination des *outliers*, les résultats des limites de référence d'hématies du groupe et des sous-groupes en fonction du sexe sont présentés dans le tableau 6. Au total, l'estimation de la limite de référence des hématies dans les urines était de 10/ μ L avec un IC90% de [10 - 11] et de 12/ μ L avec un IC95% de [11 - 13]. Il est à noter que le calcul du ratio entre les différences des intervalles de confiance à 90% et 95% étaient de 0.5 pour le groupe de référence. Concernant les sous-groupes en fonction du sexe, la limite de référence était de 11 hématies/ μ L associé à un IC90% de [10 - 12] pour le sexe masculin et de 9/ μ L pour un IC90% de [8 - 10] pour le sexe féminin.

Tableau 6 : Estimation des intervalles de référence et des intervalles de confiance des hématies/ μ L dans l'urine dans notre groupe d'échantillons de référence et par sous-groupe en fonction du sexe

Echantillons de référence (hors <i>outliers</i>)*	Limite de référence des hématies/ μ L	
	IC90%	IC95%
Total (N = 224)	10 [10 - 11]	12 [11 - 13]
Hommes (N = 151)	11 [10 - 12]	13 [12 - 14]
Femmes (N = 73)	9 [8 - 10]	11 [9 - 12]

*Selon le sexe, les *outliers* éliminés étaient de 14 chez les hommes et 4 chez les femmes. Dans le groupe de référence (indépendamment du sexe), les *outliers* éliminés étaient de 20

Par ailleurs, pour les cellules épithéliales, nous obtenons une limite de référence de 4 cellules/ μL associée à un IC à 90% et 95% de [4 –5]. L'estimation d'une limite de référence pour les cylindres n'a pas été effectuée.

2. Evaluation de l'intervalle de référence

En appliquant la limite de référence obtenue de 10 hématies/ μL au sein de la totalité de nos échantillons (hors groupe de référence et services de Pédiatrie) soit $N = 718$, nous avons observé que 71% (510/718) d'entre eux ne présentaient pas d'hématurie, contre 29% (208/718) présentant plus de 10 hématies/ μL (Tableau 7). Parmi les 208 échantillons ayant une valeur supérieure à 10 hématies/ μL , 58% (121/208) présentaient une protéinurie associée contre 37% (189/510) de ceux ayant moins de 10 hématies/ μL . Enfin, la proportion d'échantillons ne présentant pas d'hématurie et pas de protéinurie était de 45% (321/718) contre 17 % (121/718) qui présentaient une protéinurie associée à une hématurie. L'analyse statistique suggère un lien significatif, en analyse univariée, entre ces deux variables (protéinurie et hématurie) ($p < 0,0001$). Ces observations étaient similaires lorsqu'un seuil de 20 hématies/ μL était appliqué ($p < 0,005$).

Tableau 7 : Tableau de contingence entre la présence ou non d'une protéinurie selon deux seuils d'hématurie : 10 et 20 hématies / μL

Numération des hématies (N/ μL)	Protéinurie		Total	p-value
	positive	négative		
< 10	189	321	510	< 0,0001
> 10	121	87	208	< 0,0001
< 20	253	366	619	< 0,005
> 20	56	43	99	< 0,005

3. Evaluation des paramètres de morphologie érythrocytaire

Les paramètres morphologiques ont été comparés entre deux groupes dont les valeurs d'hématies étaient supérieures à 20/ μ L : le groupe A présentant une protéinurie et le groupe B sans protéinurie. Nous avons observé en analyse univariée, plusieurs différences dans les proportions ainsi que dans les moyennes des paramètres évaluant la morphologie des hématies entre les groupes A et B (Tableau 8). Concernant le paramètre « RBC info » qui renseigne sur la répartition en taille des hématies, nous avons observé une proportion plus élevée d'hématies isomorphiques (19/44 ; 43%) en l'absence de protéinurie (groupe B) contre 16% (9/55) en présence d'une protéinurie (groupe A). De même, nous retrouvons une différence significative entre les deux groupes pour la moyenne de l'indice « RBC-P70Fsc », (qui renseigne sur la taille de 70% des hématies les plus petites) qui étaient respectivement de 95 (ch) dans le groupe A et de 120 (ch) dans le groupe B. De plus, concernant les pourcentages de petites hématies et d'hématies lysées dans les deux groupes, nous avons observé une moyenne de petites hématies significativement plus élevée dans le groupe A (55% vs 35% ; $p < 0.005$) mais pas de différences dans le pourcentage d'hématies lysées (11% vs 8% ; $p > 0,05$). De même, le paramètre « URD », qui correspond au rapport des petites hématies sur les hématies non lysées, était également significativement plus élevé dans le groupe A (64% vs 40% ; $p < 0,0001$).

Tableau 8 : Caractéristiques morphologiques des hématies dans les échantillons présentant une hématurie supérieure à 20 hématies / μ L

Paramètres morphologiques	Groupe A : > 20 hématies/μL avec protéinurie N = 55	Groupe B : > 20 hématies/μL sans protéinurie N = 44	p-value
« RBC-Info »			
Isomorphique	9	19	< 0,005
Dysmorphique	12	6	< 0,005
Mixte	34	19	
« URD » (%)	64 (+/-25)	40 (+/- 32)	< 0,0001
« RBC-Fsc-DW » (ch)	57 (+/-29)	53 (+/- 39)	> 0,05
« RBC-P70Fsc » (ch)	95 (+/-31)	120 (+/-36)	< 0,0001
« Small RBC » (%)	55 (+/- 20)	35 (+/- 27)	< 0,0001
« Lysed RBC » (%)	11 (+/- 11)	8 (+/-12)	> 0,05

Les paramètres « RBC-Fsc-DW » et « RBC-P70Fsc » sont exprimés en moyenne (+/- écart type). Le paramètre « URD » est exprimé en pourcentage (%) moyen du rapport de petites hématies sur les hématies non lysées. Les paramètres « Small RBC » et « Lysed RBC » sont exprimés en moyenne de pourcentage des hématies totales.

