

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2016

THESE N°: 48

AUTOMATISME EN HEMATOLOGIE CELLULAIRE

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. Faiza NQUILA

Née le 12 Août 1990 à Loudaya Marrakech

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Automates d'hématologies – Compteurs de cellules – Erreurs de décompte –
Hémogramme automatisé.

JURY

Mr. A. MASRAR

Professeur d'Hématologie Biologique

PRESIDENT

Mme. S. BENKIRANE

Professeur d'Hématologie Biologique

RAPPORTEUR

Mme. M. NAZIH

Professeur d'Hématologie Biologique

Mr. A. DAMI

Professeur de Biochimie

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ﴾ (1)

خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ (2)

اقْرَأْ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ (3)

الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ (4)

عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ﴾ (5)

سورة العلق

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969	: Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974	: Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981	: Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989	: Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997	: Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003	: Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013	: Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :

Doyen	: Professeur Mohamed ADNIAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes	Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération	Professeur Taoufik DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie	Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général	: Mr. El Hassane AHALLAT

1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid*	Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
-------------------------	----------------------

Novembre 1983

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI	Rhumatologie
-------------------------------	--------------

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <i>Clinique Royale</i>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
Pr. BENSALD Younes	Pathologie Chirurgicale
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali	Radiologie
---------------	------------

Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. EL YAACoubi Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYAoui Mohamed

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed

Décembre 1989

Pr. ADNAoui Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOU DA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAoui Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOU DA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya

Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Médecine Interne – **Doyen de la FMPR**
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – **Doyen de la FMPO**
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – **Dir. du Centre National PV**
Chimie thérapeutique

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie

Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*

Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie **Inspecteur du SS**
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation – **Dir. HMIM**
Anesthésie Réanimation

Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSEINI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. MOHAMMADI Mohamed
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - **Directeur ERSM**
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Radiologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie
Neurologie – **Doyen Abulcassis**
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AIT OURHROUI Mohamed
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. HSSAIDA Rachid*
Pr. LAHLOU Abdou
Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil
Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

ORL

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie

Pr. EL HIJRI Ahmed
 Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
 Pr. EL MADHI Tarik
 Pr. EL OUNANI Mohamed
 Pr. ETTAIR Said
 Pr. GAZZAZ Miloudi*
 Pr. HRORA Abdelmalek
 Pr. KABBAJ Saad
 Pr. KABIRI EL Hassane*
 Pr. LAMRANI Moulay Omar
 Pr. LEKEHAL Brahim
 Pr. MAHASSIN Fattouma*
 Pr. MEDARHRI Jalil
 Pr. MIKDAME Mohammed*
 Pr. MOHSINE Raouf
 Pr. NOUINI Yassine
 Pr. SABBAH Farid
 Pr. SEFIANI Yasser
 Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 Pr. AMEUR Ahmed *
 Pr. AMRI Rachida
 Pr. AOURARH Aziz*
 Pr. BAMOU Youssef *
 Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 Pr. BENZEKRI Laila
 Pr. BENZZOUBEIR Nadia
 Pr. BERNOUSSI Zakiya
 Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. EL MANSARI Omar*
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *

Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie

Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOUE Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KHABOUZE Samira
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. LEZREK Mohammed*
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENHALIMA Hanane
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*

Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Cardiologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie
Pédiatrie
Radiologie

(mise en disponibilité)

Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. ESSAMRI Wafaa
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. GHADOUANE Mohammed*
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AMMAR Haddou*
Pr. AOUI Sarra

Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Anesthésie Réanimation

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Gastro-entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
ORL
Parasitologie

Pr. BAITE Abdelouahed*
 Pr. BALOUCH Lhousaine*
 Pr. BENZIANE Hamid*
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHARKAOUI Naoual*
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GANA Rachid
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MOUTAJ Redouane *
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. AGDR Aomar*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*

Anesthésie réanimation
 Biochimie-chimie
 Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Neuro chirurgie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologique
 Parasitologie
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

Médecine interne
 Pédiatre
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie

Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. AZENDOUR Hicham*
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. ZOUHAIR Said*

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem

Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Hématologie biologique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Microbiologie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie
 Microbiologie

Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie

Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. LEZREK Mounir
Pr. MALIH Mohamed*
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Driss*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. RAISSOUNI Maha*

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOUR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
Pr. BENSEFFAJ Nadia
Pr. BENSghir Mustapha*
Pr. BENYAHIA Mohammed*
Pr. BOUATIA Mustapha
Pr. BOUABID Ahmed Salim*
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr. CHAIB Ali*
Pr. DENDANE Tarek
Pr. DINI Nouzha*
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr. ELFATEMI Nizare
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad

Gastro entérologie
Anatomie pathologique
Ophtalmologie
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Anatomie pathologique

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie pathologique
Psychiatrie
Cardiologie

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique
Immunologie
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique

Pr. EL JOUDI Rachid*
 Pr. EL KABABRI Maria
 Pr. EL KHANNOUSSI Basma
 Pr. EL KHLouFI Samir
 Pr. EL KORAICHI Alae
 Pr. EN-NOUALI Hassane*
 Pr. ERRGUIG Laila
 Pr. FIKRI Meryim
 Pr. GHANIMI Zineb
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed*
 Pr. LATIB Rachida
 Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUY Adyl
 Pr. MRABTI Hind
 Pr. NEJJARI Rachid
 Pr. OUBEJJA Houda
 Pr. OUKABLI Mohamed*
 Pr. RAHALI Younes
 Pr. RATBI Ilham
 Pr. RAHMANI Mounia
 Pr. REDA Karim*
 Pr. REGRAGUI Wafa
 Pr. RKAIN Hanan
 Pr. ROSTOM Samira
 Pr. ROUAS Lamiaa
 Pr. ROUIBAA Fedoua*
 Pr. SALIHOUN Mouna
 Pr. SAYAH Rochde
 Pr. SEDDIK Hassan*
 Pr. ZERHOUNI Hicham
 Pr. ZINE Ali*

Toxicologie
 Pédiatrie
 Anatomie Pathologie
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 Pédiatrie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
 Pr. GHOUNDALE Omar*
 Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

***Enseignants Militaires**

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. BARKYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootechnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. HAMZAOU Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRIS Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

Mise à jour le 09/01/2015 par le

Service des Ressources Humaines

- 9 JAN 2015





Remerciements



*Soyons reconnaissants aux personnes
qui nous donnent du bonheur ;
elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*



*A ALLAH le tout miséricordieux, le tout puissant
Qui m'a inspiré, Qui m'a guidé dans le bon chemin,
Je vous dois ce que je suis devenue,
soumission, louanges et remerciements,
pour votre clémence et miséricorde.*



À Notre Maître Et Président Du Jury
Monsieur, AZLARAB MASRAR
Chef de Service Hématologie Biologique
Centre Hospitalier Ibn Sina Rabat
Professeur d'Hématologie Biologique

*Nous sommes très honorés de votre participation autant que président
du jury de cette thèse malgré vos nombreuses préoccupations.*

*Veillez trouver aussi l'expression de notre profonde gratitude et de
notre admiration pour l'homme que vous êtes d'abord, pour l'homme
de science exerçant son métier avec abnégation et rigueur.*

*Un simple mot de merci n'est pas suffisant
pour vous exprimer notre grande estime.*



*À Notre Maître Et Rapporteur De Thèse
Madame, SOUAD BENKIRANE
Professeur d'Hématologie Biologique*

*C'est un grand honneur de nous confier ce travail,
Je vous remercie énormément pour la spontanéité avec laquelle vous
avez bien voulu m'encadrer et l'amabilité avec laquelle vous m'avez
m'accordé une partie de votre temps précieux. Votre gentillesse, votre
compétence, votre sagesse, et votre sympathie inspirent une grande
estime. En choisissant de travailler sous votre direction,
Je rends hommage à votre savoir, à votre loyauté et à votre admirable
humanisme. Veuillez croire, cher maître, en l'expression de ma grande
profonde gratitude et de ma très sincère Considération
et mon profond respect.*



*À notre maitre et juge de thèse
Madame, MONA NAZIH
Professeur d'Hématologie biologique*

Vous me faites un immense plaisir en acceptant de juger ma thèse.

*Qu'elle me soit permis de témoigner à travers ces quelques lignes
mon admiration à la valeur de vos compétences, votre rigueur ainsi
que votre dynamisme qui demeurent pour moi le meilleur exemple.*

*Que ce travail soit une occasion de vous exprimer ma gratitude,
et mes sincères respects.*



À notre maitre et juge de thèse
Monsieur, ABDELLAH DAMI
Professeur de Biochimie

Nous vous remercions d'avoir voulu répondre
à notre souhait de vous voir siéger parmi nos membres de jury.

En acceptant de juger notre travail,
vous nous accordez un très grand honneur.

Veillez accepter l'expression de nos considérations
les plus distinguées.





Dédicaces



Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut....

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
l'amour, le respect, la reconnaissance....*

Aussi, c'est tout simplement que :

Je dédie cette thèse à ... ✍



A mes chers Parents

Nquila Ahmed et Belfaiz Latifa

*Merci pour votre amour, pour tout l'enseignement
que vous m'avez transmis, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir
toujours soutenu, pour vos sacrifices, pour l'encouragement
sans limites*

*que vous ne cessiez de m'offrir, pour votre soutien
dans les moments difficiles, pour votre courage et patience...*

*Vos prières n'ont jamais cessé et si je suis à cette étape
de la vie c'est grâce à vos encouragements et vos paroles de soutien.*

*Les mots seuls ne pourraient exprimer tout mon amour ni mon
estime pour vous. Ce travail est le vôtre.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer ni la profondeur de mes
sentiments ni l'amplitude de ma reconnaissance*

*Puisse dieu le tout puissant vous combler de bonne santé et vous
accorder longue vie pleine de bonheur et prospérité.*

Je vous aime mes très chers parents.



A mon cher frère Abdelilah

Ton aide, ta générosité, ton soutien ont été pour moi une source de courage et de confiance. Qu'il me soit permis aujourd'hui de t'assurer mon profond amour et ma grande reconnaissance.

*Qu'ALLAH te protège et t'assure bonheur,
santé et succès dans ta vie.*

Je te dédie cette thèse qui concrétise ton rêve le plus cher et qui n'est que le fruit de tes conseils et de tes encouragements.

Je t'aime mon adorable frère.



A mes Adorables Frères Et Sœurs

Touria, Zineb, Lamia, Hicham Et Ismail

A qui je tiens énormément pour vos grands cœurs et vos générosités.

*Que ce travail soit l'expression de mon grand attachement et ma
gratitude pour tout moment de joie partagé ensemble.*

*Que le grand dieu vous offre un avenir plein
de réussite et de bonheur.*

Je vous aime énormément mes chers.



A mes chers grands-Parents

Paternels Et Maternels

*J'ai toujours senti votre présence qui m'a apporté
encouragement et réconfort à travers vos longues prières.*

*Votre grande affection et votre générosité m'ont toujours
impressionnée.*

*Puisse ce travail être le témoignage de ma reconnaissance
de mon grand amour pour vous.*

*A la mémoire de mon grand-
père maternel*

*Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir
ce bonheur ensemble.*

*Puisse Dieu tout puissant, assurer le repos de votre âme
par sa sainte miséricorde, de vous accorder sa clémence et de vous
accueillir dans son saint paradis...*



A mes chers oncles, tantes,

leurs époux et épouses

A mes chers cousins et cousines

Puisse ce travail être le reflet de mon admiration et mon respect

Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi.

*Je vous souhaite beaucoup de bonheur et surtout
une très bonne santé.*

*A mes chères amis: Safaa, Meriem, Saloua, Ghita, Hajar,
Zineb, Hafida, Sara, Souad, Najat, Said, Salem, Abderrazzak,...*

En souvenir des moments agréables passés ensemble

*Merci pour les bons moments qu'on a passé ensemble, de votre
soutien et de votre serviabilité.*

*Je vous souhaite une brillante réussite dans la vie professionnelle,
une bonne santé et une vie inondée de bonheur.*



*Une spéciale dédicace a une personne
qui compte énormément pour moi,
et pour qui je porte beaucoup
de tendresse et de respect*

*Il y a des jours où l'on est fatiguée, où l'on est surchargée de travail,
où l'on n'a pas le moral, des jours où rien ne va.*

*Il y a des jours où l'on se sent seule, triste, découragée,
des jours où l'on a envie de pleurer.*

*Et puis, il y a une personne qui est là, visible ou parfois
dans l'ombre, une personne qui ne fait pas de bruit,
mais qui est pourtant bien présente, une personne qui m'aide (sans
forcément toujours s'en rendre compte), une personne qui m'aime,
qui est attentive, et qui m'offre des sourires, des attentions, des mots
doux, et tout cela, par pure gentillesse, générosité, bonté, par amitié,
et qui n'attende rien en retour. Cette personne-là, je voudrais te dire
combien ta bienveillance m'est douce et combien je t'aime...*

J'ai le plaisir de te dédier ce modeste travail.

A Toi ELBOUZIANI Hayat



Mention Spéciale A Professeur

Taieb AGOURAM

Je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements.

*Nous sommes très sensibles à votre gentillesse, vos conseils, votre
volonté d'enseigner et à votre profonde humanité.*

*Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre
admiration ainsi que notre gratitude.*

Veillez croire en nos sentiments les plus respectueux.

A toute la famille NQUILA

A tous mes amis et camarades de promotion

A toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail

*à tous ceux ou celles qui me sont chers
et que j'ai omis involontairement de citer.*





Liste des illustrations



LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Diversité des Unopettes®	p 18
Tableau II	les cellules sanguines normales sur frottis coloré au MGG (objectif x 100)	p 30
Tableau III	Les principales technologies actuellement disponibles pour l'analyse automatisée de l'héogramme avec certains AHC	p 52
Tableau IV	Paramètres des frottis de sangs effectués par l'équipement Sysmex® SP-1000i calculée à partir de l'hématocrite du patient	p 54
Tableau V	Les principales situations associées à une anomalie de la numération plaquettaire automatisée	p 71
Tableau VI	Les principales causes préanalytiques donnant une PTP non EDTA dépendante et les mesures correctives pour y remédier.	p 90
Tableau VII	Les principales situations associées à une anomalie de la numération leucocytaire automatisée	p 119
Tableau VIII	pathologies pouvant être associées au phénomène de leucoagglutination	p 121
Tableau IX	Données de la littérature des cas de pseudo agglutination des lymphocytes due à l'EDTA	p 132
Tableau X	principales anomalies de la formule leucocytaire automatisée	p 146
Tableau XI	les principales situations perturbant la mesure de l'hémoglobine	p 155
Tableau XII	Les principales situations perturbant la mesure des globules rouges	p 163
Tableau XIII	principales situations conduisant à une erreur de détermination du volume globulaire moyen ou de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine	p 172
Tableau XIV	les Sources possibles d'interférence avec méthodes automatisées d'analyse de réticulocytes	p 181
Tableau XV	Extrait du SH INF 50 «portées types d'accréditation »	p 185
Tableau XVI	Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux informations concernant le patient.	p 190
Tableau XVII	Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la numération globulaire	p 193
Tableau XVIII	Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la formule leucocytaire	p 204

LISTE DES FIGURES

Figure 1	L'ancêtre compteur Coulter, modèle A, commercialisé aux U.S.A en 1956	p 7
Figure 2	A gauche Coulter modèle F (années 70) ; au centre Coulter modèle S (années 80) ; à droite Coulter modèle STKS (années 90) (Impédance, radiofréquence et diffraction laser)	p 8
Figure 3	Numération des cellules à l'hématimétrie avant l'automatisme	p 13
Figure 4	(A) et (B) Technique d'étalement d'un frottis sanguin (C) Répartition des cellules dans les différentes zones d'un frottis	p 23
Figure 5	Formule leucocytaire au microscope sur frottis coloré au MGG	p 28
Figure 6	Diminution du temps de réponse corrélé à la diminution du nombre d'étapes manuelles d'après les travaux de R. Dadoun. Illustrations adaptées avec l'aimable consentement de R. Dadoun. *Statistiquement significatif ($p < 0,01$)	p 33
Figure 7	Description par Coulter de son système de comptage des cellules sanguines	p 35
Figure 8	Schéma simplifié du principe de Coulter	p 35
Figure 9	Principe de l'impédance avec méthode d'hydrofocalisation	p 36
Figure 10	Construction des histogrammes, répartition des impulsions dans des canaux	p 37
Figure 11	Histogramme des hématies illustrant le concept d'IDR	p 38
Figure 12	Histogramme des plaquettes.	p 38
Figure 13	Histogramme différentiel volumétrique des leucocytes, détermination de 3 sous populations	p 39

Figure 14	Représentation schématique de la mesure automatique de l'Ht par procédé de détection du cumul des hauteurs d'impulsions	p 40
Figure 15	Formule de la mesure automatique de l'Ht	p 41
Figure 16	Diffraction Laser multi angulaire (Abbott Diagnostics)	p 43
Figure 17	le graphique de corrélation différentiel de sysmex indique les positions ou il est probable de trouver les populations anormales	p 44
Figure18	Visualisation des agrégats plaquettaires sur les histogrammes des automates. A : avec l'automate XE-2100 (Sysmex), les amas apparaissent sur l'histogramme DIFF (formule leucocytaire) sous forme d'un nuage allongé (graphe de gauche ; flèche). Sur le graphe qui visualise une éventuelle myélémie (IMI), ces amas forment un nuage qui prolonge le nuage des leucocytes (centre ; flèche). Sur le schéma de droite, on remarque l'absence de retour à la base de l'histogramme des volumes plaquettaires (flèche). B : avec l'automate Cell-Dyn Sapphire (Abbott), à côté des populations leucocytaires normales (image de gauche), l'histogramme taille/complexité visualise un nuage anormal (en noir, image de droite). C : avec l'automate Advia 2120 (Siemens) on observe sur l'histogramme de droite (formule Perox) un nuage de points (en blanc), absent de l'image normale (à gauche), et qui recouvre une zone particulière dans laquelle ces amas seront énumérés. E = éosinophiles ; Ly = lymphocytes ; M = monocytes ; N = neutrophiles	p 80
Figure 19	Agrégats de plaquettes sur frottis sanguin (adulte sain) : petit agrégat composé de 4 à 7 plaquettes (à gauche) [40] et grand agrégat composé d'une dizaine de plaquettes (à droite)	p 81
Figure 20	Satellitisme des plaquettes autour des polynucléaires neutrophiles	p 84
Figure 21	Satellitisme des plaquettes autour des lymphocytes atypiques	p 85
Figure 22	Images illustrant le satellitisme plaquettaire autour des PNN et un monocyte (A), un basophile (B) [49] et un lymphocyte (C)	p 85

Figure 23	Satellitisme des plaquettes autour des polynucléaires neutrophiles (N). L'image de gauche montre un histogramme Perox de formule leucocytaire normale. Les plaquettes adhérant aux neutrophiles provoquent une augmentation du volume des neutrophiles et un décalage vers le haut et la droite du nuage habituel (image de droite) (Advia 2120, Siemens)	p 86
Figure 24	A, B et C : L'image A montre que sur certains neutrophiles les plaquettes commencent à s'agglutiner entre elles et se préparent à quitter la membrane (pour former de petits amas plaquettaires). L'image B et C montre des amas de neutrophiles entourés de plaquettes ». Les images montrent que les neutrophiles n'adhèrent pas directement entre eux mais par l'intermédiaire des plaquettes	p 88
Figure 25	Courbe de comptage brut des plaquettes en rapport avec la présence de plaquettes de grand volume. Arrêt de la courbe à 20 fl sans extrapolation	p 94
Figure 26	Graphe LMG : interférence par des particules de petit volume (flèche)	p 95
Figure 27	Frottis sanguin colorés au MGG : plaquettes de taille normale (à gauche), macroplaquettes (au centre) et plaquettes géantes (à droite) MGG	p 95
Figure 28	Courbe de distribution de la taille/volume plaquettaire obtenue à l'aide de l'automate Pentra 120, ABX (A) et de l'Advia 120, Siemens (B) à partir du même prélèvement EDTA	p 98
Figure 29	Frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (X63) montrant de rares plaquettes de petite taille, d'aspect punctiforme, sans différenciation granulomère-hyalomère	p 99
Figure 30	Cytogramme taille/structure des plaquettes de petite taille du patient par rapport à celles d'un témoin, analysées par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson)	p 99

Figure 31	Perturbation de la numération plaquettaire en présence de microcytes ou de schizocytes au cours des microangiopathies thrombotiques. Les plaquettes et les fragments de globules rouges les plus petits ont des volumes comparables, et sont difficiles à séparer avec la technique par impédance (A : histogramme normal ; B : présence de schizocytes perturbant la séparation plaquettes-hématies), alors que la technique optique discrimine bien les deux types de particules par leurs réfringences très différentes (C : histogramme normal ; D : les schizocytes (en noir) sont bien en dehors de la fenêtre localisant les plaquettes (orange)). (Cell-Dyn Sapphire, Abbott)	p 103
Figure 32	Pseudothrombocytose par présence de microcytose	p 104
Figure 33	Pseudothrombocytose par présence de nombreux schizocytes	p 104
Figure 34	frottis sanguin au MGG présentant des sphérocytes (pointes de flèches) et microsphérocytes (flèches) chez un sujet brûlés	p 104
Figure 35	(A) au cours de certaines leucémies aiguës, des fragments du cytoplasme de blastes leucémiques peuvent être présents dans le sang : leur taille est assez superposable à celle des plaquettes (flèche de droite), mais ils sont habituellement très basophiles (flèche de gauche) (leucémie aiguë monoblastique, frottis sanguin coloré au MGG ; fort grossissement). (B) les fragments du cytoplasme de blastes ont une réfringence et une taille assez comparables à celles des plaquettes et perturbent le décompte des plaquettes par impédance et par technique optique (images du haut et du milieu). Par contre, la technique de décompte immunologique n'est pas influencée par ces fragments cellulaires : le nuage vert de fluorescence des plaquettes est bien séparé de celui des autres particules (Cell-Dyn Sapphire, Abbott) (image en bas)	p 106
Figure 36	Présence d'un pic de particules de taille très réduite, correspondant à des bactéries libres ou en petits amas présents dans le sang lors d'une septicémie grave. Le pic étant très étroit, l'identification des plaquettes a été par ailleurs bien réalisée et la courbe log normale a été tracée permettant de valider le résultat fourni par l'automate (STKS II, Beckman-Coulter)	p 109

Figure 37	Étalements sanguins colorés au May-Grünwald Giemsa. (A) nombreuses bactéries libres, avec tendance à coller aux hématies (têtes de flèche), et d'autres intraleucocytaires, localisées dans des vacuoles de granulocytes neutrophiles (flèches). (B) altérations cellulaires associées, avec notamment une déformation cellulaire et un noyau bizarrement segmenté	p 109
Figure 38	En présence de cryoglobulines l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire (à gauche) n'est pas perturbé, alors que celui visualisant la présence d'une éventuelle myélémie (au centre) montre un excès de particules (fusée de points bleus). La numération plaquettaire par impédance est nettement perturbée par la présence d'une grande quantité de particules anormales et de taille réduite (histogramme à droite). Le décompte par technique optique n'est pas perturbé et fournit un résultat convenable (PLQ-O). Les messages d'alerte sont peu spécifiques (patient au diagnostic d'une maladie de Waldenström avec cryoglobulinémie de type 1) (Sysmex XE-2100)	p 114
Figure 39	A : cryoglobulines sous forme de cristaux fusiformes (microscopie de contraste, original grossissement x400). B : précipités réfringents mince (microscopie de contraste, original grossissement x650)	p 115
Figure 40	Frottis sanguin montrant amas de particules amorphes et rosées entre les hématies (May-Grünwald -Giemsa, original grossissement x 1000)	p 115
Figure 41	A : sur le frottis sanguin les cryoglobulines peuvent apparaître sous forme de petits agrégats variablement colorés ou totalement incolores mais déformant les hématies et leur conférant un aspect « mordu » ou « mangé aux mites » (coloration MGG, fort grossissement). B : Le frottis réalisé avec le prélèvement réchauffé à 37°C montre la disparition de l'aspect initialement observé, du fait de la redissolution des cryoprécipités	p 116
Figure 42	Graphes démonstratifs obtenus sur l'automate XE-2100 (Sysmex Corporation). (A) patient sans leucoagglutination ; (B) patient avec leucoagglutination. La flèche sur le graphe IMI (B) indique l'image dite « en flèche » caractéristique classiquement de la présence d'amas de plaquettes	p 125

Figure 43	Frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa observé à différents grossissements. (A) franges du frottis, de nombreux amas de globules blancs sont observés ; (B) centre du frottis, les leucocytes sont isolés, sans amas	p 126
Figure 44	Frottis sanguin colorées au MGG G x 1 000. (A) Amas de PNN. (B) amas de PNN avec cellules piégés : myélocyte, monocyte	p 126
Figure 45	Appareil Beckman-Coulter GEN's. Nuage de points anormal au niveau de l'histogramme de répartition des leucocytes. GB : 4,8 G/L ; PN : 45,5 % R ; PEO : 1,6 % R ; PB : 0,2 % R ; lympho : 18 % R ; mono : 34,7 % R. Alarme « blastes ». (Cas no 3 étudié par Jean-François Lesesve et al)	p 131
Figure 46	Amas de lymphocytes normaux (sang [A], moelle prélevée sur EDTA [B]), avec association de cellules lymphomateuses périphériques (C), en forme d'anneau (D). Coloration MGG × 1 000	p 134
Figure 47	Aspects morphologiques particuliers de l'artefact : amas étirés suivant l'axe de l'étalement (A), forme en « rosette » (B), apparence cohésive pseudo-métastatique (C). Amas de plasmocytes (D), cas no 4. Sang, MGG × 1 000 et 630	p 134
Figure 48	Présence d'érythroblastes sanguins. Les automates qui réalisent la formule leucocytaire à cinq paramètres localisent les érythroblastes sous la forme d'un nuage de particules de petite taille et de structure interne faible. Ici, l'histogramme biparamétrique de droite présente un petit nuage supplémentaire de points (en rouge : flèche) par rapport à l'histogramme témoin de gauche [N = neutrophiles ; E = éosinophiles ; Ly = lymphocytes ; M= monocytes] : il s'agit d'érythroblastes, et l'analyse à d'autres angles de diffraction et en présence d'iodure de propidium permettent de les dénombrer et de les soustraire du décompte des leucocytes totaux (Cell-Dyn Sapphire, Abbott)	p 138

Figure 49	Présence de globules rouges (GR) résistant à la lyse au cours d'une hémoglobinose C homozygote. On observe une différence entre le nombre de leucocytes du canal peroxydase « formule leucocytaire » (GB p) et sur le canal de numération leucocytaire « basophiles » (GB). L'histogramme Perox «formule leucocytaire » (à droite) visualise un nuage de particules de petite taille, partant de l'origine de l'histogramme (points blancs, en bas) chevauchant la partie basse de la fenêtre des lymphocytes (en bleu), ce qui surestime la numération leucocytaire de ce canal. On note par ailleurs une CCMH>36 g/dl, habituelle de cette hémoglobinose (Siemen Advia 120).	p 140
Figure50	Déficit partiel en myéloperoxydase (découvert de manière fortuite chez une femme jeune en consultation de fin de grossesse).La formule leucocytaire (A) montre un % faible de neutrophiles et élevé de monocytes et de grandes cellules non classées (LUC) (N<2 %). L'histogramme biparamétrique Perox (B) montre un nuage des neutrophiles dévié vers la gauche, positionné sur la fenêtre des monocytes (vert) et des LUC (bleu turquoise), alors que l'histogramme du canal « basophiles » Baso, (C) montre un nombre normal de cellules polylobées. Ceci génère une alarme. L'étude du frottis sanguin coloré au MGG montre une formule de répartition normale (71 % de neutrophiles et 7 % de monocytes), sans anomalie morphologique des neutrophiles (D), alors que la cytochimie de la myéloperoxydase (E) confirme le déficit en peroxydase dans une partie des neutrophiles (Siemens Advia 120).	p 148
Figure 51	(A) Normal VCS (volume, conductivity, and scatter) histogramme et l'autre d'un patient présentant l'infection avec le plasmodium falciparum. De 3,6% (B) démontrant l'hétérogénéité de volume (anisocytose) des lymphocytes et des monocytes. C'est dû à la présence de grandes cellules activées de la lignée monocyttaire ou de monocyte avec des changements histiocytaires.	p 149

Figure 52	Excès erroné de granulocytes basophiles au cours d'un lymphome de la zone manteau en dissémination sanguine. L'hémogramme chiffré (à gauche) signale une hyperleucocytose (GB = 27.08 G/l) avec excès de Lymphocytes de grandes cellules non colorées (LUC) et de granulocytes basophiles (Baso). L'histogramme « formule leucocytaire » au centre (Perox) montre un nuage continu de points qui chevauche les zones « lymphocytes » en bleu et « LUC » en bleu turquoise. L'histogramme du « canal basophiles » (à droite) montre un nuage de points jaunes très important (basophiles ?). De tels histogrammes imposent la réalisation d'un frottis sanguin, montrant 94 % de cellules de lymphome, sans excès de granulocytes basophiles (Siemens Advia 120).	p 151
Figure 53	Altération de la formule leucocytaire au cours du paludisme (<i>P.vivax</i>). La présence de granulocytes, ou de monocytes, ou d'hématies contenant de l'hémozoïne provoque une anomalie de polarisation de la lumière, superposable à celle des granulations des éosinophiles : les éléments riches en hémozoïne se localisent donc dans la même région que les éosinophiles et sont comptés comme tels par l'automate (nuage en rouge sur l'image de gauche). L'examen du frottis sanguin ne montre aucun éosinophile. L'image de droite est celle du patient après deux jours de traitement : la pseudo-éosinophilie a disparu (Sysmex XE 2100).	p 153
Figure 54	Interférence des lipides sur la mesure de l'hémoglobine. Les résultats initiaux de cette numération globulaire montrent une CCMH>36 g/dl et un message signale la possible perturbation de la mesure de l'hémoglobine (A) ; sur l'histogramme « formule leucocytaire» un amas de particules de taille réduite apparaît (C, flèche), alors que l'histogramme « numération des leucocytes » montre un nuage de points dont la silhouette particulière évoque la présence d'un excès de lipides (D, flèche)). La quantité d'hémoglobine de chaque GR déterminée par méthode optique en utilisant le canal « réticulocytes » permet d'obtenir l'hémoglobine réelle et de recalculer les indices érythrocytaires (B) (Sysmex XE 2100)	p 158

Figure 55	Image de double population cellulaire sur l'histogramme volumétrique des GR. La numération globulaire (A, à gauche) montre une hyperleucocytose franche avec anémie sévère, macrocytaire et hypochrome. L'histogramme des volumes des GR montre de gauche à droite le petit pic lié aux plaquettes, le pic majoritaire correspondant aux GR et un pic anormal (B, flèche). L'hyperleucocytose correspond à une leucémie lymphoïde chronique (C). L'automate utilisé ici (Sysmex XE 2100) fournit une valeur de l'hémoglobine non perturbée par l'hyperleucocytose et donne la valeur du mode du pic de GR majoritaire (= 90 fl). Avec l'aide de l'hématocrite centrifugé (= 16 %) il a été possible de rectifier les résultats de la numération des GR et les indices érythrocytaires (A, à droite). On remarque qu'une bonne partie des leucocytes a été initialement incluse dans le décompte des GR	p 166
Figure 56	Frottis de sang périphérique, coloration de May-Grunwald - Giemsa, x 1000. A: l'échantillon réanalysé après exposition au froid (4°C pendant 30 minutes) présence de grappes érythrocytaire, B : l'échantillon transféré sans exposition au froid	p 169
Figure 57	Perturbation de la numération globulaire en présence d'agglutinines froides. L'analyse réalisée à 22 °C (A et B) montre une CCMH très augmentée et un contraste flagrant entre un nombre d'hématies (GR) très faible, un hématocrite très bas (HCT) et une valeur d'hémoglobine (HGB) subnormale ; l'histogramme des volumes des GR (B) montre un pic dans la partie droite. Après incubation une heure à 37 °C et réanalyse rapide (C et D) la CCMH se normalise (appréciation correcte de la numération des GR, du VGM et de l'hématocrite par l'automate) ; le pic anormal sur l'histogramme des GR a disparu (Sysmex XE 2100).	p 169
Figure 58	Découverte d'une macrocytose hypochrome (en haut à gauche) chez un patient hospitalisé en unité de réanimation médicale. L'histogramme des volumes érythrocytaires présente une base très élargie (en bas à gauche). Un prélèvement de contrôle va permettre d'obtenir les indices érythrocytaires réels (en haut à droite) et un histogramme des volumes érythrocytaires normalisé (en bas à droite). La ponction veineuse a été primitivement réalisée à proximité d'une voie de perfusion de soluté glucosé isotonique et le contrôle réalisé par ponction au bras opposé : la différence entre les deux valeurs d'hémoglobine chiffre l'importance de la dilution liée à l'erreur de prélèvement	p 175

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: L'acide désoxyribonucléique
AHC	: automate d'hématologie cellulaire
ARN	: Acide Ribonucléique
Baso	: basophile(s)
Cg	: centigramme
CHCM	: concentration hémoglobinique corpusculaire moyenne
CIL	: Comparaison interlaboratoires
CIQ	: Contrôle interne de qualité
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EEQ	: Evaluation externe de qualité
Eo	: eosinophile(s)
Fab	: Fragment antigen binding
Fc	: Fragment cristallisable
FcγRIII	: Récepteur du fragment cristallisable gamma III
FI	: Fidélité intermédiaire
fl	: Femtolitre
GPIIb-IIIa	: Glycoprotéine IIb-IIIa
GR	: Globule rouge
Hb	: hémoglobine
HPA	: antigènes plaquettaires spécifiques
Ht	: hématocrite
IG	: Immature Granulocyte
Ig	: Immunoglobuline
IRF	: immature Reticulocyte fraction
LMG	: lymphocytes monocytes granulocytes
LUC	: large unstained cells
Lymph	: lymphocyte(s)

MAPSS : Multi Angular Polarised Scatter Separation
MCV : mean corpuscular volume
MGG : May-Grünwald-Giemsa
ml : millilitre
µl : microlitre
Mono : Monocyte(s)
MYH9 : Myosin heavy chain 9
Neut : neutrophile(s)
NRBC : nucleated red blood cell
PLAQ-F : plaquette en mode fluorescence
PLAQ-I : plaquette en mode impédance
PLT : plaquette (s)
PLT-O : fluorescent optical platelet count
PTE : Pseudothrombopénie liée à l'anticoagulant EDTA
PTP : Pseudothrombopénie
RBC : Red Blood Cell
RDW-CV: Coefficient of Variation of Red Cell Distribution Width
RDW-SD: width standard deviation
Retic : Réticulocyte(s)
RGD : Arginylglycylaspartic acid
TLA : Total Laboratory Automation
VGM : Volume Globulaire Moyen
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VPM : Volume Plaquettaire Moyen
WBC : White Blood Cell
WDF : white cell differential channel
WNR : white cell nucleated channel
WPC : white cell precursor channel

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	4
I-DEFINITION, HISTORIQUE.....	5
II- HEMATIMETRIE MANUELLE.....	10
II-1 Hémogramme : un examen clé.....	10
II-2 Examen quantitatif.....	12
II-2-1 Numération des éléments figurés du sang.....	12
II-2-1-1 Numération des érythrocytes.....	13
II-2-1-2 Numération des réticulocytes.....	14
II-2-1-3 Numération des cellules nucléées et leucocytes.....	15
II-2-1-4 Numération des éosinophiles.....	16
II-2-1-5 Numération des plaquettes.....	17
II-2-1-6 Utilisation des systèmes de dilution précis : Unopettes®.....	18
II-2-1-7 Erreurs de numération avec l'hémocytomètre.....	19
II-2-2 Mesure quantitative sur le contenu des globules rouges.....	19
II-2-2-1 Hématocrite.....	19
II-2-2-2 Taux d'hémoglobine.....	19
II-2-2-3 Calcul des constantes de Wintrobe.....	20
II-3-Examen qualitatif.....	21
II-3-1 Confection des frottis.....	21
II-3-2 Coloration panoptique.....	24
II-3-2-1 Coloration de May-Grunwald Giemsa.....	24
II-3-2-2 Coloration de Wright.....	27
II-3-3 Examen des frottis sanguin.....	28

III-AUTOMATISME EN HEMATOLOGIE CELLULAIRE	31
III-1 Objectifs principaux de l'automatisation	31
III-2 Principes technologiques des automates d'hématologie cellulaire.....	34
III-2-1 Principe de la mesure par impédance	34
III-2-2 Détection optique par diffraction d'un rayon laser (cytométrie en flux) 41	
III-2-3 Cytométrie de flux par fluorescence ou cytofluorométrie de flux	43
III-2-4 Analyse par cytochimie sélective	45
III-2-5 Analyse par un courant à haute fréquence	46
III-2-6 Lyse chimique	46
III-2-7 Dosage par spectrophotométrie	47
III-2-8 Calcul	47
III-2-9 marquage spécifique	47
III-3 Etat d'art des automates en hématologie	49
III-4 Evaluation des performances des automates d'hématologies cellulaires : vérification/validation de méthode.....	57
III-4-1 Définition	57
III-4-2 Description de la méthode et maîtrise des risques	58
III-4-3 Evaluation de l'AHC : critères de performances initiales	58
III-4-3-1 Fidélité	58
III-4-3-2 Justesse	60
III-4-3-3 Exactitude	61
III-4-3-4 Limite de quantification.....	61
III-4-3-5 Contamination inter échantillons	62
III-4-3-6 Comparaison de méthode	63
III-4-4 Assurer la qualité des procédures analytique	64
III-5 Validation de l'automate étaleur colorateur	66
III-6 Critères de choix d'automates en hématologie	66

DEUXIEME PARTIE : ANOMALIES ET ERREURS DE DETERMINATION DE L'HEMOGRAMME AVEC LES AUTOMATES D'HEMATOLOGIE CELLULAIRE	68
I-PRINCIPALES SITUATIONS ASSOCIE A UNE ANOMALIE DE LA NUMERATION DES PLAQUETTES	70
I-1 Situations conduisant à une fausse diminution de la numération plaquettaire : pseudothrombopénies	72
I-1-1 Définition des pseudothrombopénies	72
I-1-2 Prévalence	72
I-1-3 Circonstances de survenue des pseudothrombopénies	74
I-1-4 Conséquences cliniques d'une pseudothrombopénie.....	75
I-1-5 Classification des pseudothrombopénies.....	76
I-1-5-1 Pseudothrombopénies EDTA-dépendantes (PTE)	76
a. Agrégation plaquettaire liée à l'EDTA	76
b. Satellitisme des plaquettes autour des leucocytes	81
c. Agrégation mixte neutrophiles-plaquettes en présence d'EDTA.....	86
I-1-5-2 Pseudothrombopénies non EDTA-dépendantes.....	89
I-1-5-2-1 Causes liées aux erreurs à la phase préanalytique	89
I-1-5-2-2 Causes liées à l'échantillon.....	93
a- Plaquettes géantes ou macroplaquettes.....	93
b- Microplaquettes	97
c- Satellitisme des PLT autour des leucocytes.....	100
d- Autres causes liées à l'échantillon.....	100
I-2 Situations conduisant à une fausse augmentation de la numération plaquettaire : pseudothrombocytose.....	101
I-2-1 Hématies fragmentées	101

I-2-2 Fragments de cytoplasme de cellules nucléées.....	105
I-2-3 Micro-organismes.....	107
I-2-4 Cryoglobulines	110
I-2-5 Lipides	116
I-2-6 Divers.....	118
II-PRINCIPALES SITUATIONS ASSOCIE A UNE ANOMALIE DE LA NUMERATION DES LEUCOCYTES AUTOMATISES.....	119
II-1 Numération leucocytaire faussement diminuée	120
II-1-1 Agrégats de polynucléaires neutrophiles en présence d'EDTA.....	120
II-1-2 Agrégats des lymphocytes en présence d'EDTA	128
II-1-3 Causes liées aux erreurs à la phase préanalytique	135
II-2 Numération leucocytaire faussement augmentée.....	135
II-2-1 Agrégats plaquettaires et plaquettes géantes	135
II-2-2 Erythroblastes	137
II-2-3 Globules rouges résistant à la lyse.....	138
II-2-4 Cryoglobulines.....	140
II-2-5 Filaments de fibrine, cryofibrinogène et apparentés.....	142
II-2-6 Lipides	143
II-2-7 Tissus adipeux.....	143
II-2-8 Micro-organismes	144
II-2-9 Remplissage excessif des tubes sous vide.....	144
II-3 Anomalies de la formule leucocytaire automatisée	145
II-3-1 Problème particulier des érythroblastes	147
II-3-2 Déficit en peroxydase des leucocytes	147
II-3-3 Nombre absolu de monocytes.....	149
II-3-4 Nombre des polynucléaires basophiles	150
II-3-5 Anomalies de la numération des éosinophiles	152
II-3-6 Conservation des échantillons sanguins.....	154

III-PERTURBATION DE LA MESURE DE L'HEMOGLOBINE.....	155
III-1 Situations conduisant à une erreur de détermination de l'hémoglobine totale	156
III-1-1 Lipides et l'hyperchylomicronémie.....	156
III-1-2 Grandes hyperleucocytoses	159
III-1-3 Immunoglobulines et Cryoglobulines.....	160
III-1-4 Hémolyse.....	161
III-1-5 Structure chimique de l'hémoglobine et la bilirubine	161
IV-PERTURBATION DE LA NUMERATION DES GR ET DES PARAMETRES ERYTHROCYTAIRES	163
IV-1 Numération des GR faussement augmentée.....	164
IV-1-1 Grandes hyperleucocytoses.....	164
IV-1-2 Plaquettes géantes.....	167
IV-2 Numération des GR faussement diminuée	167
IV-2-1 Agglutinines froides	167
IV-2-2 Anémies hémolytiques à anticorps chauds	170
IV-2-3 Microcytes et schizocytes et leur séparation avec les plaquettes.....	170
IV-2-4 Cryoglobulines	170
IV-2-5 Problèmes liés à la qualité de l'échantillon	170
IV-2-6 Hémolyse in vitro	171
IV-3 Erreur de détermination du volume globulaire moyen (VGM) ou de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)	171
IV-3-1 Volume globulaire moyen et hématocrite.....	171
IV-3-1-1 VGM et agglutinines froides (et anticorps chauds)	173
IV-3-1-2 VGM et grandes hyperleucocytoses	173
IV-3-1-3 Hyperglycémie sévère	174
IV-3-1-4 Hyper- et hyponatrémie.....	176

IV-3-1-5 Influence de l'anticoagulant	176
IV-3-1-6 Influence de la Conservation des échantillons sur le VGM.....	176
IV-3-1-7 Variation du VGM en fonction de la technologie de mesure.....	177
IV-3-2 Concentration corpusculaire moyenne en Hb (CCMH).....	178
IV-3-2-1 Augmentation de la CCMH (>36 g/dl)	178
IV-3-2-2 Diminution de la CCMH	179
V-PERTURBATION DE LA NUMERATION AUTOMATISEE DES RETICULOCYTES.....	180
V-1 Fenêtrage des réticulocytes.....	181
V-2 Seuil de discrimination entre GR et réticulocytes.....	182
V-3 Intensité de coloration ou de fluorescence des réticulocytes.....	182
V-4 Autres situations perturbant la numération automatisée des réticulocytes ...	183
TROISIEME PARTIE : RECOMMANDATIONS POUR LA LECTURE MICROSCOPIQUE DU FROTTIS SANGUIN	184
I- PRESENTATION DU GROUPE DU TRAVAIL ELABORANT LES RECOMMANDATIONS DU GFHC.....	187
II- DEFINITIONS DES TERMES UTILISES ET CONVENTIONS.....	188
II-1 Notions de situation initiale	188
II-2 Situation de suivi « follow up »	189
III-RECOMMANDATIONS GFHC DE REVUE MICROSCOPIQUE DU FROTTIS SANGUIN	190
III-1 Recommandations relatives aux informations concernant le patient	190
III-1-1 Revue des frottis sanguin en fonction de l'âge des patients	191
III-1-2 Médecin prescripteur ou service d'hospitalisation	191
III-1-3 Renseignement permanent associé aux informations concernant le patient	192
III-1-4 Prescription spécifique d'analyse morphologique	192

III-1-5 Prescription associée à l'hémogramme d'un myélogramme ou d'un immunophénotypage	192
III-2 Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la numération globulaire rendu par les AHC	193
III-2-1 Numération leucocytaire	194
III-2-2 Numération plaquettaire et indices plaquettaires	195_Toc447218181
III-2-3 Numération érythrocytaire, taux d'hémoglobine et indices érythrocytaires, réticulocytes	198
III-3 Indications relatives à la formule leucocytaire	203
III-3- 1 Présence de cellules anormales sur l'antériorité	205
III-3- 2 Présence d'érythroblastes	205
III-3-3Présence d'une anomalie quantitative d'une sous-population leucocytaire	206
III-3-4 Alarmes qualitatives et anomalies des graphes leucocytaires	210
CONCLUSION	211
RESUMES	
REFERENCES	



Introduction



Durant la deuxième moitié du XXème siècle, la cytologie hématologique dépasse les techniques manuelles classiques de l'hémogramme longues, fastidieuses et peu reproductibles et s'ouvre vers des méthodes automatisées désormais des dilutions, des colorations et des observations à l'œil au microscope optique, ces méthodes sont considérablement améliorées fonctionnant avec des techniques de plus en plus sophistiquées. Elles permettent désormais d'obtenir des informations qu'un observateur microscopique ne pourrait appréhender.