DISCUSSION

L'analyse urinaire est un examen biologique des plus fréquents en laboratoire de biologie médicale. Dans le domaine de la cytologie urinaire, de nouvelles méthodes quantitatives et automatisées comme la cytométrie en flux ont révolutionné l'analyse urinaire. En effet, ces automates ont permis un gain en termes de précision et d'exactitude tout en permettant une cadence de passage très élevée (2). De plus, les automates de CMF permettent l'acquisition de nouvelles informations, comme la taille ou encore les différentes répartitions morphologiques des cellules présentes dans l'urine. L'avènement de ces méthodes crée le besoin de revoir les définitions des valeurs physiologiques de ces éléments afin d'une part, d'améliorer la détection d'anomalies, et d'autre part d'optimiser les stratégies diagnostiques en termes de coût/efficacité. Compte tenu de la multitude de paramètres pouvant être évalués par les automates de CMF mais dont la pertinence clinique reste encore à établir, le comité d'experts de l'ECLM (*European Confederation of Laboratory Medicine*) a proposé une liste d'éléments d'intérêt clinique, dans lesquels le compte des hématies urinaires est présent (71). Actuellement, la définition d'une hématurie microscopique est fondée sur la base d'intervalles de référence établis à l'aide de la microscopie optique, qui vont de 3 à 5 hématies /HPF selon les séries publiées. A notre connaissance, il n'existe actuellement pas de valeurs de référence connues de ce paramètre mesuré par CMF, pouvant être utilisées dans la définition d'une hématurie microscopique en routine. De ce fait, cette étude a été réalisée dans le but de déterminer un intervalle de référence d'éléments figurés dans les urines, notamment des hématies, à l'aide d'un automate de CMF de nouvelle génération, l'UF-4000 (Sysmex, Japon).

Sur la période d'octobre 2022 à Mars 2023, notre étude a porté sur plus de 1000 échantillons urinaires analysés par CMF et présentant moins de 10 leucocytes et 10 bactéries/ μ L. Concernant les considérations pré-analytiques, cette étude a été effectuée dans les conditions d'un recueil en routine au laboratoire sur des urines reçues en tube

boraté avec un volume adéquat et analysées le jour même. Le délai moyen entre l'heure du prélèvement et l'analyse sur l'UF-4000 et par BU étaient d'environ 5 heures ce qui est un délai satisfaisant pour l'analyse cytologique et chimique de l'urine par BU. En effet, l'utilisation de tubes contenant des conservateurs comme le borate ainsi que le délai d'analyse sur la cytologie et la chimie urinaire ont été évalués dans une étude multicentrique publiée par Kouri *et al.* (72) qui montre une stabilité des paramètres chimique et cytologique durant 6 à 24h après le recueil en présence de borate. Si le borate est considéré comme un bon conservateur cellulaire, notamment pour la numération des hématies, il est néanmoins moins performant comme agent stabilisant pour les protéines urinaires (73). En effet, l'étude de Kouri *et al.* a rapporté la présence de faux négatifs dans l'évaluation de la protéinurie en présence de borate dans les 24h suivant le recueil mais en faible proportion (4%). De plus, concernant l'influence de la température sur la stabilité des hématies, une température ambiante permet une stabilité des hématies de 1 à 24h (14). Enfin, la présence d'un faible nombre d'hématies lysées dans nos échantillons (en moyenne 1 hématies/ μ L) est en faveur de la bonne conservation de nos échantillons.

Pour la constitution d'un groupe de référence, nous avons exclu les échantillons présentant un marqueur positif à la BU, en particulier un marqueur de dysfonction rénale. Parmi ces marqueurs, la protéinurie ainsi que le rapport P/C et A/C représentaient les principales causes d'exclusion des échantillons, soit 80% (238/297). En effet, ces paramètres ont été décrits dans littérature comme robustes dans le dépistage d'une maladie rénale (15,21). De plus, l'emploi de la BU 12S associé à une lecture automatisée par UC-1000, que nous avons utilisée dans notre étude, ont été rapportés comme très performants vis-à-vis de la détection de ces marqueurs. En effet, l'étude de Delanghe *et al.* (74) a montré que l'utilisation d'un automate de lecture permettait d'améliorer considérablement la détection d'une micro-albuminurie par ces bandelettes. De même, l'étude de Currin *et al.* (33) qui avait pour objectif d'évaluer les performances du rapport A/C dans le dépistage d'une maladie rénale à l'aide d'une BU 12S et d'une lecture par un UC-1000, rapporte une bonne sensibilité de ce rapport pour le dépistage de la maladie

rénale. Au total, notre groupe de référence comportait 224 échantillons présentant moins de 10 leucocytes et bactéries/ μL , sans marqueurs positifs à la BU, notamment un marqueur de dysfonction rénale et ne provenaient pas de service d'Urologie ou de Néphrologie.

Concernant ce groupe, nous avons observé une différence dans le nombre d'échantillons entre les deux sexes (sexe ratio H/F = 2). Nous expliquons cette différence par l'application de nos critères d'inclusion (< 10 leucocytes/ μL et < 10 bactéries/ μL). Ces critères ont été choisis dans le but de ne pas inclure d'urines présentant des contaminations vaginales, notamment des hématies provenant de ce compartiment. Nous supposons alors qu'une large proportion des urines prélevées chez les femmes étaient probablement contaminées par des micro-organismes et/ou des leucocytes vaginaux. La limite de référence des cellules épithéliales (4 CE/ μL) obtenue dans les urines de la sous population de sexe féminin, très inférieure comparée aux valeurs décrites (45,6 CE/ μL) dans la série de Terajima *et al.* (52) est un argument en faveur de cette hypothèse. De plus, l'incidence des infections urinaires chez les femmes étant plus élevée que chez les hommes (12,6% chez la femme vs 3% chez l'homme) (75), nous supposons aussi qu'une proportion supérieure à celle du sexe masculin a été exclue du fait de la présence de leucocytes lors d'une infection urinaire (64). Le petit effectif de la sous population de sexe féminin ($n < 120$; $n = 73$) ne représente cependant pas une limite au calcul d'un intervalle de référence des hématies du fait de la présence de modèles statistiques alternatifs, comme la méthode « *Robust* », adaptée aux petits échantillons (63,69). En ce qui concerne les tranches d'âge, celles-ci avaient une répartition homogène quel que soit le sexe.

Les limites de référence supérieures dans les urines calculées dans notre étude étaient de 10 et 13 hématies/ μL respectivement pour un IC à 90% et 95%. Le calcul de l'intervalle de référence dans la sous-population de tranches d'âge n'était pas justifié dans notre étude car nous n'avons pas retrouvé de différence significative de la moyenne entre ces sous-groupes. Dans l'ensemble, nos résultats sont équivalents aux intervalles de

référence établis dans d'anciennes études en microscopie optique qui varient de 3 à 5 hématies/HPF, correspondant respectivement à des valeurs de 11 à 17 hématies/ μ L selon le facteur de conversion (0.297) proposé par Wang *et al.*(53). Concernant la détermination d'un intervalle de référence par CMF, seules 2 études à notre connaissance, avaient pour objectif de déterminer un intervalle de référence, dont une étude interne au constructeur (Sysmex, Japon) (51,52). Les résultats retrouvés dans notre étude étaient équivalents aux limites de références proposées par l'étude de Hyodo *et al.* (51) en 1997, qui sur un groupe de référence de 133 volontaires sains (41 femmes et 92 hommes) proposaient une limite de 11 hématies/ μ L. De même que dans notre travail, il n'avait pas été retrouvé de différence de ce seuil en fonction du sexe. Néanmoins, malgré la cohérence des résultats, cette étude en plus d'être ancienne, a été réalisée sur un des premiers prototypes d'automates de CMF (prototype UF-100) dont les performances sont inférieures à celles des automates de nouvelle génération actuellement utilisés en routine (2). Une autre étude interne au constructeur a cherché à déterminer des intervalles de référence d'éléments figurés dans l'urine. Il s'agit de l'étude de Terajima *et al.* (52), qui sur un groupe de référence de 2433 individus présumés sains (1319 hommes et 1114 femmes), propose une limite de référence de 13 hématies/ μ L pour les hommes et d'une manière étonnante, une limite de 30 hématies/ μ L pour les femmes. Globalement, les limites proposées par cette étude sont plus élevées que celles retrouvées dans notre étude et dans celles de Hyodo *et al.* ou encore celles définies à l'aide de la microscopie optique. Les auteurs discutent l'intervalle particulièrement élevé chez les femmes en suggérant qu'une contamination vaginale aurait pu avoir lieu du fait d'un nombre élevé de bactéries et de cellules épithéliales observé. Concernant l'intervalle de référence établi chez l'homme, l'absence de mention des intervalles de confiance dans cette étude rend la comparaison avec nos résultats difficile.

En ce qui concerne les autres éléments figurés détectés par CMF dans les urines de notre groupe de référence, l'estimation de l'intervalle de référence des cellules épithéliales dans les urines de notre groupe de référence, qui était de 0 à 4 CE/ μ L est

rapporté dans ce travail à titre informatif. En effet, l'urine normale a été décrite comme très peu cellulaire et contient essentiellement des cellules provenant de la desquamation de l'urothélium (26). Néanmoins, malgré la cohérence de ce résultat comparativement aux études précédemment décrites (51,52), la moyenne du délai entre le recueil et l'analyse urinaire par CMF (qui était de 5 heures) est supérieure à l'intervalle recommandé de 1 à 4 heures sur un tube boraté (73). Il existe donc un risque de sous-estimer cette limite de référence. Concernant les cylindres, nous n'avons pas estimé de limites de référence du fait de la méthode de recueil qui a été utilisée. En effet, un remplissage des tubes boratés par aspiration sous vide n'est pas recommandé pour la mesure des cylindres dans les urines du fait de leur destruction par cette méthode (73).