À l'heure actuelle les automates d'hématologie cellulaire fournissent des résultats rapides, précis et exacts qu'il s'agisse d'hémogrammes normaux ou anormaux. Cependant au-delà de certaines limites quantitatives et qualitatives variables selon les automates, des résultats erronés peuvent être observés d'origine préanalytique, liés à des particularités de la pathologie du patient étudié, à des modifications induites après le prélèvement ou à la technologie utilisés pour la mesure.

Les fabricants d'automates ont tenu compte des diverses insuffisances signalées par les utilisateurs, ont amélioré avec les années la qualité d'analyse de leurs automates et, avec les progrès de l'analyse informatique, proposent maintenant des résultats fiables et précis pour les divers paramètres de la numération globulaire, une analyse automatisée de la formule leucocytaire et une numération des réticulocytes. À l'obtention de résultats chiffrés, s'est ajoutée une visualisation au moins partielle des particules énumérées, sous la forme d'histogrammes mono-, bi- ou multiparamétriques. Outre des informations sur le fonctionnement des AHC (messages techniques), divers messages d'alerte sont apparus en parallèle des histogrammes pour signaler plus précisément certaines

des anomalies de mesure ou d'analyse (messages quantitatifs sur des seuils de normalité ou de linéarité dépassés, messages analytiques et qualitatifs signalant la difficulté de réalisation d'une analyse ou la présence possible d'éléments anormaux ou inhabituels). Ces divers messages et histogrammes complètent aujourd'hui l'interprétation technique et biologique de l'hémogramme: des anomalies dans la position des nuages, ou l'apparition de nuages anormaux des différentes populations cellulaires au sein des histogrammes, doit alerter l'opérateur et/ou les messages d'alarme qui sont aujourd'hui plus fréquents, demeurent des éléments d'orientation pour mieux cerner l'anomalie ou interpréter la formule microscopique, et ne doivent en aucun cas être transcrits tel quel sur le résultat.

Notre travail s'est fixé comme objectif de mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de l'automatisme en hémogramme par rapport aux techniques manuelles classiques. Après, une description des principes de fonctionnement des automates et des méthodes de qualification, nous nous intéressons aux anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les AHC; tout en détaillons les principales situations associées aux anomalies de la numération des plaquettes, de numérations et formules leucocytaires, les perturbations de la mesure de l'hémoglobine, des hématies et des paramètres érythrocytaires ainsi que la perturbation de la numération des réticulocytes, afin d'éviter de rendre des faux résultats qui peuvent avoir un impact non négligeable pour le patient et sa prise en charge. Enfin revoir en détail les critères de l'hémogramme requérant une analyse cytomorphologique du frottis sanguin et les encadrer par les recommandations du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC).



Première partie : généralités



I-DEFINITION, HISTORIQUE

Le mot automatisme est attesté pour la première fois en 1740. Il est créé par analogie entre le terme automate et le suffixe –isme .Le mot automate désigne alors « une machine animée par un mécanisme intérieur et imitant les mouvements d'un être vivant», il semble attesté dès 1532, son étymologie est d'origine grecque : le terme automatos apparaît chez Aristote (384-322 av .JC) désignant à la fois « le hasard », « le fortuit » et le spontané dans le sens « qui se meut soi-même » [1].

L'hématologie est longtemps demeurée une discipline mineure, la première monographie est celle de Thomas Schwencke, *Haematologia sive Sanguis historia*, publiée à La Haye en 1743, et le premier traité véritable est écrit en 1843 par Gabriel Andral sous le titre d'Essai d'hématologie pathologique. Avec les progrès techniques et scientifique au XXème siècle l'hématologie se trouve portée au premier rang.

En 1674 grâce à l'utilisation du microscope, Leeuwenhoek décrit des éléments qui forment le sang, de globules ronds et petits véhiculés par « l'humidité cristalline de l'eau » [2].

Pendant plus de deux cents ans, après la découverte de Leeuwenhoek, les observateurs examinent le sang sans artifices. Ils décrivent à côté des globules rouges les globules blancs puis les plaquettes sanguines.

Les progrès en hématologie se poursuivent avec les années : l'emploi de pipettes à prélèvement d'un volume connu et de liquides de dilution, les procédés de coloration différentielle dus à Erlich, prélèvements et étude des organes hématopoïétiques, l'utilisation de microscopie à contraste de phase employée couramment après 1950. Dans le même temps, la microscopie électronique modifie profondément les conditions d'observation des cellules du sang et des organes formateurs et permet d'obtenir un grossissement de 10^9 [2].

La base morphologique de l'hématologie cellulaire est apparue dès la fin du XIXème siècle avec la performante coloration panoptique hématologique de May-Grünwald-Giemsa [3].

C'est dans la deuxième moitié du XXe siècle que s'est fait le passage de la cytologie traditionnelle à la biologie cellulaire hématologique grâce à l'apparition et au développement de nouveaux moyens d'analyse cellulaire et moléculaire [3].

En 1956, Walter et Joseph Coulter ont inventé un dispositif de comptage des globules rouges et des globules blancs (figure 1).

Le fonctionnement de l'appareil de Coulter était basé sur une méthode qui calculait l'impédance du sang dilué dans une solution conductrice, Les premiers appareils ne comptaient que les hématies et les leucocytes, la technologie ne permettant pas de compter à ce moment-là les plaquettes [4,5].

**AUTOMATIC CELL COUNTER
&
CELL SIZE ANALYZER**

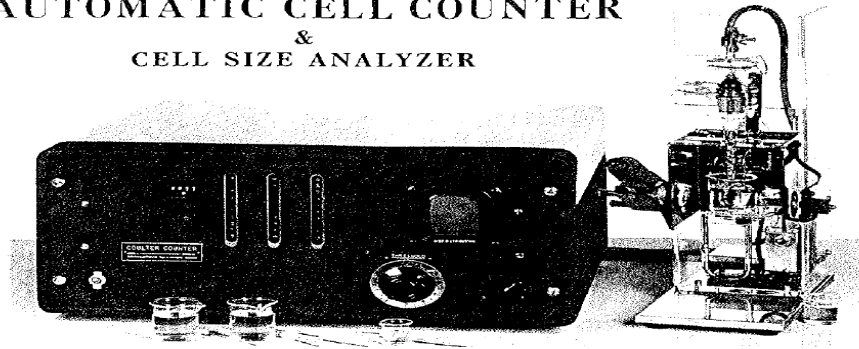


Figure 1: L'ancêtre compteur Coulter, modèle A, commercialisé aux U.S.A en 1956 [5]

Au cours des années 1960, la mise au point des premiers compteurs cellulaires automatisés. En plus de compter les globules rouges et blancs, ces instruments en déterminaient également la taille. Cette dernière mesure des globules rouges donnait le volume globulaire moyen. L'hémoglobine était analysée par lyse des globules rouges et par spectrophotométrie du cyan méthémoglobine. À partir des données ci-dessus, ces appareils pouvaient calculer l'hémoglobine globulaire moyenne et la concentration d'hémoglobine globulaire moyenne, tout comme l'hématocrite. De plus, ils pouvaient également évaluer la distribution des diverses tailles de globules rouges. Les données ainsi recueillies permettaient de tracer une courbe de Gauss, et la valeur correspondant à deux écarts-types de la moyenne devenait l'indice de déviation du volume érythrocytaire (IDVE) [4].

Au cours des années 1970, de nouveaux progrès technologiques ont permis de quantifier les plaquettes et d'évaluer leur volume. Durant la même décennie, on a élaboré des technologies basées sur la dispersion de la lumière, qui permettaient d'évaluer le nombre et la qualité des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes [4].

Vers la fin de la décennie 70 l'automatisation commence à arriver avec l'analyse automatique des leucocytes, plaquettes et les prototypes des cytomètres en flux [6] (Figure 2).

Vers la fin du siècle, plusieurs améliorations techniques ont permis d'automatiser la formule leucocytaire différentielle en cinq parties ainsi que la numération des réticulocytes. De plus, l'amélioration des microprocesseurs a grandement augmenté la rapidité et la performance des appareils [4].

En l'an 2000, cette biologie spécialisée est ainsi parvenue dans sa phase de maturité. Les systèmes automatisés permettent dorénavant d'intégrer dans des bases de données les images cytologiques numérisées, les graphes des automates d'hématologie et leurs données quantitatives, les résultats des autres techniques [3].



Figure 2: A gauche Coulter modèle F (années 70) ; au centre Coulter modèle S (années 80) ; à droite Coulter modèle STKS (années 90) (Impédance, radiofréquence et diffraction laser) [7]

Au XXI^{ème} siècle, la pratique de l'hématologie cellulaire va encore s'améliorer. On trouve sur la lancée des principales acquisitions récentes, les nouveaux progrès: Les automates d'hématologie, de plus en plus performants, détectent de manière toujours plus précise les cellules anormales du sang périphérique. Les frottis sanguins sont réalisés automatiquement, colorés de manière optimale, transférés sur des microscopes numériques capables de visualiser rapidement la galerie des cellules d'intérêt diagnostique, et de générer une éventuelle demande de consultation télé-hématologique par transfert des images significatives [3].

II- HEMATIMETRIE MANUELLE

II-1 Hémogramme : un examen clé

L'hémogramme est l'examen biologique le plus prescrit toutes pathologies confondues. Il apporte des informations sur les cellules du sang contribuant au maintien de l'intégrité de l'organisme : oxygénation des tissus, défense de l'organisme contre les agents pathogènes, prévention du risque hémorragique.

L'hémogramme est indiqué de façon non exhaustive devant un syndrome anémique, infectieux, hémorragique ou tumoral mais aussi devant une altération de l'état général, en cas de thrombose, de prurit à l'eau, ou d'érythrose cutanée. Il est également prescrit au cours de la grossesse, dans la surveillance de certains traitements ou encore dans le cadre de la médecine de travail [12,13].

L'hémogramme est réalisé à partir d'un échantillon de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un tube contenant un anticoagulant sec de type EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique). On peut pratiquer un prélèvement par microméthode au talon chez le nouveau né ou au bout du doigt chez les patients dont il convient de protéger le capital veineux (chimiothérapie, insuffisance rénale...). Il n'est pas nécessaire d'être à jeun pour cet examen, l'idéal serait d'observer un décubitus d'une demi-heure avant le prélèvement, ce qui n'est réalisable qu'en cas d'hospitalisation. Le patient ambulatoire sera prélevé en position assise.

Lors du prélèvement le tube doit être agité pour éviter la formation de micro caillots. De plus, pour avoir une analyse cytologique correcte et une numération plaquettaire exacte, l'examen doit être réalisé rapidement (<3h) après le prélèvement [12, 14]

L'hémogramme comprend :

- Un examen quantitatif
- Un examen qualitatif
- Le calcul des indices érythrocytaires.

Par examen quantitatif on entend :

- Numération des éléments figurés du sang: érythrocytes (globules rouges ou hématies), leucocytes (globules blancs) et thrombocytes (plaquettes) ;
- Détermination de la formule leucocytaire, c'est-à-dire la répartition des leucocytes en sous-population.
- Détermination de l'hématocrite (pourcentage relatif du volume des cellules circulant dans le sang par rapport au volume total du sang) et le dosage de l'hémoglobine.

L'examen qualitatif consiste en une étude morphologique des cellules sanguines.

Enfin le calcul des indices érythrocytaires nécessite la connaissance de l'hématocrite et de l'hémoglobine afin de déterminer les trois paramètres suivants : le volume globulaire moyen, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine.

Au début du siècle dernier la numération était réalisée par des méthodes manuelles (numération à l'hémocytomètre). Depuis les automates d'hématologie ont amélioré la qualité des résultats de l'hémogramme. Ils analysent les échantillons de plus en plus rapidement et permettent d'obtenir des résultats précis et reproductibles.

Malgré le perfectionnement des méthodes automatisées, certaines techniques manuelles gardent leurs places et permettent de résoudre des pièges techniques qui peuvent être dus à différentes situations, afin de valider les résultats [41].

II-2 Examen quantitatif

II-2-1 Numération des éléments figurés du sang

Les techniques de numération des cellules de sang ou d'autres liquides biologiques se fondent généralement sur le comptage direct, au microscope, des globules obtenus dans un volume déterminé de liquide, dilué suivant une proportion connue, une certaine quantité du liquide à examiner est dilué très exactement à l'aide d'une solution qui conserve et quelques fois colore les éléments étudiés. Une goutte de cette dilution est déposée sur une « cellule » ou « chambre à numération » dont la surface est divisée en rectangles et que l'on recouvre d'une lamelle maintenue à une distance telle que le volume

correspondant à chaque rectangle soit connu. Après sédimentation des cellules, on compte le nombre de cellules contenu dans chaque rectangle et on le multiplie par le coefficient de dilution (Figure 3) [8].

Les techniques de numération manuelles sont très hétérogènes et diffèrent d'un pays à un autre et au sein du même pays en absence de standardisation des méthodes. Les méthodes indiquées dans ce travail reposent sur les techniques les plus utilisées recommandées par un comité de standardisation animé par Boroviczeny qui a vu le jour en 1964.

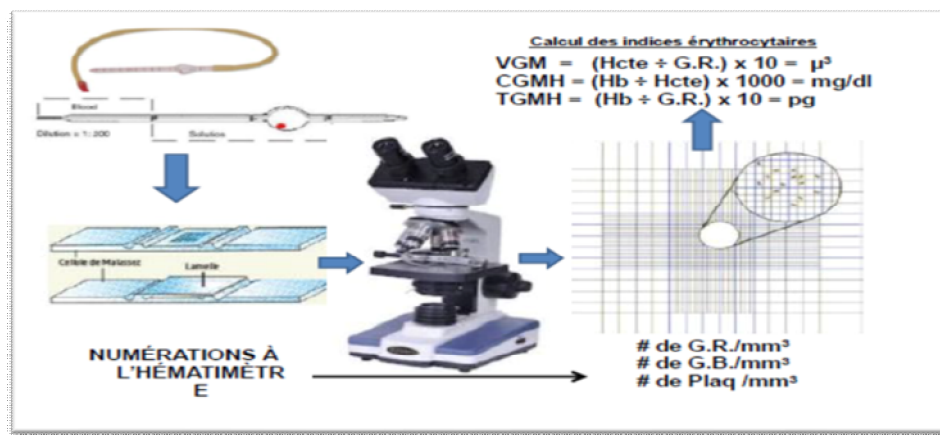


Figure 3: Numération des cellules à l'hématimétrie avant l'automatisme [7]

II-2-1-1 Numération des érythrocytes

Classiquement, la dilution du sang se fait à l'aide d'une pipette spéciale. Deux repères (marqués 1 et 2) indiquent le niveau que doit atteindre le sang avant mélange avec le liquide de dilution, pour avoir une dilution finale de 1/100 ou de 1/200 (on n'utilise la première dilution que dans les fortes anémies). Le liquide de dilution est ensuite aspiré jusqu'à la graduation marqué 101 [9].

Liquide de dilution : le liquide de Marciano, souvent utilisé, est de préparation compliqué et ne présente pas d'avantages sur le liquide de Dacie et Lewis qui est simple à réaliser, se conserve bien et ne demande pas à être stérilisé.

La composition du liquide de Dacie et Lewis :

- Formol : 1ml
- Citrate de soude à 3% : 99ml

Les érythrocytes conservent leurs formes normale de disques et ne sont pas agglutinés, on peut faire la numération plusieurs heures après que le sang ait été dilué.

Une goutte de la dilution provenant de la pipette est déposé dans la chambre à numération : il en existe de nombreux types (cellules de malassez, de thoma, de bürker, ect qui diffèrent principalement par le mode de quadrillage)

Le comptage est fait à un grossissement de 200 à 400 diamètres, on compte les érythrocytes contenus dans plusieurs rectangles et on en fait la moyenne, on rapporte au millimètre cube [9].

II-2-1-2 Numération des réticulocytes

On précipite les ribosomes des réticulocytes par un colorant (le bleu crésyl brillant) : la substance réticulo filamenteuse apparaît alors. Cette réaction se produit uniquement lorsque les cellules sont vivantes.

Dans un tube à hémolyse, on place cinq gouttes du liquide suivant :

- Bleu crésyl brillant : 1g
- CINA : 0,8 g
- Eau distillée : 100ml

Puis on ajoute cinq gouttes du sang, on laisse agir dix à trente minutes

On peut compter les réticulocytes directement dans la chambre à numération ou mieux indirectement: compter sur frottis le nombre de réticulocytes par rapport a 1000 érythrocytes ; il est nécessaire de compter un grand nombre d'érythrocytes surtout si le nombre relatif des réticulocytes est petit (si la réticulocytose est d'environ 2% on compte 20000 érythrocytes) on peut utiliser une méthode approximative :calculer tout les érythrocytes d'un champ sur dix et on déduit le nombre total (Dacie et Lewis ,1963 ; Cartwright 1968)

Le pourcentage d'erreur est considérable si l'on ne compte pas un nombre élevé d'érythrocytes.

Pour faciliter le comptage des réticulocytes, on peut utiliser un micromètre oculaire quadrillé et utiliser des frottis surcolorés au Giemsa [8,9].

II-2-1-3 Numération des cellules nucléées et leucocytes

On utilise une pipette spéciale (pipette de Potain)

On aspire d'ordinaire jusqu'à 0,5 pour un sang à peu près normal, pour un sang leucémique la dilution finale étant 1/100.

Le liquide de dilution est le liquide de Hayem qui hémolysent les érythrocytes et colore les noyaux, sa formule est la suivante :

- bleu de méthylène ou violet de Gentiane : 5 cg
- acide acétique : 1ml
- eau distillée : 200ml

Pour une dilution de 100 on compte les éléments contenus dans 100 rectangles (chambre de Malassez) et on multiplie par 100

Correction des chiffres obtenus en cas d'érythroblastose :

Dans la chambre à numération, il est très difficile de distinguer les érythroblastes des leucocytes donc le nombre compté correspond au nombre total des cellules nucléées, les érythroblastes seront reconnus sur les frottis colorés et comptés par rapport à 100 leucocytes, leur nombre N permettra de déduire le nombre des leucocytes selon la formule :

$\text{Nombre de leucocytes} = \text{cellules nucléées} \times 100 / 100 + N$

Quelques auteurs (Mai et Kosenow, 1951) proposent d'utiliser la lumière fluorescente pour faciliter la numération des leucocytes ; on ajoute alors dans le liquide de dilution de l'acridine orange [9].

II-2-1-4 Numération des éosinophiles

Procédés spécifique pour compter directement les leucocytes éosinophiles dans la chambre à numération (Discombe ,1946 ; Randolph, 1949)

Cette méthode est utile lorsqu'on veut évoluer la chute des éosinophiles après administration d'hormones.

L'examen doit être fait dans les trois heures suivant la dilution dans le liquide de Randolph car la coloration a tendance à s'altérer :

Solution 1 :

- bleu de méthylène à 0,1%
- propylène glycol : 50ml
- eau distillée : 50 ml

Solution 2 :

- phloxine à 0,1%
- propylène glycol : 50 ml
- eau distillée : 50 ml

Au moment de l'emploi on mélange volume à volume les deux solutions, les éosinophiles sont colorés en rouge vif ; les érythrocytes sont lysés par le propylène glycol [9].

II-2-1-5 Numération des plaquettes

Il existe deux méthodes pour compter les plaquettes.

La méthode directe consiste à diluer du sang avec un anticoagulant et à utiliser l'hémocytomètre.

Les méthodes indirectes consistent à diluer le sang d'une manière arbitraire et à examiner cette dilution entre lame et lamelle. On compte alors le nombre des plaquettes par rapport au nombre de globules rouges rencontrés dans chaque champ ; comme on connaît d'autre part le nombre de globules rouges, on en

déduit le nombre de plaquettes. D'une manière inattendue les deux techniques ne donnent pas des résultats comparables.

La méthode directe donne en général 500.000 plaquettes par millimètre cube chez l'Homme normal, alors que la méthode indirecte ne donne qu'environ 300.000 ; la raison en est qu'entre lame et lamelle les hématies se concentrent sur les bords de la lamelle (Fitch, 1957) [9].

Les nombreuses méthodes pour compter les plaquettes qui ont été publiées montrent bien la difficulté réelle de compter des petits corpuscules qui s'agglutinent et se détruisent si facilement (Brecher et Cronkite, 1950)

II-2-1-6 Utilisation des systèmes de dilution précis : Unopettes®

Les Unopettes® sont des systèmes de dilution à usage unique, en matière plastique composés : d'une micropipette de volume précis et d'un réservoir, hermétiquement bouché renfermant un volume précis de diluant [31].

Les Unopettes diffèrent selon les cellules énumérées (tableau I)

Tableau I: Diversité des Unopettes® [31]

Numération	Propriétés du diluant	Volume diluant	Volume micropipette	Dilution	Temps de l'hémolyse
Hématies	Na ₂ SO ₄ , méthanol Isotonique (non hémolysant)	1,990 ml	10 µl	1/200	—
Leucocytes	Bleu de méthylène, acide éthanoïque Hypotonique (hémolysant)	0,475 ml	25 µl	1/20	10-15 min
Plaquettes	Hypotonique (hémolysant) Inhibant l'agglutination et l'adhésion des Pt Favorisant leur gonflemen	1,980 ml	20 µl	1/100	

II-2-1-7 Erreurs de numération avec l'hémocytomètre

Il est difficile d'obtenir un compte de globules vraiment exact, les erreurs proviennent du mauvais état des instruments, de leurs mauvaises utilisations, de la fatigue de l'observateur et enfin de la méthode elle-même [9].

II-2-2 Mesure quantitative sur le contenu des globules rouges

II-2-2-1 Hématocrite

On peut utiliser les tubes de Wintrobe, qui contient 0,5 à 1ml de sang veineux recueilli sur EDTA ou sur héparine dans un tube ordinaire ; il est agité puis versé dans le tube de Wintrobe jusqu'à la division marquée 100. La centrifugation doit durer au moins 30 minutes, de sorte que le volume du culot globulaire soit constant. La lecture sur la graduation de l'hématocrite doit être faite au dessous de la couche leucocytaire [8,9].

II-2-2-2 Taux d'hémoglobine

L'emploi des méthodes rapides (méthode de Tallqwist, de Growers, et Sahli) ne sont plus justifié en raison de nombreuses possibilités d'erreur (une erreur de 20% étant habituelle)

En pratique seulement deux méthodes : la mesure photoélectrique de l'oxyhémoglobine et la méthode à la cyanméthémoglobine, cette dernière étant recommandée (reconnue comme méthode de référence par le comité international pour la standardisation en hématologie)

Méthode à la cyanméthémoglobine : méthode colorimétrique

C'est la méthode de Drabkin : Fe^{2+} de l'hémoglobine est oxydé en Fe^{3+} de la méthémoglobine par le ferricyanure, et la méthémoglobine réagit alors avec le cyanure de potassium(KCN) pour former la cyanméthémoglobine, un composé très stable.

L'absorbance de la cyanméthémoglobine, directement proportionnelle a la concentration en hémoglobine, est mesurée à 546 nm (520-560 nm) [8-10].

II-2-2-3 Calcul des constantes de Wintrobe

a) Volume globulaire moyen (VGM)

Représente le volume moyen d'une hématie

Le calcul se fait en divisant le volume globulaire compris dans 1 mm cube de sang (fourni par l'hématocrite) par le nombre de globules rouges contenu dans le même volume (fourni par la numération) [8,9]

$$VGM = \frac{\frac{\text{hématocrite}}{100}}{\text{concentration en hématies en nombre par litre}}$$

b) Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine(CCMH)

Représente la quantité moyenne d'hémoglobine contenue dans un litre d'hématies.

Exprime le degré de saturation (saturation index) des hématies.

Elle est obtenue de la manière suivante :

$$CCMH = \frac{\text{concentration en hémoglobine}}{\frac{\text{hématocrite}}{100}}$$

CCMH s'exprime en g d'Hb /litre [8,9]

c) Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)

Représente la quantité moyenne d'hémoglobine contenue dans une hématie [9]

$$\text{TCMH} = \frac{\text{concentration en hémoglobine}}{\text{concentration en hématies en nombre par litre}}$$

TCMH s'exprime en pg

II-3 Examen qualitatif

II-3-1 Confection des frottis

L'examen de frottis se fait après coloration dite panoptique par des méthodes dérivées de celle de Romanovski : coloration de May-Grünwald-Giemsa et de Wright.

Etaler une goutte de sang frais (prélèvement moins de 3 heures) prélevé sur EDTA ou plus rarement directement par prélèvement capillaire sur une lame de verre propre, dégraissées et à bords rodés.

➤ Technique :

- Déposer une goutte de sang de 2 mm de diamètre (prélèvement veineux ou capillaire) à 1 cm de l'extrémité de la lame.
- Placer le bord de la lame rodée sur une lame et glisser celle-ci jusqu'à ce qu'elle entre en contact avec la goutte, en maintenant un angle d'environ 45°, la goutte de sang s'étale le long de l'arête par capillarité (Figure 4 A).

- D'un mouvement souple et régulier, étaler la goutte de sang (Figure 4 B).
- Sécher complètement le frottis à l'air pour bien conserver la forme des GR et éviter la formation d'artéfacts.
- Identifier le frottis à une extrémité de la lame [9].

➤ **Qualité du frottis sanguin:**

La bonne qualité du frottis est un préalable indispensable à l'analyse du frottis de sang après coloration. En effet, des frottis mal faits risquent d'être à la source d'erreurs dues à une mauvaise appréciation du pourcentage des populations leucocytaires liée à une répartition hétérogène, une difficulté d'identification des cellules anormales ; une difficulté d'analyse des hématies.

Les qualités d'un bon frottis sanguins sont relatives à sa présentation. Ainsi, un frottis de qualité doit respecter les critères suivants (figure 4 C) :

- Goutte étalée en entier.
- Il doit posséder une tête, un corps et une queue en empreinte de pouce avec une bonne taille (1/2 à 3/4 de la lame)
- Il doit être sans franges excessives : ne doit être ni trop mince (sinon pauvre en éléments), ni trop épais (sinon éléments rétractés non identifiables) et régulier avec des bords parallèles à la lame mais distants d'eux avec une extrémité arrondie ou en pinceau.
- Il ne doit atteindre ni les bords, ni les extrémités de la lame (sinon les éléments les plus volumineux seront perdus)

- Il doit être correctement séché (sinon présence d'artefacts et les hématies seront crénelées)
- Il doit être uniforme : ne doit pas présenter des stries verticales ou horizontales (cas où l'étalement est mal rodé) ou des trous (cas où la lame est mal dégraissée) [9,11].

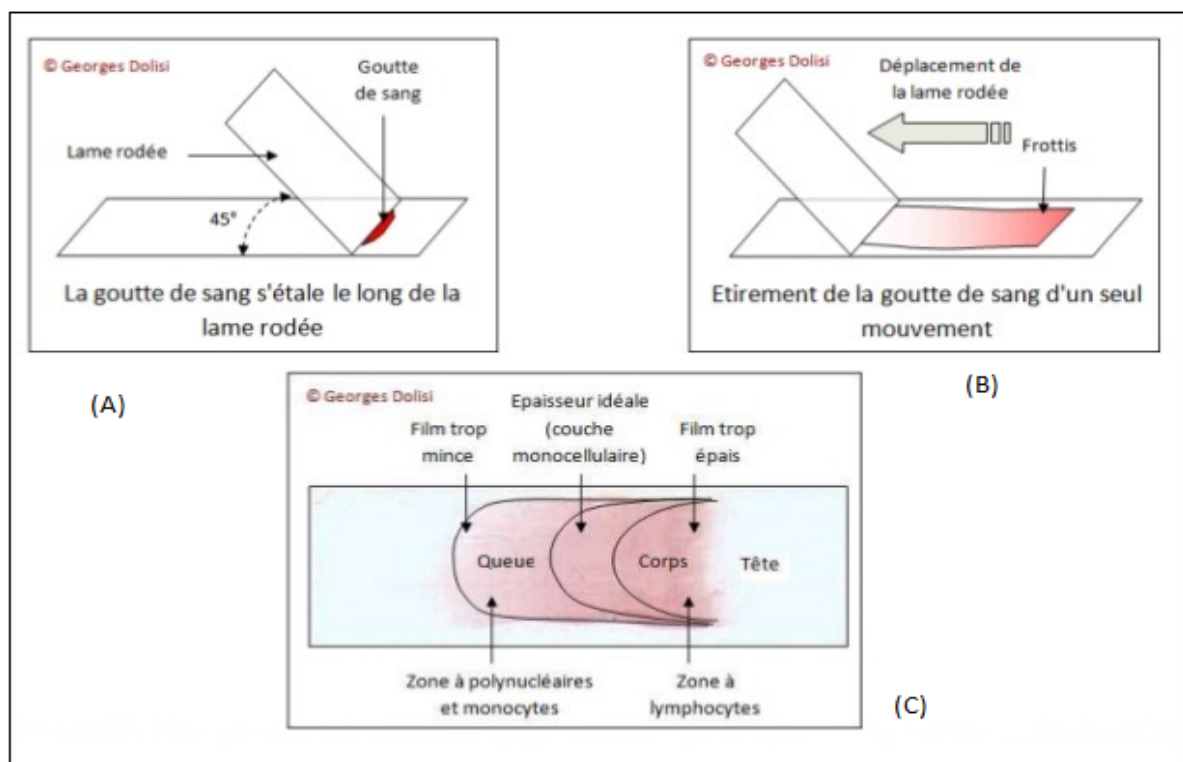


Figure 4 : (A) et (B) Technique d'étalement d'un frottis sanguin

(C) Répartition des cellules dans les différentes zones d'un frottis [15]

II-3-2 Coloration panoptique

Les colorations les plus utilisées en hématologie cellulaire sont la coloration de May-Grünwald-Giemsa (Europe) et celle de Wright (États-Unis). Elles dérivent de la coloration de Romanovsky, mise au point à la fin du XIX^{ème} siècle. Grâce aux différentes affinités tinctoriales de leurs constituants, elles colorent différemment les composants cellulaires (noyau, cytoplasme, granulations), ce qui permet ensuite de reconnaître les cellules par lecture microscopique [9].

II-3-2-1 Coloration de May-Grunwald Giemsa

Le frottis sanguin réalisé peut être conservé de quelques heures à deux jours. Passé ce délai, les leucocytes s'altèrent.

➤ Principe :

Avant d'être coloré, le frottis doit être fixé. La fixation s'effectue au contact du méthanol dans lequel est dilué le colorant de May-Grünwald.

La coloration de May-Grünwald-Giemsa repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres et sur l'affinité des éléments cellulaires pour des colorants acides (éléments acidophiles) ou basiques (éléments basophiles).

Utilisation de deux colorants neutres :

- Le colorant de May-Grünwald neutre : Il contient :
 - un colorant acide : l'éosine
 - un colorant basique : le bleu de méthylène sous forme d'éosinate de bleu de méthylène

- Le colorant de Giemsa neutre : Il contient :

- un colorant acide : l'éosine
- un colorant basique : les azurs de méthylène

Ces deux colorants sont solubilisés dans le méthanol et sont inactifs dans cette solution : c'est l'adjonction de l'eau qui leur donne leur pouvoir colorant : les sels sont alors dissociés en colorant acide (éosine) et en colorant basique (bleu de méthylène ou azurs de méthylène).

On obtient alors 4 colorations possibles :

- Trois colorations orthochromatiques : les éléments colorés prennent la même teinte que celle du colorant (le colorant en se fixant ne change pas de conformation donc pas de changement de couleur).

- Première coloration acidophile : Les éléments cellulaires acidophiles (c'est-à-dire basiques) seront colorés par le colorant acide (l'éosine) : par exemple, le cytoplasme des hématies (hémoglobine)

-Deuxième coloration basophile : Les éléments cellulaires basophiles (c'est-à-dire acides) seront colorés par le colorant basique (le bleu de méthylène) par exemple, l'ADN des noyaux, les ARN du cytoplasme des lymphocytes

-troisième Coloration neutrophile : Les éléments cellulaires neutres seront colorés à la fois par le colorant acide et par le colorant basique : par exemple, les granulations des granulocytes neutrophiles

-Une coloration métachromatique = coloration azurophile :

Les éléments colorés ne prennent pas la même teinte que celle du colorant (le colorant en se fixant change de conformation donc de couleur).

➤ **Technique :**

1- Fixation

- Placer la lame du frottis sur un support horizontal au dessus d'un bac de coloration.
- Verser sur la lame 15 gouttes de colorant May-Grünwald pur de façon à recouvrir complètement le frottis. Laisser agir 3 minutes.

2- Coloration au May-Grünwald

- Ajouter autant de gouttes d'eau neutre que de gouttes de colorant, le mélange est rapide.
- Laisser agir 2 minutes. (Préparer la dilution du Giemsa pendant ce temps.)
- Rejeter le colorant par un jet d'eau neutre.

3- Coloration au Giemsa

- Préparer la dilution du Giemsa pendant les 3 minutes précédentes : pour cela introduire 20 cm³ d'eau neutre dans une éprouvette graduée, ajouter 30 gouttes de colorant de telle manière que celui-ci reste à la surface de l'eau neutre.

- Verser le contenu de l'éprouvette dans une boîte de Laveran. Dès que la lame est prête, mélanger en agitant doucement (le pouvoir colorant est maximum au moment du mélange).
- Déposer la lame (frottis en dessous) dans la boîte, laisser agir 20 minutes (Giemsa lent).
- Rincer sous un jet d'eau neutre.

4- Séchage

- Laisser sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec du papier filtre.
- Attendre au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis [9, 82].

II-3-2-2 Coloration de Wright

La coloration de Wright permet la réalisation de formule sanguine et médullaire. C'est un mélange Bleu de méthylène d'éosine et d'azur de méthylène. Il fixe le frottis par son alcool méthylique et comme tous les colorants neutres en solution alcoolique, il ne libère son activité colorante qu'après addition d'eau tamponnée.

La coloration de Wright donne un résultat analogue au procédé panoptique [9, 29].

II-3-3 Examen des frottis sanguin

- Faible grossissement (objx40) permet d'apprécier la qualité du frottis
- Études Cytologiques (objx100 à l'immersion) permet :
 - Observer les éventuelles anomalies morphologiques des GR: anomalies de forme, de taille, de coloration, la présence d'inclusions intra-érythrocytaires.
 - Observer les éventuelles anomalies morphologiques des plaquettes (taille, forme), la présence éventuelle d'amas plaquettaire, et confirmer la densité de la numération plaquettaire.
 - Effectuer la formule leucocytaire (figure 5).

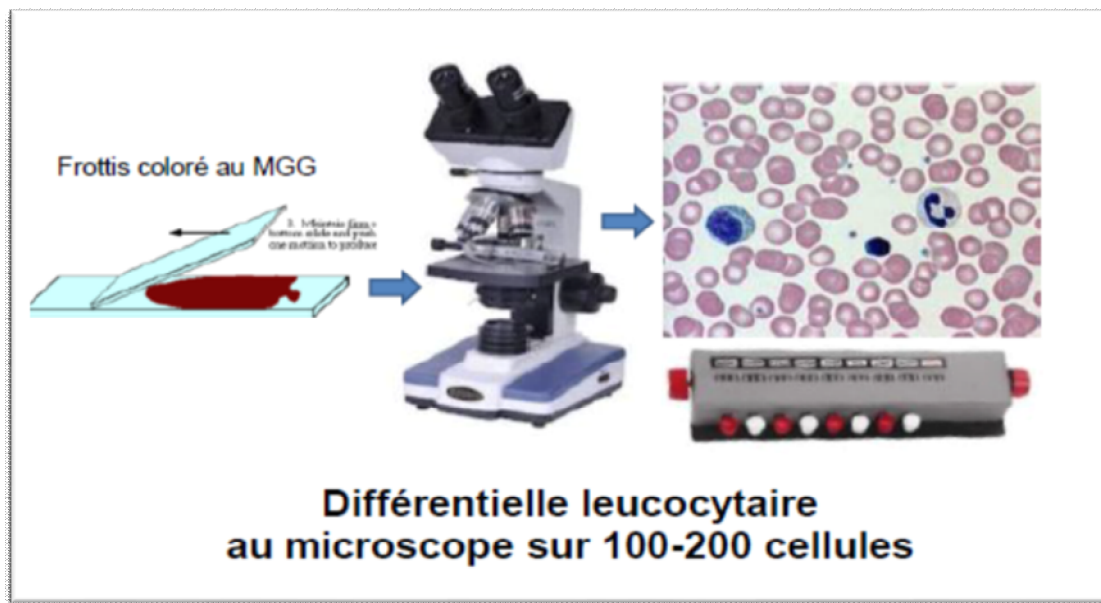


Figure 5: formule leucocytaire au microscope sur frottis coloré au MGG [7]

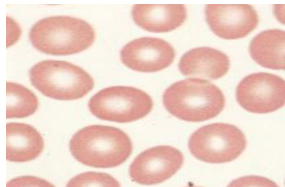
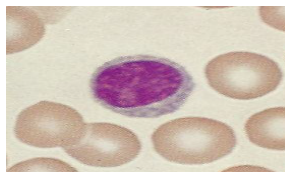
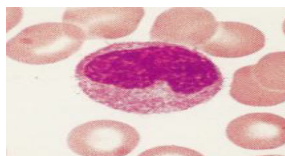
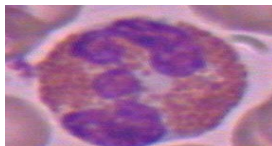
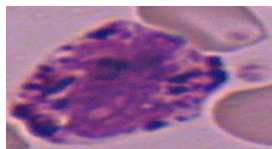
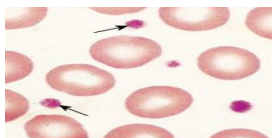
- Résultats au microscope x 100 et x 400

Si la préparation est réussie, les cellules sont bien séparées, les cytoplasmes non rétractés, et les colorations suivantes apparaissent :

- Noyaux rouge violet à rouge
- Plaquettes rouges
- Cytoplasmes acidophiles roses (granulocytes et hématies)
- Cytoplasmes basophiles bleus (lymphocytes)
- Cytoplasmes polychromatophiles gris (monocytes)
- Granulations acidophiles ou éosinophiles orangées
- Granulations basophiles violet foncé
- Granulations neutrophiles violet lilas
- Granulations azurophiles rouges (monocytes et gros lymphocytes)

Les représentations typiques des cellules sanguines normales sur frottis coloré au MGG (objectif x 100) sont représentées dans le tableau II

Tableau II : Les cellules sanguines normales sur frottis coloré au MGG (objectif x 100)

	Aspect microscopique	Particularités	Rôles
Hématies (6 à 7µm)		Cellules : - sans noyau - en forme de disques biconcaves - colorées en rose par l'hémoglobine	Transport des gaz respiratoires
Lymphocytes (6 à 8µm)		Cellules : - à gros noyau sphérique et très colorable - sans granulations cytoplasmiques	Défense et immunité de l'organisme
Monocytes (15 à 30 µm)		Cellules : - à noyau clair en forme de haricot - à cytoplasme sans granulations.	
Granulocytes : Neutrophile		Cellules : - à noyau plurilobé - à cytoplasme contenant de nombreuses granulations parfois très colorées et masquant le noyau.	
Acidophile			
Basophile (10 à 15 µm)			
Plaquettes (2 à 3 µm)		Ce ne sont pas des cellules mais des fragments cellulaires sans noyau.	Rôle dans la coagulation

III-AUTOMATISME EN HEMATOLOGIE CELLULAIRE

La robotisation et l'automatisation permettent aux laboratoires d'atteindre des niveaux de productivité très élevés.

L'approche de la robotisation dans le domaine des laboratoires combine deux technologies : l'automatisation et l'informatique.

Les tâches qui peuvent être robotisées dans les laboratoires de biologie médicale sont :

- Tri des échantillons
- Chargement et déchargement de la centrifugeuse;
- Décapsulage et recapsulage des tubes;
- Chargement, mise en marche et déchargement de l'analyseur;
- Revue automatique des résultats
- Affichage des résultats des analyses
- Tri et distribution des échantillons dans les réfrigérateurs d'entreposage [21].

III-1 Objectifs principaux de l'automatisation

- Augmenter l'efficacité des laboratoires
- Répondre aux exigences accrues de fiabilité et de qualité
- Réduire au minimum le temps passé sur des tâches sans valeur ajoutée ; prise en compte d'un maximum de tâches manuelles

- Diminuer les risques et renforcer la sécurité biologique pour le personnel
- Minimiser les volumes d'échantillons nécessaires
- Optimiser le délai de rendu des résultats en assurant une excellente qualité analytique adapté à la situation d'urgence (analyse 24h /24h) [20-22].

L'équipe de R. Dadoun, vice président de l'hôpital St Mary de Montréal tendent à soutenir la perspective d'automatisation totale ou TLA

Cette équipe élabore trois études: La première montre que le temps de réponse des analyses de chaque échantillon passé dans un système est considérablement réduit si l'on passe, grâce à l'automatisation , de 40 étapes manuelles identifiées à 21 étapes (figure 6 A)

Observant quel est le temps moyen d'analyse de chaque tube, Dadoun montre que l'automatisation permet de faire passer la moyenne de traitement de chaque tube de 35 min à 25 min. l'écart type moyen est considérablement réduit, il passe de +23 min à +6 min, ce qui signifie que plus on automatise plus on réduit les écart entre tubes.

En conséquence, Dadoun a intégré dans l'ensemble des analyses traitées ce qui relevait de la routine et ce qui relevait de l'urgence sans distinction de l'une ou de l'autre. L'étude réalisée lui permet d'observer le résultat suivant : le nombre d'étapes manuelles passe de 12 à 2, et le temps de réponse moyen est réduit de manière considérable, ainsi que l'écart type (figure 6 B). Urgence comprise, 90% des échantillons sont analysées en moins de 30min.

Enfin, dans une troisième étude menée avec l'hôpital de New York Dadoun a observé une augmentation nette de la productivité : alors que le nombre d'analyses augmentait et que le nombre d'heures de travail nécessaire était réduit, la même équipe était capable de réaliser 122 analyses à l'heure en 2003 au lieu de 52 en 1997 [22].

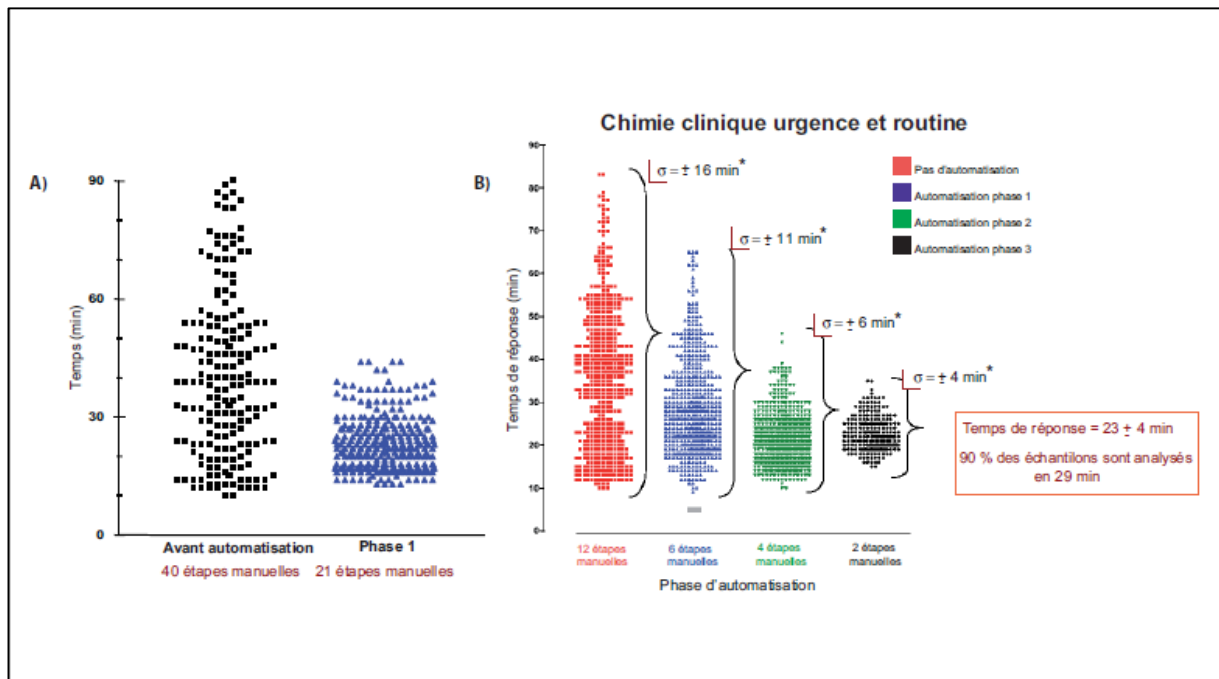


Figure 6 : Diminution du temps de réponse corrélé à la diminution du nombre d'étapes manuelles d'après les travaux de R. Dadoun. Illustrations adaptées avec l'aimable consentement de R. Dadoun. *Statistiquement significatif ($p < 0,01$) [22]

III-2 Principes technologiques des automates d'hématologie cellulaire

III-2-1 Principe de la mesure par impédance

Dans le principe décrit par Coulter (1956) [5] les cellules sanguines sont utilisées pour interrompre un courant passant entre deux électrodes. Le signal ainsi produit est détecté et analysé. Les cellules sanguines, dont les membranes lipidiques sont non conductrices, présentent une résistivité élevée et se comportent comme des isolants vis-à-vis d'un courant électrique à basse fréquence. La description ci-dessous et la figure 7 sont extraites de la présentation originale de Wallace Coulter à la National électronique conférence (États-Unis) en 1958 : « Une suspension très diluée de cellules est contenue dans un béccher E où l'on a immergé une électrode D. Un tube B est muni d'un orifice A très petit au travers duquel un volume très exactement défini de cette suspension est aspiré. La seconde électrode C est immergée dans ce tube. Chaque fois qu'une cellule sanguine passe à travers l'orifice A, elle provoque une impulsion (liée à l'augmentation temporaire de résistivité) dont l'amplitude dépend de la taille de la cellule. Les impulsions sont comptées et leurs amplitudes mesurées. Connaissant le volume de suspension aspiré et le rapport initial de dilution on peut en déduire le nombre de cellules dans un volume de sang donné et mesurer leurs tailles. L'hématocrite peut être aisément calculé ». Il est très important de noter qu'ici le spécimen original est très dilué.