Il est important de souligner qu'un intervalle de référence diffère d'une limite de décision médicale. En effet, un intervalle de référence dérive d'une distribution de référence établie à partir d'une population de sujets présumés sains dans un but descriptif. Une limite de décision elle, dérive de courbes ROC (Receiver Operating Characteristic), et peut servir comme élément de dépistage, de diagnostic ou encore de suivi pouvant être utilisé en routine clinique (76). Ainsi une limite d'hématies strictement inférieure à 3 hématies/HPF établie par microscopie optique est retenue dans plusieurs recommandations de sociétés d'experts, comme seuil de définition d'une hématurie microscopique (36,77,78). Ce seuil représente un seuil de décision clinique puisqu'en présence de facteurs de risque de néoplasie comme le tabac ou l'âge, il est recommandé des examens complémentaires d'investigation (41). Il est à noter que notre valeur limite de référence de 10 hématies/ μ L est inférieure à cette valeur de 11 hématies/ μ L (correspondant à 3 hématies/HPF). Afin d'investiguer notre limite de référence comme potentiel seuil pathologique, nous avons appliqué cette valeur à l'ensemble de notre population d'échantillons (hors groupe de référence). D'une manière intéressante nous avons observé, en analyse univariée, une proportion significativement plus élevée de patients ayant un seuil supérieur à 10 hématies/ μ L associé à un marqueur de dysfonction rénale positif à la BU, notamment une protéinurie. De même, ce résultat a aussi été

retrouvé pour la valeur limite de 20 hématies/ μ L. Néanmoins la conception de cette étude ne nous permet pas de conclure sur un seuil de décision clinique mais présente une perspective intéressante dans la définition d'un seuil pathologique. Pour cela une étude complémentaire portant sur des groupes de patients présentant ou non une dysfonction rénale ou urologique serait nécessaire.

Un des objectifs secondaires de cette étude était d'évaluer l'intérêt des paramètres de morphologie érythrocytaire fournis par l'automate. Etant donné que la protéinurie est un marqueur de dysfonction rénale notamment retrouvé lors d'une atteinte glomérulaire, nous avons choisi de comparer les paramètres de morphologie érythrocytaire entre deux groupes d'échantillons présentant une hématurie > 20 hématies/ μ L et différant par la présence ou non d'une protéinurie. Ainsi ces paramètres semblent différer significativement entre ces deux groupes. Tout d'abord, nous observons une proportion plus élevée d'hématies dysmorphiques, évaluée par le paramètre « RBC-Info » dans le groupe protéinurie (groupe A). De plus, dans ce groupe, les petites hématies sont prédominantes en termes de pourcentage (55% Small RBC) par rapport aux hématies totales et par rapport aux hématies non lysées (64 % URD) mais également en termes d'indice de taille RBC-P70Fsc (95 ch). Ces observations sont comparables à celles de l'étude de Cho *et al.* en 2021, qui avait pour objectif d'évaluer ces paramètres pour différencier les hématuries glomérulaires des non-glomérulaires. Ainsi, les auteurs rapportent une plus grande proportion de petites hématies avoisinant 50% des hématies totales (Small RBC) ainsi qu'une valeur moyenne de 100 ch de l'indice RBC-P70-Fsc comme étant en faveur d'une origine glomérulaire de l'hématurie. Ils concluent que l'URD (%) couplé à la présence d'une protéinurie permet de discriminer d'une façon fiable les hématuries glomérulaires des non-glomérulaires.

Au vu de nos résultats, les perspectives de ce travail sont diverses. Une première serait d'étudier la limite de référence comme seuil diagnostic de différentes pathologies rénales ou urologiques. La seconde serait de confirmer en pratique les performances des marqueurs de morphologie érythrocytaire dans la différenciation de l'origine d'une

hématurie afin d'orienter les explorations diagnostiques. Enfin, il serait intéressant d'évaluer ces paramètres pour des populations spécifiques, comme les transplantés rénaux. En effet, en France, l'hématurie est un des paramètres de surveillance des transplantés rénaux recommandé par la Haute Autorité de Santé après 3 mois post-greffe (79). Une étude portant sur un seuil d'hématurie et sa cinétique d'évolution couplé à la morphologie érythrocytaire, comme marqueur précoce de dysfonction rénale dans le suivi des patients transplantés rénaux serait également une perspective intéressante.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous proposons par le biais de cette étude un intervalle de référence d'hématies dans les urines de 0 à 10 hématies/ μ L établi à l'aide d'un automate de CMF (l'UF-4000 Sysmex, Japon). Cette limite de référence (< 10 hématies/ μ L) doit faire l'objet d'une évaluation clinique afin de déterminer si elle peut servir de seuil de décision diagnostique dans certaines pathologies. De plus, cette étude confirme que les paramètres de morphologie érythrocytaire comme le pourcentage de petites hématies ou les paramètres URD et RBC-P70Fsc pourraient servir de marqueurs de dysfonction rénale et aider dans l'orientation des explorations diagnostiques.