La figure 8 est une simplification de la précédente et permet de mieux comprendre la procédure utilisée [16].

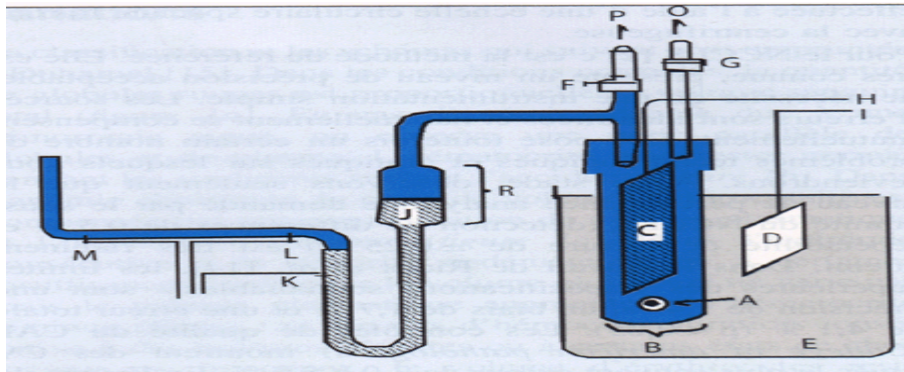


Figure 7 : Description par Coulter de son système de comptage des cellules sanguines [16]

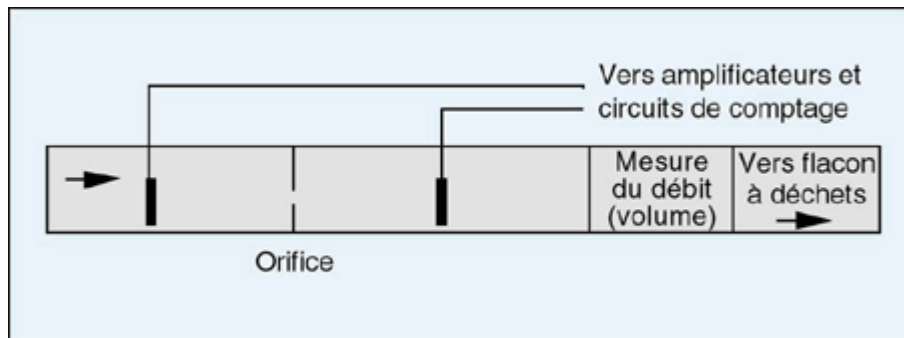


Figure 8: Schéma simplifié du principe de Coulter [16]

La hauteur des impulsions enregistrées est proportionnelle au volume de la cellule détectée d'où identification.

La méthode d'hydrofocalisation améliore encore l'exactitude des résultats (figure 9) [17]: elle garantit que les cellules passent à travers l'orifice en une seule file et élimine donc les estimations de volume incorrectes par :

- Le flux de balayage (sweep flow) : un flux de diluant balaie l'arrière des orifices, empêchant les cellules de retourner dans la zone de détection et de perturber l'analyse (surtout pour les plaquettes)
- La correction de coïncidence : Lorsque deux cellules traversent simultanément l'orifice, elles ne génèrent qu'une seule impulsion de forte intensité : c'est le passage en coïncidence, sa fréquence est une loi statistiquement prévisible qui est corrigée automatiquement par les analyseurs d'hématologie.

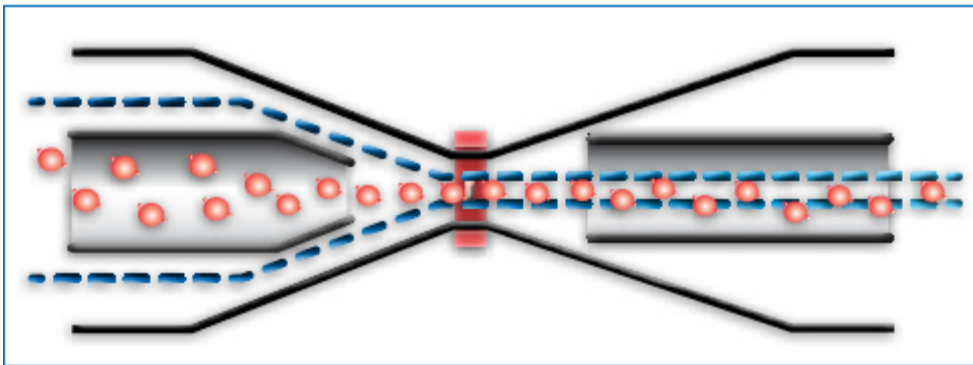


Figure 9: Principe de l'impédance avec méthode d'hydrofocalisation [17]

Les impulsions générées sont triées de façon à ne garder que celles correspondant à un passage standard.

Les cellules sont classées en fonction de leur volume dans différents canaux, ce qui permet la construction des histogrammes érythrocytaire et plaquettaire (figure 10)

Un nombre élevé de canaux traduit avec précision la réalité.

- Trop faible : ne rend pas compte de la répartition volumétrique vraie
- Trop élevé : chaque cellule devient unique [18]

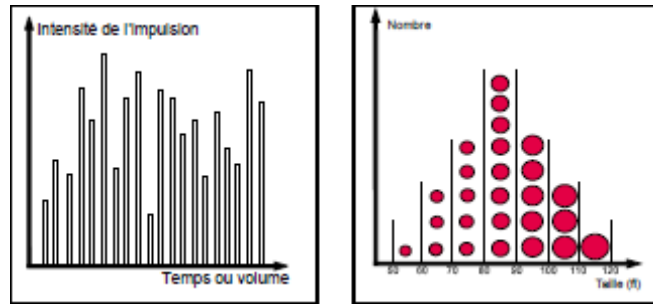


Figure 10 : Construction des histogrammes

Répartition des impulsions dans des canaux [19]

Application :

- **Numération des érythrocytes** : Toute particule d'un volume supérieur à 36 fl est comptée comme un globule rouge
- **indice de répartition des globules rouges (IDC ou IDR ou RDW)** :
Les analyseurs automatiques produisent des histogrammes, représentant la taille de chaque cellule, déterminée par la hauteur de l'impulsion générée lors de son passage par l'ouverture d'impédance. Plusieurs populations de cellules peuvent être évaluées, les plaquettes et les hématies étant en général représentés ensemble. Ces deux populations de cellules sont différenciées l'une de l'autre par les fameux discriminateurs qui s'appuient sur la taille des cellules. L'IDR est une mesure quantitative de la variabilité de la taille des hématies, indiqués sous la forme IDR-SD et IDR-CV (Figure11) [17].

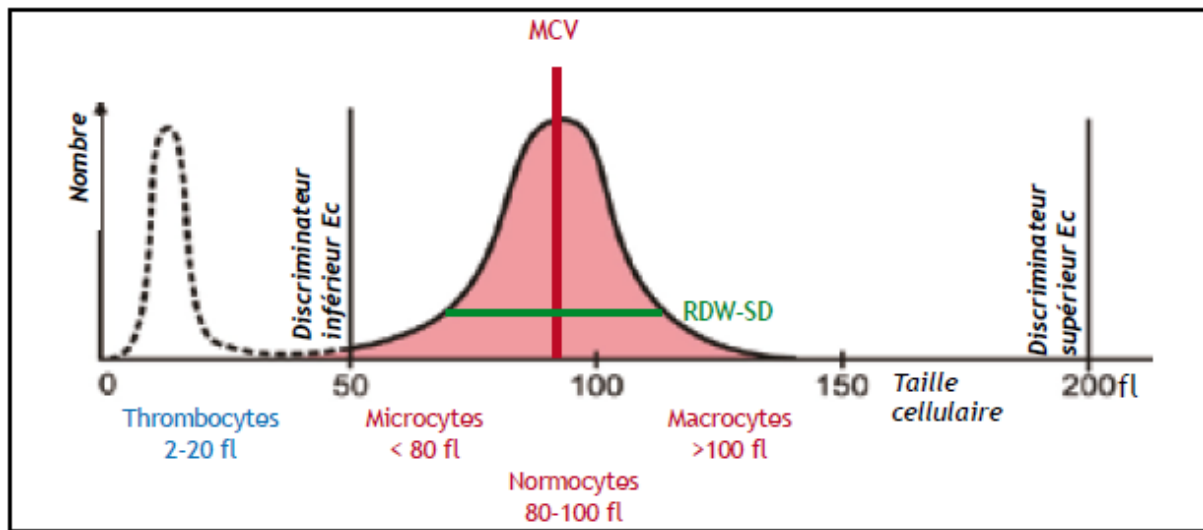


Figure11: Histogramme des hématies illustrant le concept d'IDR [19]

-Numération des plaquettes : Les seuils identifiant les particules comptées comme des PLT varient de 2 à 6 fl pour le seuil inférieur (discrimination des PLT et du bruit de fond) et de 20 à 40 fl pour le seuil supérieur (discrimination avec les GR) (Figure12) [40].

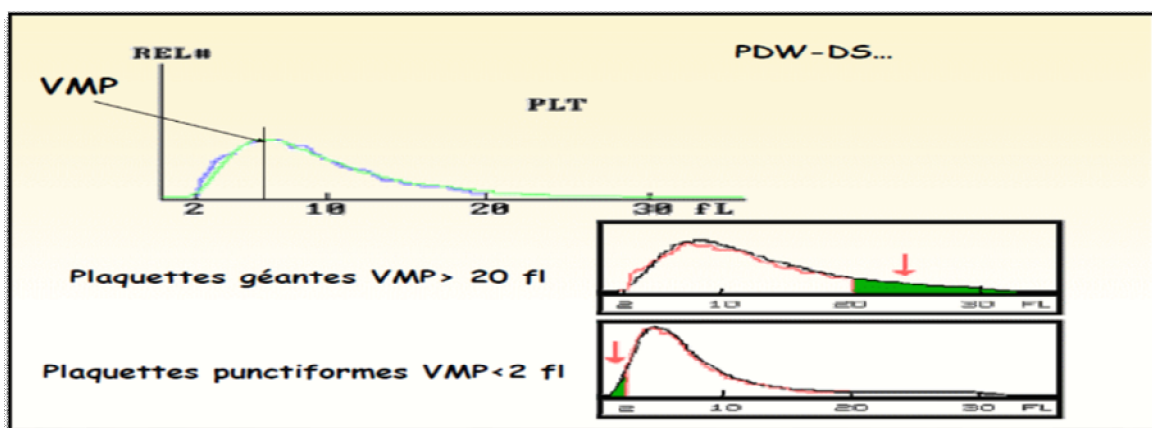


Figure 12: Histogramme des plaquettes [18]

- **Numération des leucocytes :** les analyseurs d'hématologie automatique différencie les leucocytes en trois populations en se basant sur la mesure par impédance d'une suspension de sang dilué après lyse des érythrocytes par des réactifs chimiques (les leucocytes restent intacts).

Trois groupes sont identifiés en fonction du volume des cellules (figure 13) :

- Les cellules de grandes taille ou granulocytes
- Les cellules de petite taille ou lymphocytes
- Les cellules de taille moyenne ou monocytes

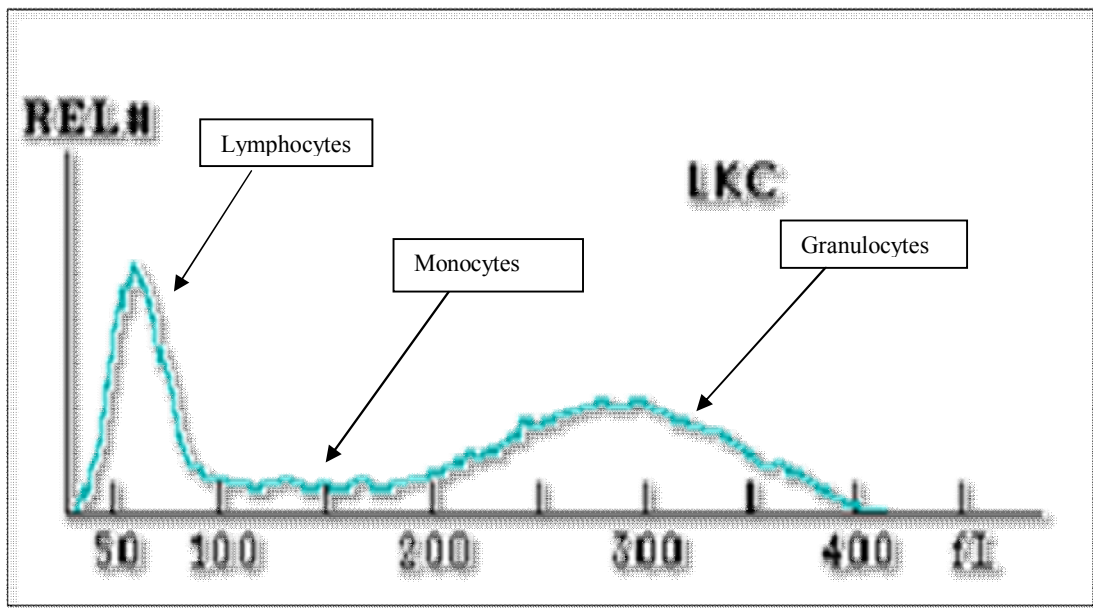


Figure 13: Histogramme différentiel volumétrique des leucocytes, détermination de 3 sous populations [18]

▪ Détermination de l'hématocrite

La mesure de l'Ht par un analyseur automatique d'hématologie est en effet obtenue grâce à la technique de l'impédance : le passage de chaque cellule à travers l'ouverture génère une impulsion électrique, présumée proportionnelle au volume de la cellule. L'Ht est obtenu à partir du cumul des hauteurs d'impulsions générées par chaque cellule (figure 14) selon la formule indiquée dans la figure 15 [17].

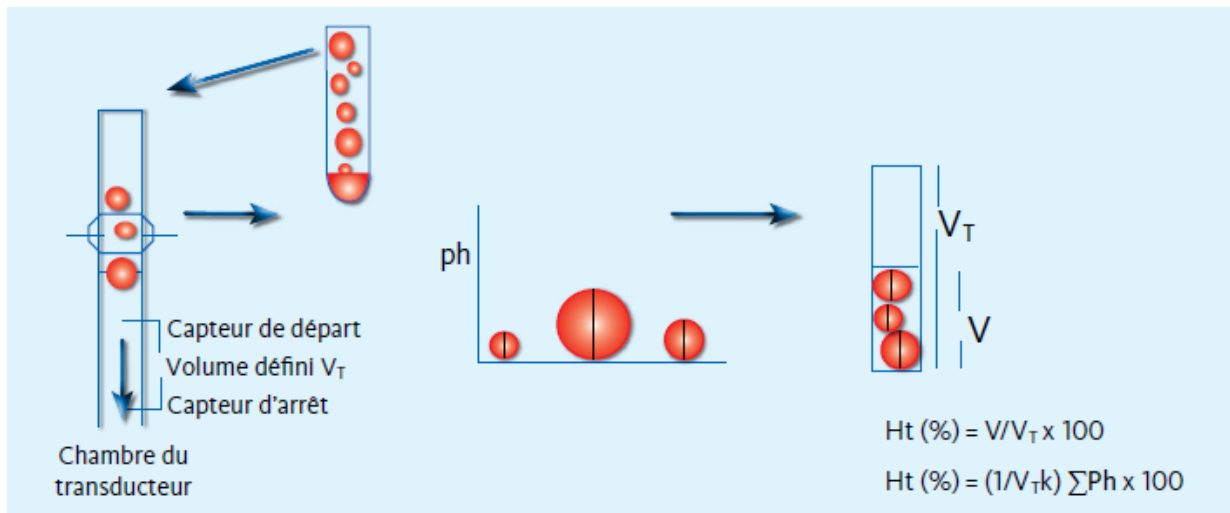


Figure 14 : Représentation schématique de la mesure automatique de l'Ht par procédé de détection du cumul des hauteurs d'impulsions [17]

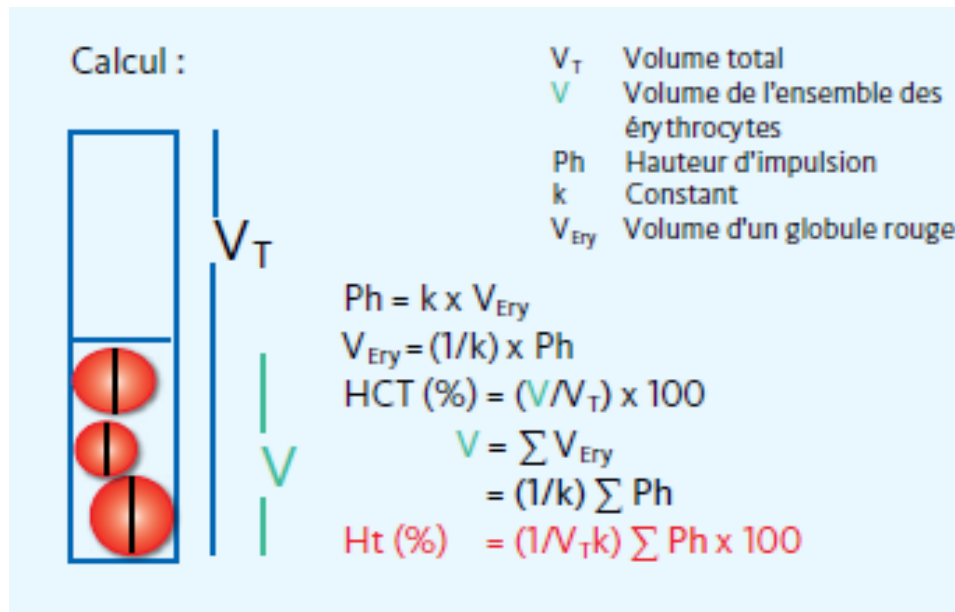


Figure 15 : Formule de la mesure automatique de l'Ht [17]

III-2-2 Détection optique par diffraction d'un rayon laser (cytométrie en flux)

Permet d'obtenir des renseignements sur le nombre, la taille des cellules et leur contenu cytoplasmique (la granularité)

La cytométrie en flux est la mesure (métrie) des propriétés optiques de cellules (cyto-) transportées par un liquide vecteur (flux) jusqu'à une source d'excitation lumineuse, souvent un laser.

Un cytomètre de flux est composé de quatre éléments :

- Fluidique: séparation et alignement des particules, tri, vitesse d'analyse et de tri;
- Optique: source(s) lumineuse(s), détecteurs, séparation spectrale (filtres, miroirs dichroïques)

- Electronique: collection et analyse des signaux optiques, affichage des données, contrôle des sources lumineuses, des détecteurs ;
- Analyse des données: affichage et analyse des données, analyses multi-variées, identification de sous populations et quantification.

Les cellules à étudier sont mises en suspension dans un milieu et sont très diluées comme dans le principe Coulter, puis sont aspirées par un système de pompe et envoyées une à une devant un faisceau laser qui permet de mesurer ou d'évaluer des paramètres cellulaires.

La lumière diffractée par ces cellules est captée par des détecteurs qui transmettent l'information à l'ordinateur pour le traitement du signal, lequel utilise notamment l'angle de diffraction [20].

La lumière diffractée peut alors être analysée sous différents angles :

- Intensité de la lumière diffractée par la cellule, recueillie dans l'axe de la lumière incidente, dite "diffraction aux petits angles" (2 à 6°), (FALS Forward Angle Light Scatter, ou FSC Forward Scatter Channel), est en relation proportionnelle avec la taille cellulaire, la forme cellulaire, et l'indice de réfraction cellulaire

- Intensité de la lumière diffractée par la cellule, recueillie de 8° à 90° de l'axe de la lumière incidente, "diffraction aux grands angles", (RALS Right Angle Light Scatter, ou SSC Side Scatter Channel), est en relation proportionnelle avec l'hétérogénéité du contenu cellulaire, présence/absence et taille de granulation cytoplasmique, forme et taille du noyau, rapport N/C, densité chromatinienne du noyau, ce paramètre est appelé « Granularité » (Figure 16) [16,18].

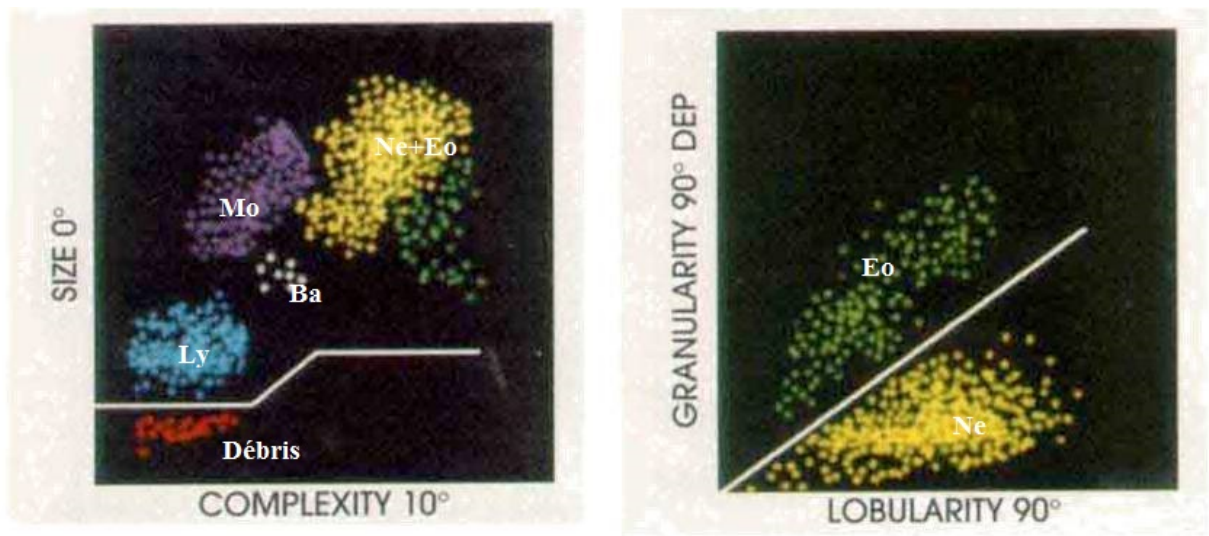


Figure 16 : Diffraction Laser multi angulaire (Abbott Diagnostics) [18]

III-2-3 Cytométrie de flux par fluorescence ou cytofluorométrie de flux

Différencie les cellules en se basant sur leur concentration en acide nucléique, leur structure interne ou leur complexité.

L'échantillon est exposé à un colorant fluorescent qui se lie à l'ARN et l'ADN intracellulaires. L'intensité du signal fluorescent est proportionnel à la concentration d'ARN/d'ADN de chaque cellule. En outre, la différenciation atteint un degré élevé d'exactitude grâce au logiciel offrant un système d'analyse cluster adaptative (ACAS). Ceci garantit que chaque population cellulaire forme un cluster distinct avant que les événements soient identifiés comme appartenant à une sous catégorie de cellule. D'autres systèmes utilisent un portillonnage fixe pouvant générer le comptage, dans un groupe incorrect, de certaines cellules, en particulier dans le cas d'échantillons pathologiques [26].

Application :

- Différenciation des leucocytes en 5 populations : lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles.
- Identification des cellules immatures : grâce au principe selon lequel leur concentration en acide nucléique est supérieure à celle des cellules matures. la numération des granulocytes immatures inclut les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes mais pas les granulocytes non segmentés (figure 17).
- Identification qualitative des cellules immatures et anormales grâce à un système d'alarme [26].

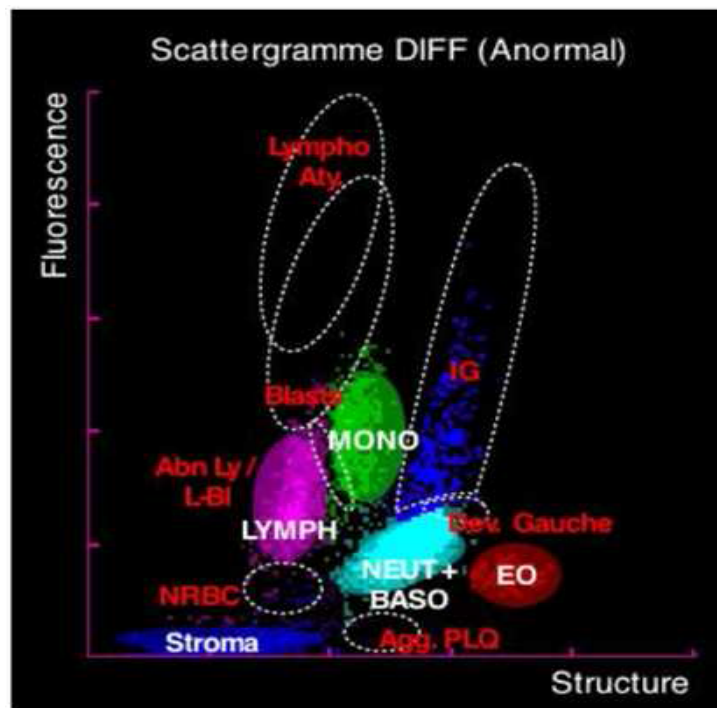


Figure 17 : Graphique de corrélation différentiel de sysmex indique les positions où il est probable de trouver les populations anormales [26]

III-2-4 Analyse par cytochimie sélective

Ces techniques sont utilisées par certains constructeurs pour identifier ou sélectionner les populations leucocytaires.

La réaction des peroxydases, principalement la réaction significative cytochimiques de la myéloperoxydase, sert à la mise en évidence des éléments cellulaires myéloïques, dans laquelle le degré de maturité des granulocytes arrivant à maturité peut être largement apprécié d'après l'intensité de la réaction colorée brun-noir.

Principe :

Les peroxydases sont des catalases lysosomales qui transfèrent un donateur approprié (autrefois la benzine carcinogène, ici : chloro-4-naphtol-1) sur un peroxyde (ici le superoxyde d'hydrogène). Ce faisant, le donneur chloro-4-naphtol-1 est oxydé et transformé en un colorant insoluble brun noir qui peut être considéré comme un indicateur de l'activité correspondante des peroxydases [23].

Appréciation :

- Toutes les cellules de la série de maturation des neutrophiles et en particulier des éosinophiles sont nettement positifs (granulés de colorations brun noir) à la peroxydase.
- La majorité des monocytes normaux réagit également de manière positive à la peroxydase ; leur coloration est toutefois plus faible par comparaison aux granulocytes neutrophiles et éosinophiles.
- Les granulocytes basophiles ainsi que toutes les cellules de la série lymphatique et érythropoïétique sont négatifs à la peroxydase [23].

III-2-5 Analyse par un courant à haute fréquence

Cette technique a été décrite initialement en 1948-50 pour la mesure automatique directe de l'hématocrite, améliorée et perfectionnée entre 1950 et 1956. Elle utilise le même principe de base que celle de Coulter mais avec une approche globale et non " cellulaire ". Le sang est un mélange de cellules (faiblement conductrices) en suspension dans du plasma (fortement conducteur). La conductivité d'une ligne de sang total est donc fonction de la conductivité du plasma, de la fraction volumique des éléments figurés et de leur forme. Les érythrocytes constituent l'immense majorité de ces éléments et l'on peut pratiquement ignorer les autres. La conductivité diminue lorsque le nombre de cellules augmente et inversement [16].

Application d'un courant alternatif à haute fréquence (Radio Fréquence) et un courant continu à basse fréquence (courant continu ou DC) (Sysmex XE 2100) permet la détection des Granulocytes immatures sachant que les autres cellules sont déterminées selon d'autres principes (impédance, diffraction avec fluorochrome de l'ARN, diffraction laser aux petits et grands angles et lyse chimique [40].

III-2-6 Lyse chimique

Des procédés de lyse sont appliqués à la numération des polynucléaires basophiles sur certains instruments. Addition d'agents de lyse drastiques qui détruisent les GR et les membranes leucocytaires tout en respectant les noyaux leucocytaires, à l'exception des granulocytes basophiles qui restent intacts. Ce canal de numération des leucocytes est encore appelé « canal basophiles », car il fournit le nombre de noyaux leucocytaires et le nombre des polynucléaires

basophiles (l'ensemble correspondant à la numération leucocytaire totale). Sur certains AHC les réactifs lysent les GR et contractent les leucocytes (déshydratation partielle), permettant d'obtenir le nombre de leucocytes ainsi qu'une formule leucocytaire approchée à trois paramètres appelée LMG (pourcentages de lymphocytes, monocytes et granulocytes) [91].

III-2-7 Dosage par spectrophotométrie

Après lyse des globules rouges par une solution de lyse (réactif de lyse pour méthode automatique), l'Hb est converti en un chromogène stable (cyanméthémoglobine). L'absorbance lue est directement proportionnelle à la concentration en Hb [24].

III-2-8 Calcul

Utilisation de nombre de GR et de l'Hb pour le calcul de : CCMH et TCMH

III-2-9 Marquage spécifique

Les cellules hématopoïétiques sont très bien caractérisées par les marqueurs (antigènes) qu'elles portent à la surface de leur membrane. Ces antigènes de surface permettent de définir l'appartenance d'une cellule à une lignée hématopoïétique et également son stade de différenciation et d'activation. Les dernières innovations en hématologie viennent d'ailleurs de l'utilisation de nouveaux marqueurs, visant ces antigènes de membranes, permettant des détections toujours plus précises des sous-populations cellulaires [20,40].

Les applications d'immunomarquage cellulaire réalisables sont [25]:

- Numération des plaquettes par immunomarquage CD61 (anti Gp IIIa) pour une meilleure prise en charge des thrombopénies profondes
- Numération des sous populations lymphocytaires CD 3/4/8 pour une meilleure prise en charge des patients séropositifs pour le VIH.

Par ailleurs certain automate propose un mode spécialisé ouvert à l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour d'autres applications de typage cellulaire par une méthode simple et rapide:

- Technique de comptage d'hématies fœtales RhD+ dans le sang maternel RhD- (anticorps anti D+ BRAD 3 FITC)
- Typage d'hémopathies lymphoïdes (CD5/CD19)
- Dosage de l'antigène de surface CD 64 dans le diagnostic du sepsis

III-3 Etat d'art des automates en hématologie

Les AHC actuels produisent des résultats rapides, exacts et précis à partir d'un faible échantillon de sang en utilisant une combinaison de plusieurs principes technologiques pour une analyse multiparamétrique et une cadence de plus de 100 échantillons par heure.

En revanche, pour répondre aux contraintes actuelles de productivité, de traçabilité, de temps de traitement, de délais de rendu de résultats et de réduction des coûts, les industriels proposent de nouvelles configurations modulaires ou consolidées surtout pour faire face à la fusion des laboratoires en un grand ensemble.

Au cours du congrès annuel 2014 de l'American Association of Clinical Chemistry (AACC) les entreprises présentent des nouveautés concernant les automates d'analyses automatisés de biologie médicale en générale.

Concernant l'hématologie cellulaire : pour répondre aux contraintes et attentes des laboratoires à grande activités, les industriels proposent les solutions suivantes : interconnecter plusieurs automates à la fois et même une analyse de cytologie hématologique en ligne, qui assure dès lors et en un seul passage, la numération formule sur les AHC, suivie de l'étalement sur l'étaleur colorateur et la caractérisation de la morphologie des cellules sur l'analyseur morphologique automatisé [32].

Exemples de propositions actuelles

Beckman Coulter propose la solution Workcell Hemato qui permet d'interconnecter jusqu'à 3 automates de type DxH 800 couplés avec un étaleur/colorateur (UniCel DxH slidemaker /stainer) directement connecté sur la chaîne.

SYSMEX présente des solutions d'hématologie configurables selon les activités et besoins spécifiques de chaque laboratoire. Nous retrouvons ainsi la gamme actuelle composée des solutions :

- XN-1000 : un analyseur de paillasse XN (XN-10 ou XN-20) pour une cadence annoncée de 100 échantillons/ heure avec 5 racks de 10 tubes.
- XN-2000 : deux modules d'analyse XN (XN-10 ou XN-20) pour une cadence annoncée de 200 échantillons/ heure avec 10 racks de 10 tubes.
- XN-3000 : deux modules d'analyse XN et un module étaleur-colorateur de lames SP-10.
- XN-9000 : composée de plusieurs modules d'analyse XN (trois ou plus) pouvant atteindre des cadences de 900 échantillons/heure associés à l'étaleur-colorateur de lames SP-10.

Cette solution dispose d'une fonctionnalité appelée « rerun et reflex » disponible sur les configurations XN-1000, XN-2000 et XN-3000 qui permet de réintégrer automatiquement dans le flux de travail les échantillons devant être réanalysé.

Quant à l'identification de l'échantillon, elle est assurée par une première lecture du code-barres lors du positionnement aléatoire du tube sur le rack de l'échantillonneur puis par une seconde lecture pour interrogation avant le pipetage par l'aiguille [32, 33].

SYSMEX présente l'analyseur morphologique SYSMEX DI-60, premier dispositif de cytologie numérique entièrement automatisé et intégré à une chaîne d'hématologie. Le DI-60 (84 cm) est un microscope digitalisé issu de la collaboration entre SYSMEX et CELLAVISION déjà connu pour le DM1200, automate de cytologie numérique jusque-là indépendant, que l'on pouvait placer à proximité de la paillasse d'hématologie.

Le DI-60 se compose d'un microscope automatique, d'un appareil photo numérique haute définition et d'un système informatique. Celui-ci collecte et procède à un classement des cellules obtenues à partir de frottis sanguins préalablement colorés par l'étaleur-colorateur. Il localise automatiquement les cellules sur la lame et prend des photographies de chacune d'entre elles. Il analyse ensuite chaque image avant d'effectuer une classification par type cellulaire [32].

✓ Les principales technologies actuellement disponibles pour l'analyse automatisée de l'hémogramme avec certains automates d'hématologie de numération et de formule leucocytaire sont représentés dans le tableau III [30, 33, 34, 40, 43].

**Tableau III : Les principales technologies actuellement disponibles
pour l'analyse automatisée de l'hémogramme avec certains AHC**

	Technique de numération	Formule leucocytaire
Siemens: Advia 2120i	Diffraction optique (leucocytes, PLT, GR) Quantification des érythroblastes (calcul à partir d'une analyse multicanaux) Réticulocytes : nombre, volume, fraction immature, contenu en Hb	Basophiles : lyse différentielle et diffraction optique Neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par diffraction optique en fonction de la taille et de l'absorption en fonction de la réactivité de la peroxydase
Sysmex: XE-2100 XE-5000	Variation d'impédance (GR, PLT) en première analyse Diffraction optique (GR, PLT) avec fluorochrome de l'ARN : déclenchement automatique ou à la demande Fraction PLT immature Leucocytes : diffraction laser (sans et avec fluorochrome) Quantification des érythroblastes (avec polyméthine : diffraction et intensité de fluorescence) Réticulocytes : nombre, fraction immature, contenu en Hb	Basophiles : lyse différentielle et diffraction optique Neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par diffraction optique aux petit et grand angles, et mesure de fluorescence Granulocytes immatures : détection avec un courant alternatif à haute fréquence (Radio Fréquence) et un courant continu à basse fréquence (courant continu ou DC)
Sysmex: la gamme XN	Les mêmes techniques que la gamme X avec des nouveautés : l'introduction de nouveaux canaux basés sur la technique de cytométrie en flux avec fluorescence : WNR, WDF, WPC (déclenchés comme test reflexe pour différencier les blastes des lymphocytes anormaux), PLAQ-F (en cas d'anomalies des GR) l'impédance n'est plus utilisée pour la numération des leucocytes	Séparation des Mono et Lymph dans le WDF grâce à un nouveau réactif de perforation
Horiba Medical: Pentra 120 DX	Variation d'impédance (GR, PLT) Leucocytes : variation d'impédance et histogramme Lymphocytes, Monocytes, Granulocytes (LMG) Quantification des érythroblastes (thiazole orange ; diffraction et intensité de fluorescence) Réticulocytes : nombre, fraction immature, volume	Basophiles : impédance après lyse des autres leucocytes Neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par impédance électrique et transmission optique (absorption lumineuse) après coloration par le noir chlorazol E
Beckman Coulter: LH 785	Variation d'impédance (GR et PLT) [pour les PLT : calcul de log-normalité, courbe lissée] Leucocytes : variation d'impédance et histogramme LMG Quantification des érythroblastes (calcul après expansion d'échelle et modélisation des données) Réticulocytes : nombre, fraction immature, volume	Basophiles, neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par variation d'impédance, courant électrique haute fréquence et diffraction d'un faisceau de lumière monochromatique (volume, conductivité, diffraction) puis analyse multidimensionnelle et individualisation des populations dans un espace cubique
Abbott diagnostics: Cell-Dyn Sapphire	GR et PLT : impédance et diffraction optique en parallèle PLT : cytofluorométrie en flux avec CD61 (à la demande) Leucocytes : diffraction optique Quantification des érythroblastes (iodure de propidium ; diffraction et intensité de fluorescence) Réticulocytes : nombre, fraction immature, volume	Basophiles, neutrophiles, éosinophiles, monocytes et lymphocytes : mesure par diffraction optique MAPSS (Multi Angular Polarised Scatter Separation : transmission, diffraction à angle aigu et angle droit, dépolarisation) ; sans colorant ou cytochimie

✓ Technologies et caractéristiques des automates étaleurs colorateurs

➤ SP-1000i de Sysmex

▪ Descriptif technique :

Unité de Préparation et de coloration de Lame Hématologique Automatisée et perfectionnée Disponible sur les systèmes automatisés XE et HST-NMC de Sysmex.

▪ Caractéristiques :

Le SP-1000i offre un moyen rapide et constant pour préparer les frottis de sang périphérique au laboratoire. Le système contribue à réaliser des gains de productivité en tant que partie d'un système X ou d'un système HST intégré.

- Il améliore et standardise le temps nécessaire pour préparer le frottis
- Une préparation de lame réflexive : il applique les critères définis par le laboratoire pour préparer les frottis.
- Un faible volume d'échantillon nécessaire : le mode intégré de microéchantillon aspire 60 μ L de volume d'échantillon pour préparer et colorer des frottis de qualité [28].
- Il produit de manière constante des frottis de qualité : préparation des frottis de sang en fonction de la valeur d'hématocrite de chaque échantillon, en ajustant le niveau du frottis de sang par l'angle d'inclinaison et la vitesse de la glissière d'écartement (tableau IV) [27].

Tableau IV : Paramètres des frottis de sangs effectués par l'équipement Sysmex[®] SP-1000i calculée à partir de l'hématocrite du patient [27]

	Hématocrite(%)	Angle(°)	Vitesse (mm /s)
Niveau 1	<20	31	180
Niveau 2	20-25	30	175
Niveau 3	25-30	29	165
Niveau 4	30-35	29	160
Niveau 5	35-40	29	155
Niveau 6	40-45	29	150
Niveau 7	45-50	29	120
Niveau 8	>50	29	100

- Exploitation flexible :
 - Il a la capacité de colorer des frottis préétablis (ex : échantillons de liquide biologique, de moelle osseuse)
 - Il peut produire automatiquement de multiples frottis
 - Technologie :
- Préparation de la lame :
 - Utilisent une lame d'étalement robuste et autonettoyante pour préparer des frottis monocouches
 - Impriment directement sur la lame porte-objets des informations selon les options définies par le laboratoire
 - Sèchent automatiquement les frottis avant coloration
 - Abritent les lames dans des cassettes individuelles

- Coloration :

- Des périodes de coloration modifiables pour permettre au laboratoire d'obtenir des frottis colorés optimaux
- Le recyclage du colorant aide à réduire le gaspillage de colorant
- La conception unique et réutilisable des cassettes empêche l'évaporation du colorant et permet une coloration régulière
- Sèchent automatiquement les frottis colorés avant qu'ils n'arrivent à la zone de sortie [28].

➤ CELL-DYN SlideMaker /Stainer (Cell-Dyn SMS): Abbott diagnostics

▪ Descriptif technique :

Unité de Préparation et de coloration de Lame Hématologique Automatisée. Disponible sur les systèmes automatisés Cell-Dyn Sapphire de Abbott diagnostics.

▪ Caractéristiques :

Cell-Dyn SMS offre la possibilité de préparer des frottis de qualité en optimisant plusieurs paramètres. L'auto-chargeur utilisé à 50 positions différentes et est responsable d'identifier chaque échantillons. Il améliore le temps nécessaire pour préparer le frottis : 80 frottis sanguin /heure.

Un faible volume d'échantillon nécessaire : aspire 200µl de volume d'échantillon pour préparer et colorer des frottis de qualité

Exploitation flexible : employer n'importe quel colorant et produire des frottis multiple pour un même échantillon [35].

➤ UniCel® DxH Slidemaker / Stainer (DxH SMS) : Beckman Coulter

▪ Descriptif technique :

Unité de Préparation et de coloration de Lame Hématologique Automatisée conçu pour être installé à la suite d'un ou plusieurs DxH 800 de Beckman Coulter (un maximum de trois automates de type DxH 800 pour créer une ligne de travail d'hématologie connecté) ou bien être complètement autonome par rapport à la plate forme analytique.

▪ Caractéristiques :

- Cadence de travail : 150 Lames colorées à l'heure
- Un faible volume d'échantillon nécessaire : le mode intégré de microéchantillon aspire 90 µl de volume d'échantillon pour préparer quatre frottis de qualité (aspiration unique)
- Une préparation de lame réflexive : il applique les critères définis par le laboratoire pour préparer les frottis
- Le système dispose d'un graveur de lames (code-barres, numéro...). Méthode MGG classique. Les colorants sont aqueux et écologiques. Ils ne contiennent pas de méthanol. Ils ne sont pas toxiques.
- L'équipement est doté de deux bidons de diluant. Ces bidons sont commutés automatiquement. Le remplacement du bidon destiné à la « formule » est remplacé toutes les 2000 « formules ».
- L'appareil ne nécessite qu'une demi-heure d'arrêt par jour [33,36].

III-4 Evaluation des performances des automates d'hématologies cellulaires : vérification/validation de méthode

III-4-1 Définition

La vérification/validation des méthodes s'effectue en deux phases : une phase initiale avant la mise en œuvre en routine et une phase de vérification continue afin de confirmer les performances dans le cadre du fonctionnement quotidien du laboratoire.

Les évaluations sur sites qui comparent la nouvelle technologique à celle à laquelle elle doit succéder sont fréquentes. S'il est difficile de démontrer l'exactitude des méthodes automatisées, les études de comparaison doivent être menées en utilisant des critères de qualité dépendant du processus analytique mis en œuvre et en suivant les règles recommandés [37]. Parmi ces critères seront étudiés successivement la fidélité (répétabilité, reproductibilité), justesse, exactitude, limite de quantification, contamination inter échantillons, ainsi que la comparaison de méthode (quand les principes analytiques des instruments ne sont pas rigoureusement les mêmes). Par ailleurs, il est utile lorsque l'automate est depuis un ou deux ans sur le marché, de s'aider des annales du contrôle de qualité en hématologie organisées par l'Agence du médicament : les performances de nombreux automates y sont analysées [37, 38].

III-4-2 Description de la méthode et maîtrise des risques

La première partie est consacrée à la description de la méthode, le laboratoire doit collecter les informations pertinentes à connaître sur le système analytique telles que le Principe de mesures de l'analyte, le type d'échantillon primaire et de récipients et additifs, les unités et les intervalles de références mais aussi des informations sur le matériel : le type d'instrument, la référence des réactifs, les matériaux d'étalonnage. L'ensemble de ces informations est en général disponible et facilement accessible dans les documents fournisseur (mode d'emploi, fiche réactifs...) et doivent être consignées dans le rapport de validation.

Le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser pour chaque paramètre [38].

III-4-3 Evaluation de l'AHC : critères de performances initiales

III-4-3-1 Fidélité

a- Evaluation de la répétabilité

➤ Définition

L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales.

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes: même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné [38].

➤ **Méthode**

En pratique, Il est recommandé d'utiliser au minimum deux niveaux de concentration, en choisissant, si possible, un niveau proche de la (des) zone(s) décisionnelle(s). Pour une interprétation statistique optimale Le nombre de détermination idéal par niveau est de 30.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

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

Le CV calculé permet une évaluation de la répétabilité de la méthode exprimée en %.

Lors de la vérification, le CV calculé est comparé au CV limite admissible, préalablement choisi (fournisseurs, sociétés savantes, ...) [38].

b- Fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire)

➤ **Définition**

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages. L'objectif est de connaître la variabilité analytique de la méthode.

Il est souhaitable que les niveaux testés pour évaluer la fidélité intermédiaire soient identiques à ceux testés en répétabilité (établissement de la robustesse).

➤ **Méthode**

La fidélité intermédiaire est établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et au minimum à deux niveaux de concentration.

Classiquement, la fidélité intermédiaire est évaluée à l'aide des coefficients de variation calculés à partir des résultats des CIQ. L'essai est réalisé au cours de séries successives, en général 1 à 2 fois par jour, d'échantillons de Contrôle Interne de Qualité (CIQ) quotidiens (L'utilisation d'échantillons de patients n'est pas adapté pour la détermination de la FI) [38].

III-4-3-2 Justesse

➤ **Définition**

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées «m» et une valeur de référence (ou valeur vraie) «v». L'objectif est d'évaluer l'erreur systématique encore appelé biais. L'obtention de valeur vraie nécessite l'utilisation d'un matériau de référence certifié ce qui n'est pas possible. Lorsque l'on ne dispose pas de matériaux de référence, le biais est alors déterminé par rapport à une «valeur cible ».

➤ **Méthode**

La justesse est déterminée grâce au CQI externalisé [38].

L'erreur systématique est égale au biais exprimé en pourcentage calculé par la formule :

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

III-4-3-3 Exactitude

➤ Définition

L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée « x » et la valeur vraie « v » d'un mesurande. Elle permet de déterminer l'erreur totale (inexactitude), combinaison de l'erreur systématique et de l'erreur aléatoire

➤ Méthode

L'inexactitude de la méthode est déterminée grâce à l'exploitation des évaluations externes de la qualité (EEQ) [38].

L'erreur totale correspond à l'inexactitude en % calculé par la formule :

$$l'inexactitude(\%) = \frac{(x-v) \times 100}{v}$$

III-4-3-4 Limite de quantification

➤ Définition

La limite de quantification correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue.

➤ Méthode

La limite de quantification peut être évaluée à l'aide de dilutions d'un étalon ou de l'échantillon de Contrôle Interne de Qualité le plus bas (différent de 0) avec le diluant, selon le schéma : 100 + 0 ; 90 + 10 ;10 + 90 ; 0 + 100 soit 11 échantillons mesurés chacun 10 fois dans une série unique.

On calcule, pour chaque série de mesures des différentes dilutions, l'écart-type (s), le Coefficient de Variation (CV) et l'écart de la moyenne (m) à la valeur théorique (réalisation d'un profil de « précision » ou profil de fidélité). A partir de la courbe des CV en fonction des concentrations (courbe d'Horwitz), est déterminée la concentration correspondant à un CV de 10 % et représentant la limite de quantification [38].

III-4-3-5 Contamination inter échantillons

➤ Définition

Phénomène qui résulte de transfert d'une partie d'un échantillon dans un autre tel qu'il produit une modification dont l'effet peut être évalué et quantifié.

➤ Méthode

Une étude des contaminations inter-échantillons peut être effectuée de la façon suivante :

- Un échantillon à valeur élevée (ou positif fort) est analysé 3 fois consécutivement (H1, H2, H3, de moyenne mH)
- Echantillon à valeur basse également analysé 3 fois (B1, B2, B3).

Les séquences (H1, H2, H3, B1, B2, B3) peuvent être répétées plusieurs fois (5 fois) afin d'établir la moyenne des B1 (mB1) et la moyenne des B3 (mB3). La différence statistiquement significative entre les 2 moyennes pourra être établie à l'aide d'un test « t » de Student avant de procéder au calcul du pourcentage de contamination inter échantillons [38].

Le pourcentage de contamination entre les échantillons est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Contamination \%} = \frac{100 \times (mB1 - mB3)}{mH - mB3}$$

III-4-3-6 Comparaison de méthode

➤ Définition

La comparaison de méthode permet de vérifier la corrélation entre deux méthodes ou deux équipements qui mesurent les mêmes paramètres que ce soit lors du changement d'automate ou entre des automates en miroir. Sa réalisation est obligatoire si l'on souhaite utiliser les antécédents des patients dans leur suivi.

➤ Méthode

Pour comparer les résultats d'une méthode Y (à tester) avec ceux d'une méthode X (utilisée au laboratoire ou prise comme référence), on analyse au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique.

Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés en simple par les 2 techniques, dans un délai le plus court possible. Les résultats sont examinés au fur et à mesure, et il est vérifié si les discordances (écart entre les deux méthodes) sont jugées supérieures aux limites préétablies calculées comme suit :

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

Avec σ FI : écart-type de la fidélité intermédiaire (FI) obtenue à partir des CIQ.

Si σ FI technique testée = σ FI technique de comparaison = σ

Alors Limites de suivi = $\pm 4.24 \sigma$ pour chaque niveau de concentration

Pour chacun des couples retenus x_i (méthode X) et y_i (méthode Y) :

- Calculer les différences $x_i - y_i$
- Calculer les rapports y_i / x_i

Etablir les graphiques des différences, $(x_i - y_i)$ fonction de x_i et (y_i / x_i) fonction de x_i , et reporter les limites retenues en valeur absolue ou relative sur les graphiques.

L'analyse de ces graphes permet de repérer les échantillons déviants ainsi que d'éventuelles différences systématiques [38].

III-4-4 Assurer la qualité des procédures analytique

Les contrôles de qualité constituent la base de la phase de vérification continue et de confirmation des performances, pour contrôler la qualité du processus analytique et donc des résultats lors du fonctionnement au quotidien.

Les différents types de contrôle de qualité [39] :

- Contrôle interne de qualité (CIQ) : réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôles lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients pour vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction de limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli.

- Comparaison interlaboratoires (CIL) : organisation, exécution et évaluation de mesurages ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées (NF EN ISO/CEI 17043).

On distingue deux types de CIL :

- Evaluation externe de qualité (EEQ) : Procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire (essai d'aptitude, cf. annexe : définitions) par le biais d'une comparaison interlaboratoires réalisée par un organisateur respectant substantiellement les exigences de l'ISO 43-1 et la réglementation en vigueur à l'aide d'échantillon de contrôles inconnus.
- Contrôle interne de qualité externalisé : CIQ réalisé par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles confrontés entre eux par établissement périodique des moyennes (généralement mensuel) permettant d'estimer la justesse (biais). Le CIQ externalisé n'est pas considéré comme un EEQ (document SH REF 02).

III-5 Validation de l'automate étaleur colorateur

Le laboratoire doit également passer par un processus de validation Pour évaluer la performance et la fiabilité de l'automate étaleur colorateur incorporé dans la routine.

➤ Méthode

Pour chaque patient: deux lames sont préparées par l'automate étaleur colorateur. La première lame sert pour contrôler la qualité, en utilisant l'analyseur morphologique (lecteur de frottis) pour évaluer la qualité de la coloration et le pourcentage d'artefacts dans le frottis sanguin à travers un test de localisation cellulaire. Ce test vérifie la capacité de l'équipement de distinguer les leucocytes, les érythrocytes et des artefacts dans les frottis sanguins; le test de contrôle de qualité est seulement considéré comme suffisant lorsque la localisation cellulaire est supérieure à 97% et les artefacts sont moins de 30%.

La deuxième lame est utilisée pour effectuer l'analyse différentielle et des évaluations qualitatives des hématies, des leucocytes et des plaquettes dans le dispositif lecteur de frottis. Le test de pré-classement par l'équipement est évalué par un biologiste et en cas de désaccord entre les résultats, les cellules sont reclassées [27].

III-6 Critères de choix d'automates en hématologie

Le choix d'un automate d'hématologie par un laboratoire consiste bien souvent à comparer les performances du nouvel appareil à celles de celui utilisé jusqu'alors. Une stratégie d'utilisation doit ainsi être définie par l'utilisateur en fonction de ses besoins propres : population recrutée, performances de l'appareil, support informatique et surtout praticabilité.

Ce choix nécessite de pouvoir évaluer l'automate et doit se faire au cours d'une période d'essai sur site. Il nécessite le suivi d'un protocole simple mais complet (voir partie évaluation des performances des AHC)

Dans un second temps, la comparabilité des résultats permet d'apprécier la fiabilité des alarmes. Chaque échantillon présentant une alarme doit faire l'objet d'un contrôle visuel par un technicien expérimenté [37].

L'aspect biomédical de l'automate : Il permet de comparer les performances techniques de chaque appareil (paramètres mesurés, principes de mesures, traitement de l'échantillon, cadence horaire). Le support informatique participe également à la stratégie d'utilisation de l'automate.

L'ergonomie (dimensions de l'appareil, facilité d'utilisation par les techniciens de laboratoire, qualité du niveau sonore...) est désormais un facteur d'intégration, à part entière, de l'automate dans le fonctionnement du laboratoire.

Le volet financier de l'investissement: prix d'achat et ses perspectives d'amortissement, coût de réalisation d'un hémogramme, existence de stages de formation pour le personnel amené à utiliser l'automate, caractéristiques du contrat de maintenance et qualité du service après-vente.

On insistera, enfin, sur la nécessité de prendre contact avec les laboratoires utilisant déjà l'automate que l'on veut évaluer [37].



*Deuxième partie :
anomalies et erreurs de détermination
de l'hémogramme avec les automates
d'hématologie cellulaire*



Les AHC fournissent rapidement des résultats précis et exacts quelque soit leurs méthodologies d'analyse. Cependant, dans certaines circonstances, liées à des particularités de l'échantillon sanguin, à une pathologie particulière du patient étudié, à des modifications induites après le prélèvement, ou à la technologie utilisée pour la mesure, les AHC peuvent produire des résultats erronés pour un ou plusieurs des paramètres de l'hémogramme.

Les fabricants d'AHC ont amélioré avec les années la qualité d'analyse de leurs machines en tenant compte des diverses insuffisances signalées par les utilisateurs et, avec les progrès de l'analyse informatique, proposent maintenant des résultats fiables et précis pour les divers paramètres

Les AHC proposent des résultats chiffrés, des histogrammes mono-, bi- ou multiparamétriques avec des messages techniques donnant des informations sur le fonctionnement et divers messages d'alerte pour signaler plus précisément certaines des anomalies de mesure ou d'analyse. Ces divers messages et histogrammes complètent aujourd'hui l'interprétation technique et biologique de l'hémogramme : ils font habituellement l'objet d'une formation spécifique (formation « utilisateurs ») et sont inscrits dans le guide technique de l'automate.

Chaque biologiste doit savoir comment son AHC réagit devant les diverses situations qui peuvent conduire à la validation de résultats erronés, autant que le principe de fonctionnement de son automate afin d'éviter de rendre des faux résultats qui peuvent avoir un impact non négligeable pour le patient et sa prise en charge [40, 41].

I-PRINCIPALES SITUATIONS ASSOCIE A UNE ANOMALIE DE LA NUMERATION DES PLAQUETTES

Les automates d'hématologie, de par leur principe de détection, considèrent Tous les éléments figurés du sang comme des particules identifiées avant tout par leur volume exprimé en femtolitre (fl).

Un histogramme de distribution des volumes est établi en même temps que le comptage des particules. Si ces particules forment une population homogène en volume, la courbe de distribution correspondante est régulière et l'automate n'affiche aucune alarme. Dans le cas contraire, si des anomalies apparaissent, l'automate va le signaler. Pour les plaquettes, des alarmes de type « distribution anormale des plaquettes », « agrégats plaquettaires », «scattergramme anormal des plaquettes » sont automatiquement déclenchées au niveau des résultats de l'analyse. Ainsi, des particules appartenant à une même lignée et présentant une importante anomalie dans les volumes sont décelées et l'erreur de comptage peut être évitée par un contrôle manuel. Tous les automates d'hématologie sont dotés de cette sécurité, et par ce biais, la majorité des anomalies de l'hémogramme sont détectées. Cependant, dans un petit nombre de cas, des particules dans l'organisme ou dans le tube de prélèvement peuvent prendre par exemple toutes les caractéristiques des plaquettes. Elles réalisent un mimétisme parfait, quant à leur volume, leur nombre et leur histogramme de distribution. Aucun analyseur actuellement en routine ne peut reconnaître la nature étrangère des particules et faute d'une anomalie dans la distribution, il ne peut la signaler en affichant une alarme correspondante. En plus les AHC ne comptent que les particules libres (globules blancs, globules rouges et plaquettes), pour des

diverses raisons si les éléments figurés du sang se disposent en agrégats, les particules libres circulantes diminuent et l'appareil va donner systématiquement une fausse détermination du taux réel de ces particules. Ces pièges sont imparables en comptage automatique.

Les principales situations associées à une anomalie de la numération plaquettaire automatisée sont présentés dans le tableau V

Tableau V : Les principales situations associées à une anomalie de la numération plaquettaire automatisée

Fausse diminution : pseudothrombopénies	Fausse augmentation : Pseudo-thrombocytoses
➤ Agrégabilité ou adhésivité excessive des PLT : - Agrégation des PLT entre elles (essentiellement liée à l'EDTA) - Satellitisme des PLT autour des neutrophiles (parfois d'autres leucocytes) - lié à l'EDTA - Agrégats mixtes de PLT et de neutrophiles ➤ Conditions préanalytique diverses : - Ponction diluée (proximité d'une perfusion) - Coagulation partielle de l'échantillon de sang - Rapport quantité de sang/d'anticoagulant non respecté (ponction difficile) - Tube de sang trop rempli - Echantillon sanguin trop âgés ➤ Causes liées à l'échantillon : - Les plaquettes géantes ou macroplaquettes - Les microplaquettes - Autres causes liés à l'échantillon	- Hématies fragmentées (schizocytes, microcytes : micro angiopathies, grands brulés, carences en fer sévères) - Fragments du cytoplasme des cellules nucléées - Cryoglobulines - Lipides (hyperlipémies, prélèvement près d'une perfusion lipidique, ou parfois postprandial) - Microorganismes : bactéries (septicémie, tube de prélèvement non stérile), champignons (Candida)

I-1 Situations conduisant à une fausse diminution de la numération plaquettaire : pseudothrombopénies

I-1-1 Définition des pseudothrombopénies

La fausse thrombopénie ou pseudothrombopénie (PTP) est un phénomène purement artéfactuel, relativement rare, de découverte souvent fortuite [40,44] dans lequel le nombre de PLT rapporté par les automates est beaucoup plus faible que leur nombre réel circulant in vivo. Elle est le résultat de la présence de PLT de taille anormale en grand pourcentage ou de l'agglutination des PLT in vitro et donc, la formation d'agrégats plaquettaires que les automates sont incapables de différencier des cellules individuelles, conduisant à une numération plaquettaire faussement diminuée [40, 44, 49].

La PTP doit être envisagée surtout chez des individus asymptomatiques présentant une thrombopénie inattendue ou d'apparition nouvelle sans pétéchies ou ecchymoses ou tendance à l'hémorragie même si aucune alarme indicative d'un artefact n'est donnée par l'automate de numération [50].

I-1-2 Prévalence

Elle varie selon les études de 0,07 à 0,20 % des échantillons sanguins analysés dans la population générale et serait de 0,1 à 2,0 % pour les patients hospitalisés. L'incidence est assez superposable chez les hommes, les femmes et les patients âgés [40].

Dans une étude faite aux Etats Unis, la PTP est apparue chez 2,1% des patients traités par abciximab et chez 0,6% des patients traités par placebo.

Elle a aussi été la cause de :

- 32,2% de tous les cas de faible numération plaquettaire dans les deux populations étudiées : groupe placebo et groupe traité par l'abciximab
- et de 36,3% des cas dans le groupe traité par l'abciximab [52].
- Dans les PTP on distingue :
 - Les PTP EDTA-dépendantes qui sont dues soit à l'aggrégation plaquettaire liée à l'EDTA, le satellitisme plaquettaire, soit à l'aggrégation mixte neutrophiles-plaquettes en présence d'EDTA.
 - Les PTP non EDTA-dépendantes appelées aussi PTP EDTA-indépendantes.

La pseudothrombopénie secondaire à l'agglutination des plaquettes a été signalée comme une anomalie quantitative fréquente rencontrée dans 0,03 à 1,9 % des hémogrammes, représente 15-20 % des causes de " thrombopénies inexpliquées "et constitue 75 à 90 % des étiologies de pseudothrombocytopénies [45, 46, 50, 51]

Cependant une autre étude rapporte la fréquence de 1,9 % chez les patients hospitalisés et 0,9% en ambulatoire tandis qu'une autre étude a rapporté l'incidence de 0,13 % dans un grand hôpital général.

Dans une clinique d'hématologie, 15% des patients renvoyé pour thrombopénie isolée pourrait être expliqué par agglutination des plaquettes [45, 53]. Bien que la plupart des patients atteints de pseudothrombopénie ont aucune maladie sous-jacente, ce phénomène est noté plus fréquemment chez les patients

gravement malades, et ceux avec maladie auto-immune associée à l'arthrite rhumatoïde, syndrome de Sjögren, le syndrome de Guillain-Barré, néoplasmes, athérosclérose [53].

La fréquence du satellitisme plaquettaire est beaucoup plus faible que celle de l'agglutination des PLT EDTA-dépendante (1/12 000 numérations réalisées, soit 0,008 %) mais l'incidence réelle du phénomène peut être sous-estimée [40, 42, 49, 58, 59].

Dans une étude chez 82% des patients montrant l'agglutination des plaquettes des anticorps antiplaquettaires ont été détectés. Dans une autre étude 5% de la population en bonne santé a exprimé des anticorps aux antigènes plaquettaires cryptiques, et certains de ces individus peut présenter une pseudothrombopénie EDTA dépendante [53].

I-1-3 Circonstances de survenue des pseudothrombopénies

Dans la littérature, il y a un désaccord entre les auteurs : certains auteurs documentent que la pseudothrombopénie est plus fréquemment observés chez les patients gravement malades avec maladies auto immune, maladies du foie, néoplasiques [45, 48], l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de Guillain-Barré, le syndrome Sjögren [48] ainsi que des infections virales ou une septicémie [51] en conséquence ces auteurs pensent qu'il a une relation possible entre la survenue de ce phénomène et ces maladies. Cependant, d'autres auteurs rapportent qu'aucune augmentation de l'incidence des pathologies précitées n'a été constatée chez les patients sains chez qui une PTP était découverte, même après plus de dix ans de suivi et donc aucune association cohérente n'a été confirmée entre la survenue de PTP et les maladies précitées [51, 54].

La PTE peut survenir chez des patients par ailleurs déjà thrombopéniques, amplifiant la profondeur de celle-ci ou, à l’opposé, chez des patients hyperthrombocytaires, aboutissant à une numération des PLT faussement normale. La PTE est transitoire (disparition en quelques mois) ou permanente [40].

I-1-4 Conséquences cliniques d’une pseudothrombopénie

Les conséquences directes de la présence des anticorps antiplaquettaire semblent nulles : in vivo, ils ne sont pas associés à des anomalies de l’hémostase primaire ni à des anomalies quantitatives plaquettaires ; in vitro, ils semblent sans retentissement sur les fonctions plaquettaires. Leur signification réelle reste donc discutée. Il pourrait s’agir d’anticorps capables de reconnaître des antigènes cryptiques plaquettaires exprimés uniquement par des plaquettes circulantes âgées ou lésées comme dans le cas d’infections sévères, favorisant leur élimination. Cependant, il a été démontré in vivo qu’ils ne sont pas responsables d’un turnover plaquettaire accru [45].

La PTP ne pose pas un risque hémorragique ou thrombotique au patient [50, 54] cependant il paraît indispensable de dépister cet artefact afin d’éviter le déclenchement de la démarche diagnostique et/ou thérapeutique mise en œuvre devant une thrombopénie (ponction médullaire, transfusion de plaquettes). S’il est en général facilement évoqué dans les formes isolées, il est certainement sous-estimé chez les patients présentant des causes potentielles de thrombopénie vraie. Seule la mise en œuvre d’une démarche systématique, appliquée devant toute thrombopénie constatée sur une numération automatisée permettra leur dépistage [45].

I-1-5 Classification des pseudothrombopénies

Les pseudothrombopénies se divisent en deux grands groupes : les pseudothrombopénies EDTA dépendantes et les pseudothrombopénies EDTA indépendantes.

I-1-5-1 Pseudothrombopénies EDTA-dépendantes (PTE)

Elle correspond à un phénomène purement artéfactuel provoqué in vitro en présence de l'EDTA et ne se produit pas en présence d'autres anticoagulants comme le citrate ou l'héparine. La fausse diminution en comptage automatique des plaquettes normalement libres et détachées les unes des autres en présence d'anticoagulant (EDTA) est le résultat d'un regroupement irréversible des plaquettes entre elles (agrégats) ou d'une disposition particulière et insolite autour d'un globule blanc, comme des satellites autour de la terre (satellitisme plaquettaire) [40, 41, 45, 48].

Les PTP-EDTA dépendante sont dues soit à :

a. Agrégation plaquettaire liée à l'EDTA

Il s'agit d'un phénomène irréversible provoqué in vitro par des anticorps particuliers, présents dans les échantillons sanguins prélevés sur EDTA, et qui réagissent avec les PLT pour les agréger entre elles et puisque les automates sont incapables d'énumérer les PLT incluses dans les agrégats, ce qui induit une pseudothrombopénie parfois majeure, jusqu'à moins de 20 G/l malgré le fait que le taux réel soit normal (Figure18). Ce phénomène est purement artéfactuel et ne traduit aucune pathologie chez le sujet prélevé et n'est jamais accompagné de signes hémorragiques [40, 43].

➤ **Mécanisme de formation des agrégats :**

Le mécanisme conduisant à la formation des agrégats plaquettaires est complexe et influencé par des facteurs immunologiques (autoanticorps antiplaquettes), chimiques (anticoagulants), et physiques (température) qui, ensemble, rendent ce phénomène possible seulement in vitro [49].

Cet artefact de laboratoire est d'origine immunologique. Il est dû à des anticorps antiplaquettaires induisant la formation d'amas uniquement en présence d'EDTA [36]. Les isotypes en cause, isolés ou parfois associés, sont de type IgG (33 à 50 % des cas) ou IgM (10 à 63% des cas), plus rarement de type IgA (4 à 40% des cas) selon les séries de la littérature [40, 45, 47]. Ces anticorps sont considérés comme ayant un maximum d'action à " température ambiante ", l'optimum thermique quand il est précisé pouvant être de 4 °C ou de 22 °C et ne peut pas être renversée par le réchauffement à 37°C et peut se produire à des concentrations d'EDTA aussi faibles que 0,3 mM, et 20 fois plus faible que celle nécessaire pour empêcher la coagulation [42, 45, 49]. Toutefois, dans 20% des cas, les agglutinines qui sont réactives aussi bien à température ambiante (environ 22°C) qu'à 37°C sont impliquées et quand cela arrive, les IgM sont presque toujours présentes et l'agglutination persiste aussi bien en présence d'EDTA qu'en présence de citrate [45, 47, 49, 53, 54]. Cet aspect est à rapprocher des cas d'agglutinines froides antiplaquettaires décrits par Schimmer, la frontière entre cette entité et les pseudothrombocytopenies strictement liées à l'EDTA paraissant floue [45].

La cinétique de l'agrégation est rapide, débutant dans les minutes qui suivent le contact du sang avec l'EDTA, devenant maximale soit après quelques minutes, soit, au contraire, après quelques heures. Les amas sont de taille très variable, allant de 2 à 5 PLT jusqu'à plusieurs dizaines ou plusieurs centaines de PLT selon les cas (figure 19). Pour certains auteurs, la numération des PLT serait d'autant plus basse que les amas seraient plus importants en taille [40, 55].

Les cibles antigéniques sont mal connues. Ils ne semblent pas être dirigés contre des antigènes plaquettaires spécifiques (HPA). Cependant, le rôle joué par des épitopes cryptiques de la fraction glycoprotéique IIb du complexe membranaire GP IIb/IIIa est bien documenté [40,42]. La GP IIb/IIIa, cytoadhésine membranaire de la famille des intégrines, a un rôle majeur dans l'agrégation plaquettaire par fixation du fibrinogène. Ce complexe est maintenu sous sa forme hétérodimérique grâce à la présence de calcium fixé sur la GP IIb. À température ambiante (inférieure à 25 °C) et en présence d'EDTA, chélateur du calcium, le complexe GP IIb/IIIa est dissocié et des épitopes cryptiques pourraient être exposés [40, 43, 49]. Le site de fixation de la séquence RGD, commune au fibrinogène, à la fibronectine, à la vitronectine et au vWF, situé sur la GP IIIa pourrait être l'un de ces épitopes [45].

Les études de transfert ont montré que le plasma EDTA des patients présentant une PTE était capable d'agréger les PLT de tous les patients sauf celles de la thrombasthénie de Glanzmann, suggérant que le complexe glycoprotéique α IIb/ β IIIa, récepteur du fibrinogène, était impliqué dans la PTE. Un anticorps monoclonal a d'ailleurs été produit qui reconnaît un épitope sur l'intégrine α IIb/ β IIIa, dont l'accessibilité est augmentée lors du contact des PLT

avec l'EDTA. La thrombopénie artéfactuelle qui apparaît fréquemment chez les patients traités par des antagonistes des récepteurs $\alpha\text{IIb}/\beta\text{IIIa}$ en est une autre preuve indirecte [40].

Quelques publications rapportent cependant que d'autres protéines que des anticorps pourraient être responsables de la PTE, voire que des complexes immuns interviendraient par un jeu d'interactions entre Fc des immunoglobulines et récepteurs plaquettaires [40,43, 54].

Une publication précise que Les anticorps peuvent être transférés au fœtus à travers le placenta menant à une PTP chez le nouveau-né [56]. Ces anticorps sont considérés comme " naturels " et pourraient avoir un rôle physiologique dans l'élimination des plaquettes âgées. L'hypothèse d'autoanticorps " acquis " résultant de la destruction de PLT après septicémie, toxémie gravidique, microangiopathie thrombotique, syndromes myélodysplasiques, ou apparaissant pendant l'hospitalisation et particulièrement après une infection, ont été souvent évoquées. Ces anticorps sont associés dans la plupart des cas à des anticorps antiphospholipides qui pourraient eux aussi intervenir dans le mécanisme d'agrégation [40, 45, 57].

Une fois apparue, la pseudothrombocytopénie liée à l'EDTA a tendance à persister. Elle peut toutefois être transitoire, en particulier dans les contextes infectieux ou de prise médicamenteuse. Récemment, des cas de pseudothrombocytopénies liées à l'EDTA ont été découverts lors du suivi de traitements par abciximab, et leur physiopathologie demeure inexpliquée [45].

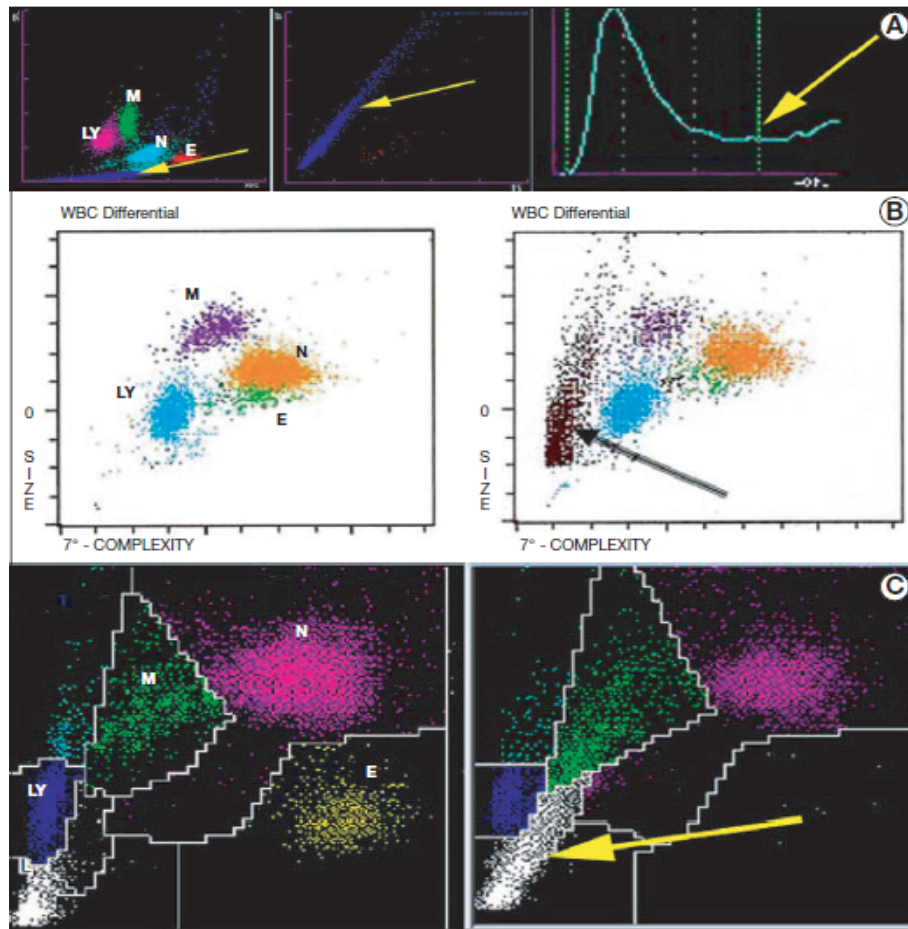


Figure 18: Visualisation des agrégats plaquettaires sur les histogrammes des automates.

A : avec l'automate XE-2100 (Sysmex), les amas apparaissent sur l'histogramme DIFF (formule leucocytaire) sous forme d'un nuage allongé (graphe de gauche ; flèche). Sur le graphe qui visualise une éventuelle myélémie (IMI), ces amas forment un nuage qui prolonge le nuage des leucocytes (centre ; flèche). Sur le schéma de droite, on remarque l'absence de retour à la base de l'histogramme des volumes plaquettaires (flèche).

B : avec l'automate Cell-Dyn Sapphire (Abbott), à côté des populations leucocytaires normales (image de gauche), l'histogramme taille/complexité visualise un nuage anormal (en noir, image de droite). C : avec l'automate Advia 2120 (Siemens) on observe sur l'histogramme de droite (formule Perox) un nuage de points (en blanc), absent de l'image normale (à gauche), et qui recouvre une zone particulière dans laquelle ces amas seront énumérés. E = éosinophiles ; Ly = lymphocytes ; M = monocytes ; N = neutrophiles [40].

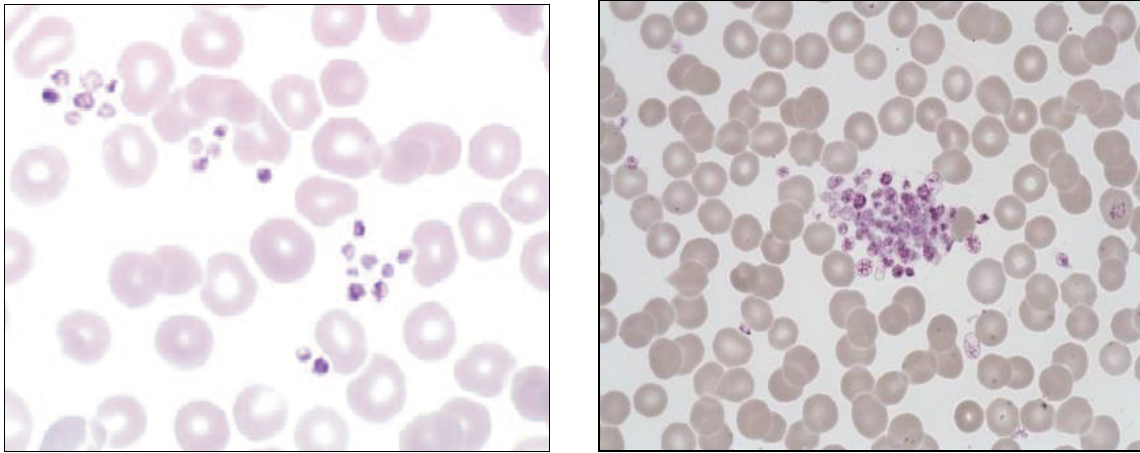


Figure 19 : Agrégats de plaquettes sur frottis sanguin (adulte sain) : petit agrégat composé de 4 à 7 plaquettes (à gauche) [40] et grand agrégat composé d'une dizaine de plaquettes (à droite) [44].

b. Satellitisme des plaquettes autour des leucocytes

Le satellitisme des plaquettes, ou satellitose, ou rosettes leucoplaquettaires, est un phénomène acquis *in vitro* en présence d'EDTA et lié à l'adhésion des plaquettes à la membrane des polynucléaires neutrophiles matures (figure 20) mais il peut s'agir de façon exceptionnelle des autres leucocytes : de lymphocytes atypiques (figure21), de polynucléaires basophiles ou de monocytes (figure22) [40, 42, 58, 59, 61].

Il s'agit d'une situation rare qui surviendrait dans un cas sur 12 000 numérations réalisées, soit 0,008 % [40, 42, 58, 59]. Il survient *in vitro* lorsque l'échantillon sanguin est prélevé en présence d'EDTA, conservé et analysé à température ambiante, mais ne survient pas si le prélèvement est maintenu à 37 °C dès son recueil ou si le sang est prélevé en présence d'anticoagulants autres

que l'EDTA, comme l'héparine, le citrate et l'oxalate [59, 60]. Cependant, des cas de satellitisme plaquettaire survenus en présence de citrate et d'héparine ont été décrits [59].

Quelque fois reliée à un processus auto-immun mais dans la plupart des cas, Il n'est pas associé à une situation clinique particulière [40, 43, 58, 59] ou à une prise médicamenteuse. En outre, aucune relation n'a été établie avec des anomalies de l'hémostase, la présence d'autoanticorps spécifiques et non spécifiques d'organes, de facteur rhumatoïde, de cryoglobulines ou d'agglutinines froides [59].

➤ **Mécanisme de satellitisme :**

Deux mécanismes sont proposés pour expliquer le phénomène de satellitisme plaquettaire [59-60].

Le premier consiste en un mécanisme immunologique reposant sur la présence d'un autoanticorps.

Les résultats de l'étude de Bizzaro et al suggèrent que ce phénomène est médié par des immunoglobulines d'isotype G reconnaissant un épitope cryptogénique, exposé en présence d'EDTA à température ambiante et localisé à la fois sur la glycoprotéine GP IIb-IIIa (CD41/61) de la membrane plaquettaire et sur le récepteur Fc gamma RIII (CD16) de la membrane du polynucléaire. La survenue du phénomène en présence du fragment Fab'2 des IgG prouve que la liaison est indépendante du fragment Fc de l'immunoglobuline et que le même déterminant antigénique est reconnu au niveau des plaquettes et des polynucléaires [58-60].

Le satellitisme des plaquettes survient préférentiellement autour des polynucléaires mais ce phénomène a été également rapporté avec les monocytes. La présence du récepteur FcγRIII à la surface des monocytes peut expliquer ce phénomène bien qu'il existe deux types de récepteurs: FcγRIII b sur la membrane des polynucléaires neutrophiles et FcγRIII a à la surface des monocytes et de la cellule natural killer (NK). Les autres cellules myéloïdes ne présentent pas cette particularité, en revanche certains lymphocytes, semblent impliqués dans le satellitisme plaquettaire. En effet, l'étude d'Espanol et al met en évidence un satellitisme plaquettaire à la fois autour des polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes à grains. Ces lymphocytes (de phénotype NK) présentent le marqueur CD16, ce qui permet de conclure à la même hypothèse mécanistique que le satellitisme autour des polynucléaires neutrophiles [60].

La seconde hypothèse, proposée par Christopoulos et al attribue un rôle possible à la thrombospondine contenue dans les granules alpha plaquettaires. En étudiant les plaquettes d'un sujet présentant un satellitisme plaquettaire, il a constaté que les plaquettes impliquées dans le satellitisme sont fortement marquées par des anticorps monoclonaux murins dirigés contre la thrombospondine de surface et intracellulaire, alors que les plaquettes non impliquées sont faiblement ou non marquées [59,60].

En pratique: Les automates ne signalent pas le satellitisme plaquettes-neutrophiles en tant que tel, et le phénomène peut passer totalement inaperçu. Comme les neutrophiles ont une taille plus élevée du fait des plaquettes collées certains automates signalent parfois un nuage des neutrophiles de localisation anormale sur l'histogramme formule (« neutrophiles anormalement grands »,

ou « neutrophiles immatures », selon les automates) (Figure 23) [40,58]. Quand l'analyse est faite plus de 3 à 4 heure après le prélèvement, les petits amas de plaquettes qui se détachent des neutrophiles provoquent un message d'alerte « suspicion d'amas plaquettaires ». Les amas mixtes plaquettes-neutrophiles sont soit dissociés lors de l'analyse et la formule automatisée reste valide et sans alarme, soit les amas ne sont pas dissociés et ne sont pas repérés par l'automate : la numération des leucocytes est basse et un message (leucopénie, ou neutropénie) apparaît. Si l'automate énumère les leucocytes après destruction des membranes (= compte des « noyaux leucocytaires ») la numération leucocytaire n'est pas perturbée [58].

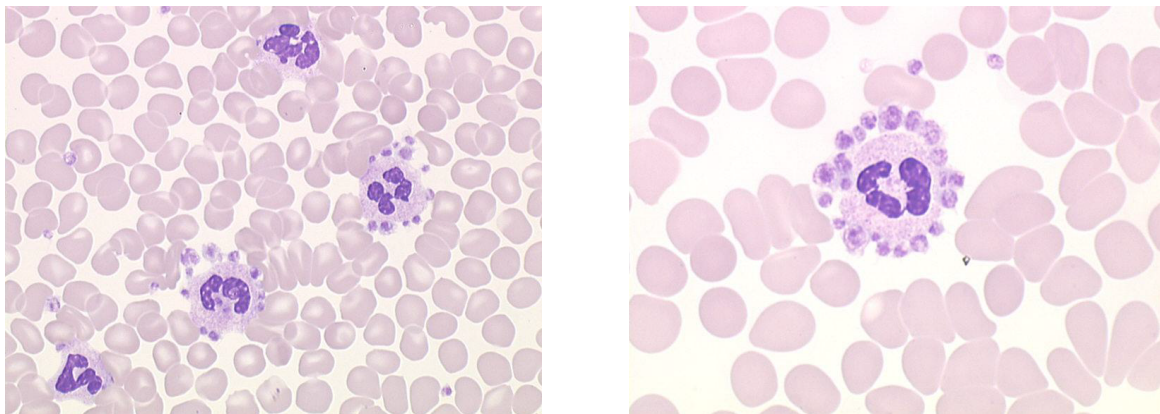


Figure 20: Satellitisme des plaquettes autour des polynucléaires neutrophiles [58]

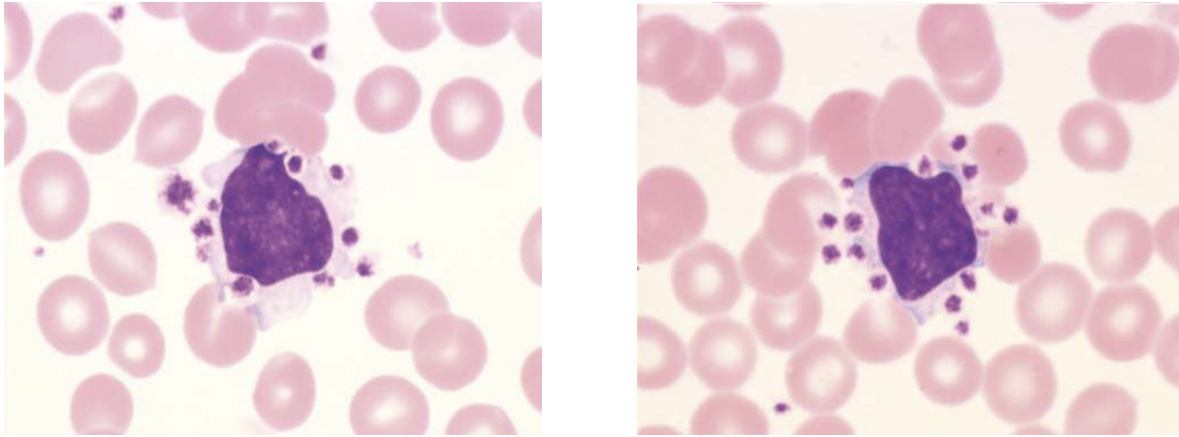


Figure 21: Satellitisme des plaquettes autour des lymphocytes atypiques [60]

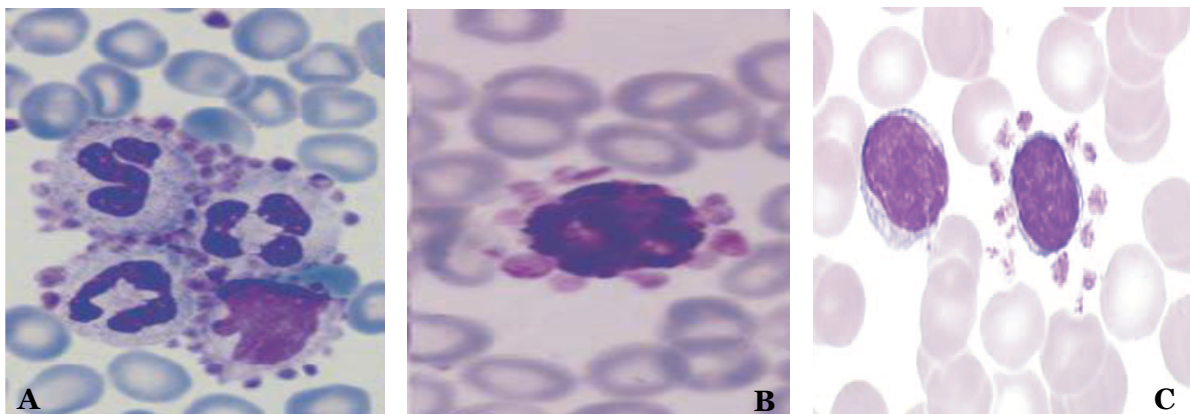


Figure 22: Images illustrant le satellitisme plaquettaire autour des PNN et un monocyte (A), un basophile (B) [49] et un lymphocyte (C) [40].

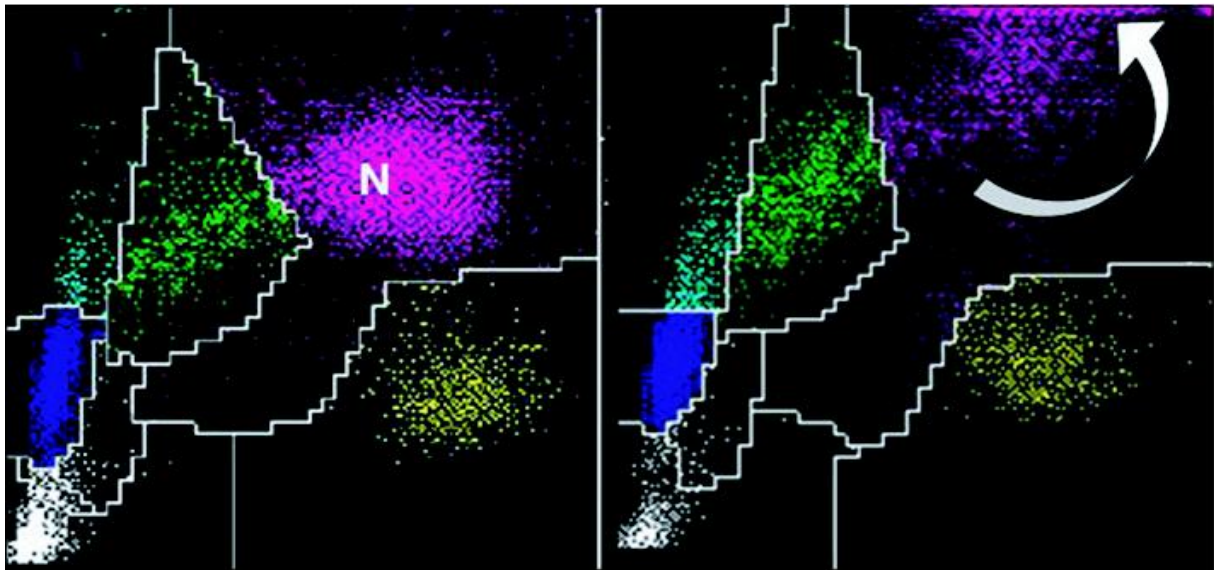


Figure 23: Satellitisme des plaquettes autour des polynucléaires neutrophiles (N). L'image de gauche montre un histogramme Perox de formule leucocytaire normale. Les plaquettes adhérant aux neutrophiles provoquent une augmentation du volume des neutrophiles et un décalage vers le haut et la droite du nuage habituel (image de droite) (Advia 2120, Siemens) [40].

c. Agrégation mixte neutrophiles-plaquettes en présence d'EDTA

Un phénomène lié à la présence d'EDTA et apparaît *in vitro* et qui est caractérisé par la présence de grands amas de PLT et quelques PNN. Semblant être le point final d'un processus initié par un satellitisme classique des PLT autour des PNN [40, 60] qui est un phénomène évolutif. Quand le sang est prélevé sur EDTA le satellitisme se produit en quelques minutes et persiste quelques heures. Mais progressivement les plaquettes « glissent » le long de la membrane du neutrophile et finissent par former (3 à 4 heure après le prélèvement) un amas de plaquettes à un pôle du neutrophile; cet amas de plaquettes se détache ensuite et 1 à 2 heure plus tard on peut observer que les

neutrophiles ont perdu leurs plaquettes en surface, et qu'il existe de petits amas de plaquettes dispersés sur le frottis. Dans quelques cas, plutôt que de « glisser » sur la membrane et former des amas de plaquettes, ces plaquettes vont servir de « ponts » entre neutrophiles pour former des amas mixtes plaquettes-neutrophiles. Les neutrophiles ne sont pas collés directement entre eux mais toujours par l'intermédiaire d'une ou quelques plaquettes (Figure 24 A, B et C) [58].