REFERENCES

1. Queremel Milani DA, Jialal I. Urinalysis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557685/>
2. Oyaert M, Delanghe J. Progress in Automated Urinalysis. *Ann Lab Med.* 28 janv 2019;39(1):15-22.
3. Delanghe JR, Kouri TT, Huber AR, Hannemann-Pohl K, Guder WG, Lun A, et al. The role of automated urine particle flow cytometry in clinical practice. *Clin Chim Acta.* nov 2000;301(1-2):1-18.
4. Mundt LA, Shanahan K. *Graff's textbook of urinalysis and body fluids.* Third edition. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning; 2020.
5. Hickling DR, Sun TT, Wu XR. Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. Mulvey MA, Stapleton AE, Klumpp DJ, éditeurs. *Microbiol Spectr.* 2 juill 2015;3(4):3.4.21.
6. Gueutin V, Deray G, Isnard-Bagnis C. Physiologie rénale. *Bull Cancer (Paris).* mars 2012;99(3):237-49.
7. Dembele M, Delafosse M, Yousfi N, Debiec H, Ngo K, Plaisier E, et al. Modélisation de la barrière de filtration glomérulaire: Nouvelles avancées. *médecine/sciences.* mars 2021;37(3):242-8.
8. *Néphrologie: collège universitaire de enseignants de néphrologie.* 10e édition. 2022. (ECNi, les référentiels).
9. Perucca J, Bouby N, Valeix P, Bankir L. Sex difference in urine concentration across differing ages, sodium intake, and level of kidney disease. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* févr 2007;292(2):R700-5.
10. Bankir L, Perucca J, Weinberger MH. Ethnic Differences in Urine Concentration: Possible Relationship to Blood Pressure. *Clin J Am Soc Nephrol.* mars 2007;2(2):304-12.
11. Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. ALDOSTERONE. *Adv Physiol Educ.* mars 2002;26(1):8-20.
12. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, et al. The Human Urine Metabolome. Dzeja P, éditeur. *PLoS ONE.* 4 sept 2013;8(9):e73076.
13. Reitzer L, Zimmern P. Rapid Growth and Metabolism of Uropathogenic *Escherichia coli* in Relation to Urine Composition. *Clin Microbiol Rev.* 18 déc 2019;33(1):e00101-19.
14. Pressac M. [Tamm-Horsfall protein]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2000;58(2):167-76.
15. Toto RD. Microalbuminuria: Definition, Detection, and Clinical Significance. *J Clin Hypertens.* nov 2004;6(s11):2-7.
16. Piéroni L, Cristol JP. Urinary biomarkers of kidney dysfunction. *Ann Biol Clin (Paris).* mars 2015;73(2):151-7.

17. Peterson JC. Blood Pressure Control, Proteinuria, and the Progression of Renal Disease: The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Ann Intern Med.* 15 nov 1995;123(10):754.
18. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, Sandberg S, Aakre KM, McQueen MJ, et al. Current Issues in Measurement and Reporting of Urinary Albumin Excretion. *Clin Chem.* 1 janv 2009;55(1):24-38.
19. Levey AS, Becker C, Inker LA. Glomerular Filtration Rate and Albuminuria for Detection and Staging of Acute and Chronic Kidney Disease in Adults: A Systematic Review. *JAMA.* 24 févr 2015;313(8):837.
20. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers—A General Review. *Curr Protoc Pharmacol.* mars 2017 ;76(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpph.19>
21. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, Hebert L, Levey AS, Parving HH, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *Am J Kidney Dis.* oct 2003;42(4):617-22.
22. Cameron MA, Maalouf NM, Adams-Huet B, Moe OW, Sakhaee K. Urine Composition in Type 2 Diabetes: Predisposition to Uric Acid Nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol.* mai 2006;17(5):1422-8.
23. Elliot JS, Sharp RF, Lewis L. Urinary pH. *J Urol.* févr 1959;81(2):339-43.
24. Alguacil J, Kogevinas M, Silverman DT, Malats N, Real FX, García-Closas M, et al. Urinary pH, cigarette smoking and bladder cancer risk. *Carcinogenesis.* juin 2011;32(6):843-7.
25. Wagner CA, Mohebbi N. Urinary pH and stone formation. *J Nephrol.* 2010;23 Suppl 16:S165-169.
26. Molinié V, Vieillefond A. Apport de la cytologie urinaire (méthodologie, intérêt et limites). *Rev Francoph Lab.* janv 2008;2008(398):25-36.
27. Chen YT, Hsu HJ, Hsu CK, Lee CC, Hsu KH, Sun CY, et al. Correlation between spot and 24h proteinuria: Derivation and validation of equation to estimate daily proteinuria. Shimosawa T, éditeur. *PLOS ONE.* 2 avr 2019;14(4):e0214614.
28. American Diabetes Association. Standards of Medical Care for Patients With Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1 janv 2003;26(suppl_1):s33-50.
29. Haute Autorité de Santé. Évaluation du rapport albuminurie/créatininurie dans le diagnostic de la maladie rénale chronique chez l'adulte. déc 2011.
30. Aspevall O, Hallander H, Gant V, Kouri T. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clin Microbiol Infect.* avr 2001;7(4):173-8.