Les amas mixtes PLT-PNN sont suffisamment volumineux pour ne pas être détectés en tant que tels par les AHC et, dans les observations rapportées, on note une diminution de la numération des PLT (soit avec un résultat restant au sein de valeurs normales soit une pseudothrombopénie) et une tendance à la leucopénie. C'est d'ailleurs par une tendance leuconeutropénique qu'est parfois révélée la situation. Il y a peu de cas rapportés et analysés avec les AHC les plus récents : la numération leucocytaire par décompte des noyaux après lyse des membranes leucocytaires et plaquettaires ne devrait pas être perturbée, à l'inverse du décompte leucocytaire réalisé dans le canal formule. L'examen au faible grossissement du frottis sanguin est nécessaire devant chaque échantillon leucopénique d'un patient inconnu ou lorsque le nombre des leucocytes chute fortement : il faut avoir à l'esprit ce type d'artéfact et rechercher les amas, peu nombreux mais parfois très volumineux, localisés plutôt aux extrémités des frottis. Dans un cas, la fausse numération leucocytaire était liée à la fois à une diminution du nombre des PNN (localisés dans les amas) et à la présence d'amas de PLT faussement comptés comme leucocytes [40]

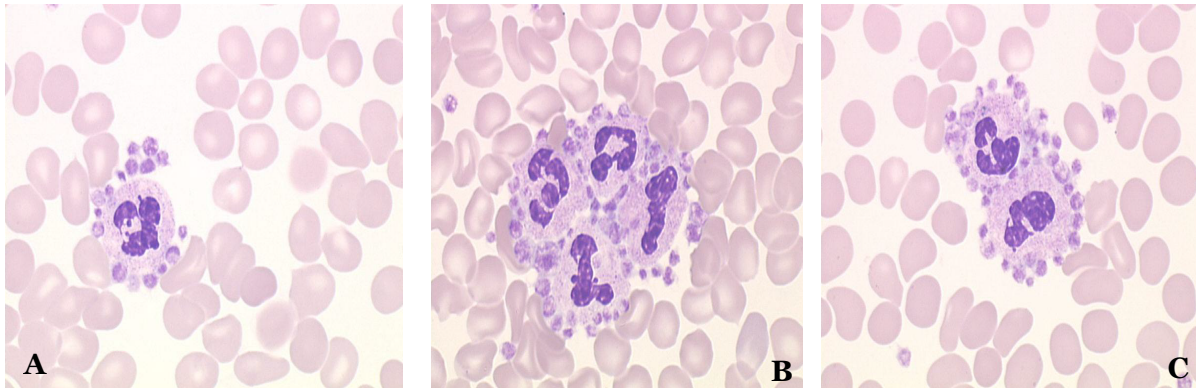


Figure 24 A, B et C : L'image A montre que sur certains neutrophiles les plaquettes commencent à s'agglutiner entre elles et se préparent à quitter la membrane (pour former de petits amas plaquettaires). L'image B et C montre des amas de neutrophiles entourés de plaquettes ». Les images montrent que les neutrophiles n'adhèrent pas directement entre eux mais par l'intermédiaire des plaquettes [58].

I-1-5-2 Pseudothrombopénies non EDTA-dépendantes

Les principales causes des pseudothrombopénies non EDTA dépendantes :

I-1-5-2-1 Causes liées aux erreurs à la phase préanalytique

La phase préanalytique est une étape primordiale dans la réalisation d'un acte de biologie médicale. Elle comprend toutes les étapes du prélèvement de l'échantillon jusqu'à l'analyse au laboratoire. Toutes procédures inadéquates relatives à la ponction, à l'identification, à la manipulation et au transport des prélèvements peuvent entraîner l'émission de résultats erronés. Les dysfonctionnements préanalytiques sont sans doute plus fréquents que les anomalies analytiques d'où l'importance de la maîtrise de la qualité de cette phase extrêmement importante.

Cette phase préanalytique est sous la responsabilité du biologiste qu'elle soit traitée par des personnes placées sous sa responsabilités (secrétaires, techniciens...) ou non (IDE des services de soins) selon la réglementation (GBEA, norme ISO 15189).

Toute personne impliquée dans cette phase doit être consciente de l'importance du préanalytique, des risques engendrés par les erreurs commises et des conséquences qui peuvent en découler, pour le patient.

Les principales causes préanalytiques donnant une PTP non EDTA dépendante et les mesures correctives pour y remédier sont reprise dans le tableau VI [40, 63, 64, 65]

Tableau VI: Les principales causes préanalytiques donnant une PTP non EDTA dépendante et les mesures correctives pour y remédier.

Erreurs préanalytiques	Mesures correctives
Echantillons sanguins dilués par prélèvement à proximité d'une perfusion ou sur une voie de perfusion ou cathéter insuffisamment purgé	Eviter de faire des prélèvements à proximité d'une perfusion ou sur une voie de perfusion.
une augmentation de la concentration de l'anticoagulant utilisé dans l'échantillon : défaut de sang par ponction veineuse difficile ou prélèvement difficile comme chez le nouveau-né (risque d'activation et donc d'agrégation plaquettaires ou coagulation partielle de l'échantillon favorisé par l'hypercoagulabilité du sang du nouveau-né)	- Mentionner sur la fiche de prescription d'analyse les difficultés rencontrées au cours de l'opération pour les prendre en compte dans l'interprétation des résultats. - Contrôler les échantillons de ce genre, sur tube et sur frottis, pour détecter d'éventuels agrégats de PLT. - Eviter les prélèvements traumatiques et éliminer les premiers millilitres de sang prélevés car ils contiennent souvent de petites traces de débris tissulaires qui peuvent favoriser l'activation plaquettaire - Idéalement, le ratio sang/anticoagulant de l'échantillon doit être optimal. Cependant, pour les cas difficiles, il semble qu'une variation du ratio sang/anticoagulant inférieure de 10 % du volume optimal n'occasionne pas de différence significative dans le résultat et soit considérée comme acceptable selon Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). - utiliser des tubes pédiatriques adaptés à ce genre de prélèvements

un retard entre le prélèvement et l'analyse peuvent modifier le volume des PLT, conduisant à une difficulté de l'automate à générer une courbe lissée ou à retrouver précisément les critères habituels de définition des PLT.	- le comptage automatique des éléments du sang veineux, prélevé sur EDTA et maintenu à température ambiante, doit être effectué dans les 6 heures après le prélèvement. - Ce délai est limité à 4 heures pour les prélèvements en micro-méthodes. En cas de réalisation manuelle de la formule, le frottis sanguin doit être réalisé au mieux dans les 2 heures suivant le prélèvement, mais un délai de 6 à 8 heures est tolérable en pratique. - Contrôler les échantillons sur tube et sur frottis sanguin : recherche d'éventuels amas plaquettaires. - Refaire le prélèvement en cas de détection d'amas plaquettaires avec plus de précautions.
Un retard de contact entre le sang prélevé et l'anticoagulant peuvent initier la coagulation et générer des amas plaquettaires soit par une homogénéisation insuffisante ou inadéquate ou par écoulement du prélèvement goutte à goutte dans le tube (difficulté de ponction)	- assurer un mélange sang/anticoagulant adéquat, les tubes doivent être mélangés par inversion de 5 à 10 fois après le prélèvement. - Contrôler les échantillons sur tube et sur frottis sanguin : recherche d'éventuels amas plaquettaires. - Refaire le prélèvement en cas de détection d'amas plaquettaires avec plus de précautions.
Un prélèvement sous vide trop rempli pouvant générer des anomalies des divers paramètres de la numération globulaire, et notamment, une numération plaquettaire basse par la difficulté à homogénéiser l'échantillon de manière adéquate	- Eviter de trop remplir les tubes - un retour progressif à des résultats proches des résultats réels était obtenu après plusieurs aspirations.

Une étude précise que la concentration en PLT est stable 6 jours à +4 °C mais seulement 24 heures à température ambiante, au-delà il y a diminution de leur nombre [64]. Alors qu'une autre publication précise que le tube d'hémogramme doit, au mieux, rester à "température ambiante" (15 à 25°C), qui est la température idéale à la fois pour la conservation des cellules et pour le fonctionnement des automates. La conservation à +4°C n'améliore pas la survie cellulaire [65].

Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement de nouveau-né, et à cause de l'hypercoagulabilité de son sang, il existe un risque important de formation d'amas plaquettaires et de coagulation du prélèvement c'est pourquoi il convient d'être particulièrement vigilant lors de l'analyse de tels échantillons pour dépister ces artefacts malgré le fait que la détection des micro-caillots en pratique est quasiment impossible. La notion de micro- prélèvement doit apparaître sur le rendu du résultat, afin d'attirer l'attention du clinicien et/ou du biologiste sur les réserves à prendre pour interpréter l'hémogramme en particulier.

Pour améliorer la qualité de ce genre de prélèvement, on peut utiliser certaines précautions :

- Masser vigoureusement le talon pour obtenir rapidement une goutte de sang ;
- Opérer rapidement pour transférer le sang dans le tube ;
- Mélanger consciencieusement l'échantillon
- Ne pas se contenter de trop faibles volumes de sang (même s'ils sont a priori suffisants pour l'analyse) [64].

I-1-5-2-2 Causes liées à l'échantillon

a- Plaquettes géantes ou macroplaquettes

Dans les conditions normales et dans diverses situations pathologiques, quelques PLT ont un volume plus élevé, et pour cette raison, les AHC considèrent que les PLT peuvent avoir un volume atteignant 36, 40, voire même 60 fl. Il faudra avoir à l'esprit que dans certaines pathologies (syndromes myéloprolifératifs ou myélodysplasiques), quelques PLT peuvent présenter une taille (volume) identique ou proche de celle des leucocytes et ne sont pas identifiées comme telles, ou peuvent être incluses dans le décompte des GR ou/et celui des leucocytes mais c'est au cours des thrombopénies que l'absence d'identification convenable des grandes PLT constitue un réel problème. Même si des améliorations considérables ont été apportées afin de discriminer les grandes PLT et les autres particules (histogramme volumétrique avec courbe lissée, seuil mobile entre PLT et GR, diffraction lumineuse à plusieurs angles, analyse de l'indice de réfraction), la précision et l'exactitude de la numération des PLT restent faibles dans cette circonstance, comme le montre par exemple leur faible reproductibilité au cours des macrothrombopénies constitutionnelles [40].

Les AHC signalent le plus souvent ces grandes PLT (ou PLT géantes) avec un message d'alerte, mais dont la spécificité est faible car croisée avec la présence de petits agrégats de PLT, voire de noyaux d'érythroblastes. La présence de tels messages doit conduire à l'examen de l'histogramme volumétrique des PLT, à vérifier si l'AHC a réalisé une bonne discrimination des PLT-GR, lorsqu'on note l'absence de retour à la ligne de base de la courbe

de répartition des plaquettes selon leur volume dans la zone 20 fl (figure 25) et la présence d'éléments de petit volume sur le graphe LMG (lymphocytes monocytes granulocytes) font suspecter la présence de plaquettes de grande taille (figure 26). L'examen du frottis coloré selon la technique de MGG surtout en cas de thrombopénie, pour un patient inconnu permet de confirmer la présence de grande plaquettes (ou plaquettes géantes) (figure 27) et éliminer le doute sur la présence d'autres causes qui peuvent générer les mêmes messages : petits amas plaquettaires et noyaux d'érythroblastes [40, 66].

La numération des PLT par méthode optique est parfois moins imprécise. La présence d'un nombre élevé de grandes PLT, surtout en cas de thrombopénie vraie associée, est une situation de choix pour utiliser la méthode immunologique de numération des PLT à l'aide d'anticorps monoclonaux. Enfin, l'affichage d'un volume moyen plaquettaire élevé peut aider à identifier une macrothrombopénie, mais uniquement après avoir examiné l'étalement sanguin et éliminé l'existence de petits agrégats de PLT [40].

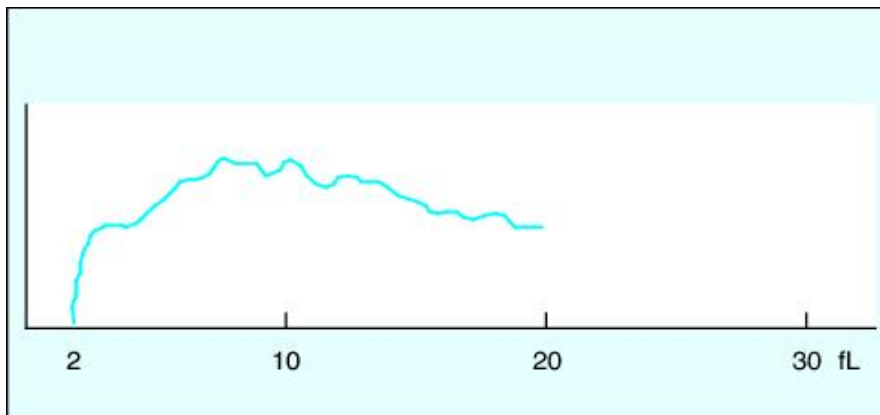


Figure 25 : Courbe de comptage brut des plaquettes en rapport avec la présence de plaquettes de grand volume. Arrêt de la courbe à 20 fl sans extrapolation [66].

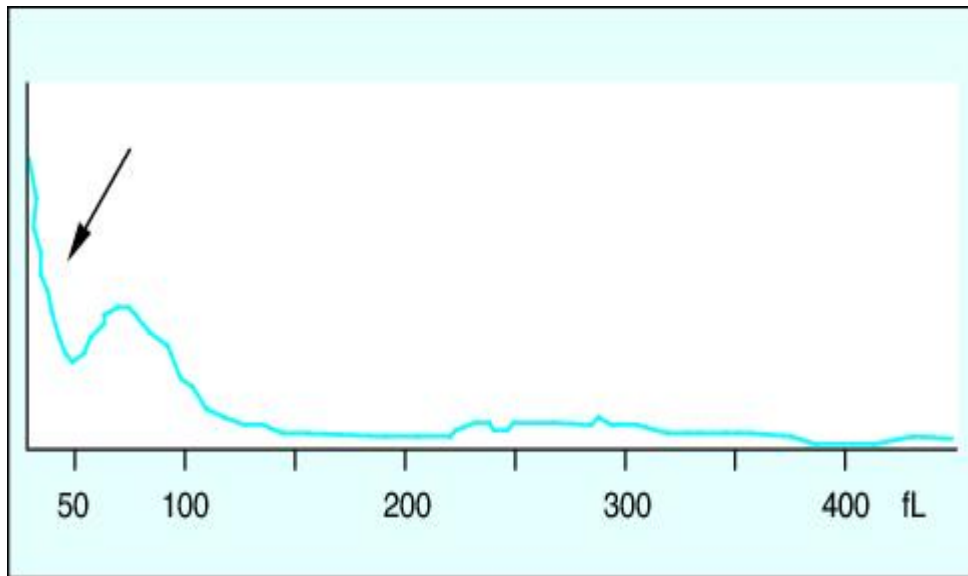


Figure 26 : Graphe LMG : interférence par des particules de petit volume (flèche) [66].

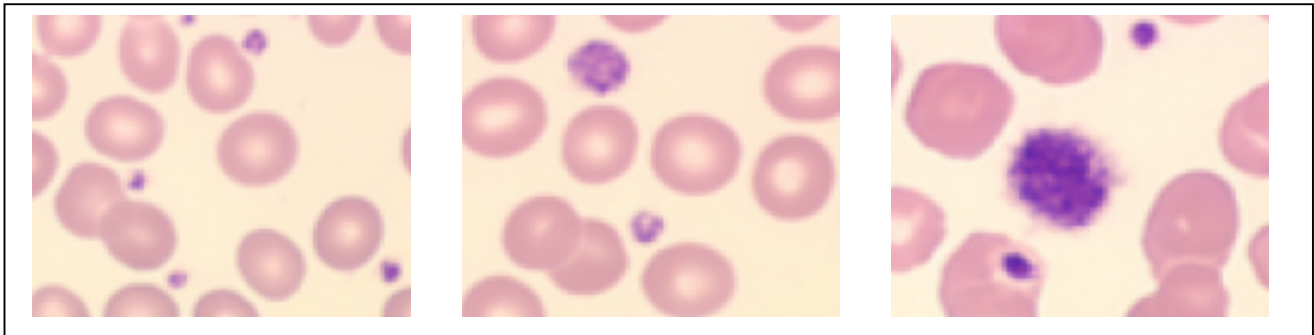


Figure 27: Frottis sanguin colorés au MGG : plaquettes de taille normale (à gauche), macroplaquettes (au centre) et plaquettes géantes (à droite) MGG [67]

Les PLT géantes et/ou macroplaquettes sont observées dans des conditions normales et dans diverses situations pathologiques: les principales situations sont [40, 43, 68, 69, 70, 71, 72, 76, 77] :

- Syndrome de Bernard-Soulier
- Syndrome des plaquettes grises
- Pseudo-Willebrand plaquettaire
- La thrombocytopénie immune (TPI), anciennement purpura thrombopénique idiopathique (PTI)
- Syndromes myéloprolifératifs ou myélodysplasiques
- La macrothrombocytopénie familiale (dite méditerranéenne)
- Macrothrombocytopénies constitutionnelles liées à MYH9 (Anomalie de May-Hegglin, Syndrome de Sebastian, d'Epstein, de Fechtner, d'Alport-like avec macrothrombocytopénie)
- Le syndrome de la délétion 22q11.2 (syndrome vélocardiofacial ou de Di George)
- Des plaquettes de taille augmentée sont également décrites chez de rares patients traités par cholestyramine (hypolipémiant)
- thrombopénie Paris-Trousseau / syndrome de Jacobsen
- La thrombopénie liée à l'X avec dysérythropoïèse
- Maladie de Willebrand type 2B / Pseudo Willebrand plaquettaire
- Lors d'une demande accrue pour les PLT (thrombopénie gestationnelle) les mégacaryocytes peut également réagir en produisant des PLT qui sont plus grandes que d'habitude
- Dysmégacaryopoïèse.
- Hyperlipidémie (augmentation du pourcentage de grandes PLT), hyperthyroïdie (MPV élevé)

b- Microplaquettes

Les microplaquettes ou microthrombocytes sont des plaquettes de petites taille (VPM < 7fl) qui peuvent être exclu de la numération par les AHC. Selon le principe de fonctionnement des AHC des divergences de comptage plaquettaire ont été trouvées en fonction de l'appareil d'hématimétrie utilisé (figure 28). La surestimation par l'appareil fonctionnant par impédancemétrie (Pentra 120, ABX) est probablement liée au comptage de microcytes. La sous-estimation par l'appareil par analyse optique (Advia 120, Siemens) est attribuée à la difficulté de prendre en compte les éléments de petite taille ayant pu être considérés comme des débris (d'où pseudothrombopénie). Ces microplaquettes peuvent être identifiées grâce à l'examen au microscope d'un frottis sanguin coloré au MGG révèle des plaquettes rares corroborant la thrombopénie, de morphologie arrondie et d'aspect punctiforme, de petite taille homogène, bien granuleuses et sans différenciation granulomère hyalomère (figure 29) et leur numération précise se fait par un immuno-comptage par cytométrie en flux (figure 30) selon un protocole bien défini et standardisé. Cette méthode est considérée comme plus sensible et reproductible. Elle est par conséquent utile dans le comptage des numérations plaquettaires basses (< 50 G/l), et son utilisation est proposée dans ce domaine de valeur afin d'affiner la précision des valeurs rendues en cas de thrombopénie ce qui permettrait de diminuer le seuil transfusionnel jusqu'à 10 G/l, voire 5 G/l [74, 75].

Les microplaquettes sont observées dans des conditions normales et dans diverses situations pathologiques [69, 70, 74,75, 76, 77]:

- Syndrome de Wiskott-Aldrich(WAS)
- Autre thrombopénie liée à l’X (XLT)
- Diminution de MPV a été associée à une hypoplasie mégacaryocytaire et la thérapie de médicaments cytotoxiques.
- Les PLT de petite taille (microthrombocytes) sont vues dans les situations d'échec de moelle osseuse comme dans la leucémie, anémie aplasique, et thrombopénie familiale amégacaryocytaire.

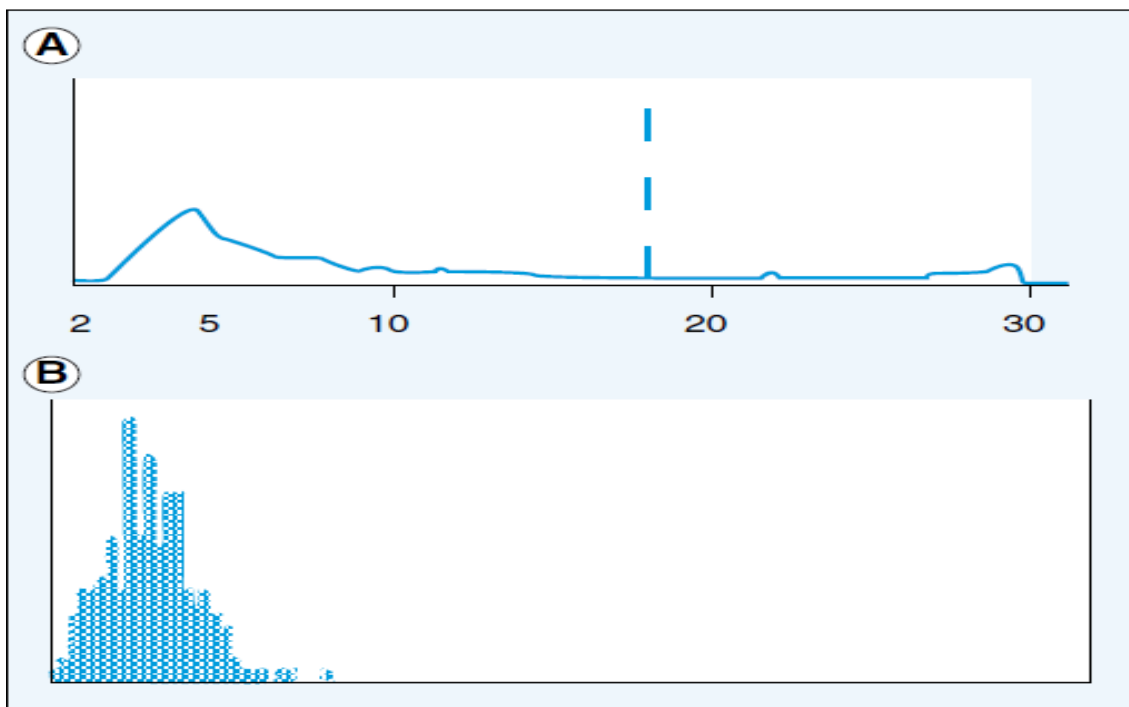


Figure 28 : Courbe de distribution de la taille/volume plaquettaire obtenue à l’aide de l’automate Pentra 120, ABX (A) et de l’Advia 120, Siemens (B) à partir du même prélèvement EDTA [74].

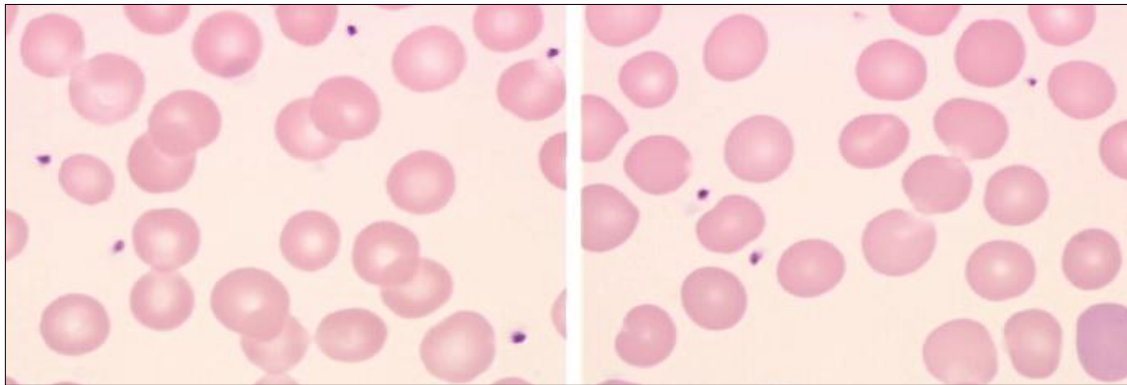


Figure 29 : Frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (X63) montrant de rares plaquettes de petite taille, d'aspect punctiforme, sans différenciation granulomère-hyalomère [74].

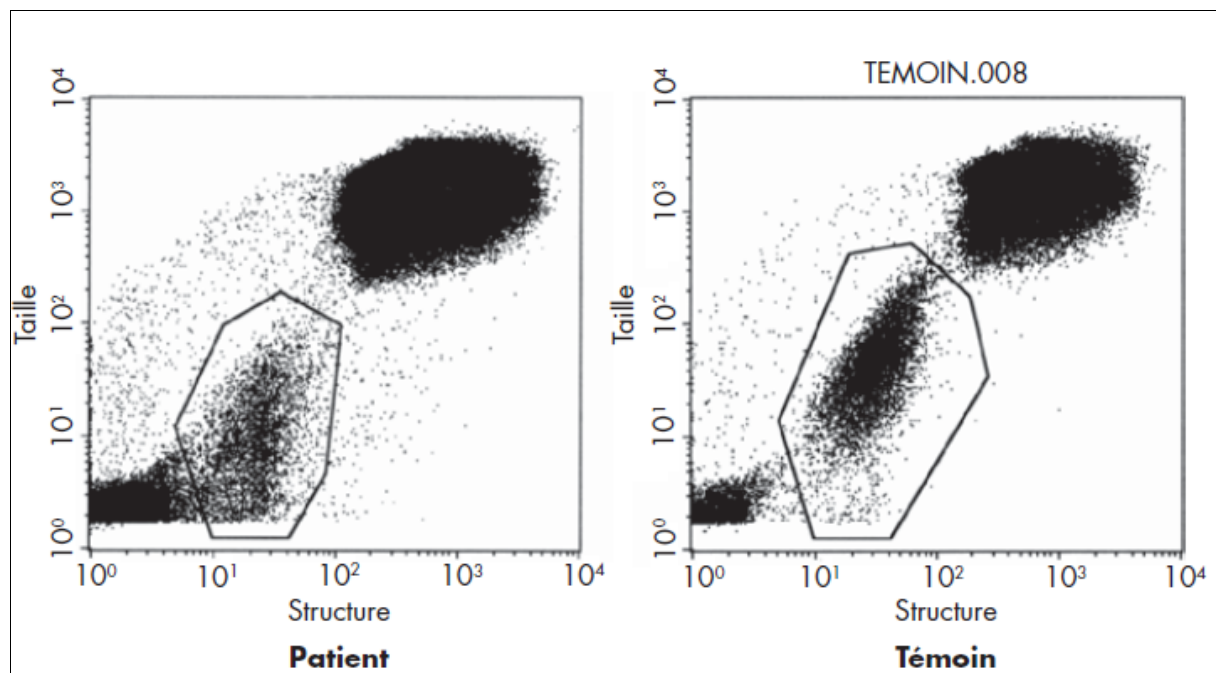


Figure 30: Cytogramme taille/structure des plaquettes de petite taille du patient par rapport à celles d'un témoin, analysées par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson) [75].

c- Satellitisme des PLT autour des leucocytes

Dans la majorité des cas le satellitisme des PLT autour des leucocytes s'observe dans le sang sur EDTA. Cependant, le satellitisme, a été vu parfois sur sang hépariné, oxalaté, citraté ou encore avec un prélèvement frais au bout du doigt [59, 60, 79].

d- Autres causes liées à l'échantillon

Parmi les autres causes décrites comme capable d'induire une pseudothrombopénie non EDTA dépendante :

- La maladie de von Willebrand type IIB : elle peut provoquer l'agglutination des PLT sur un frottis et causé une PTP apparente [77].
- apparition d'agrégats plaquettaires sur sang total citraté en cas d'infarctus cérébral chronique (Hyperaggrégabilité des PLT sanguines) [80].
- L'émotion, l'effort physique, le stress peuvent entraîner l'activation plaquettaire. En effet, le prélèvement sur un malade agité sera souvent de mauvaise qualité et activé [81].

I-2 Situations conduisant à une fausse augmentation de la numération plaquettaire : pseudothrombocytose

La nature des particules qui peuvent interférer totalement par mimétisme avec les plaquettes sont d'origines diverses. On distingue celles qui sont déjà préexistantes dans l'organisme comme les schizocytes, les microcytes (< 60 fl), les débris cytoplasmiques des blastes circulants, les bactéries, les parasites (*Plasmodium* sp.) et les levures. Quant aux particules qui se forment de novo dans le tube, elles appartiennent à la famille des immunoglobulines. Ce sont des autoanticorps actifs à des températures inférieures à 37°C et appelés cryoglobulines.

I-2-1 Hématies fragmentées

La détermination de la numération des PLT et des GR se réalise sur le même canal ou les mêmes canaux. Pour les AHC utilisant la technique par impédance, le critère primordial de séparation entre PLT et GR est la taille (volume) [31, 34]. Quand le sang est riche en GR de volume très réduit: Microcytose en cas d'anomalies de synthèse en hémoglobine (carence en fer, thalassémie), nombre élevés de schizocytes (stigmate des anémies hémolytiques mécaniques dont le groupe des microangiopathies thrombotiques), sphérocytes et microsphérocytes chez les grands brûlés [82] (figure 32, 33, 34), ces particules peuvent se localiser dans une région correspondant habituellement aux grandes PLT et faire générer de fausses courbes lissées avec excès d'éléments de grande taille (figure 31 A, B), qui conduisent à une numération plaquettaire faussement augmentée. Une erreur par défaut de la numération des GR a également été rapportée dans ce cas, mais elle reste modeste. Dans les

brûlures sévères, les GR qui éclatent en donnant naissance à de nombreux petits fragments perturbent la numération des PLT et génèrent des histogrammes assez superposables à ceux que l'on peut observer en présence d'autres types de petites particules, comme les cryoglobulines.

Pour les AHC utilisant la mesure par diffraction optique, la détermination du volume, d'une part, et l'indice de réfraction (Abbott, Siemens) ou l'intensité de fluorescence des PLT (Sysmex), d'autre part, permet dans la plupart des cas une bonne séparation avec les GR très microcytaires ou les schizocytes. Certains AHC énumèrent les PLT avec la technique d'impédance, et à la demande ou systématiquement, ajoutent la numération par diffraction optique [Abbott (figure 31C, D), Sysmex] : l'affichage comparatif ou le plus réaliste est proposé. Dans des situations extrêmes, la numération par technique immunologique avec un anticorps monoclonal (CD61) sur le même échantillon (Abbott) permet d'obtenir le résultat exact. Les messages d'erreur observables dans cette circonstance se rapportent à la présence de « plaquettes géantes » et/ou l'inaptitude à séparer convenablement PLT et GR. L'examen des histogrammes des volumes plaquettaires et érythrocytaires est crucial. L'examen du frottis sanguin, le décompte microscopique ou/et l'utilisation d'une autre méthode de comptage (diffraction optique plutôt qu'impédance) sont souhaitables quand l'histogramme des volumes plaquettaires ne revient pas à la ligne de base à 20 fl, quand une population de microcytes apparaît sur l'histogramme plaquettaire et que celui-ci n'est pas lissé (Beckman), quand le volume plaquettaire moyen est exagérément élevé, ou quand la distribution des volumes des GR est très étendue [40, 43].

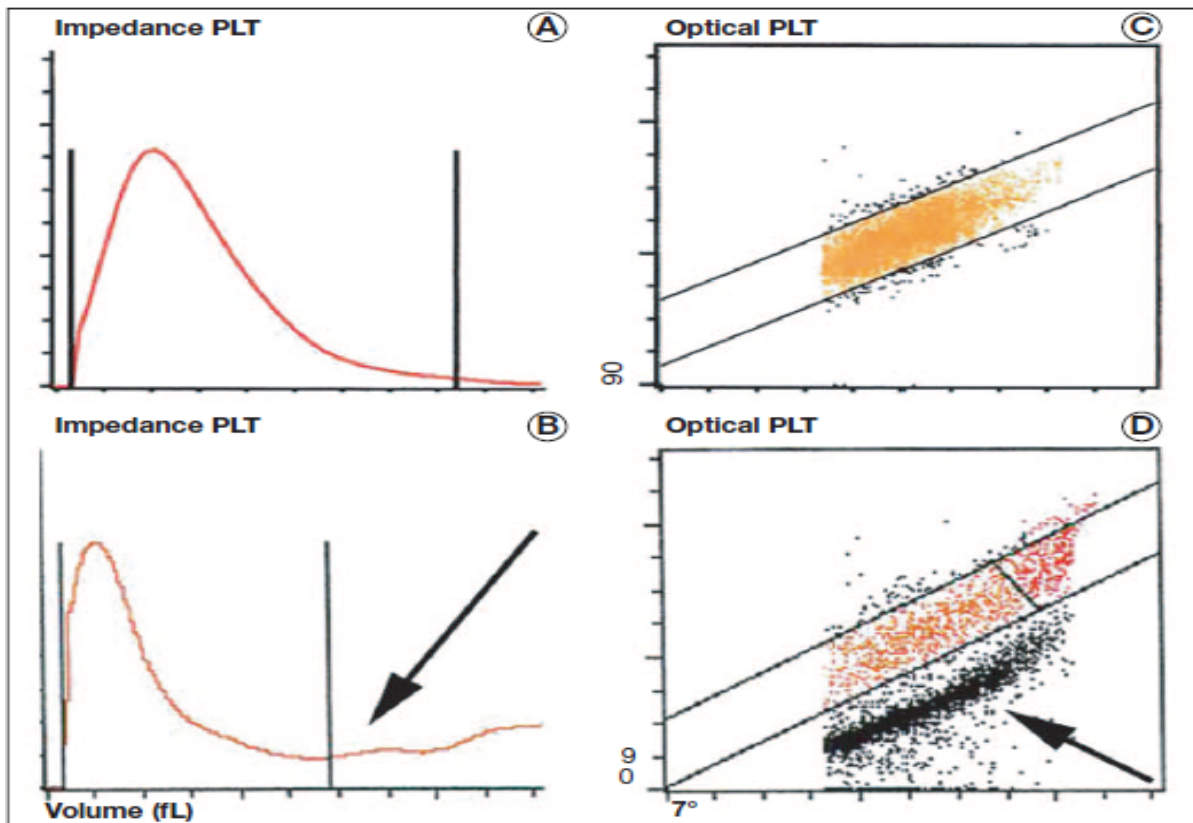


Figure 31 : Perturbation de la numération plaquettaire en présence de microcytes ou de schizocytes au cours des microangiopathies thrombotiques. Les plaquettes et les fragments de globules rouges les plus petits ont des volumes comparables, et sont difficiles à séparer avec la technique par impédance (A : histogramme normal ; B : présence de schizocytes perturbant la séparation plaquettes-hématies), alors que la technique optique discrimine bien les deux types de particules par leurs réfringences très différentes (C : histogramme normal ; D : les schizocytes (en noir) sont bien en dehors de la fenêtre localisant les plaquettes (orange)). (Cell-Dyn Sapphire, Abbott) [40]

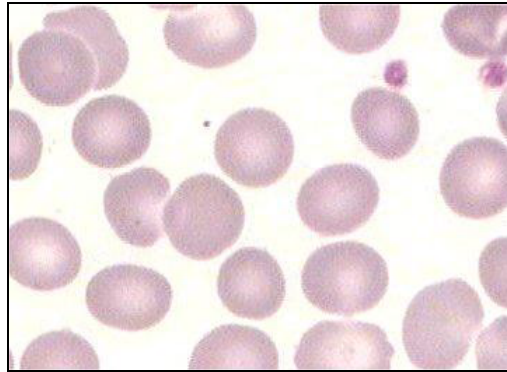


Figure 32: Pseudothrombocytose par présence de microcytose [82]

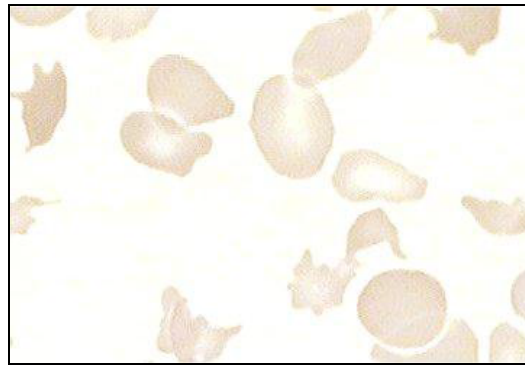


Figure 33: Pseudothrombocytose par présence de nombreux schizocytes [82]

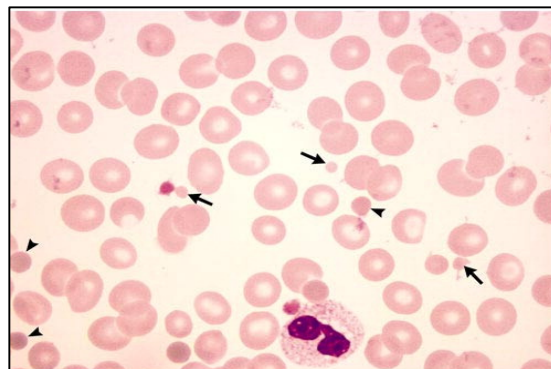


Figure 34 : frottis sanguin au MGG présentant des sphérocytes (pointes de flèches) et microsphérocytes (flèches) chez un sujet brûlés [62]

I-2-2 Fragments de cytoplasme de cellules nucléées

Comme les fragments de GR, les fragments du cytoplasme des leucocytes peuvent provoquer une augmentation de la numération des PLT. Il peut s'agir de fragments de blastes (monoblastes ou lymphoblastes), de cellules lymphomateuses lors de la phase de dissémination de lymphomes diffus à grandes cellules au diagnostic ou pendant la chimiothérapie, ou de tricholeucocytes. La cytochimie (butyrate estérase), l'immunocytochimie (Myéloperoxydase, CD61) ou la microscopie électronique confirment l'origine leucémique de ces particules. On peut les observer sur les frottis sanguins colorés : ces fragments cytoplasmiques sont plus hétérogènes en taille et en contenu que les PLT, et paraissent souvent plus nettement basophiles (figure 35A). L'incidence de cette anomalie est loin d'être négligeable et une étude a récemment montré que l'on pouvait trouver au moins quelques fragments cytoplasmiques sur les frottis sanguins de 25,4 % des patients ayant une leucémie aiguë, et que dans 7 cas (4,1 %), la numération plaquettaire vraie était inférieure à 15 G/l, alors que le compte automatisé variait entre 21 et 75 G/l (moyenne = 39 G/l). Une transfusion de PLT a parfois été retardée du fait de cette fausse augmentation. Une telle situation doit être évoquée par le clinicien comme par le biologiste lorsqu'il existe un syndrome hémorragique alors que la numération des PLT n'est pas effondrée [40, 83].

Sur les AHC, un message d'alerte est en général présent, mais sans spécificité : « PLT géantes », « agrégats plaquettaires? », « fantômes de globules rouges », ou divers autres messages liés à l'impossibilité de produire une courbe lissée. La numération des PLT est fausse, aussi bien avec la technique d'impédance que la technique de diffraction optique (figure 35B). La mesure par technique immunologique a ici une place de choix (figure 35B). On peut réaliser sur frottis sanguin le décompte de ces fragments pour 100 PLT et faire ensuite la correction de la numération plaquettaire brute rendue par l'AHC, afin de proposer un résultat plus proche de la réalité [40, 43].

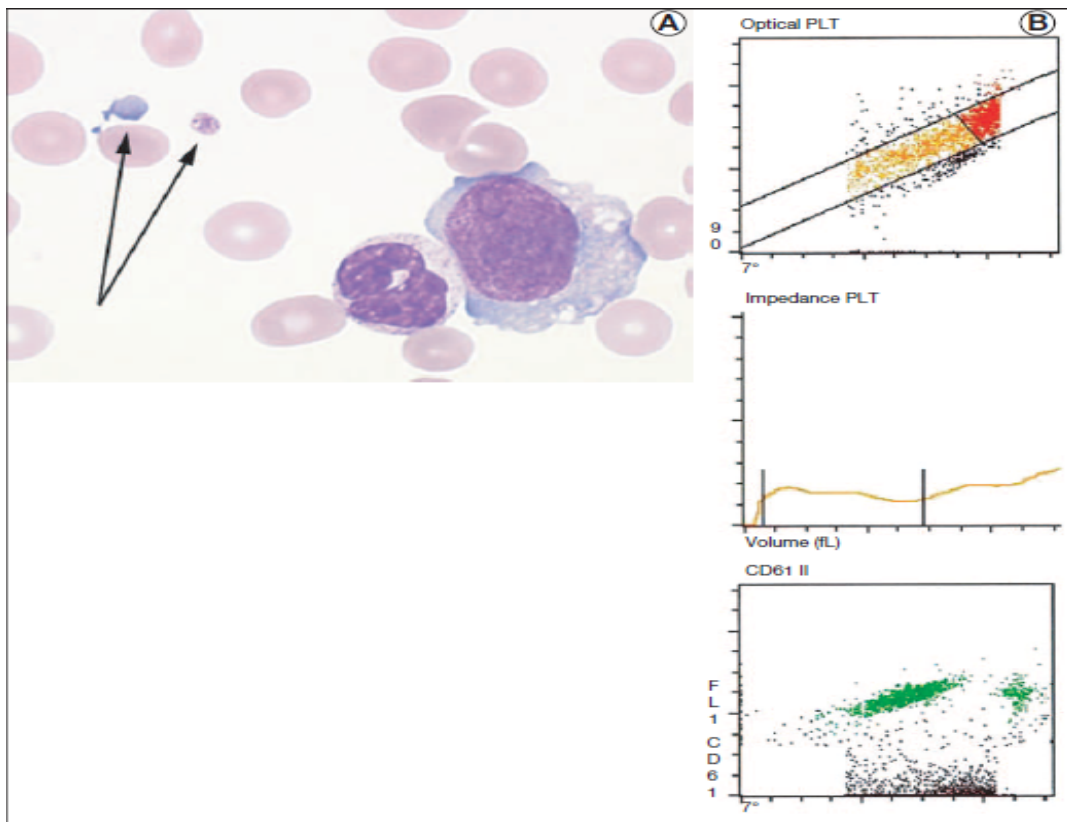


Figure 35 : (A) au cours de certaines leucémies aiguës, des fragments du cytoplasme de blastes leucémiques peuvent être présents dans le sang : leur taille est assez superposable à celle des plaquettes (flèche de droite), mais ils sont habituellement très basophiles (flèche de gauche) (leucémie aiguë monoblastique, frottis sanguin coloré au MGG ; fort grossissement). (B) les fragments du cytoplasme de blastes ont une réfringence et une taille assez comparables à celles des plaquettes et perturbent le décompte des plaquettes par impédance et par technique optique (images du haut et du milieu). Par contre, la technique de décompte immunologique n'est pas influencée par ces fragments cellulaires : le nuage vert de fluorescence des plaquettes est bien séparé de celui des autres particules (Cell-Dyn Sapphire, Abbott) (image en bas) [40].

I-2-3 Micro-organismes

La présence in vivo de bactéries peut induire une fausse augmentation de la numération des PLT générés par les automates, bien qu'il s'agisse d'une situation rare, même chez les patients septiques. Les cas décrits dans la littérature sont rares. Gloster et al ont décrit deux patients avec des hémocultures positives pour les bactéries *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* respectivement, qui avaient aussi les bactéries dans leurs frottis de sang périphérique. Ces bactéries génèrent une numération plaquettaire automatisée faussement élevée [40, 84, 85]. Gérard et al décrit un cas clinique d'un patient admis en urgences pour coma fébrile associé à une IRA, l'examen en réanimation montre une septicémie avec la présence de nombreux diplocoques intra- et extracellulaires (figure 37). Le patient décède dans le même jour d'un arrêt cardio-circulatoire compliquant une défaillance multiviscérale, reliée à un choc septique à pneumocoque avec localisation pulmonaire et méningée [86].

L'histogramme des volumes plaquettaires est anormal et montre un décalage vers un excès de particules de petite taille qui correspondent à des bactéries ou à des amas de bactéries (figure 36). Chez les patients présentant un sepsis sévère, lorsqu'un histogramme plaquettaire était anormal par présence de petites particules, des bactéries étaient constamment observées sur le frottis sanguin [40, 43, 86].

Autres situations au cours desquelles des bactéries sont visibles sur le frottis sanguin alors que la situation clinique est sans rapport avec un état infectieux sévère :

- Une mention particulière doit tout d'abord être apportée aux prélèvements réalisés à partir de cathéters non stériles, dans ce cas l'histogramme des volumes et la numération des PLT sont anormaux, Un pic de particules de taille réduite à l'extrême gauche de l'histogramme des volumes plaquettaires ou un nuage de points dans la région proche de l'origine de l'histogramme bi- ou multiparamétrique de la formule leucocytaire doivent faire penser à ce type d'artéfact. Certains automates ont un seuil minimum de définition des PLT fixé à 3 fl ou variable de 2 à 6 fl qui améliore la fiabilité du résultat rendu par l'AHC [40, 86].

- Un échantillon sanguin analysé longtemps après un prélèvement (habituellement plus de 24 heures) réalisé dans des conditions non stériles (tube de prélèvement souillé) peut être l'objet d'un développement bactérien, et l'on peut observer des bactéries libres sur les frottis sanguins, voire même des leucocytes ayant phagocyté ces bactéries [40, 43, 86].

- La présence de bactéries (et/ou de champignons) dans les colorants, ou plus fréquemment dans les tampons de dilution de ces colorants quand ceux-ci sont conservés dans des conditions impropres, doit être évoquée. Les bactéries apparaissent posées sur les hématies et les leucocytes du frottis sanguin (jamais au sein d'une vacuole) aussi bien que sur le plasma [40, 43].

- Des champignons peuvent présenter la même taille que des PLT, et chez des patients thrombopéniques infectés par des *Candida*, ces derniers ont été observés sur les frottis sanguins et ont provoqué une fausse augmentation de la numération des PLT. Chez un patient traité pour paludisme, de petits GR infectés par des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* ont été identifiés à tort comme étant des PLT (Abbott), conduisant à une numération plaquettaire faussement normale [98].

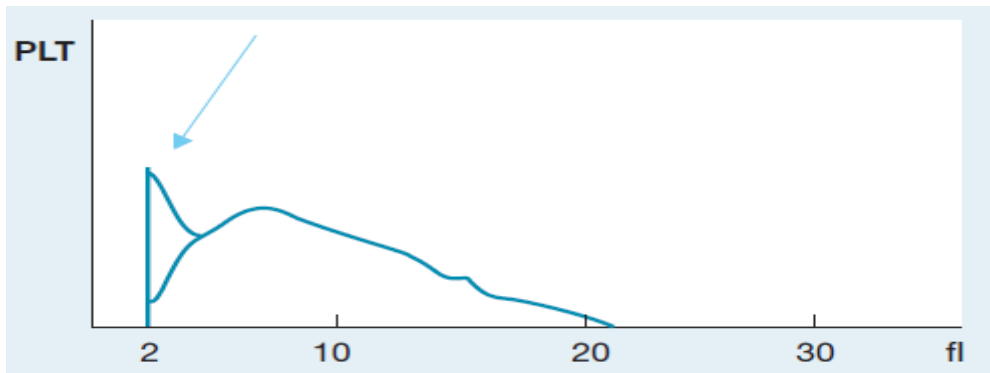


Figure 36: Présence d'un pic de particules de taille très réduite, correspondant à des bactéries libres ou en petits amas présents dans le sang lors d'une septicémie grave. Le pic étant très étroit, l'identification des plaquettes a été par ailleurs bien réalisée et la courbe log normale a été tracée permettant de valider le résultat fourni par l'automate (STKS II, Beckman-Coulter) [40].

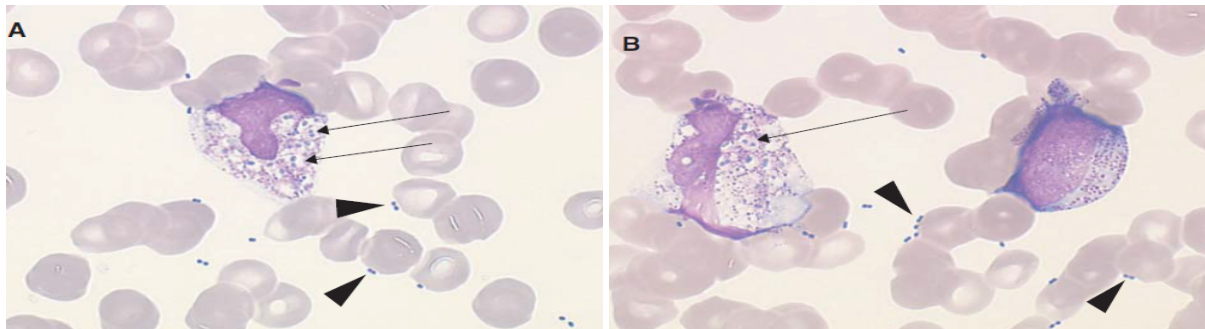


Figure 37 : Étalements sanguins colorés au May-Grünwald Giemsa. (A) nombreuses bactéries libres, avec tendance à coller aux hématies (têtes de flèche), et d'autres intraleucocytaires, localisées dans des vacuoles de granulocytes neutrophiles (flèches). (B) altérations cellulaires associées, avec notamment une déformation cellulaire et un noyau bizarrement segmenté [86].

I-2-4 Cryoglobulines

Les cryoglobulines constituent des complexes multimoléculaires composés d'une ou plusieurs classes d'immunoglobulines, associées parfois à d'autres protéines qui ont la propriété de précipiter entre 4 °C et 37 °C et de se redissoudre par réchauffement du sérum à 37 °C. Elles intéressent le laboratoire d'hématologie pour au moins deux raisons : l'interférence sur la numération des cellules sanguines et l'association possible à certaines hémopathies. Elles peuvent accompagner de nombreuses maladies : hémopathies lymphoplasmatocytaires, maladies immunoprolifératives et maladies inflammatoires chroniques auto-immunes, infectieuses ou virales [87, 88, 89].

Il existe deux groupes de cryoglobulines : les cryoglobulines monoclonales (type I) composées d'une seule immunoglobuline, et les cryoglobulines mixtes associant plusieurs immunoglobulines dont l'une ou une partie d'entre elles a une activité anticorps dirigée contre les autres immunoglobulines (activité facteur rhumatoïde IgM anti-IgG le plus souvent). Lorsque l'immunoglobuline qui possède cette activité anticorps est monoclonale, il s'agit d'une cryoglobuline mixte de type II ; au contraire, lorsqu'elle est polyclonale, il s'agit d'une cryoglobuline mixte de type III. Chaque cryoglobuline possède une température de précipitation qui lui est propre, comprise entre 4 °C et 37 °C. D'une façon générale, les cryoglobulines de type I précipitent plus rapidement que les autres (quelques heures). De même, la concentration de la cryoglobuline décroît du type I au type III.

Tous les types de cryoglobulines sont susceptibles d'interférer sur l'hémogramme. Toutefois, l'interférence est d'autant plus probable que la cryoglobuline précipite rapidement et à température proche de la température ambiante. La concentration de la cryoglobuline n'est pas toujours en rapport avec le déclenchement de l'interférence.

En fonction de la taille des cryoprécipités, l'erreur analytique peut être à l'origine d'une pseudothrombocytose ou du masquage d'une thrombopénie avec histogramme montrant de nombreuses particules de petite taille. Une alarme est généralement présente (Figure 38).

Si les cryoprécipités s'agregent entre eux, ils peuvent augmenter artificiellement la numération des leucocytes (jusqu'à 10 fois), avec dans le canal différentiel des éléments souvent situés près des lymphocytes ou au dessus du seuil des plaquettes. Les numérations des leucocytes et plaquettes sont parfois perturbées toutes les deux (Figure 38).

Plus rarement, Hb et GR peuvent être perturbés : Surestimation de l'Hb, et de la CCMH due à des troubles dans la cuve de lecture liés à l'IgM et/ou problème du flux dans l'analyseur ; fausse macrocytose si une activité de type agglutinine froide se surajoute [40, 88, 89, 90, 91, 93].

Quand la présence de cryoglobulines se traduit par la gélification plus ou moins totale de l'échantillon de sang, l'aspiration est difficile, insuffisante ou nulle, et se rapproche du cas de l'échantillon coagulé : un message d'erreur peut apparaître (« aspiration insuffisante ? ») [40, 88, 90].

L'interférence est levée et l'anomalie disparaît après incubation de l'échantillon à 37°C pendant au moins 30 minutes (figure 41B). Dans certains cas cependant, des cryoprécipités persistent ou des éléments de petites tailles très interférentes avec les plaquettes sont générés en grand nombre par dissolution partielle de gros amas, dans ces situations, le mieux est d'effectuer un nouveau prélèvement qu'on aura soin de maintenir à 37°C et d'analyser rapidement [40, 88, 90, 91, 93, 94].

Les perturbations des automates d'hématologie par la présence des cryoglobulines sont souvent plus franches sur les automates utilisant des réactifs à température du laboratoire, mais altèrent parfois tous types d'automate [40, 90, 94].

Les appareils Bayer Technicon (détection optique des cellules du sang fondée sur le principe de la diffraction d'un rayon lumineux), les cryoglobulines se manifestent essentiellement par une interférence au niveau de l'origine de la courbe de distribution en volume des plaquettes (événements proches de 2 fl) conduisant à un volume plaquettaire moyen anormalement bas. Les précipités de cryoglobulines se situent normalement dans la zone d'exclusion du diagramme « peroxydase ». Ils peuvent néanmoins parfois se manifester sous la forme d'un nuage diffus partant de l'angle inférieur gauche du diagramme et situé dans l'axe de la bissectrice. Les cryoglobulines n'interfèrent généralement pas dans la numération des leucocytes effectuée dans le canal « basophile ».

Avec les appareils Coulter (détection des cellules du sang par variation d'impédance), le principal indice permettant de suspecter une cryoglobulinémie est la présence d'une numération leucocytaire élevée, constamment associée à

une alarme *R qui signe une interférence par des éléments de faible volume détectée au niveau de l'histogramme différentiel des leucocytes. Une incidence sur la distribution plaquettaire est possible mais inconstante, s'accompagnant alors de l'alarme R qui signifie que la distribution en volume des plaquettes est atypique (prédominance d'événements de faible volume en l'occurrence). Il est à noter que les fausses hyperleucocytoses rapportées dans la littérature avec les appareils Coulter (modèle S plus) sont parfois transitoires ou intermittentes [88].

D'un point de vue morphologique, les cryoglobulines sont habituellement visibles à l'état frais entre lame et lamelle. Elles se présentent comme des particules à contours irréguliers faiblement réfringents, ou plus rarement comme des cristaux de formes variées : aiguilles, cristaux courts, « écailles » (figure 39). Sur frottis coloré au MGG, elles sont rarement identifiables. Elles prennent la forme de petits précipités grisâtres (figure 40), de sphères extracellulaires bleuâtres, de particules amorphes rosées ou de corpuscules situés dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles, et souvent une déformation particulière des GR est visible (aspect « mangé aux mites » (figures 41) [88, 91].

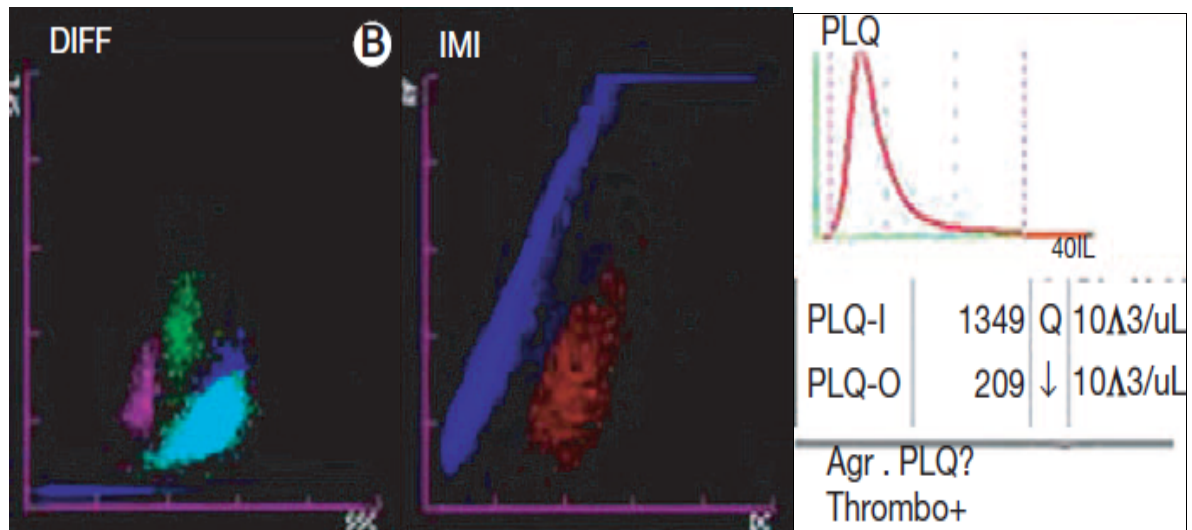


Figure 38: en présence de cryoglobulines l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire (à gauche) n'est pas perturbé, alors que celui visualisant la présence d'une éventuelle myélémie (au centre) montre un excès de particules (fusée de points bleus). La numération plaquettaire par impédance est nettement perturbée par la présence d'une grande quantité de particules anormales et de taille réduite (histogramme à droite). Le décompte par technique optique n'est pas perturbé et fournit un résultat convenable (PLQ-O). Les messages d'alerte sont peu spécifiques (patient au diagnostic d'une maladie de Waldenström avec cryoglobulinémie de type 1) (Sysmex XE-2100) [40].

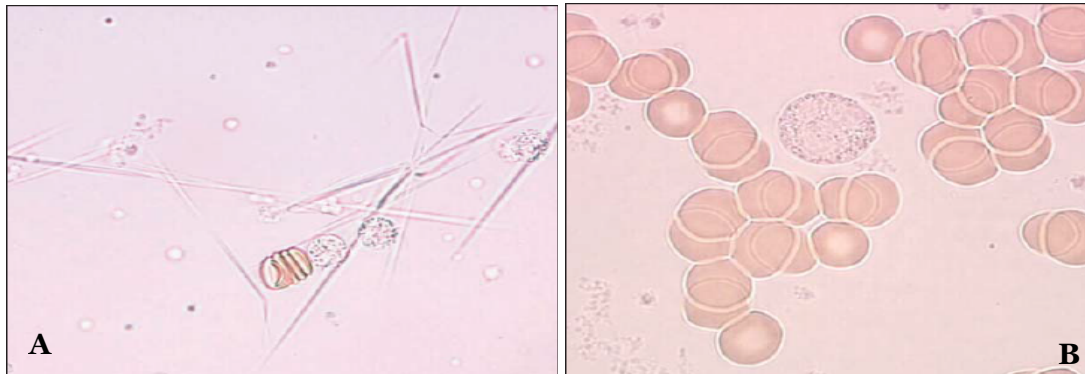


Figure 39 : A cryoglobulines sous forme de cristaux fusiformes (microscopie de contraste, original grossissement x400). B : précipités réfringents mince (microscopie de contraste, original grossissement x650) [94].

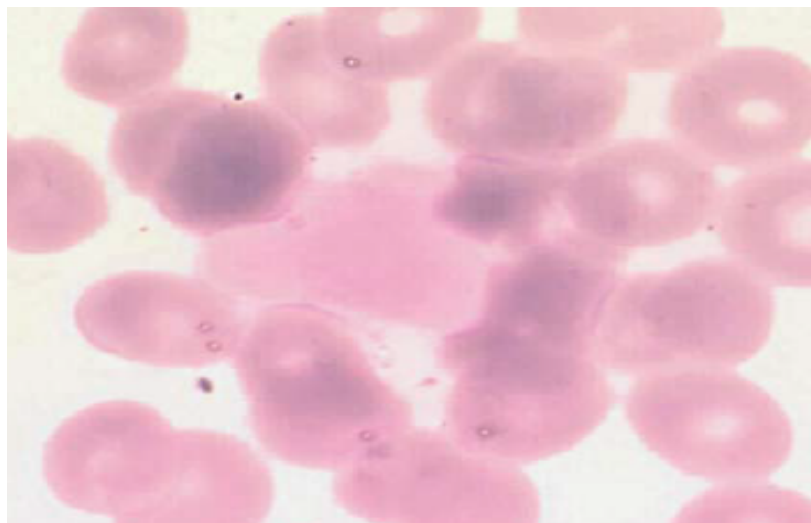


Figure 40 : Frottis sanguin montrant amas de particules amorphes et rosées entre les hématies (May-Grünwald -Giemsa, original grossissement x 1000) [94].

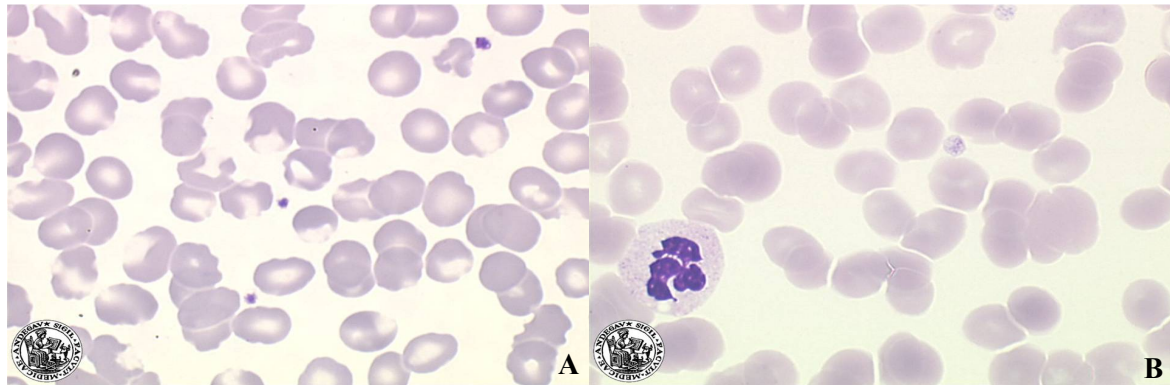


Figure 41 : A. sur le frottis sanguin les cryoglobulines peuvent apparaître sous forme de petits agrégats variablement colorés ou totalement incolores mais déformant les hématies et leur conférant un aspect « mordu » ou « mangé aux mites » (coloration MGG, fort grossissement). B : Le frottis réalisé avec le prélèvement réchauffé à 37°C montre la disparition de l'aspect initialement observé, du fait de la redissolution des cryoprécipités [90]

I-2-5 Lipides

En présence d'un excès de chylomicrons ou avec des échantillons de sang prélevé après un repas, ou au cours de nutrition parentérale avec lipides, il peut se former de petites micelles lipidiques *in vitro*, lesquelles peuvent perturber la numération des PLT. Cet excès de lipides peut également perturber la détermination de l'hémoglobine, de paramètres érythrocytaires et leucocytaires (voir les parties correspondantes). Certains auteurs ont comparé l'influence de l'excès de chylomicrons sur la numération des PLT réalisée par deux types d'AHC : ils ont observé une augmentation modérée pour l'AHC utilisant une technique de comptage optique par rapport à celui utilisant la méthode de mesure par impédance, ce dernier ne paraissant pas affecté. Si l'augmentation était faible et négligeable chez les patients avec une numération

plaquettaire normale (augmentation de 2 à 40 G/l), elle ne l'était plus chez les patients thrombopéniques, notamment en cas de leucémie traitée par L-asparaginase. Les lipides possèdent un indice de réfraction élevé et peuvent générer des signaux anormaux qui se localisent sur les histogrammes biparamétriques près de la région des PLT ou à la même place que les petits GR ou les débris de GR. Pour les AHC qui analysent les leucocytes sur deux canaux, les réactifs utilisés dans chaque canal ne sont pas sensibles de la même manière à la présence de lipides et, en fonction de la quantité et de la composition de ces derniers, une discordance entre la numération des leucocytes sur chacun des deux canaux peut être observée (Siemens, Sysmex). Des messages d'erreur (« schizocytes ? », « fragments de GR ? ») et l'analyse attentive des histogrammes leucocytaires (il existe des images particulières qui seront discutées plus loin dans le document consacré aux leucocytes) sont les points clés pour apprécier l'interférence potentielle des lipides sur la numération des PLT. Dans la mesure où les lipides perturbent la quantification de l'hémoglobine, des leucocytes et/ou la formule leucocytaire automatisée, des messages d'alarme correspondant à ces perturbations apparaissent (« turbidité cuve Hb », « interférence lipides »). Les méthodes proposées pour éliminer spécifiquement les lipides de l'échantillon (extraction à l'éther, remplacement du plasma par un volume identique de diluant iso-osmotique) sont à éviter car elles peuvent conduire elles-mêmes à de fausses numérations plaquettaires, soit par défaut soit par excès. Des modifications plus ou moins superposables à celles observées avec les micelles lipidiques ont été rapportées par ailleurs avec l'utilisation d'émulsions de perfluorocarbène [40, 92].

I-2-6 Divers

Des bulles d'air résultant de fuites dans les tuyauteries des AHC peuvent se mélanger au flux de cellules et perturber les techniques de numération par impédance. De même, la contamination des réactifs (poussière, champignons) ou des débris introduits dans l'analyseur peuvent fausser la numération des PLT. Un nettoyage et des techniques de mesure du bruit de fond selon les préconisations des constructeurs sont nécessaires, tout comme le respect du contrôle de qualité, et permettent en général d'éviter de tels ennuis. Dans les échantillons sanguins trop âgés (au-delà de 1 à 2 jours) des variations du volume plaquettaire peuvent modifier la distribution Log normale des volumes des PLT et une impossibilité à générer une courbe lissée, ce qui diminue la précision de la mesure [40].

II- PRINCIPALES SITUATIONS ASSOCIE A UNE ANOMALIE DE LA NUMERATION DES LEUCOCYTES AUTOMATISES

Sur les automates d'hématologie cellulaire, le nombre des leucocytes est obtenu après lyse des hématies puis analyse par diffraction optique ou variation d'impédance. L'examen des histogrammes leucocytaires, soit avec trois paramètres soit générant une formule complète, permet de repérer plusieurs de ces particules perturbatrices sous la forme de nuages de points, et leur localisation sur le graphe oriente parfois aussi sur leur nature. Une numération leucocytaire est parfois réalisée également sur le canal d'analyse de la formule complète, et une discordance de résultats entre canaux sera signalée. La formule leucocytaire automatisée se révèle exacte et précise quand les hémogrammes sont normaux ou montrent des variations quantitatives modérées, mais diverses imprécisions de mesure persistent.

Les principales situations associées à une anomalie de la numération leucocytaire automatisée sont présentées dans le tableau VII

Tableau VII : Les principales situations associées
à une anomalie de la numération leucocytaire automatisée

Fausse diminution	Fausse augmentation
- Agglutination des neutrophiles (liée à l'EDTA) - Agglutination de divers autres types de leucocytes entre eux (lymphocytes, cellules de leucémies ou de lymphome) - Agrégats mixtes neutrophiles plaquettes - Excès d'anticoagulant EDTA-K3 (rapport quantité de sang/quantité d'anticoagulant non respectée) - Coagulation partielle de l'échantillon	- Agrégats plaquettaires - Plaquettes géantes - Érythroblastes - Globules rouges résistant à la lyse (nouveau-nés, hémoglobines anormales, chimiothérapie, insuffisance rénale ou hépatique, hyperosmolarité plasmatique) - Cryoglobulines, cryofibrinogène - immunoglobulines monoclonales - lipides - Micro-organismes (agrégats de bactéries) - Tube de sang trop rempli - Anecdotique : présence de cellules adipeuses dans l'échantillon de sang

II-1 Numération leucocytaire faussement diminuée

II-1-1 Agrégats de polynucléaires neutrophiles en présence d'EDTA

La leucoagglutination des PNN est un phénomène rare avec une incidence variable estimée de 1/7 500 à 1/32 500 hémogrammes , au contraire de l'agglutination des plaquettes EDTA dépendante, beaucoup plus fréquente, d'où la méconnaissance de cet artefact et l'absence de document relatant une conduite pratique utilisable en routine. Une cinquantaine de cas sont répertoriés dans la littérature. Cette anomalie est observée aussi bien chez l'homme que chez la femme à tout âge et peut être transitoire ou permanente [78, 79, 91].

Un contexte pathologique précis ne semble pas associé à cette anomalie, qui peut survenir chez des sujets apparemment sains (tableau VIII). Néanmoins, un contexte inflammatoire est très souvent présent, soit aigu (maladie infectieuse), soit chronique (tumeur solide, hémopathie, maladie auto-immune). La revue bibliographique indique cependant souvent la présence de tumeurs et d'une maladie du foie, au moment du diagnostic ou dans les antécédents. Enfin, même lors d'un contexte aigu, l'aspect transitoire de l'anomalie est souvent mentionné [79, 91].

Tableau VIII: pathologies pouvant être associées au phénomène de leucoagglutination [79]

Pathologies		Référence par auteurs
Cancer (± métastase)	Colon	Deol et al (1955) ; Carr et al (1996)
	Foie	Vinatier et al (1994)
	Rein	Vinatier et al (1994)
	Langue (dans les antécédents)	Rohr et al (1990)
	Vessie (dans les antécédents)	Epstein et al (1988)
Hémopathie	Lymphome malin non hodgkinien	Vinatier et al (1994)
Hépatopathie	hépatite (alcoolique, infectieuse)	Epstein et al (1988) ; Kobayashi(1991)
	Cirrhose (alcoolique)	Savage (1989) ; Vinatier et al (1994) ; Imbing et al (1996)
	Cancer	Vinatier et al (1994)
Polyarthrite rhumatoïde		Antonsen et al (1989)
Maladie de Biermer		Lesesve. J.-F et al (2000)
Diabète insulino-dépendant		Lesesve. J.-F et al (2000)
Syndrome infectieux	septicémie	Lesesve. J.-F et al (2000)
	Poumon, bronches (légionellose)	Savage et al (1989) ; Robbins et al (1991) ; khalil (1991)
	BCG ite généralisé	Epstein et al (1988)
	Mononucléose infectieuse	Guibaud et al (1983)
	Choc toxi-infectieux	Imbing et al (1996)
Divers	dyspepsie	Hillyer et al (1990)
	Epilepsie (traité)	Schinella et al (1995)
Aucune		Rohr et al (1990) ; Galifi et al(1993) ; Lesesve. J.-F et al (2000)

➤ **Mécanisme**

Le mécanisme de formation des amas est probablement variable et reste mal élucidé. La seule certitude est la survenue *in vitro*. Les notions souvent mentionnées sont : l'EDTA dépendance, la présence d'une IgM température ou non dépendante. Des modifications de la structure des membranes ont été observées en microscopie électronique (comme dans les cas d'agglutinations d'hématies ou de plaquettes) pouvant provoquer l'exposition de sites potentiellement antigéniques. L'EDTA pourrait s'y lier soit directement, soit indirectement (fixation de l'EDTA à une protéine plasmatique, formation d'un complexe immun circulant se déposant ensuite sur la membrane).

D'autres auteurs supposent la présence d'anticorps agissant comme des agglutinines froides dirigées contre des antigènes membranaires des leucocytes, en particulier dans un contexte d'infection à légionelles, mycoplasmes ou de mononucléose infectieuse. Cette hypothèse expliquerait la persistance de la leuco-agglutination avec d'autres anticoagulants que l'EDTA. Après incubation du plasma avec un anticorps anti-Ig ou avec le dithiothreitol, certains auteurs ont montré que ce phénomène était lié à un composant plasmatique de nature IgM et ont rapporté que la taille des agrégats était plus importante à basse température et qu'ils disparaissaient à 37 °C. D'autres auteurs ont remarqué que l'agglutination n'était qu'inconstamment corrigée par le réchauffage à 37 °C, en défaveur de l'implication constante d'une agglutinine froide dans la genèse des amas. Un taux élevé d'expression d'intégrine CD11b (CD18) sur la membrane des PNN a été rapporté dans une étude [79, 91].

Selon le type d'AHC, un message d'alerte est présent ou non : il s'agit alors d'une alarme quantitative (« leucopénie » ou « neutropénie »), secondaire à la déplétion en neutrophiles ou d'une alarme qualitative concernant les leucocytes non agrégés « immatures granulocytes » dans ce cas tout les graphes sont normaux à part le graphe IMI (immature information), qui montrait une image caractéristique de celle obtenue normalement en présence d'amas de plaquettes (figure 42), et l'alarme « lymphocytes atypiques », mais il n'y a pas de message spécifique pour l'agrégation des PNN. Quand le nombre de leucocytes est déterminé sur le canal de numération des leucocytes après lyse des membranes et décompte des noyaux (« canal basophiles ») le résultat est correct car les agrégats sont détruits (lyse des membranes), alors que le nombre obtenu sur le canal « formule leucocytaire » est sous-estimé, la lyse ménagée préservant les amas, qui ne sont ni identifiés ni comptés. Les histogrammes biparamétriques de la formule leucocytaire (taille/contenu, ou taille/activité myéloperoxydasique) peuvent visualiser les petits amas sous la forme de quelques points correspondant à des particules de grande taille (au-dessus du nuage des PNN) et/ou avec forte activité peroxydase et/ou perturbant la séparation des nuages leucocytaires normaux. Les messages les plus fréquemment générés sont : « granulocytes immatures » ou « band cells », ou « forte activité peroxydase », ou « neutropénie », ou « HPX » (présence de particules à forte activité peroxydase ; Siemens), mais se rapportent surtout aux particularités des leucocytes résiduels [78, 91].

Sur les frottis sanguins les amas leucocytaires ont une taille variant de quelques uns à plusieurs centaines de PNN par amas (des amas de PNN de petite taille (jusqu'à 5 cellules), de taille moyenne (6 à 50 cellules) ou de grande taille (plus de 50 cellules)) : l'examen au faible grossissement doit être attentif car plus les amas sont volumineux plus ils sont rares et donc difficiles à détecter , ces amas sont trouvés surtout sur les bords et franges mais en fait répartis sur toute la surface du frottis (figure 43). Des granulocytes immatures (myélocytes ou métamyélocytes) ou des neutrophiles non segmentés sont observables dans ces amas, et parfois quelques lymphocytes ou monocytes semblent y avoir été piégés (Figure 44 A et B) [78, 79, 91]. Les érythrocytes et plaquettes restent de morphologie normale. Il n'a pas été décrit d'association à un satellitisme des plaquettes aux PNN, mais un cas de pseudo neutropénie associée à une pseudo-thrombopénie par agglutination est connu [79].

Les méthodes pour prévenir ce phénomène in vitro dépendent de son mécanisme causal mais il reste souvent indéterminé. Dans la littérature, plusieurs méthodes sont ainsi proposées comme de simplement chauffer le tube à 37 °C, utiliser un anticoagulant alternatif [78, 79, 91], agiter mécaniquement par vortexage [79], voire ajouter de la kanamycine au sang EDTA [78] ces méthodes diminuent inconstamment la taille et le nombre des agrégats et ne doit pas être proposé comme moyen d'obtenir une numération leucocytaire exacte. Un prélèvement de sang sur citrate trisodique est à conseiller en première intention. La dilution immédiate de sang capillaire dans un milieu sans EDTA prévient l'agglutination [78, 91].

Les agrégats de PNN sont dépourvus de PLT, par opposition aux agrégats mixtes PNN - PLT décrits dans la partie des pseudothrombopénies EDTA dépendantes de ce travail. En outre il n'y a pas de relation entre le phénomène lié à EDTA présenté ici et l'anomalie qui peut survenir in vivo dans diverses maladies dont les syndromes de détresse respiratoire de l'adulte ou la leucostase, au cours desquels les PNN ont tendance à s'agréger comme conséquence d'interactions de leur membrane avec le complément [91].

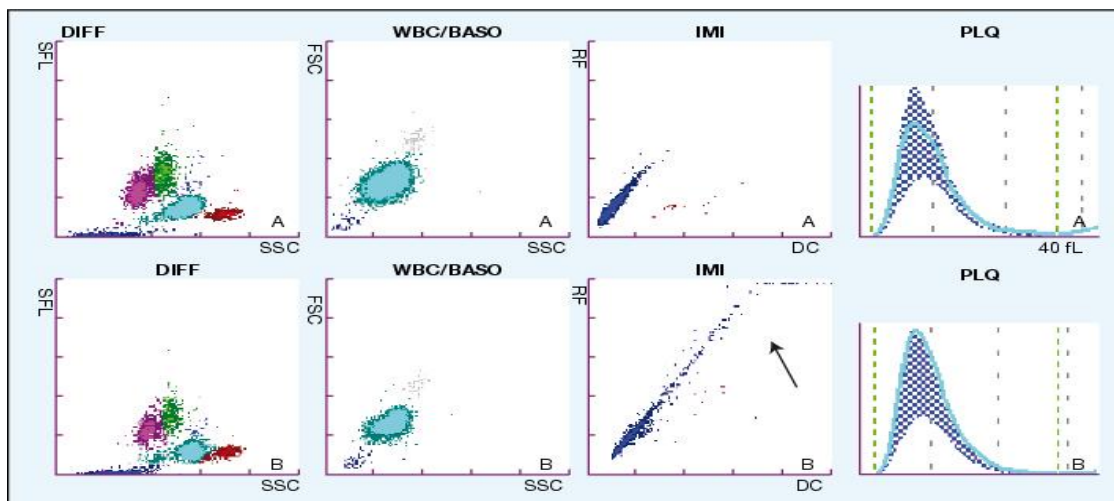


Figure 42: Graphes démonstratifs obtenus sur l'automate XE-2100 (Sysmex Corporation). (A) patient sans leucoagglutination ; (B) patient avec leucoagglutination.

La flèche sur le graphe IMI (B) indique l'image dite « en flèche » caractéristique classiquement de la présence d'amas de plaquettes [78].

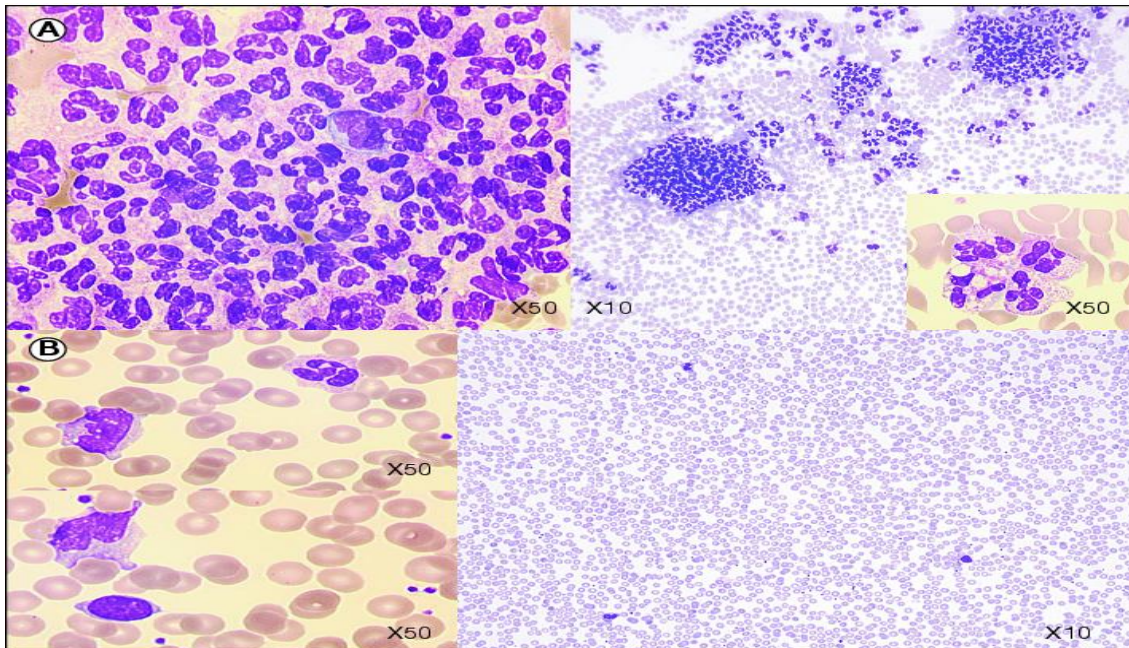


Figure 43 : Frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa observé à différents grossissements. (A) franges du frottis, de nombreux amas de globules blancs sont observés ; (B) centre du frottis, les leucocytes sont isolés, sans amas [78].

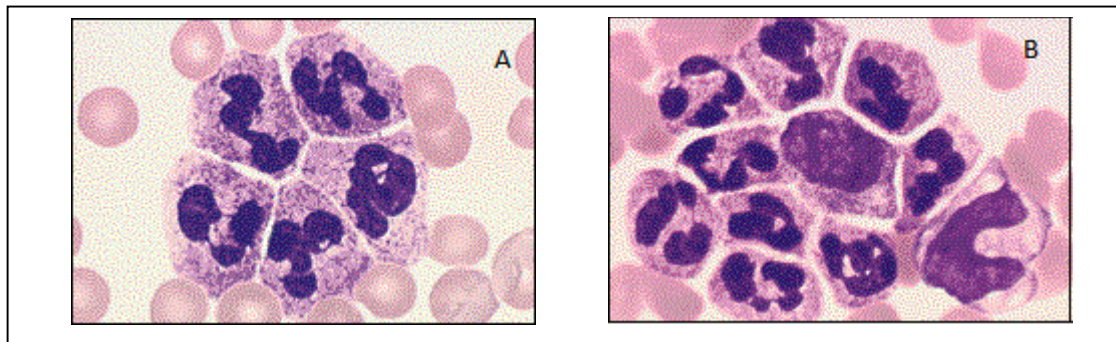


Figure 44 : Frottis sanguin colorées au MGG G x 1 000. (A) Amas de PNN. (B) amas de PNN avec cellules piégés : myélocyte, monocyte [79]

Plusieurs facteurs contribuent à l'absence de détection de la leucoagglutination :

1) le type d'automate joue un rôle important, comme indiqué par plusieurs auteurs. Il faut garder en mémoire que les amas les plus grands sont complètement négligés par l'automate et seuls les plus petits amas déclenchent les alarmes [78, 79]. Pour les automates à impédance comme le STKS (Coulter), ce phénomène est suspecté quand il est difficile de séparer les différents types de leucocytes ou quand on observe une distribution anormale du nuage de points sur les histogrammes biparamétriques avec une ligne de points se projetant au dessus du nuage correspondant aux PNN et débordant sur la zone des monocytes. L'alarme la plus fréquente est alors « granulocytes immatures » ou « Band cells (PNN peu segmentés) ». Sur les automates Bayer-Technicon, les petits amas peuvent créer des événements en haut à droite de la différentielle leucocytaire et déclenchent une alarme « high peroxydase content ». Certains automates possèdent un canal comptant les noyaux des globules blancs après lyse drastique des membranes (Bayer, Abbott), ce qui désagrège les amas de leucocytes et on peut alors observer une différence avec le compte des leucocytes obtenu par le canal peroxydase et évoquer ce phénomène. Le XE-2100, automate décrit comme performant pour détecter les anomalies de globules blancs, ne semble pas très sensible à ces amas de PNN [78].

2) la manière de regarder le frottis sanguin peut également induire des faux négatifs. En effet les amas de PNN sont surtout visibles en bout de frottis [78,79, 91] en raison d'un phénomène physique connu qui pousse les grandes cellules ou amas au niveau des franges du frottis, même lorsque le frottis est réalisé par un

automate. Les amas n'auraient ainsi pas été détectés si l'opérateur s'était contenté de regarder le frottis à l'objectif 50 au centre du frottis. L'introduction récente de microscopes motorisés pilotés par logiciel d'analyse (type Cellavision DM8/96, Roche diagnostics) peut donc également contribuer à l'absence de détection de ce phénomène. En effet, les frottis sont scannés automatiquement par un microscope dirigé par ordinateur et les leucocytes sont classés, mais les franges des frottis ne sont pas scannées du tout et un phénomène de leucoagglutination peut alors passer inaperçu [78].

3) Le phénomène de leucoagglutination est par ailleurs rarement associé à une forte neutropénie. La diminution du nombre de PNN apparaît souvent partielle dans de nombreux cas et le degré de neutropénie n'est jamais aussi sévère que lors des pseudothrombopénies. Le nombre de PNN peut donc ne pas déclencher un étalement et une vérification au microscope [78].

II-1-2 Agrégats des lymphocytes en présence d'EDTA

La pseudoagglutination des lymphocytes due à l'EDTA est un phénomène moins fréquent que l'agglutination EDTA dépendante des PNN, l'étude de la littérature ne retrouvant que seize observations (tableau IX). La fréquence ne peut pas être déduite de cette simple analyse bibliographique, mais elle correspond au CHU de Nancy à environ moins d'un cas par année (45 000 hémogrammes), alors que trois à huit cas de leucoagglutination à PNN sont observés durant cette période [95, 96].

Des lymphocytes, comme des monocytes, se trouvent parfois emprisonnés dans les amas de PNN au cours des leucoagglutinations à PN. Les cas concernant uniquement des lymphocytes sont très rares. Les lymphocytes peuvent être normaux (cinq cas) ou pathologiques (dix cas), voire les deux (une observation). La lympho-agglutination observée chez le patient atteint d'un lymphome B dans le cadre d'un sida, concernait les lymphocytes normaux, un examen par cytométrie en flux ayant permis de constater un mélange de lymphocytes T et B de nature polyclonale. La concomitance d'hémopathies B chroniques (13 cas : leucémies lymphoïdes chroniques [LLC], lymphomes, myélomes) est intrigante. La possibilité d'une association à des cas de lymphomes spléniques à lymphocytes villeux avait été posée. Le phénomène a également concerné des plasmocytes circulants dans un cas étudié par Jean-François Lesesve et al (cas n° 4 tableau IX), cette observation restant isolée [91, 96].

La répartition des cellules telle qu'affichée par l'AHC indique un nuage de points inhabituel, mais non spécifique (histogramme rendu par AHC pour cas n°3 étudié par Jean-François Lesesve et al figures 45) [91, 96], et les alarmes qui en découlent également (« LUC » le plus souvent). Elles obligent en principe à réaliser un frottis qui permet alors de découvrir facilement l'anomalie [96].

Les 16 observations indiquent des amas de taille moyenne, assez proches, entre 3 et 50 lymphocytes, toujours facilement détectables sur le frottis. Les « gros » amas ne sont jamais observés. L'observation de Jean-François Lesesve et al de groupement en anneau semble unique, mais les regroupements à tendance

« Circulaire » sont fréquents (figures 46,47). Le diagnostic morphologique différentiel reste aisé : les lymphocytes gardent leurs caractéristiques et ne sont pas lysés. Une observation a également été effectuée sur un frottis médullaire (étalement d'une aspiration recueillie sur EDTA) sans confusion trompeuse avec des cellules métastiques.

La durée d'observation est variable, mais souvent persistante. Par contraste, des observations ponctuelles, isolées dans le temps, ont été décrites, et des phénomènes transitoires ont été observés (phénomène non retrouvé au cours d'hospitalisations ultérieures) [96]. Dans tous les cas rapportés jusqu'à présent l'EDTA était impliqué, bien que de petits amas de cellules aient également été observés sur des prélèvements héparinés utilisés comme contrôles, et l'emploi de sang prélevé sur citrate de sodium ou héparine ne modifiait pas réellement la tendance à l'agglutination des cellules lymphoïdes dans un cas. Un prélèvement de sang capillaire avec dilution immédiate dans un liquide sans EDTA semble la meilleure manière d'éviter la formation des agrégats [91, 95, 96]. Le réchauffage à 37 °C a été mentionné comme peu efficace pour faire disparaître les agrégats [91, 96]. Comme le nombre de cas rapporté est faible, seules des hypothèses concernant le mécanisme ou les mécanismes conduisant à l'agglutination des lymphocytes ont été proposées, impliquant diverses molécules comme l'adrénaline, l'acide arachidonique, ou le leucotriène D4 [91]. Une exposition de sites antigéniques cryptiques démasqués par l'EDTA est suspectée. Une agglutinine froide (IgM) pourrait être en cause du fait de la diminution de l'artefact après chauffage [96].

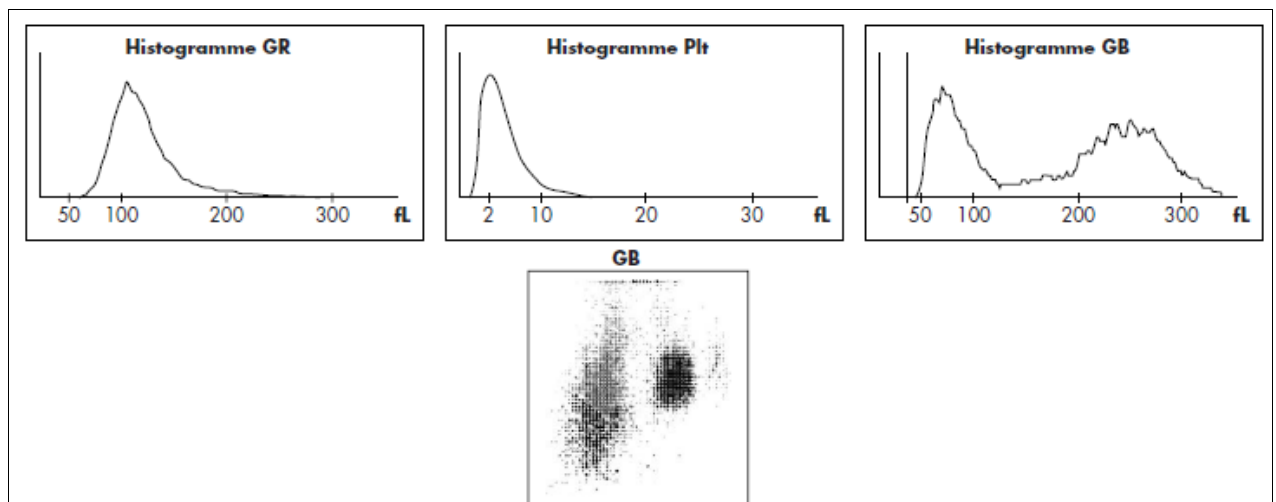


Figure 45 : Appareil Beckman-Coulter GEN's. Nuage de points anormal au niveau de l'histogramme de répartition des leucocytes. GB : 4,8 G/L ; PN : 45,5 % R ; PEO : 1,6 % R ; PB : 0,2 % R ; lympho : 18 % R ; mono : 34,7 % R. Alarme « blastes ». (Cas no 3 étudié par Jean-François Lesesve et al) [96].

Tableau IX: Données de la littérature des cas de pseudo agglutination des lymphocytes due à l'EDTA [87].