31. Kavuru V, Vu T, Karageorge L, Choudhury D, Senger R, Robertson J. Dipstick analysis of urine chemistry: benefits and limitations of dry chemistry-based assays. *Postgrad Med.* 2 avr 2020;132(3):225-33.
32. Oyaert M, Delanghe JR. Semiquantitative, fully automated urine test strip analysis. *J Clin Lab Anal.* juin 2019 ; 33 (5) ; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.22870>
33. On behalf of the ARK Consortium, Currin SD, Gondwe MS, Mayindi NB, Chipungu S, Khoza BL, et al. Diagnostic accuracy of semiquantitative point of care urine albumin to creatinine ratio and urine dipstick analysis in a primary care resource limited setting in South Africa. *BMC Nephrol.* déc 2021;22(1):103.
34. Zafrani L, Monneret G. *Comprendre la cytométrie en flux.* 2017;
35. Willis GC, Tewelde SZ. The Approach to the Patient with Hematuria. *Emerg Med Clin North Am.* nov 2019;37(4):755-69.
36. Barocas DA, Boorjian SA, Alvarez RD, Downs TM, Gross CP, Hamilton BD, et al. Microhematuria: AUA/SUFU Guideline. *J Urol.* oct 2020;204(4):778-86.
37. Ingelfinger JR. Hematuria in Adults. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med.* 8 juill 2021;385(2):153-63.
38. Jung H, Gleason JM, Loo RK, Patel HS, Slezak JM, Jacobsen SJ. Association of Hematuria on Microscopic Urinalysis and Risk of Urinary Tract Cancer. *J Urol.* mai 2011;185(5):1698-703.
39. Mohr DN. Asymptomatic Microhematuria and Urologic Disease: A Population-Based Study. *JAMA.* 11 juill 1986;256(2):224.
40. Samson P, Waingankar N, Shah P, Friedman D, Kavoussi L, Han J. Predictors of genitourinary malignancy in patients with asymptomatic microscopic hematuria. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* janv 2018;36(1):10.e1-10.e6.
41. Bolenz C, Schröppel B, Eisenhardt A, Schmitz-Dräger BJ, Grimm MO. The Investigation of Hematuria. *Dtsch Ärztebl Int.* 30 nov 2018. Disponible sur : <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2018.0801>
42. Wollin T, Laroche B, Psooy K. Canadian guidelines for the management of asymptomatic microscopic hematuria in adults. *Can Urol Assoc J.* 25 avr 2013;3(1):77.
43. Horie S, Ito S, Okada H, Kikuchi H, Narita I, Nishiyama T, et al. Japanese guidelines of the management of hematuria 2013. *Clin Exp Nephrol.* oct 2014;18(5):679-89.
44. Methven S. Clinical management of chronic kidney disease.
45. Goldberg DL. BAUS/RA Guidelines: Initial assessment of haematuria.
46. Malmstrom PU. Time to abandon testing for microscopic haematuria in adults? *BMJ.* 12 avr 2003;326(7393):813-5.

47. Addis T. THE NUMBER OF FORMED ELEMENTS IN THE URINARY SEDIMENT OF NORMAL INDIVIDUALS *. *J Clin Invest.* 1 juin 1926;2(5):409-15.
48. Wright WT. Cell Counts in Urine. *Arch Intern Med.* 1 janv 1959;103(1):76.
49. Sutton JM. Evaluation of hematuria in adults. *JAMA.* 9 mai 1990;263(18):2475-80.
50. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS, Hricak H, Shuler CL, Agerter DC, et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy—part I: definition, detection, prevalence, and etiology. *Urology.* avr 2001;57(4):599-603.
51. Hyodo T, Kumano K, Haga M, Sakai T, Fukuda M, Isami Y, et al. Analysis of Urinary Red Blood Cells of Healthy Individuals by an Automated Urinary Flow Cytometer. *Nephron.* 1997;75(4):451-7.
52. Terajima S, Yokomizo H, Yagi A, Miura M, Amano C, Int'l SJ. Evaluation Study for Reference Intervals of Urine Sediments Using UF-1000i in Medical Checkup Population. 2009;19(1).
53. Wang L, Wang H, Zhao C, Chen C. The standardization of the report for urine cell counting—A converting factor for Sysmex UF-1000i. *J Clin Lab Anal.* mai 2019;33(4):e22857.
54. Birch DF, Fairley KF. HÆMATURIA: GLOMERULAR OR NON-GLOMERULAR? *The Lancet.* oct 1979;314(8147):845-6.
55. Köhler H, Wandel E, Brunck B. Acanthocyturia—A characteristic marker for glomerular bleeding. *Kidney Int.* juill 1991;40(1):115-20.
56. Zaman Z, Proesmans W. Dysmorphic erythrocytes and G1 cells as markers of glomerular hematuria. *Pediatr Nephrol.* 16 août 2000;14(10-11):980-4.
57. Saha MK, Massicotte-Azarniouch D, Reynolds ML, Mottl AK, Falk RJ, Jennette JC, et al. Glomerular Hematuria and the Utility of Urine Microscopy: A Review. *Am J Kidney Dis.* sept 2022;80(3):383-92.
58. Hyodo T, Kumano K, Sakai T. Differential Diagnosis between Glomerular and Nonglomerular Hematuria by Automated Urinary Flow Cytometer. *Nephron.* 1999;82(4):312-23.
59. Koo KC, Lee KS, Choi AR, Rha KH, Hong SJ, Chung BH. Diagnostic impact of dysmorphic red blood cells on evaluating microscopic hematuria: the urologist's perspective. *Int Urol Nephrol.* juill 2016;48(7):1021-7.
60. Schneider F, Maurer C, Friedberg RC. International Organization for Standardization (ISO) 15189. *Ann Lab Med.* 1 sept 2017;37(5):365-70.

61. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem Z Klin Chem Klin Biochem*. mai 1987;25(5):337-42.
62. Henny J. Determining and verifying reference intervals in clinical laboratories. *Ann Biol Clin (Paris)*. mars 2011;69(2):229-37.
63. C28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. 2012;
64. Rémic: référentiel en microbiologie médicale. 7e édition, 2022. Paris: Société française de microbiologie; 2022.
65. Westgard JO, Westgard SA. Establishing Evidence-Based Statistical Quality Control Practices. *Am J Clin Pathol*. 1 mars 2019;151(4):364-70.
66. Liu W, Bretz F, Cortina-Borja M. Reference range: Which statistical intervals to use? *Stat Methods Med Res*. févr 2021;30(2):523-34.
67. Schäfer H. STATISTICAL BASIS OF REFERENCE VALUES IN LABORATORY MEDICINE. *Stat Med*. 30 oct 1996;15(20):2266-2266.
68. Tuey JW. Exploratory data analysis. 1977.
69. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: a user's guide. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry. Inc; 2005.
70. Tukey JW. Exploratory data analysis. Reading, Mass: Addison-Wesley Pub. Co; 1977. 688 p. (Addison-Wesley series in behavioral science).
71. Kouri TT, Gant VA, Fogazzi GB, Hofmann W, Hallander HO, Guder WG. Towards European urinalysis guidelines. *Clin Chim Acta*. juill 2000;297(1-2):305-11.
72. Kouri T, Malminiemi O, Penders J, Pelkonen V, Vuotari L, Delanghe J. Limits of preservation of samples for urine strip tests and particle counting. *Clin Chem Lab Med*]. 1 janv 2008 ;: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2008.122/html>
73. Delanghe J, Speeckaert M. Preanalytical requirements of urinalysis. *Biochem Medica*. 2014;89-104.
74. Delanghe JR, Himpe J, De Cock N, Delanghe S, De Herde K, Stove V, et al. Sensitive albuminuria analysis using dye-binding based test strips. *Clin Chim Acta*. août 2017;471:107-12.
75. Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am*. juin 2003;17(2):227-41.

76. Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem Medica*. 2016;5-16.
77. Vlasschaert C, Lanktree MB. Microscopic hematuria.
78. Rodgers M, Nixon J, Hempel S, Aho T, Kelly J, Neal D, et al. Diagnostic tests and algorithms used in the investigation of haematuria.
79. Haute Autorité de Santé. Suivi ambulatoire de l'adulte transplanté rénal au-delà de 3 mois après transplantation. HAS. nov 2007;

ANNEXES

Annexe 1 : Principe de mesure de la bandelette BU 10S et 12S et principales interférences rapportées par le constructeur Sysmex

Paramètres analysés	Principe de mesure	Risque de faux positif	Risque de faux négatif
Urobilinogène	Méthode de couplage azoïque	Effets des médicaments (Psychotrope, antituberculeux, antipsychotiques, anti-hypertenseur)	Lorsqu'un échantillon laissé au repos est utilisé (se transforme en biliverdine par oxydation, subit une décomposition photochimique) Effets des médicaments (Acide ascorbique)
Erythrocytes	Action de l'hémoglobine Peroxydase-like	Interférences mutuelles (contact entre le glucose et les bandelettes sanguines) Effet de la lumière directe du soleil (UV) Bactériurie sévère (libération de peroxydase) Leucocyturie sévère (libération de peroxydase) Myoglobinurie Mélange d'une grande quantité de sperme (diamine oxydase) Effet des médicaments (IEC, Acide ascorbique)	Gravité spécifique élevée de l'urine Hyper-protéinurie Acide ascorbique Présence de nitrites en raison d'une infection des voies urinaires
Protéine	Erreur protéique de l'indicateur de pH	Urine alcaline dépassant le pouvoir tampon Urine à gravité spécifique élevée Hémoglobinurie sévère Présence de médicaments (antiarythmiques, psychotropes)	Urine acide dépassant le pouvoir tampon Produit de contraste iodé Globuline, protéine de Bence Jones, protéine de Tamm-Horsefall, etc.
Glucose	Méthode enzymatique (GOD et POD)	Mélange d'un agent oxydant Effet de la lumière directe du soleil (lumière UV, après que la bandelette a été retirée de son contenant) Effet des médicaments (Psychotrope)	Urine à gravité spécifique élevée Acide ascorbique Effet des médicaments (Acide ascorbique, lévodopa, analgésiques)
Corps cétonique	Méthode au nitroprusside	Effets des médicaments (Anti-hypertenseur, antiparkinsoniens)	Pas d'interférences rapportées
Bilirubine	Méthode de couplage azoté	Effets des médicaments (Psychotrope, antituberculeux, antipsychotiques, anti-hypertenseur)	Lorsqu'un échantillon laissé au repos est utilisé (se transforme en biliverdine par oxydation, subit une décomposition photochimique) Effets des médicaments (Acide ascorbique)
Nitrite	Méthode de Griess	Médicaments qui colorent l'urine en rouge (phénazopyridine, etc.)	Urine qui ne reste que peu de temps dans la vessie Effet des médicaments (Acide ascorbique)
Gravité Spécifique (S.G)	Méthode chimique (basée sur l'effet métachromatique des cations)	Pas d'interférences rapportées	Pas d'interférences rapportées
Leucocytes	Mesure de l'activité estérasique des leucocytes	Contamination vaginale lors de la collecte d'urine	Hyperprotéinurie (500 mg/dL ou plus) Gravité spécifique élevée de l'urine Présence d'inhibiteur de la trypsine dans l'urine Effet des médicaments (Antibiotiques)
pH	Méthode de l'indicateur de pH	Pas d'interférences rapportées	Pas d'interférences rapportées
Albumine	Erreur protéique de l'indicateur de pH		
Créatinine	Méthode de Benedict-Behre	Pas d'interférences rapportées	Pas d'interférences rapportées

Annexe 2 : Marqueurs biologiques évalués par la bandelette urinaire UC 12S et exemples de pathologies pour lesquelles un marqueur serait positif