Référence	Sexe/âge	Pathologies	Messages d'alarmes (appareils de numération)	Lympho-agglutination (specimen recueilli sur EDTA)	Persistance des amas lymphocytaires ?	Durée
Bizzaro, 1991	H/88	LLC	LUC, nuage de point anormal (Technicon H6000)	Amas jusqu'à 17 cellules (leucémiques)	Sang natif : - MO : Présents	Observations répétées
Juneja, 1992	H/66	Lymphome splénique avec lymphocytes villeux adénocarcinome prostatique métastatique	Non indiqué (Coulter S-Plus IV)	Amas de 4 à ≈ 50 cellules (lymphomateuses)	Sang natif : -	Observations répétées
Imbing, 1995	F/56	Lymphome splénique avec lymphocytes villeux	Non indiqué	Amas jusqu'à ≈ 40 cellules (lymphomateuses)		
Deol, 1995	F/82	Infection urinaire	Non indiqué	Amas de 10 à 20 cellules (bénignes)	Sang natif : - Héparine : + (diminué)	
Deol, 1995	H/36	LNH B (sans dissémination sanguine) Sida	Non indiqué	Amas de 9 à 12 cellules (bénignes)	Citrate : -	Ponctuel (hospitalisé 3 jours)
Shelton, 2000	F/65	Lymphome splénique avec lymphocytes villeux polycythemia vera	Nuage de points anormal (Coulter STKS)	Amas de 2 à 15 cellules (lymphomateuses)	Citrate : + Chauffage : diminué MO : présents	Observations répétées (> 30 mois)
Lesesve, 2001	F/82	Gammapathie monoclonale	Nuage de points anormal (Coulter STKS)	Amas de 4 à 12 cellules (bénignes)	Sang natif : - Chauffage : sans effet	Plusieurs prélèvements (7jours)

Lesesve, 2001	H/84	Leucémie myélo-monocytaire chronique	LUC, nuage de points anormal (Bayer Technicon H2)	Amas et anneaux de 16 à 46 lymphocytes (bénins)	Sang natif : - Chauffage : sans effet	Plusieurs prélèvements (2 mois)
Wenburg, 2003	H/79	LNH manteau	Non indiqué	Amas de 4 à 40 cellules (lymphomateuses)	Sang natif : - Citrate : - Héparine : -	
Lesesve, 2007	F/42	LNH B (cutané) (sans dissémination sanguine)	Non concerné (moelle osseuse recueillie sur EDTA)	Amas et anneaux de 7 à 30 cellules (bénignes et LNH)	MO : Présents	
Lesesve, 2009 Cas 1	F/49	LLC	LUC, nuage de points anormal (Bayer ADVIA 120)	Amas et anneaux de 3 à 12 cellules (leucémiques)	Sang natif : - Citrate : - Héparine : - Chauffage : diminué	Observations répétées (1 mois)
Lesesve, 2009 Cas 2	F/81	LNH (zone marginale)	LUC, ly atyp., blastes, nuage de point anormal (Cell-Dyn 4000) LUC, nuage de points anormal (Bayer ADVIA 120)	Amas de 4 à ≈ 50 cellulless (leucémiques)	Sang natif : - Citrate : -	1 examen (pas de suivi)
Lesesve, 2009 Cas 3	H/80	LNH (B diffus à grandes cellules)	blastés, nuage de point anormal (Coulter GEN's)	Amas et anneaux de 2 à 15 cellules (lymphomateuses)	Sang natif : - Citrate : -	Plusieurs mois
Lesesve, 2009 Cas 4	F/71	Myélome	LUC, ly.atyp., blastés, nuage de points anormal (Bayer ADVIA 120)	Amas de 3 à 15 cellules (plasmocytes dystrophiques)	Citrate : -	1 examen (pas de suivi)
Lesesve, 2009 Cas 5	F/63	LLC	LUC, nuage de points anormal (Bayer ADVIA 120)	Amas de 2 à 5 cellules (leucémiques)	Sang natif : - Citrate : -	Observations répétées (5 jours)
Lesesve, 2009 Cas 6	F /15	Syndrome des antiphospholipides	LUC, nuage de points anormal (Bayer ADVIA 120)	Amas et anneaux de 3 à 8 cellules (bénignes)	Sang natif : - Citrate : -	Observations répétées (1 mois)

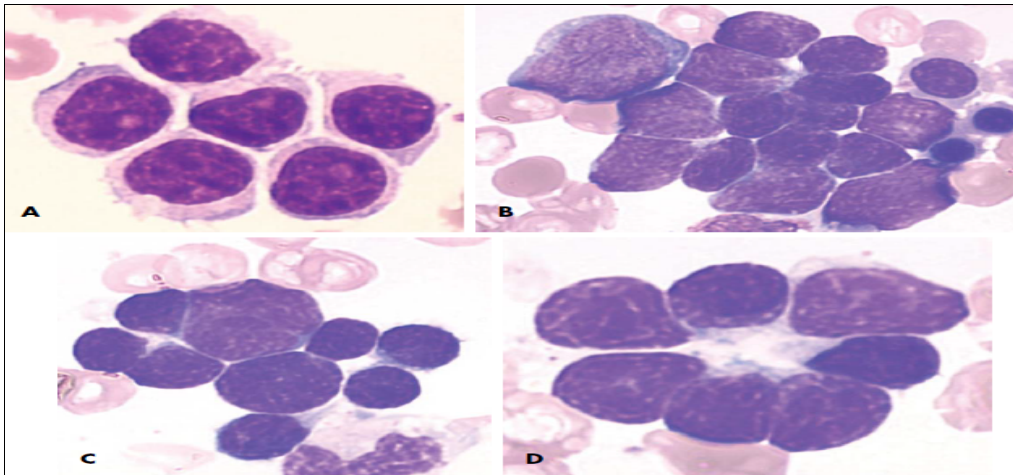


Figure 46 : Amas de lymphocytes normaux (sang [A], moelle prélevée sur EDTA [B]), avec association de cellules lymphomateuses périphériques (C), en forme d'anneau (D).

Coloration MGG $\times 1\,000$ [96].

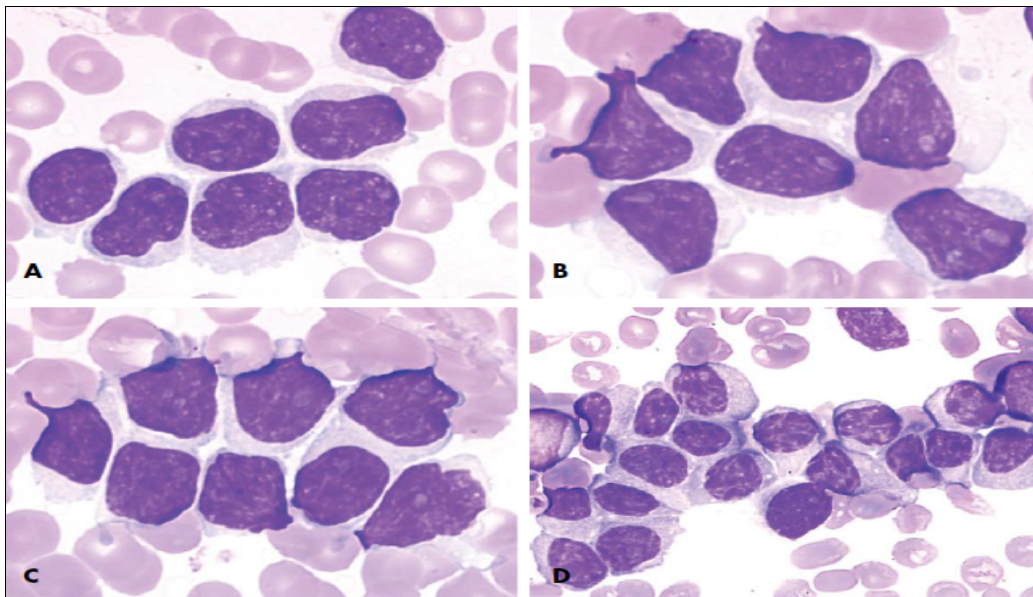


Figure 47 : Aspects morphologiques particuliers de l'artefact : amas étirés suivant l'axe de l'étalement (A), forme en « rosette » (B), apparence cohésive pseudo-métastatique (C). Amas de plasmocytes (D), cas no 4. Sang, MGG $\times 1\,000$ et 630 [96]

II-1-3 Causes liées aux erreurs à la phase préanalytique

- Nature et quantité d'anticoagulant

Une diminution du nombre des leucocytes sans relation avec une agglutination leucocytaire a été rapportée pour des échantillons sanguins contenant une quantité de sang insuffisante (après ponction veineuse difficile) : l'excès d'EDTA K3 a été mis en avant comme pouvant altérer les leucocytes. Les histogrammes de la formule leucocytaire montrent alors des aspects anormaux, peu superposables d'un cas à l'autre. Ce phénomène doit être évoqué également pour les prélèvements capillaires chez le nouveau-né et le nourrisson ; il semble cependant ne pas survenir en cas d'excès d'EDTA K2 [64, 91].

- La coagulation partielle de l'échantillon peut aussi induire une numération leucocytaire faussement diminué [91].

II-2 Numération leucocytaire faussement augmentée

II-2-1 Agrégats plaquettaires et plaquettes géantes

Les agrégats de PLT ont une taille variable et parfois proche de celle des leucocytes et peuvent être énumérés comme tels, induisant une fausse hyperleucocytose [40, 91]. Lors de la numération des leucocytes avec la technique d'impédance et la détermination de la formule approchée LMG, l'histogramme correspondant peut, outre montrer les 3 pics correspondant respectivement aux lymphocytes, monocytes et granulocytes, signaler une interférence liée à la présence de particules de petite taille, signalée par un message : « agrégats de PLT », « PLT géantes », mais aussi parfois « érythroblastes » (Beckman, série LH). Dans le canal énumérant les noyaux leucocytaires (« canal basophiles») l'agent de lyse détruit les agrégats de PLT et

la numération leucocytaire proposée est exacte. Par contre si un décompte est réalisé dans le canal « formule » les agrégats de PLT ne sont pas détruits : ils sont inclus parmi les leucocytes et induisent un résultat faussement augmenté (les différences sont affichées ou un message de résultats discordants est proposé). Les amas de PLT ont des tailles différentes chez un patient donné et forment sur les histogrammes biparamétriques de la formule leucocytaire un nuage de points assez allongé (en fusée) partant souvent de l'origine du graphe. Outre un message d'alerte signalant ce phénomène, certains AHC peuvent quantifier ces agrégats et proposer une numération et une formule leucocytaires corrigées (Siemens). Par contre, quand l'AHC ne réalise pas la formule leucocytaire (ou que le programme formule a été débrayé) les messages d'erreur venant des histogrammes leucocytaires sont absents et il est nécessaire d'être plus attentif aux résultats de la numération des leucocytes et des PLT. Dans certaines circonstances, comme les syndromes myéloprolifératifs ou les syndromes myélodysplasiques il existe des PLT géantes, dont les plus grandes peuvent être comptées parmi les leucocytes. Des messages sont habituellement produits, issus de l'histogramme des volumes des PLT ou des histogrammes biparamétriques de la formule leucocytaire (voir aussi la partie des anomalies et erreurs des plaquettes) : les AHC discriminent peu PLT géantes et petits agrégats plaquettaires, et les messages d'alerte peuvent proposer les deux options, la conduite pratique étant superposable dans les deux cas. Tout comme pour les amas de PLT, ces PLT géantes sont détruites dans le canal de numération leucocytaire « basophiles » et la numération proposée dans ce canal est donc exacte. Quand on ne dispose pas de la technologie de double décompte dans deux canaux différents, il faut être prudent avec le nombre des leucocytes fourni par l'AHC, faire un compte avec un hématimètre, ou éventuellement essayer d'estimer les nombres respectifs de leucocytes et de PLT géantes sur le frottis en situation d'urgence (faible grossissement ; très subjectif) [91].

II-2-2 Erythroblastes

Présents de manière physiologique dans le sang périphérique des nouveau-nés ou découverts dans diverses circonstances pathologiques, leur nombre peut être ou devenir parfois très supérieur à celui des leucocytes. Lors de la dilution dans le canal « formule leucocytaire » les agents de lyse des GR agissent également sur les érythroblastes en détruisant leur membrane mais respectent leur noyau : les anomalies du décompte leucocytaire sont liées à la présence de ces noyaux d'érythroblastes. Leur taille (30 - 50 fl) superposable à celle des amas de PLT ou des PLT géantes explique qu'ils perturbent la numération des leucocytes de manière assez similaire à celles des amas de PLT et qu'ils génèrent souvent des messages signalant indifféremment l'existence de l'un ou/et l'autre de ces artefacts. Sur les histogrammes biparamétriques de formule leucocytaire les noyaux des érythroblastes sont visualisés dans une région assez proche de celle des amas de PLT (figure 48). Les AHC les plus élaborés signalent la présence d'érythroblastes et en proposent parfois un décompte, soit après réanalyse soit directement, le résultat étant soustrait de celui de la numération leucocytaire brute. Quand un AHC ne réalise pas de formule leucocytaire cinq paramètres, il faut bien comprendre si, quand et comment apparaît l'alarme « érythroblastes », créer un protocole de décompte sur frottis sanguin et réaliser manuellement la soustraction des érythroblastes du nombre brut des leucocytes [91].

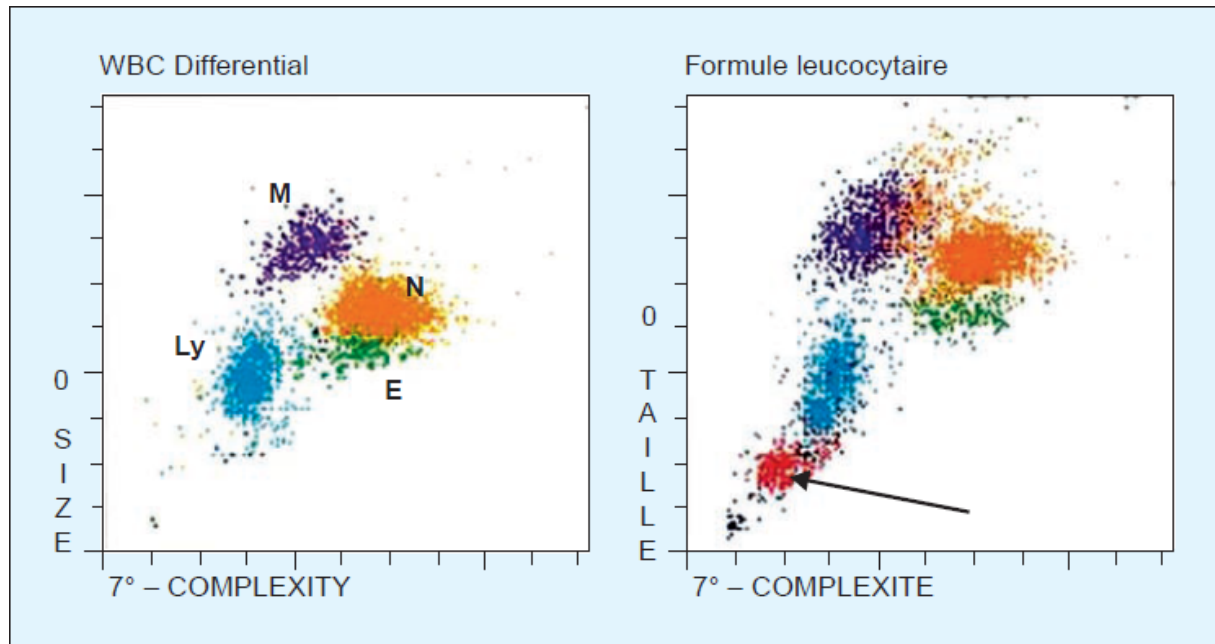


Figure 48 : Présence d'érythroblastes sanguins. Les automates qui réalisent la formule leucocytaire à cinq paramètres localisent les érythroblastes sous la forme d'un nuage de particules de petite taille et de structure interne faible. Ici, l'histogramme biparamétrique de droite présente un petit nuage supplémentaire de points (en rouge : flèche) par rapport à l'histogramme témoin de gauche [N = neutrophiles ; E = éosinophiles ; Ly = lymphocytes ; M= monocytes] : il s'agit d'érythroblastes, et l'analyse à d'autres angles de diffraction et en présence d'iodure de propidium permettent de les dénombrer et de les soustraire du décompte des leucocytes totaux (Cell-Dyn Sapphire, Abbott) [91].

II-2-3 Globules rouges résistant à la lyse

Certains GR peuvent ne pas être détruits par les agents de lyse chez les nouveau-nés, ou en pathologie au cours de maladies hépatiques, dans l'insuffisance rénale, au cours des chimiothérapies ou de certaines hémoglobinoses (homozygotes CC, ou hétérozygotes composées CS ou C_ thalassémie) [99]. Ces GR résistants à la lyse peuvent provoquer sur certains AHC une fausse augmentation de la numération leucocytaire. Dans le canal «

numération leucocytaire » l'agent de lyse détruit habituellement (mais pas toujours) les GR, et le décompte des leucocytes n'est que très inconstamment perturbé. Certains automates proposent un mode de lyse étendue qu'il suffit d'activer pour éliminer ce problème (Abbott). Par contre les GR ne sont pas détruits avec la lyse ménagée proposée dans le canal « formule », et ils apparaissent dans les histogrammes biparamétriques « formule leucocytaire » sous la forme d'un nuage de points, dans des régions qui varient selon les AHC (figure 49). L'aspect se rapproche parfois de celui observé en présence d'un grand nombre d'érythroblastes. L'incapacité ou la difficulté à réaliser une formule leucocytaire automatisée induit la génération d'un message d'alerte.

L'anomalie se traduit par une hyperleucocytose plus ou moins notable (jusqu'à plusieurs dizaines de G/l), difficile à appréhender en l'absence d'histogramme des leucocytes. La discordance entre les numérations leucocytaires obtenues sur le canal de « numération leucocytaire » (avec lyse forte) et sur le canal « formule », associée à une image particulière (amas de particules, de localisation variable selon les AHC) permet de préciser l'anomalie. Une appréciation sur lame de la richesse en leucocytes est possible (mais très subjective), et un décompte avec un hématimètre après dilution et lyse manuelle peut être envisagé. Une attention particulière doit être portée aux patients sous chimiothérapie car quelques GR résistant à l'hémolyse peuvent induire une fausse normalisation voire une augmentation de la numération leucocytaire alors qu'il existe en réalité une leucopénie : la comparaison avec les résultats antérieurs (Delta Check) et l'examen du frottis sanguin sont nécessaires dans de tels cas. Particulièrement quand on dispose d'un AHC qui ne réalise pas de formule leucocytaire automatisée, l'anomalie peut ne pas être détectée [91].

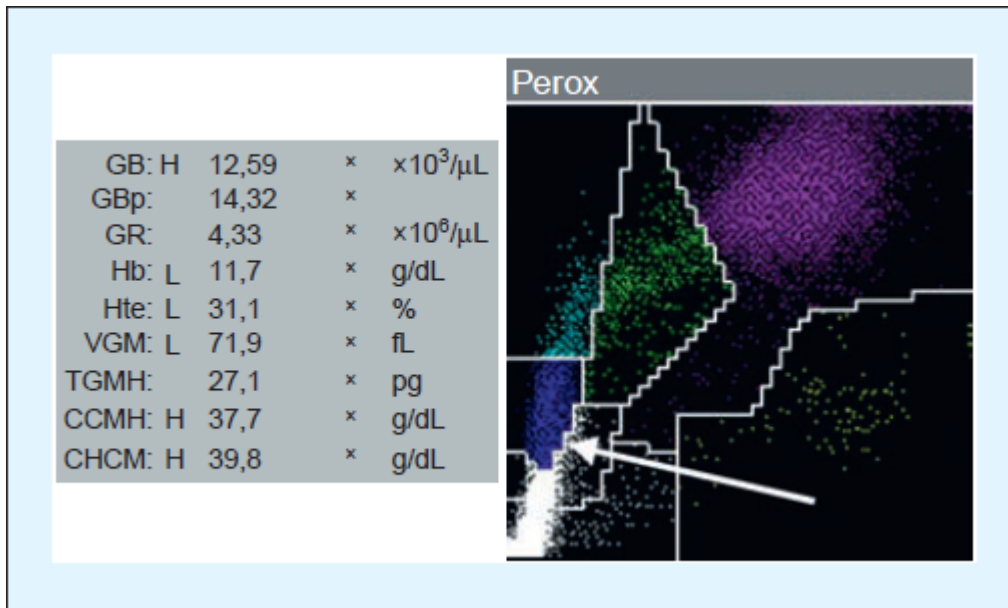


Figure 49: Présence de globules rouges (GR) résistant à la lyse au cours d'une hémoglobinosé C homozygote. On observe une différence entre le nombre de leucocytes du canal peroxydase « formule leucocytaire » (GB p) et sur le canal de numération leucocytaire « basophiles » (GB). L'histogramme Perox «formule leucocytaire » (à droite) visualise un nuage de particules de petite taille, partant de l'origine de l'histogramme (points blancs, en bas) chevauchant la partie basse de la fenêtre des lymphocytes (en bleu), ce qui surestime la numération leucocytaire de ce canal. On note par ailleurs une CCMH>36 g/dl, habituelle de cette hémoglobinosé (Siemen Advia 120) [91].

II-2-4 Cryoglobulines

La présence de cryoglobulines induit une fausse augmentation de la numération des leucocytes mais également de la numération des PLT, et plus rarement à une altération du nombre des GR ou de la mesure de l'hémoglobine. L'aspiration de l'échantillon de sang est insuffisante ou nulle quand la cryoglobuline a une action gélifiante, et les messages d'alerte sont en rapport (« aspiration insuffisante » ou message apparenté) : il convient de ne pas

confondre l'aspect du tube avec celui d'un prélèvement coagulé. La cryoglobuline peut précipiter en cristaux : ceux de taille réduite faussent la numération des PLT (partie de fausse augmentation des plaquettes), et ceux de taille plus élevée peuvent faussement augmenter la numération des leucocytes. Dans ce cas un nuage de particules est parfois visible sur l'histogramme de la formule leucocytaire, soit près de la région des lymphocytes ou au-dessus du seuil discriminant avec les PLT, soit au-dessus du nuage des neutrophiles, selon l'AHC utilisé.

Les anomalies disparaissent habituellement après incubation à 37 °C, sauf quand la quantité de cryoglobuline est très élevée. Les AHC qui utilisent des réactifs chauffés à 37 °C, même avec des réactifs à pH bas mentionnés comme évitant la précipitation des cryoglobulines, ne sont pas exempts d'anomalie quand la cryoglobuline est présente en grande quantité, et de faux décomptes peuvent alors être également observés (Siemens). Les cryopécipités sont parfois visibles sur des frottis colorés et dans presque tous les cas après examen du sang frais avec un microscope à contraste de phase (l'anomalie est plus évidente si l'analyse est réalisée à basse température). Divers aspects morphologiques des précipités ont été rapportés : amas de particules denses et amorphes ou en flaque, aspect de cristaux, ou de globules plus ou moins rosés, et souvent une déformation particulière des GR est visible (aspect « mangé aux mites » ; voir figure 41A de la partie des Pseudothrombocytoses).

La conduite pratique est l'incubation du tube de sang au bain-marie à 37 °C pendant une heure puis une réanalyse rapide. L'anomalie s'amplifie sur un aliquot de sang incubé à 4 °C et conforte l'hypothèse diagnostique. Parfois la disparition de l'anomalie est incomplète à 37 °C : un nouvel échantillon sanguin, prélevé et maintenu à 37 °C jusqu'à analyse, devient nécessaire pour obtenir des résultats exacts. La détermination de l'hémoglobine et de la numération des GR ont été parfois signalées comme anormales en présence de cryoglobuline [40, 43, 88, 91, 93, 94] (voir partie erreurs et anomalies de numération des plaquettes).

II-2-5 Filaments de fibrine, cryofibrinogène et apparentés

Des particules correspondant à du cryofibrinogène ou de la fibrine ont été rapportées comme pouvant augmenter la numération des PLT, parfois jusqu'à 2 fois la valeur réelle, et jusqu'à 16 fois la numération des leucocytes. Les messages d'alerte sont proches de ceux générés par la présence d'amas de PLT, et les perturbations de l'histogramme « formule » sont du même type. L'examen attentif des frottis sanguins montre de fines fibrilles, qui ont l'aspect de fibrine après étude en microscopie électronique. Ces fibrilles peuvent correspondre soit à du cryofibrinogène, bien que la recherche biochimique soit négative dans certains cas, soit à un mélange de cryoglobuline et de cryofibrinogène. Cependant l'analyse d'un nouvel échantillon sanguin EDTA de ces patients ne reproduit que rarement le phénomène, et fait penser qu'il s'agirait plutôt d'une polymérisation de fibrine, peut-être suite à une ponction veineuse un peu difficile, initiant la coagulation in vitro, avant contact du sang avec l'EDTA. Après chauffage des échantillons à 37 °C, l'anomalie de décompte est soit moins prononcée, soit disparaît totalement : un contrôle sur un nouveau prélèvement est cependant souhaitable [91].

II-2-6 Lipides

Les lipides peuvent former des gouttelettes de taille suffisamment grande pour perturber la numération des PLT et/ou celle des leucocytes. La discordance des résultats produits par les deux canaux de mesure des leucocytes (canal «basophiles » et canal « formule ») est souvent signalée, mais les deux résultats peuvent se situer encore au sein des valeurs normales : déterminer le résultat correct nécessite l'interprétation des histogrammes générés avec les canaux d'analyse correspondants (choisir le résultat du canal ne visualisant pas de nuage anormal). La présence d'un excès de lipides est en effet souvent bien visible sur les histogrammes leucocytaires, sous forme d'un nuage de points : ces nuages ont une forme variable selon les AHC, mais leur aspect est suffisamment particulier avec chaque type d'AHC pour évoquer d'emblée cette interférence. Les commentaires sur la perturbation de la mesure de l'hémoglobine en présence de lipides seront apportés dans la partie des perturbations de l'hémoglobine [40, 91].

II-2-7 Tissus adipeux

Une numération leucocytaire faussement augmentée par contamination avec du tissu adipeux sous-cutané a été rapportée dans le cas d'un prélèvement sanguin obtenu par une ponction à la veine fémorale : l'histogramme de la formule leucocytaire présentait également une image anormale [97].

II-2-8 Micro-organismes

Des bactéries ou des champignons peuvent être observés sur les frottis sanguins et, comme mentionné dans la partie des anomalies des PLQ de ce travail, ils peuvent provoquer une fausse augmentation de la numération des PLT. Des études in vitro au cours desquelles de grandes quantités de microorganismes ont été rajoutées aux échantillons sanguins ont montré qu'ils peuvent s'auto-agglutiner et provoquer alors une augmentation de la numération leucocytaire et des modifications de la formule leucocytaire automatisée. L'augmentation de la numération leucocytaire, avec histogrammes WBC anormale et présence des messages d'alerte peuvent être le signe de présence de bactéries, champignons ou de parasites (*plasmodium falciparum*), en particulier si les organismes infectieux sont agglutinés [98].

Concernant spécifiquement le paludisme, les GR, les PNN et les monocytes peuvent contenir de l'hémozoïne [47], et ce pigment dépolarise les faisceaux laser en entraînant des anomalies de la formule leucocytaire (voir plus loin) ; la numération leucocytaire n'est pas perturbée

II-2-9 Remplissage excessif des tubes sous vide

Le remplissage excessif des tubes peut induire la difficulté d'homogénéisation de l'échantillon, du fait de l'absence de bulle d'air ce qui provoque des numérations anormales et non reproductibles [64, 91].

II-3 Anomalies de la formule leucocytaire automatisée

Diverses situations qui perturbent les paramètres de la numération globulaire altèrent secondairement la détermination et/ou la qualité de la formule leucocytaire. Ces situations anormales, abordées dans ce travail, correspondent notamment aux amas de PLT, PLT géantes, érythroblastes, GR non lysés, ou particules diverses qui apparaissent sur les histogrammes leucocytaires sous la forme de nuages de points, pouvant se juxtaposer ou chevaucher les nuages leucocytaires habituels. Enfin la formule automatisée peut être perturbée par un problème d'identification des cellules normales (modifications de nature réactionnelle) ou par la présence de cellules anormales. Un histogramme leucocytaire anormal impose de toute manière une démarche de l'opérateur et dans la majorité des cas l'examen microscopique du frottis sanguin [91].

Les principales anomalies de la formule leucocytaire automatisée sont représentées dans le tableau X.

Tableau X : Principales anomalies de la formule leucocytaire automatisé [82]

	Causes d'anomalies de formule leucocytaire
Situations inhabituelles ou anormales perturbant la numération leucocytaire	Amas de plaquettes Plaquettes géantes (si nombre élevé) Agrégats de leucocytes (entre eux ou avec les plaquettes) Globules rouges mal lysés Présence de lipides
Présence de cellules anormales en faible nombre	Incluses parmi les leucocytes habituels (cellules de lymphome), ou non détectées car en nombre inférieur au seuil de détection de l'automate (leucopénies)
Érythroblastes	Influence variable selon les automates : les plus performants identifient, énumèrent et retirent les érythroblastes du décompte des leucocytes
Déficit en myéloperoxydase des leucocytes (Siemens)	Total ou partiel, constitutionnel ou acquis, il perturbe les capacités des automates (Siemens , Advia) à identifier les divers leucocytes : augmentation du nombre des lymphocytes, grandes cellules non colorées, ou des monocytes, selon les cas
Monocytes	Faible reproductibilité du décompte d'un automate à l'autre Difficulté d'identification au cours des états infectieux sévères Présence de cellules anormales de taille comparable (neutrophiles des chimiothérapies, leucémies aiguës, lymphomes, grands lymphocytes activés)
Granulocytes basophiles	Fausse augmentation possible en présence de cellules de lymphome, blastes, lymphocytes activés, plasmocytes, neutrophiles ou monocytes géants de myélodysplasies, sang conservé plus de 24 heures. Fausse diminution : basophiles inclus parmi les lymphocytes au cours de la leucémie myéloïde chronique
Éosinophiles	Difficultés d'identification : leucémies myéloïdes et myélodysplasies Paludisme avec présence d'hémozoïne dans les neutrophiles, les monocytes ou les globules rouges (schizontes matures)
Conservation des échantillons sanguins avant analyse	Modifications variables selon les automates et le type de cellule concerné : Neutrophiles : stabilité bonne jusqu'à 2-3 J à + 4 °C Lymphocytes : diminution de 2 à 7 % après 2 J à +4°C Monocytes : variations fortes à la baisse ou à la hausse (- 12 – 25 % pour Sysmex XE et Beckman LH, + 30 % pour Siemens Advia après 1 J à + 4°C)

II-3-1 Problème particulier des érythroblastes

Il constituait un piège de la numération leucocytaire sur les premières générations d'AHC, et interfère encore maintenant sur les AHC d'entrée de gamme en provoquant une surestimation du nombre des leucocytes (voir précédemment). La formule leucocytaire est alors perturbée, et la localisation habituelle des noyaux d'érythroblastes près ou au niveau du nuage des lymphocytes entraîne une surestimation du nombre de ces derniers. Les AHC les plus élaborés signalent l'existence des érythroblastes et peuvent les compter, soit dès le premier passage de l'échantillon (Siemens, Abbott, Beckman) soit secondairement (Horiba, Sysmex), le résultat de la numération leucocytaire étant ensuite directement corrigé [91].

II-3-2 Déficit en peroxydase des leucocytes

Il perturbe la formule automatisée déterminée par méthode cytochimique (Siemens) et sous-estime soit le nombre des neutrophiles (déficit en myéloperoxydase), soit des éosinophiles (déficit en éosinoperoxydase), soit des monocytes (déficit en peroxydase monocyttaire). Dans ces situations les populations concernées sont délocalisées par rapport à la situation normale : outre leur nombre sous estimé elles perturbent l'analyse et la quantification des autres leucocytes. Des messages d'alerte adaptés sont proposés et l'aspect particulier de l'histogramme « formule leucocytaire » permet d'évoquer le déficit (figure 50) [91].

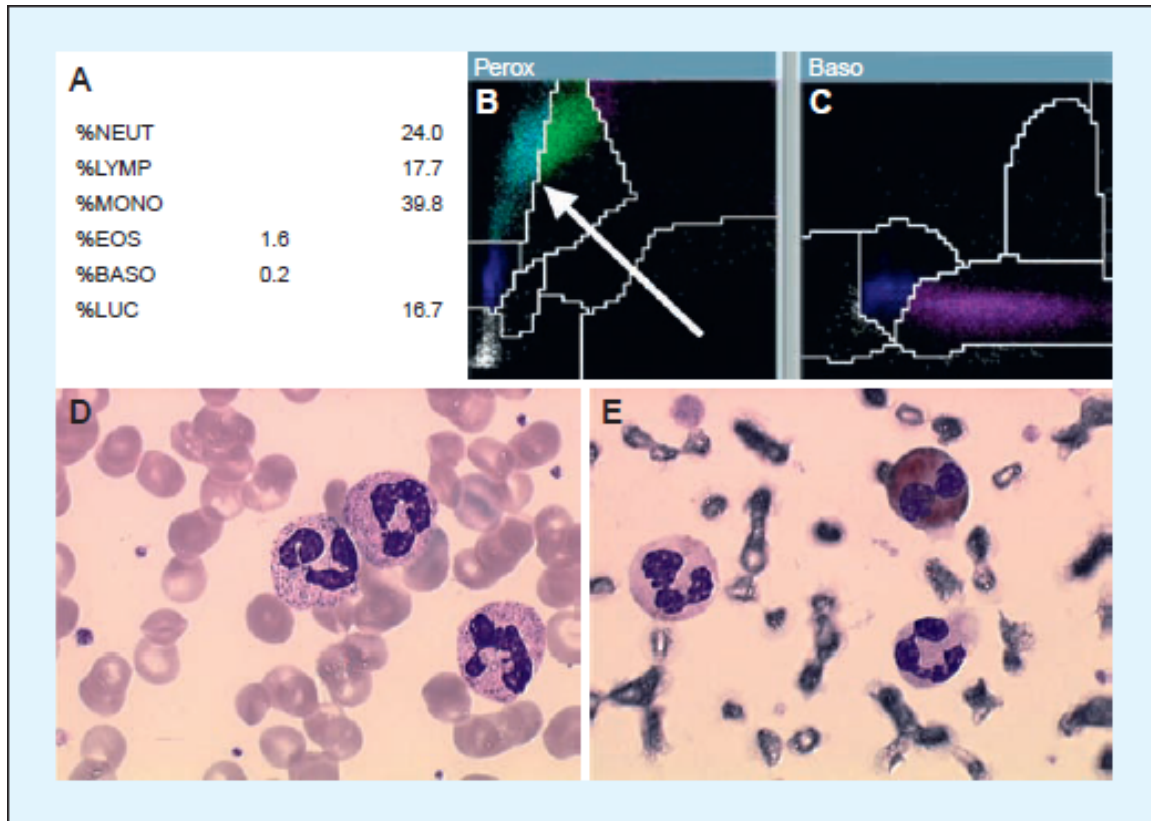


Figure 50 : Déficit partiel en myéloperoxydase (découvert de manière fortuite chez une femme jeune en consultation de fin de grossesse). La formule leucocytaire (A) montre un % faible de neutrophiles et élevé de monocytes et de grandes cellules non classées (LUC) ($N < 2\%$). L'histogramme biparamétrique Perox (B) montre un nuage des neutrophiles dévié vers la gauche, positionné sur la fenêtre des monocytes (vert) et des LUC (bleu turquoise), alors que l'histogramme du canal « basophiles » Baso, (C) montre un nombre normal de cellules polylobées. Ceci génère une alarme. L'étude du frottis sanguin coloré au MGG montre une formule de répartition normale (71 % de neutrophiles et 7 % de monocytes), sans anomalie morphologique des neutrophiles (D), alors que la cytochimie de la myéloperoxydase (E) confirme le déficit en peroxydase dans une partie des neutrophiles (Siemens Advia 120) [91].

II-3-3 Nombre absolu de monocytes

Les performances des AHC concernant la numération des monocytes sont loin d'être parfaites et acceptables : la reproductibilité d'un AHC à l'autre est faible, avec des écarts de résultats variant de 13 à 59 % selon les séries de la littérature [91]. Outre le déficit en peroxydase monocyttaire et la présence de cellules anormales localisées près du nuage monocyttaire (blastés, granulocytes dysplasiques, lymphocytes activés, plasmocytes de myélome), l'activation des monocytes au cours des états infectieux sévères peut rendre leur identification plus malaisée par l'AHC ; cette modification a été mise à profit par certains pour aider à la détection du paludisme (Beckman) (figure 51) [100]. De plus le décompte des monocytes s'altère rapidement dans le temps, avec une augmentation ou une diminution dès 6-10 heures après le prélèvement, indépendamment de la température de conservation [91]

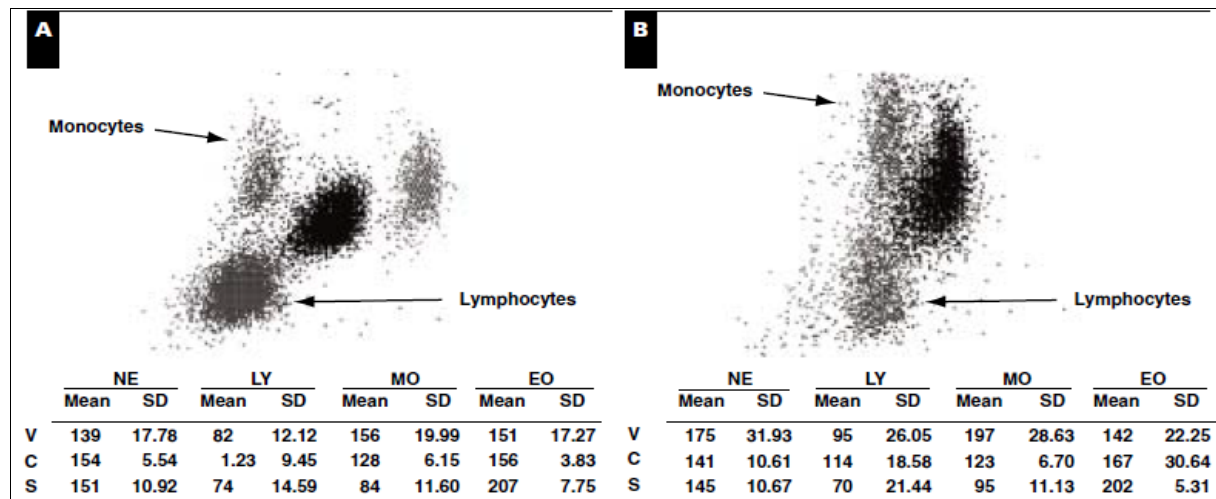


Figure 51: (A) Normal VCS (volume, conductivity, and scatter) histogramme et l'autre d'un patient présentant l'infection avec le plasmodium falciparum de 3,6% (B) démontrant l'hétérogénéité de volume (anisocytose) des lymphocytes et des monocytes. C'est dû à la présence de grandes cellules activées de la lignée monocyttaire ou de monocyte avec des changements histiocytaires [100].

II-3-4 Nombre des polynucléaires basophiles

La numération des polynucléaires basophiles est la population la plus difficile à compter, elle est globalement imparfaite comme pour les monocytes : les AHC sous-estiment leur nombre quand il est augmenté, et de plus un nombre élevé de basophiles doit être interprété avec prudence [101, 102].

Les granulocytes basophiles sont souvent identifiés et comptés séparément des quatre autres leucocytes de la formule sur un canal dédié : toute cellule ou tout élément qui, comme les basophiles, résiste aux modifications chimiques induites par les réactifs est susceptible d'en perturber le décompte par interférence. Selon les AHC, diverses cellules ont été rapportées comme pouvant entraîner une « pseudobasophilie » : lymphocytes de patients positifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), blastes de divers types de leucémies aiguës (myéloblastes, promyélocytes), granulocytes ou monocytes anormaux au cours des syndromes myélodysplasiques, cellules de lymphomes (figure 52) ou de myélome, parfois érythroblastes ou amas de PLT [102, 103]. Même s'ils ne perturbent pas toujours le décompte des basophiles, les érythroblastes et les amas de PLT peuvent se localiser sur les histogrammes « formule » à proximité du nuage des basophiles (Sysmex) et conduisent à s'interroger sur la dissociation entre un faible nombre de basophiles lors du décompte et un nuage apparemment important sur l'histogramme leucocytaire. Par ailleurs une petite augmentation du nombre de basophiles s'associe à l'analyse d'un échantillon conservé au-delà de 24 heures [91].

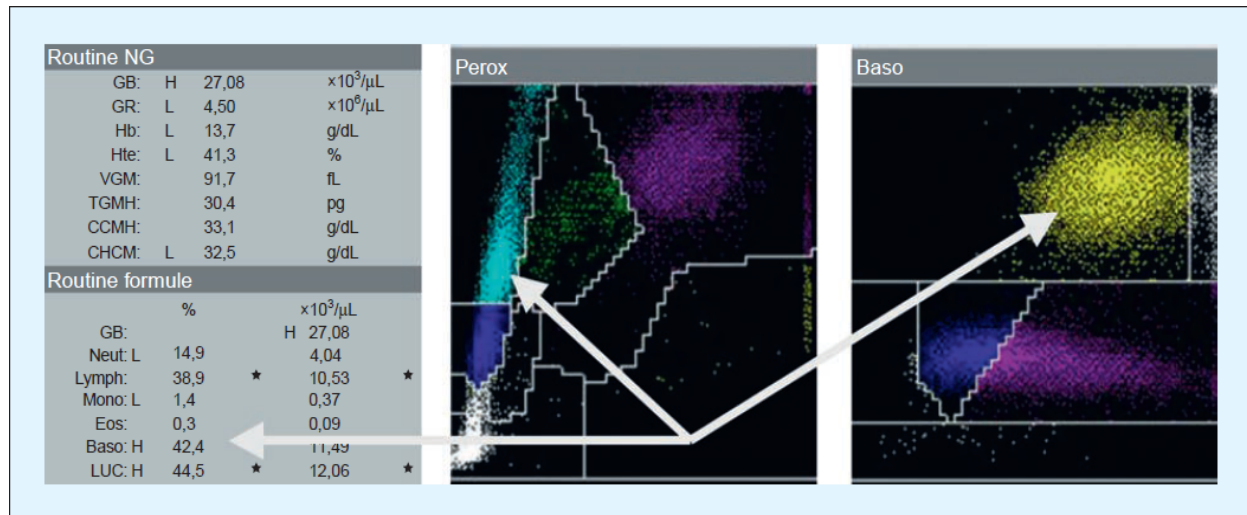


Figure 52: Excès erroné de granulocytes basophiles au cours d'un lymphome de la zone manteau en dissémination sanguine. L'hémogramme chiffré (à gauche) signale une hyperleucocytose (GB = 27.08 G/l) avec excès de Lymphocytes de grandes cellules non colorées (LUC) et de granulocytes basophiles (Baso). L'histogramme « formule leucocytaire » au centre (Perox) montre un nuage continu de points qui chevauche les zones « lymphocytes » en bleu et « LUC » en bleu turquoise. L'histogramme du « canal basophiles » (à droite) montre un nuage de points jaunes très important (basophiles ?). De tels histogrammes imposent la réalisation d'un frottis sanguin, montrant 94 % de cellules de lymphome, sans excès de granulocytes basophiles (Siemens Advia 120) [91].

II-3-5 Anomalies de la numération des éosinophiles

Outre le déficit en éosinoperoxydase qui sous-estime leur nombre (ci-dessus), des difficultés à identifier précisément les éosinophiles dans des syndromes myélodysplasiques et certaines leucémies aiguës myéloïdes ont été rapportées. Au cours du paludisme les granulocytes neutrophiles et les monocytes peuvent phagocyter du pigment malarien (hémozoïne), dont les propriétés dépolarisantes de la lumière et des faisceaux laser sont comparables à celles des granulations éosinophiles. Les leucocytes qui en contiennent sont délocalisés de leur région normale et redistribués dans une région proche de celle des éosinophiles (Abbott). Cette particularité permet de prédire avec une forte sensibilité et une forte spécificité l'existence d'une infestation paludéenne : des alarmes particulières sont générées sur certains automates récents (Abbott). Les GR parasités peuvent résister à la lyse sur le canal formule et former un nuage de points proche de celui des éosinophiles, pouvant ressembler à un dédoublement de la population éosinophile ou neutrophile (Abbott, Sysmex) (figure 53). Cette anomalie ne perturbe pas le décompte dans le canal de numération leucocytaire. Une conservation au-delà de 24 heures peut diminuer le nombre des éosinophiles (Horiba Argos 5 diff) [91, 104].

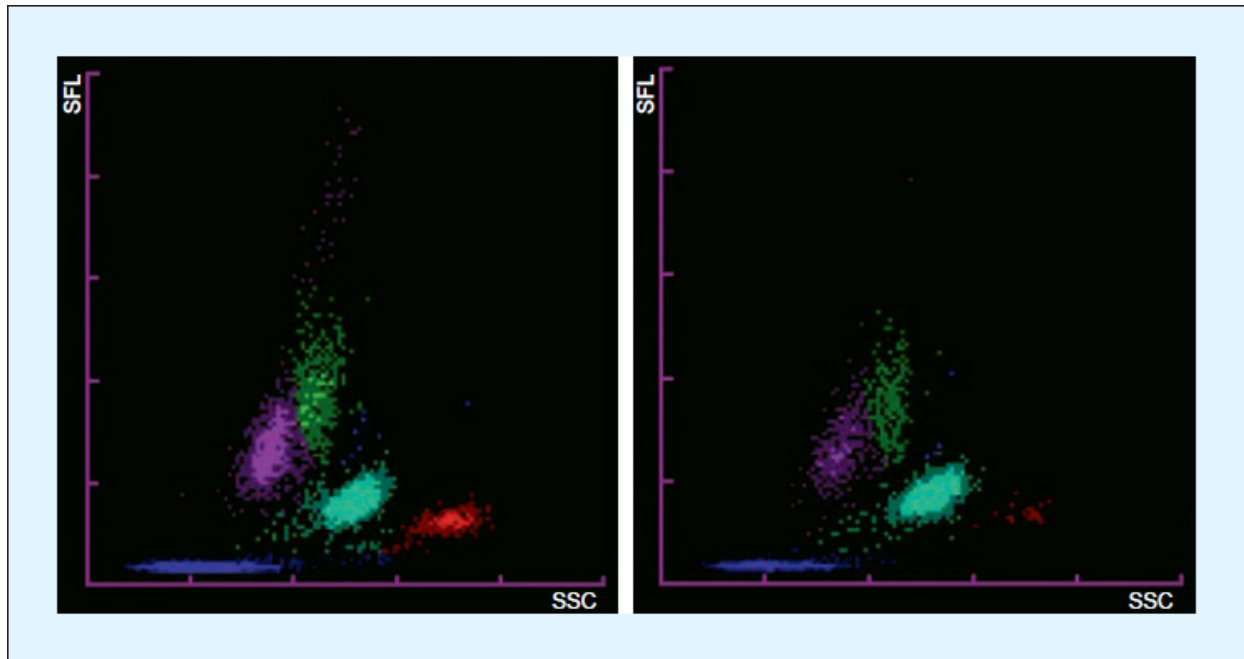


Figure 53 : Altération de la formule leucocytaire au cours du paludisme (*P.vivax*). La présence de granulocytes, ou de monocytes, ou d'hématies contenant de l'hémozoïne provoque une anomalie de polarisation de la lumière, superposable à celle des granulations des éosinophiles : les éléments riches en hémozoïne se localisent donc dans la même région que les éosinophiles et sont comptés comme tels par l'automate (nuage en rouge sur l'image de gauche). L'examen du frottis sanguin ne montre aucun éosinophile. L'image de droite est celle du patient après deux jours de traitement : la pseudo-éosinophilie a disparu (Sysmex XE 2100) [91].