Rein & TU	Foie	Pancréas		Autres
<ul style="list-style-type: none"> Infections urinaires Calculs urinaires Urétrites 			LEU	<ul style="list-style-type: none"> Inflammation induite par irradiation Intoxication médicamenteuse
	<ul style="list-style-type: none"> Hépatite aiguë / chronique Obstruction des voies biliaires 		URO	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation du catabolisme de l'hémoglobine, Ex: Maladie entraînant la destruction des GRs
	<ul style="list-style-type: none"> Obstruction des voies biliaires Cirrhose Cancer du foie 	<ul style="list-style-type: none"> Cancer du pancréas 	BIL	<ul style="list-style-type: none"> Syndrome de Dubin Johnson
<ul style="list-style-type: none"> Infections urinaires Altération de la BFG Néphropathie tubulaire Cancer des voies urinaires 			BLD	<ul style="list-style-type: none"> Hémoglobinurie (après transfusion sanguine, exposition au froid, brûlure)
<ul style="list-style-type: none"> Glycosurie rénale 		<ul style="list-style-type: none"> Acido-cétose diabétique 	CET	<ul style="list-style-type: none"> Pathologie métabolique Après un effort intense Troubles de la digestion et de l'absorption
		<ul style="list-style-type: none"> Diabète 	GLU	<ul style="list-style-type: none"> Phéochromocytome Hyperthyroïdie Syndrome de Cushing
<p>Rapport P/C et A/C</p> <ul style="list-style-type: none"> Maladie rénale chronique Néphropathie tubulaire Pathologie glomérulaire 			CRE	
			ALB	
<ul style="list-style-type: none"> Infections urinaires Mécanismes compensatoires de troubles ventilatoires Alimentation 		<ul style="list-style-type: none"> Acido-cétose diabétique Trouble ventilatoire 	PRO	<ul style="list-style-type: none"> Myélome Myxoedème Prééclampsie Après un exercice physique intense
<ul style="list-style-type: none"> Stade IV de la MRC Prise de diurétique Anurie 		<ul style="list-style-type: none"> Diabète 	pH	<ul style="list-style-type: none"> Fièvre Intoxication méthanol
<ul style="list-style-type: none"> Infections urinaires 			S.g	<ul style="list-style-type: none"> Modification important de l'état d'hydratation
			NIT	

Annexe 3 : Fréquence de distribution des cellules épithéliales (CE) dans l'urine dans notre groupe de référence

CE/ μ L	Fréquence		Total
	Hommes	Femmes	
0	45	7	52
1	58	6	64
2	16	11	27
3	11	14	25
4	7	8	15
5	5	5	10
6	3	5	8
7	0	4	4
8	0	1	1
9	2	1	3
10	2	1	3
11	2	1	3
13	0	3	3
14	1	1	2
15	0	1	1
17	0	1	1
21	0	1	1
28	0	1	1

Les valeurs colorées en rouge sont les outliers identifiés dans le groupe de référence et les valeurs colorées en orange sont les outliers identifiés par sous-groupe en fonction du sexe.

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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



BOUTOUCHENT Nassim

Détermination d'un intervalle de référence d'hématies dans les urines à l'aide d'une méthode automatisée par cytométrie en flux

Th. D. Pharm., Rouen, 2023, 55 p.

RESUME

L'hématurie microscopique (HM) est un marqueur important dans le dépistage et le diagnostic de pathologies rénale ou urologique. L'avènement de méthodes quantitatives automatisées comme la cytométrie en flux (CMF) ont révolutionné la cytologie urinaire en matière de précision et de reproductibilité par rapport à la méthode manuelle en microscopie optique. Actuellement, la définition d'une HM repose sur des valeurs établies en microscopie optique et à notre connaissance, il n'existe pas de valeurs établies par CMF.

Ce travail avait pour but de déterminer un intervalle de référence des hématies (GR) dans les urines à l'aide d'un automate de CMF, l'UF-4000 (Sysmex, Japon) et d'évaluer l'intérêt des paramètres renseignant sur la morphologie érythrocytaire.

Un groupe de 224 échantillons de référence a permis d'estimer des limites de référence de 10 GR/ μ L à un IC90% de [10 - 11] et de 12/ μ L à un IC95% de [11 - 13]. Concernant les sous-groupes selon le sexe, la limite de référence pour un IC90% était de 11 GR/ μ L [10 - 12] chez l'homme et de 9 GR/ μ L [8 - 10] chez la femme. L'application de la valeur limite de 10 GR/ μ L à une population de 718 échantillons (hors groupe de référence) a montré qu'une proportion plus importante d'échantillons ayant plus de 10 GR/ μ L présentait une protéinurie par comparaison à ceux ayant moins de 10 GR/ μ L (58% vs 42% ; $p < 0,0001$). Les paramètres morphologiques érythrocytaires ont été comparés entre 2 groupes de plus de 20 GR/ μ L : le groupe A avec protéinurie et le groupe B sans protéinurie. Nous avons observé une proportion plus élevée de GR de morphologie anormale et de petite taille dans le groupe A que dans le groupe B (84% vs 57% ; $p < 0.005$).

En conclusion, nous proposons un intervalle de référence de 0 à 10 GR/ μ L déterminé par CMF dans les urines. Cette limite de référence (< 10 GR/ μ L) doit faire l'objet d'une évaluation comme seuil diagnostic. De plus, cette étude confirme que les paramètres de morphologie érythrocytaire pourraient servir de marqueurs de dysfonction rénale et aider dans l'orientation des explorations diagnostiques.

MOTS CLES : Cytométrie en flux – UF4000 Sysmex – Intervalle de référence – Hématurie

JURY

Président : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON, PU-PH

Membres : Madame le Professeur Soumeiya BEKRI, PU-PH
Madame le Docteur Sophie BOYER, PH
Monsieur le Docteur Thomas GUEUDET, PH
Madame le Docteur Mélanie HANOY, PH

DATE DE SOUTENANCE : 03 juillet 2023