II-3-6 Conservation des échantillons sanguins

Elle influe de manière variable sur les résultats de la formule automatisée. Les effets du retard à l'analyse sur les résultats de la formule automatisée débutent en pratique après 24 heures sur échantillons conservés à température ordinaire ou à 4 °C, mais sont variables d'un AHC à l'autre et d'une firme à l'autre [105, 106]. Par exemple les améliorations technologiques permettent que des modifications quantitatives des lymphocytes, des monocytes et des éosinophiles observés après 6-8 heures de stockage en utilisant les AHC Beckman STKS ne s'observent qu'après 1-2 jours sur les AHC Beckman GenS. Une diminution du nombre de neutrophiles avec augmentation correspondante du nombre de monocytes a été rapportée pour divers AHC quand l'analyse est réalisée au-delà de 24 heures (Sysmex NE 1500 et NE 8000, Beckman-Coulter STKS). De même, après 24 heures de conservation, une augmentation du nombre des lymphocytes est observable sur certains AHC, isolée ou associée à une petite diminution du nombre des neutrophiles et monocytes (Abbott CD3500, Horiba Argos 5 diff) [91].

Cependant il a été rapporté récemment que le nombre des monocytes pouvait diminuer de 25% après 1 à 2 j à température ordinaire comme à +4 °C (Sysmex XE2100 ; Beckman LH 750), alors que les mêmes échantillons voyaient leur nombre de monocytes augmenter de 30 % après 12 heures dans les mêmes conditions de conservation avec d'autres AHC (Siemens Advia 120) [106].

III-PERTURBATION DE LA MESURE DE L'HEMOGLOBINE

La concentration en Hb du sang est mesurée après dilution et lyse des GR (hypotonie, pH bas, addition d'agents accélérant la lyse), et en présence de détergents non ioniques qui diminuent la turbidité liée aux membranes cellulaires et aux lipides plasmatiques. La mesure est spectrophotométrique, utilisant soit une modification de la technique à la cyanmethémoglobine soit divers agents dépourvus de cyanure tels que le laurylsulfate de sodium ou l'imidazole. Les AHC analysant les GR par une technique de diffraction optique mesurent également directement la quantité (ou la concentration) en Hb de chaque GR : divers indices sont alors proposés, tels que la concentration hémoglobinique corpusculaire moyenne (CHCM), superposable chez le sujet sain de la CCMH calculée (Siemens, Abbott), ou la teneur individuelle en hémoglobine des GR (Sysmex) [107].

Les principales situations perturbant la mesure de l'hémoglobine sont reprises dans le tableau XI.

Tableau XI: Les principales situations perturbant la mesure de l'hémoglobine

Fausse augmentation	Fausse diminution
Lipides Grandes hyperleucocytoses Immunoglobulines (et cryoglobulines) Hémolyse in vitro Carboxyhémoglobine (forte quantité) Bilirubine (>250-300 mg/L)	Circonstances préanalytiques liées à l'échantillon : coagulation, remplissage excessif du tube Ponction à proximité d'une perfusion Sulfhémoglobine

III-1 Situations conduisant à une erreur de détermination de l'hémoglobine totale

III-1-1 Lipides et l'hyperchylomicronémie

L'hyperlipémie peut induire, outre une numération erronée des PLT et des leucocytes, une turbidité excessive dans les cuves de lecture de l'Hb. Ce phénomène s'observe principalement avec des échantillons de sang prélevés après un repas riche en lipides, et parfois chez des patients présentant une hypertriglycémie sévère constitutionnelle ou acquise, ou qui reçoivent des perfusions intraveineuses d'émulsions lipidiques [107-109].

Parmi les diverses hyperlipémies, des erreurs sont observées chez les patients ayant au moins 20 g/l de triglycérides (hyperlipoprotéïnémies de type I et une partie des types V).

Tous les AHC, même les plus récents, sont sensibles à l'hyperlipémie, bien qu'à des degrés variables. Par exemple, les AHC Cell Dyn 4000 et Sapphire (Abbott) proposent des valeurs vraies de l'Hb jusqu'à des concentrations sériques de 13 g/l de triglycérides et 9 g/l de cholestérol, et deviennent progressivement sensibles à l'hyperlipémie au-delà. On suspecte ce type d'interférence quand la CCMH est >36 g/dl, et/ou quand il existe une image anormale sur l'histogramme biparamétrique de la formule leucocytaire : les particules lipidiques peuvent en effet apparaître sous forme d'un nuage de points, revêtant des aspects variables selon les AHC (figure 54). Les AHC qui utilisent la méthode de mesure par diffraction optique proposent souvent une mesure de l'Hb intraérythrocytaire (CHCM), qui permet d'obtenir par calcul la

valeur de l'Hb sanguine (Siemens Advia, Sysmex). Sinon, différentes méthodes ont été proposées pour retrouver la valeur approximative de l'Hb de l'échantillon, mais sont à éviter : remplacement isovolumétrique, du plasma par un diluant iso-osmotique ou extraction à l'éther des lipides. Un calcul approximatif de la valeur de l'Hb à partir de la valeur de l'Ht centrifugé est utilisable en situation d'urgence (3 unités d'Ht correspondent approximativement à 1 g/dl d'Hb). Bien qu'un excès de lipides soit surtout rapporté comme augmentant faussement la valeur de l'Hb, une valeur anormalement diminuée a été rapportée dans un cas [107].

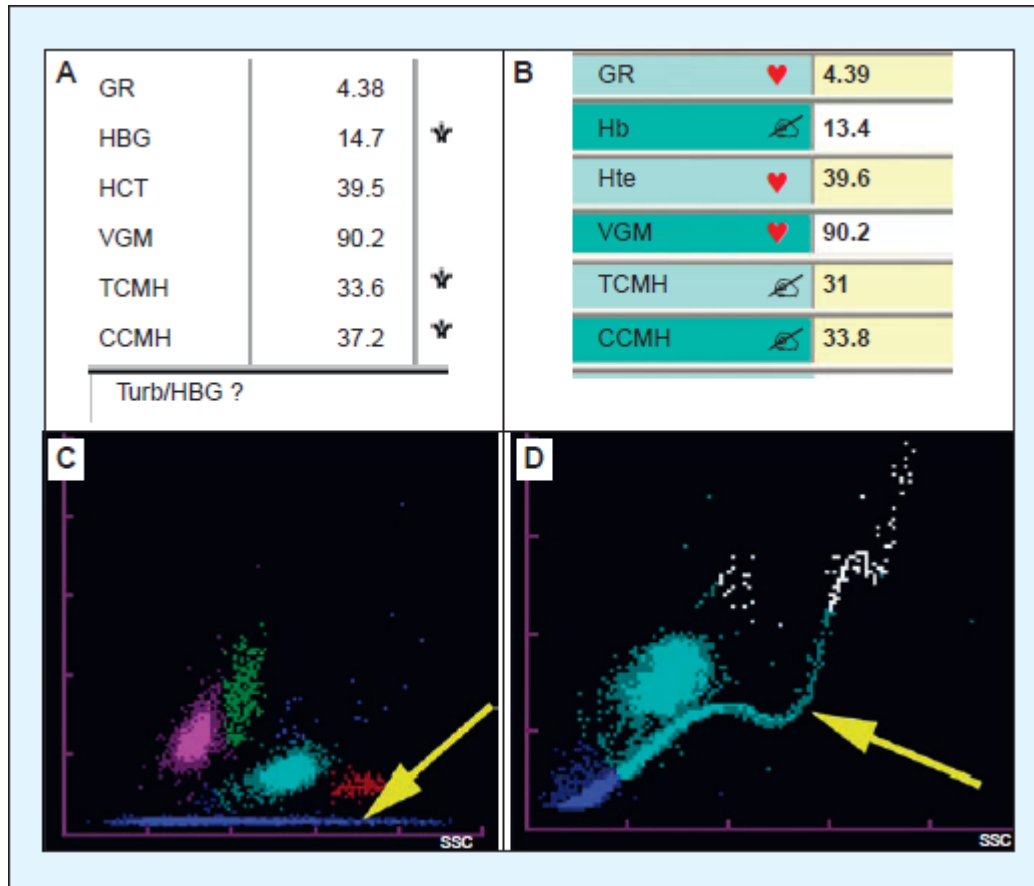


Figure 54: Interférence des lipides sur la mesure de l'hémoglobine. Les résultats initiaux de cette numération globulaire montrent une CCMH>36 g/dl et un message signale la possible perturbation de la mesure de l'hémoglobine (A) ; sur l'histogramme « formule leucocytaire » un amas de particules de taille réduite apparaît (C, flèche), alors que l'histogramme « numération des leucocytes » montre un nuage de points dont la silhouette particulière évoque la présence d'un excès de lipides (D, flèche)). La quantité d'hémoglobine de chaque GR déterminée par méthode optique en utilisant le canal « réticulocytes » permet d'obtenir l'hémoglobine réelle et de recalculer les indices érythrocytaires (B) (Sysmex XE 2100) [107].

III-1-2 Grandes hyperleucocytoses

Un nombre élevé de leucocytes insuffisamment détruits par les agents d'hémolyse et les détergents peut provoquer une turbidité excessive dans la cuve de mesure de l'Hb et en perturber la mesure : il n'y a pas de seuil clairement défini, mais en pratique il faut être prudent quand l'hyperleucocytose dépasse 50 à 100 G/l [109]. Certains AHC définissent un seuil à 250 G/l, alors que d'autres sont insensibles à l'hyperleucocytose du fait de l'addition d'un mélange particulier d'agents lytiques et de détergents avant la mesure de l'Hb (Sysmex). Il n'y a pas d'alarme spécifique, quoique certains AHC signalent la possibilité d'une turbidité excessive dans la cuve d'Hb, et c'est surtout l'existence d'une CCMH anormalement haute dans un contexte d'hyperleucocytose qui doit faire évoquer l'anomalie. La CHCM proposée par les AHC utilisant la diffraction optique permet d'obtenir la vraie valeur de l'Hb. La dilution du prélèvement sanguin permet parfois de minimiser l'interférence, mais doit être utilisée avec précautions ; les méthodes de déleucocytation par centrifugation ménagée et échange de plasma riche en leucocytes avec du diluant sont sujettes à des erreurs ultérieures sur la mesure des autres paramètres de l'hémogramme. La numération des GR peut également être perturbée au cours des grandes hyperleucocytoses (voir plus loin), rendant les indices érythrocytaires calculés suspects : la mesure de l'Ht par centrifugation puis une approximation constitue l'alternative dans les cas extrêmes [107].

III-1-3 Immunoglobulines et Cryoglobulines

L'excès d'immunoglobulines (Ig) interfère dans la détermination de divers examens biologiques. Une fausse augmentation de l'Hb a été décrite chez des patients présentant une macroglobulinémie de Waldenström avec IgM et dans le myélome multiple avec IgA ou IgG. Les Ig en quantité élevée interagissent avec les réactifs de la solution de lyse : pour les IgM ce phénomène est clairement relié à une quantité élevée de forme monomère dans le sang circulant [110-113].

Les AHC utilisant la technique à la cyanmethémoglobine semblent être plus fréquemment affectés, sans doute parce que les méthodes sans cyanure surajoutent divers surfactants.

Ici, la CCMH est habituellement supérieure à 36 g/dl par une surestimation de l'Hb, alors que l'Ht de l'AHC n'est pas perturbé. Afin d'obtenir des résultats plus exacts, il a été proposé de déterminer « l'Hb plasmatique » après centrifugation de l'échantillon, qui donne la turbidité liée à la paraprotéine, puis de retirer ce résultat de l'Hb mesurée à partir du sang. Pour certains AHC (Sysmex), il semble que ce phénomène ne survienne plus si l'échantillon est dilué de moitié par le technicien avant analyse total [110]. Pour les AHC proposant une CHCM mesurée (technique de diffraction optique), la discordance avec la CCMH calculée génère une alarme : la valeur vraie de l'Hb peut être obtenue à partir de la CHCM (Siemens, Sysmex) [107].

Une fausse augmentation de l'Hb liée à la présence de cryoglobulines est une situation rare, qui a été rapportée dans quelques cas, correspondant soit à un mécanisme similaire à celui de la présence de grandes quantités d'Ig [91] soit à la perturbation de la transmission lumineuse [94]. Dans d'autres cas ce sont des

anomalies de flux liées à l'hyperviscosité au sein de l'AHC (gélification partielle de l'échantillon produisant un aspect proche de celui d'un sang coagulé) qui provoquent une diminution à la fois de l'Hb et de la numération des GR [94].

III-1-4 Hémolyse

En conditions normales la quantité d'Hb libre plasmatique est négligeable et ne provoque aucune interférence de dosage. Cependant, dans les hémolyses intravasculaires majeures liées à des toxiques, en rapport avec des valves cardiaques ou post-transfusionnelles, l'Hb libre plasmatique peut être suffisamment élevée pour perturber la mesure de l'Hb totale, entraînant parfois une CCMH>36 g/dl. Les AHC qui déterminent la CHCM (diffraction optique) permettent d'obtenir la vraie valeur de l'Hb (Siemens, Sysmex). Dans les grandes hémolyses il faut en outre réaliser l'analyse rapidement après le prélèvement, car celle-ci peut se poursuivre in vitro, entraînant une appréciation faussée de l'Hb libre plasmatique mais aussi une fausse diminution du nombre des GR et de l'Hb [107].

III-1-5 Structure chimique de l'hémoglobine et la bilirubine

En situation normale, l'Hb est soit couplée à l'oxygène, soit au dioxyde de carbone, et les pics optimaux d'absorption lumineuse de l'Hb diffèrent légèrement : l'utilisation de divers réactifs (ferricyanure, laurylsulfate), qui transforment toutes les formes de couplage de l'Hb en une molécule unique de pic d'absorption lumineuse étroit, permet d'obtenir une valeur très exacte de l'Hb sanguine. Cependant, quand il existe une forte quantité de monoxyde de carbone, le complexe Hb-monoxyde de carbone se transforme plus lentement

sous l'influence des réactifs, ce qui peut induire une fausse augmentation de la valeur de l'Hb. À l'opposé, la sulfhémoglobine en grande quantité a été rapportée comme diminuant la valeur de l'Hb. En pratique, de telles anomalies ne s'observent qu'au cours de situations extrêmes d'intoxication au monoxyde de carbone ou d'anémies hémolytiques toxiques. Concernant la bilirubine, bien qu'il faille par principe être prudent quand il en existe de grandes quantités dans le plasma, on n'observe pas d'interférence sur la plupart des AHC, au moins pour des concentrations allant jusqu'à 400 $\mu\text{mol/l}$ [107].

IV-PERTURBATION DE LA NUMERATION DES GR ET DES PARAMETRES ERYTHROCYTAIRES

Les AHC déterminent simultanément, à partir d'un même canal, le nombre des GR, le VGM et la numération des PLT. L'Ht est soit calculé à partir du produit du nombre des GR par le VGM, soit mesuré à partir de la somme des volumes individuels des GR qui traversent l'orifice en un temps donné.

Les indices érythrocytaires, utiles à la démarche diagnostique des anémies, doivent également être considérés comme les premiers messages d'alerte pour détecter une erreur de détermination du nombre des GR, du VGM et/ou de l'hémoglobine (Hb). Notamment, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) est calculée à partir de trois paramètres mesurés, et une anomalie de mesure de l'un d'entre eux va générer une CCMH anormale : cet indice doit donc être particulièrement surveillé avant la validation technique de l'hémogramme, des valeurs trop hautes ou trop basses pouvant être le signe d'une anomalie de mesure autant que d'une pathologie précise [107].

Les principales situations perturbant la mesure des GR sont reprises dans le tableau XII.

Tableau XII : Les principales situations perturbant la mesure des globules rouges

Fausse augmentation	Fausse diminution
Grandes hyperleucocytoses Plaquettes géantes (anecdotique)	Agglutinines froides Agglutinines chaudes (quelques cas) Microcytes, schizocytes Cryoglobulines : si aspiration insuffisante Hémolyse in vitro Coagulation dans l'échantillon de sang

IV-1 Numération des GR faussement augmentée

IV-1-1 Grandes hyperleucocytoses

Quand les AHC énumèrent les GR par impédancemétrie, le décompte réalisé dans le canal « GR et PLT » inclut en réalité les GR et une partie des leucocytes. En situation physiologique la surestimation de la numération des GR ne dépasse pas 0,1 % (en considérant un nombre de leucocytes de 5 G/l et un nombre de GR de 5 T/l). Cependant, de grandes hyperleucocytoses (>100 G/l) peuvent induire une modification significative de la numération érythrocytaire, particulièrement si le patient est anémique [107].

Selon les AHC, la plage de mesure des GR varie (40 à 250 fl ou 36 à 360 fl), et les leucocytes seront inclus ou non dans le nombre des GR en fonction de leur volume. Ceci est particulièrement vrai dans la leucémie lymphoïde chronique ou dans la phase de dissémination des lymphomes à petites cellules, car les cellules anormales ont un volume faible (150-200 fl). L'histogramme des volumes des GR montre la présence d'une seconde population cellulaire, de plus grand volume (figure 55). Le VGM rendu est plus ou moins faussé car il correspond à la moyenne des volumes des GR et des leucocytes. Cette erreur de numération des GR est observée également avec la technique par diffraction optique, mais plus ou moins nettement selon les AHC. Quand l'hyperleucocytose dépasse 100 G/l, l'alarme ou l'aspect particulier de l'histogramme des GR (évocateur d'une « double population de GR ») aident à repérer l'anomalie. La CCMH est parfois anormale, mais soit augmentée soit diminuée selon l'importance des perturbations respectives du nombre des GR et de la mesure du VGM. Il faut prendre en compte que la valeur de l'Hb est aussi parfois faussée par l'hyperleucocytose. En pratique, quand la CCMH et le VGM

se situent encore dans les zones de normalité et que l'histogramme des GR est normal, il n'est pas utile de réaliser de calculs correctifs. Si une deuxième population cellulaire est présente sur l'histogramme des volumes des GR, et que la CCMH est $< 31-32$ g/dl, on peut alors calculer le nombre réel de GR en lui retirant celui du nombre des leucocytes. Il faudra ensuite recalculer l'Ht et vérifier que la CCMH retrouve des valeurs proches de la normale pour valider les nouveaux résultats. Mais le VGM peut être également faussé, ce qui limite la portée des calculs correctifs. Utiliser le résultat de l'Ht obtenu après centrifugation permet de déterminer au moins approximativement quelles corrections apporter. Le VGM peut être apprécié à la valeur modale du pic majoritaire de l'histogramme des volumes érythrocytaires. Certains AHC proposent le volume moyen de chaque pic cellulaire en cas de « double population » clairement identifiée sur l'histogramme des GR, ce qui permet de corriger le VGM (Sysmex). Enfin, quand cela est possible, il ne faut pas oublier de vérifier l'Hb à partir de la mesure directe dans les GR, comme le proposent les AHC utilisant la diffraction optique [107, 115].

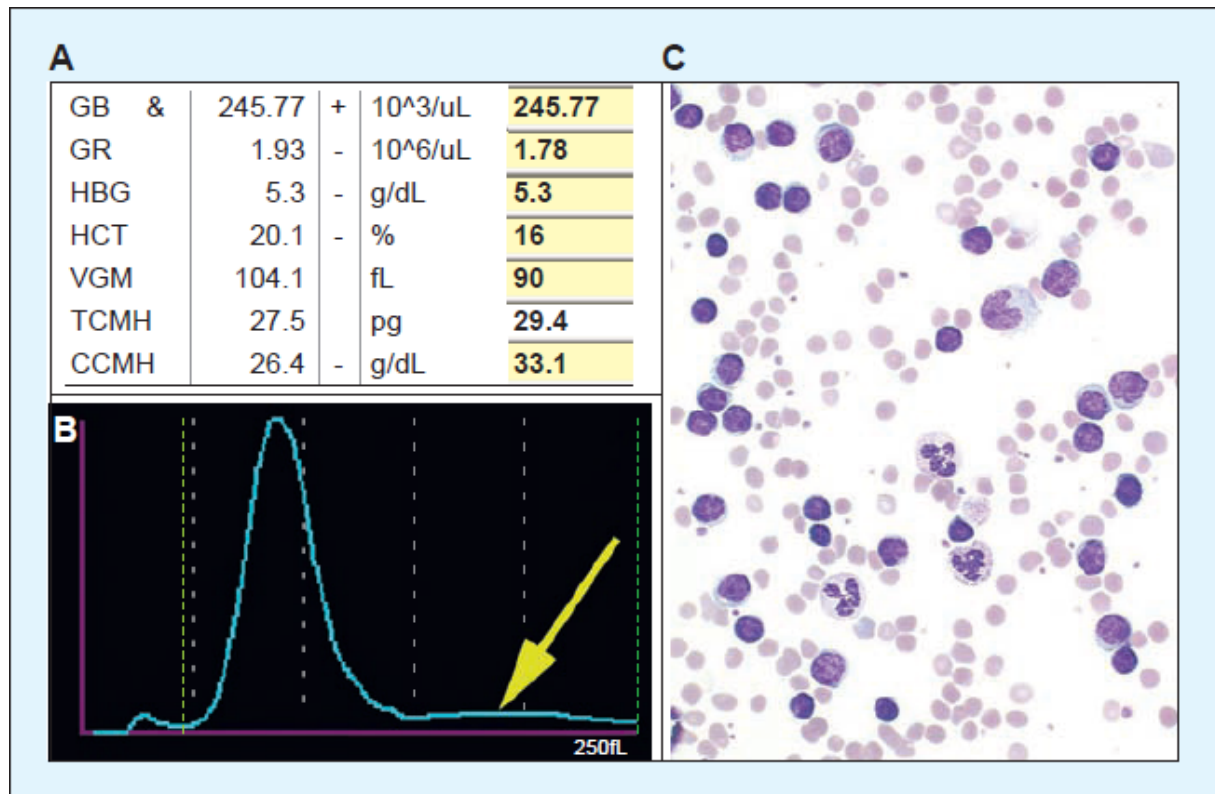


Figure 55 : Image de double population cellulaire sur l'histogramme volumétrique des GR. La numération globulaire (A, à gauche) montre une hyperleucocytose franche avec anémie sévère, macrocytaire et hypochrome. L'histogramme des volumes des GR montre de gauche à droite le petit pic lié aux plaquettes, le pic majoritaire correspondant aux GR et un pic anormal (B, flèche). L'hyperleucocytose correspond à une leucémie lymphoïde chronique (C). L'automate utilisé ici (Sysmex XE 2100) fournit une valeur de l'hémoglobine non perturbée par l'hyperleucocytose et donne la valeur du mode du pic de GR majoritaire (= 90 fl). Avec l'aide de l'hématocrite centrifugé (= 16 %) il a été possible de rectifier les résultats de la numération des GR et les indices érythrocytaires (A, à droite). On remarque qu'une bonne partie des leucocytes a été initialement incluse dans le décompte des GR [107].

IV-1-2 Plaquettes géantes

Des PLT géantes peuvent présenter un volume supérieur à celui du seuil discriminant PLT-GR, ne pas être incluses dans la numération des PLT et être alors énumérées parmi les GR. Dans cette situation, la perturbation de la numération des GR reste très modérée et en pratique elle est négligée [40, 107].

IV-2 Numération des GR faussement diminuée

IV-2-1 Agglutinines froides

Les agglutinines froides agrègent les GR entre eux quand la température est inférieure à 37 °C (figure 56A) : de ce fait, des anomalies de détermination des paramètres érythrocytaires sont presque constantes avec les AHC fonctionnant à température du laboratoire. Les petits agglutinats de deux ou trois GR sont analysés dans le canal « érythrocytes » et énumérés comme une seule particule. Les agglutinats érythrocytaires plus volumineux sont négligés par les AHC, au-delà du seuil maximum de mesure (250 à 360 fl selon les AHC). La numération des GR est ainsi sous-estimée et le VGM surestimé. L'Ht, qu'il soit calculé (nombre de GR x VGM) ou mesuré, est également sous-estimé. En revanche l'Hb, mesurée après lyse des GR, n'est pas affectée par la présence d'agglutinines : la CCMH calculée est élevée, dépassant parfois 150 g/dl quand l'Ht est très effondré.

L'association particulière d'une numération des GR basse, avec un VGM élevé et une CCMH > 36 g/dl est quasi pathognomonique de l'interférence liée à une agglutinine froide, et il n'est pas rare que ce type de perturbation soit à l'origine de la découverte de cette agglutinine. Les AHC qui utilisent des

réactifs à température proche de 37 °C sont moins sensibles à ce phénomène, mais quand le titre de l'agglutinine est élevé des modifications de la numération globulaire apparaissent cependant, provoquant une augmentation discrète du VGM, difficile à détecter car la CCMH demeure à la limite supérieure des valeurs normales. En revanche, même en cas de titre très élevé d'agglutinine, la CHCM mesurée par diffraction optique est le plus souvent proche de la réalité et l'Hb ainsi obtenue n'est pas perturbée. Les anomalies observées disparaissent quand l'échantillon est réchauffé au bain-marie à 37 °C pendant une à deux heures puis réanalysé rapidement (figure 56B). L'amplification des anomalies sur un aliquot préalablement placé pendant une heure à 4 °C renforce le diagnostic (figure 57). Une alternative consiste en la centrifugation de l'échantillon et le remplacement iso-volumétrique du plasma par du diluant isoosmotique, puis l'homogénéisation et l'incubation à 37 °C préalables à l'analyse. Dans de rares cas le titre de l'agglutinine est si élevé que la normalisation de l'hémogramme ne peut pas être obtenue après réchauffage à 37 °C, nécessitant alors un nouveau prélèvement réalisé et maintenu à 37 °C jusqu'à l'analyse [107, 115, 117].

La viscosité de l'échantillon peut être très élevée et conduire à une aspiration insuffisante, générant une alarme liée à ce type d'anomalie (« échantillon insuffisant », « aspiration insuffisante », ou un message apparenté). La coexistence d'une agglutination des GR avec une thrombopénie induite par l'EDTA a été rapportée, mais les anticorps dirigés contre les GR et ceux dirigés contre les PLT étaient différents [107].

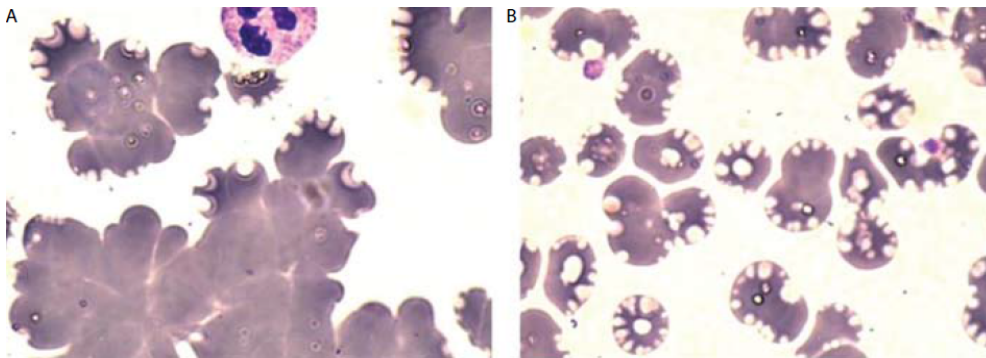


Figure 56 : Frottis de sang périphérique, coloration de May-Grunwald - Giemsa, x 1000.

A: l'échantillon réanalysé après exposition au froid (4°C pendant 30 minutes) présence de grappes érythrocytaire, B : l'échantillon transféré sans exposition au froid [117]

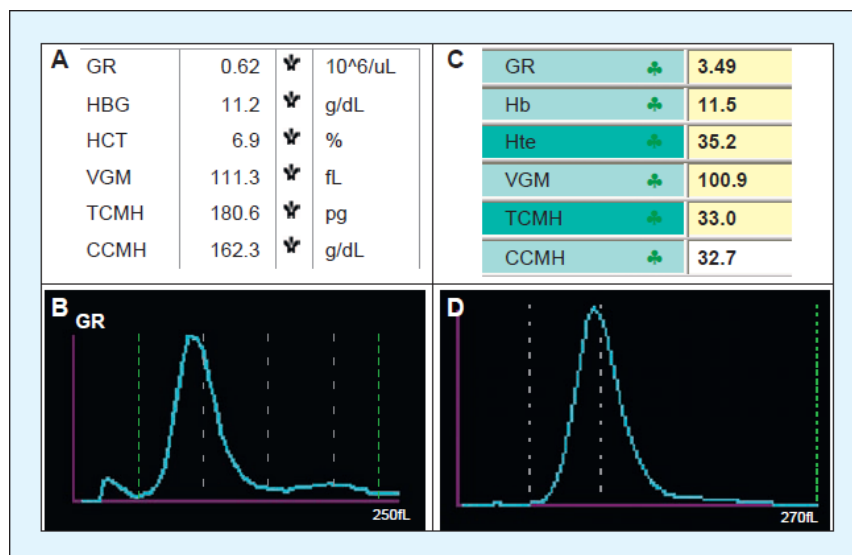


Figure 57 : Perturbation de la numération globulaire en présence d'agglutinines froides. L'analyse réalisée à 22 °C (A et B) montre une CCMH très augmentée et un contraste flagrant entre un nombre d'hématies (GR) très faible, un hématocrite très bas (HCT) et une valeur d'hémoglobine (HGB) subnormale ; l'histogramme des volumes des GR (B) montre un pic dans la partie droite. Après incubation une heure à 37 °C et réanalyse rapide (C et D) la CCMH se normalise (appréciation correcte de la numération des GR, du VGM et de l'hématocrite par l'automate) ; le pic anormal sur l'histogramme des GR a disparu (Sysmex XE 2100) [107].

IV-2-2 Anémies hémolytiques à anticorps chauds

Quelques cas d'agglutination des GR en présence d'autoanticorps chauds ont également été rapportés, provoque des artefacts de numération par l'automate conduisant à de faux résultats de la numération érythrocytaire et du VGM, comme dans le cas des agglutinines froides, mais avec une absence de correction de l'anomalie après réchauffage à 37 °C [107, 114, 115].

IV-2-3 Microcytes et schizocytes et leur séparation avec les plaquettes

La numération des PLT peut être perturbée par les GR microcytaires, notamment si leur taille est <36-40 fl, induisant une possible surestimation de leur nombre (pseudo-thrombocytose par présence des microcytes et de schizocytes). Cependant certains AHC ne comptent pas les particules érythrocytaires en deçà du seuil discriminant parmi les GR et PLT : une sous-estimation de la numération des GR peut alors être observée, bien qu'elle reste limitée, ne dépassant pas 5 à 6 % [40, 107].

IV-2-4 Cryoglobulines

Comme déjà mentionné, une petite diminution portant à la fois sur l'Hb et sur la numération des GR a été rapportée dans quelques cas, liée à une anomalie de flux, avec un message correspondant à une aspiration insuffisante ou à un prélèvement coagulé [94].

IV-2-5-Problèmes liés à la qualité de l'échantillon

La coagulation ou une homogénéisation insuffisante par remplissage excessif du tube sanguin peuvent conduire à l'aspiration d'un aliquot non représentatif de l'échantillon. Les agglutinines froides (comme parfois les

cryoglobulines) peuvent rendre l'échantillon sanguin très visqueux, et induire une aspiration insuffisante (message d'alarme signalé par divers AHC). Quand il n'a été possible d'obtenir que très peu de sang capillaire ou veineux, et que le recueil a été réalisé dans un tube de volume normal contenant de l'EDTA-K3 sous forme liquide, une petite dilution peut s'observer (nourrisson prélevé avec un tube pour adulte) [64, 107].

IV-2-6 Hémolyse in vitro

Dans certaines situations, notamment dans les hémolyses post-transfusionnelles ou toxiques, les GR peuvent continuer à se lyser dans le tube de sang et conduisent à une numération anormalement diminuée. Il en est de même pour la mesure de l'Hb et des indices érythrocytaires [107].

IV-3 Erreur de détermination du volume globulaire moyen (VGM) ou de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

IV-3-1 Volume globulaire moyen et hématocrite

Une erreur d'appréciation du volume globulaire moyen (VGM) et/ou de la numération des GR peuvent induire secondairement une erreur de l'hématocrite (Ht) (habituellement calculé par les AHC). De manière systématique, quand on suspecte une anomalie de mesure du VGM, de la numération des GR et/ou de l'Ht, il faut vérifier la validité des deux autres paramètres considérés.

Les principales situations perturbant la mesure du VGM sont reprises dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Principales situations conduisant à une erreur de détermination du volume globulaire moyen ou de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

volume globulaire moyen (VGM)		la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)	
Fausse augmentation	Fausse diminution	Supérieure à 36 g/dl	Inférieure à 32 g/dl
- Agglutinines froides - agglutinines chaudes - Grandes hyperleucocytoses - Grandes hyperglycémies (ou ponction proche d'une perfusion glucosée) - Excès d'EDTA K2 - Hypernatrémie - Sang vieilli (>3 jours)	- Hyponatrémie - Technique de mesure : impédance sans focalisation - hydrodynamique et anémies hypochromes	- (hyperchromie « vraie ») - Agglutinines froides, agglutinines chaudes - Lipides - Grandes hyperleucocytoses - Immunoglobulines (et cryoglobulines) - Hémolyse in vivo et in vitro - Carboxyhémoglobine (>20 %) - Bilirubine (>250-300 mg/L) - Médicaments immunosuppresseurs	- Hyperglycémie (ou ponction proche d'une perfusion glucosée) - Grandes hyperleucocytoses - Sang vieilli

IV-3-1-1 VGM et agglutinines froides (et anticorps chauds)

On observe une augmentation du VGM (plus nette quand les AHC utilisent des réactifs à température du laboratoire) et de la CCMH et une baisse de la numération des GR, alors que la mesure de l'Hb n'est pas perturbée. Certains AHC « mesurent » l'Ht en faisant la somme des volumes des particules analysées dans le canal GR en un temps et un volume donnés : ce résultat est également faussé en présence d'agglutinines froides car les agglutinats de gros volume sont négligés (Sysmex) [107, 115].

IV-3-1-2 VGM et grandes hyperleucocytoses

Comme mentionné ci-dessus, le décompte réalisé dans le canal « GR et PLT » inclut en réalité les GR, mais également une partie des leucocytes (variable selon l'AHC), ces leucocytes augmentant artificiellement le VGM. Si, en situation normale, ces leucocytes peuvent être négligés, l'interférence devient significative chez un patient anémié ou lorsque les leucocytes sont de petite taille comme les lymphocytes des malades atteints de leucémie lymphoïde chronique. Une augmentation pouvant atteindre 15-20 fl peut être observée dans certaines circonstances. Les AHC qui calculent le VGM à partir de l'Ht et de la numération des GR sont eux aussi sensibles aux hyperleucocytoses >100 G/L. Une perturbation de l'Hb et de la numération des GR est également à envisager : les approches correctives sont discutées dans la partie précédente [107, 115].

IV-3-1-3 Hyperglycémie sévère

Le VGM peut être artificiellement augmenté lorsque l'échantillon sanguin contient des taux élevés de glucose (hyperglycémie sévère), ou lorsque le prélèvement a été réalisé à proximité d'une perfusion de soluté glucosé. Dans ce dernier cas le prélèvement est en plus dilué, conduisant à une pseudo-anémie macrocytaire ou à une accentuation de l'anémie préexistante. Dans les deux cas, l'« augmentation » du VGM est directement liée à la quantité de glucose intra-érythrocytaire, en équilibre avec le glucose plasmatique. Dans les AHC, dès les premières secondes suivant la dilution du sang, de l'eau pénètre dans les GR riches en glucose, ce qui provoque leur gonflement. Le retour à la taille normale se réalise ensuite progressivement, et est complet après deux à cinq minutes. Le VGM augmente de manière variable selon les AHC : une petite augmentation peut apparaître avec des concentrations en glucose supérieures à 20 mmol/l, et tous les AHC sont perturbés avec des concentrations dépassant 35 mmol/l. Le VGM peut être faussement augmenté de 30-50 fl. Les AHC utilisant la sphérisation isovolumétrique sont particulièrement sensibles à l'hyperglycémie, car la stabilisation du volume des GR survient dans les secondes qui suivent la dilution, au moment où le gonflement est à son maximum. L'augmentation du VGM augmente artificiellement l'Ht, et la CCMH est faussement diminuée. La découverte d'une macrocytose hypochrome doit faire évoquer en premier lieu un échantillon hyperglycémique (figure 58). Des messages d'alerte aspécifiques (« macrocytose », « hypochromie », « anémie ») sont visualisés. Chez le patient diabétique, la numération des GR et la valeur de l'Hb ne sont pas affectées : comme l'Ht centrifugé n'est pas modifié, il permet le calcul du VGM réel. La CHCM, a parfois été rapportée comme également faussée [107, 115, 116].

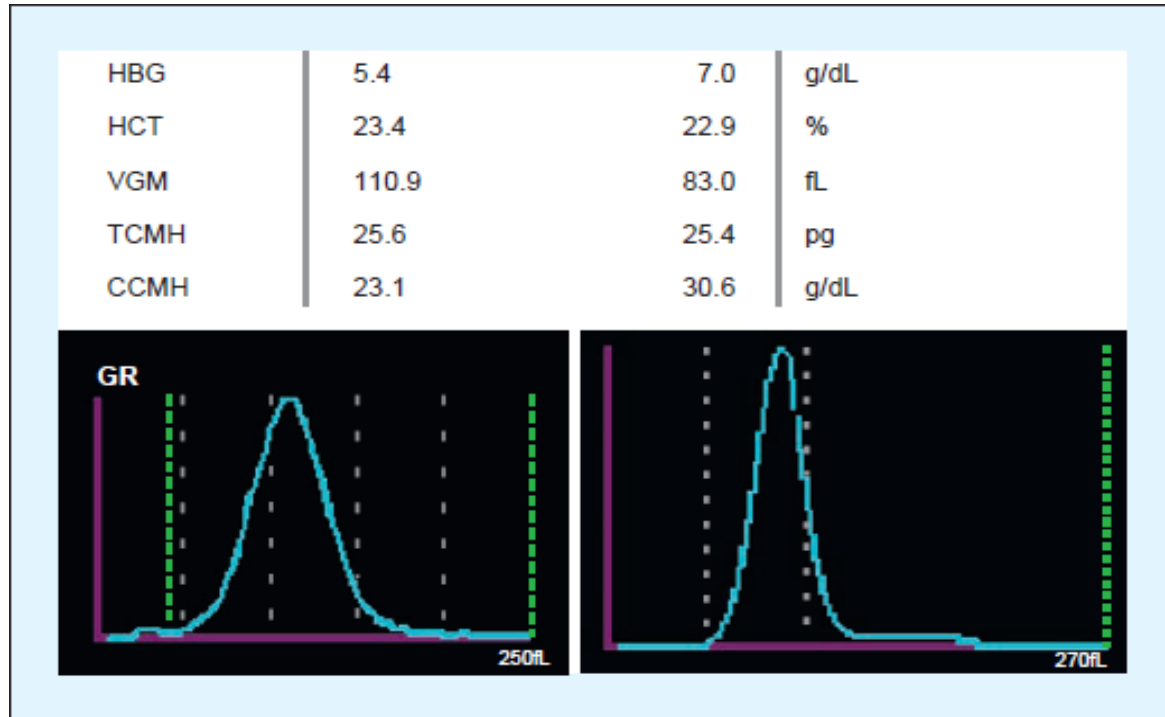


Figure 58: Découverte d'une macrocytose hypochrome (en haut à gauche) chez un patient hospitalisé en unité de réanimation médicale. L'histogramme des volumes érythrocytaires présente une base très élargie (en bas à gauche). Un prélèvement de contrôle va permettre d'obtenir les indices érythrocytaires réels (en haut à droite) et un histogramme des volumes érythrocytaires normalisé (en bas à droite). La ponction veineuse a été primitivement réalisée à proximité d'une voie de perfusion de soluté glucosé isotonique et le contrôle réalisé par ponction au bras opposé : la différence entre les deux valeurs d'hémoglobine chiffre l'importance de la dilution liée à l'erreur de prélèvement [107].

IV-3-1-4 Hyper- et hyponatrémie

En cas d'hypernatrémie on observe une tendance à la macrocytose et à l'hypochromie des GR, tandis que l'hyponatrémie entraîne une tendance microcytaire et hyperchrome. De telles situations ont également été rapportées chez les animaux. L'hyper- et l'hyponatrémie sont également des situations qui peuvent induire des erreurs de l'Ht centrifugé [118].

IV-3-1-5 Influence de l'anticoagulant

L'utilisation des anticoagulants EDTA-K2 ou K3 n'interfère pas avec la numération des GR lorsque les tubes sont remplis de manière optimale. Cependant, quand la quantité de sang est insuffisante dans le tube (ponction difficile, nouveau-nés), la concentration en anticoagulant est proportionnellement augmentée, et des modifications peuvent être observées. Une concentration excessive en EDTA-K2 conduit à une petite augmentation du VGM sur divers types d'AHC [119]. L'excès d'EDTA-K3 n'influence ni le VGM ni l'Ht des AHC, à l'opposé de ce que l'on observe avec l'Ht centrifugé qui diminue artificiellement par contraction des GR [119, 120].

IV-3-1-6 Influence de la Conservation des échantillons sur le VGM

L'EDTA utilisé comme anticoagulant permet une détermination exacte des divers paramètres de la numération globulaire jusqu'à 24 heures après le prélèvement. Après cette date, le VGM peut augmenter, notamment si l'échantillon est stocké à température du laboratoire. Les modifications sont signalées comme étant discrètes, de l'ordre de 1,5 % après 24 heures et 4 % après 48 heures, le stockage prolongé au-delà de 3 jours pouvant parfois

masquer une microcytose modérée [105, 121]. La numération érythrocytaire et l'Hb étant relativement stables dans la même période, la CCMH diminue avec le temps [105, 121]. Cependant certains auteurs signalent des variations plus importantes du VGM, pouvant atteindre 9% après 24 heures et 16 % après 48 heures, et ce sur plusieurs types d'AHC [122].

IV-3-1-7 Variation du VGM en fonction de la technologie de mesure

Lors de la mesure par impédance, les GR discoïdes s'étirent (ellipses) lorsqu'ils sont aspirés au travers de l'orifice de mesure : cette élongation est en outre plus prononcée pour les particules qui passent en périphérie de l'orifice que pour celles qui passent à la partie centrale. Ce phénomène s'accroît particulièrement au cours des anémies hypochromes, lorsque la concentration en Hb des GR est faible : le VGM peut ainsi être exagérément diminué de 5 à 7 fl. Ceci conduit à une diminution de l'Ht, et par voie de conséquence à une erreur de la CCMH : cette dernière demeure faussement « normale » ou est à peine diminuée, sous-estimant l'hypochromie dans de telles situations. Des modifications techniques de la mesure par impédance, comme une chambre de mesure mieux adaptée (Beckman Horiba) ou la focalisation hydrodynamique qui dirige le flux des GR au centre de l'orifice (Sysmex), améliorent la précision de mesure. Avec la diffraction optique, la nécessité d'une sphérisation isovolumétrique préalable à l'analyse évite cet écueil. Pour les AHC qui utilisent la technique de mesure par impédance et « mesurent » l'Ht en additionnant les volumes individuels des GR analysés dans un volume et un temps donnés (le VGM est alors le paramètre calculé), la valeur de l'Ht est également faussée [107].

IV-3-2 Concentration corpusculaire moyenne en Hb (CCMH)

Elle correspond au rapport entre la quantité d'Hb et l'Ht, et reflète la concentration en Hb au sein des GR, définissant la normo-, l'hypo- ou l'hyperchromie. Avec la mesure par diffraction optique, certains AHC déterminent directement la concentration en Hb au sein de chaque GR (CHCM): cet indice est comparé à la CCMH calculée, et un message d'alerte est généré lorsque la différence dépasse un seuil (habituellement 1,9g/dl) (Siemens, Abbott). Cette discordance correspond habituellement à une anomalie dans la détermination de l'un des paramètres mesurés que sont l'Hb, la numération des GR et/ou le VGM, ou l'Ht [107].

Les principales situations perturbant la valeur de la CCMH sont reprises dans le tableau XIII.

IV-3-2-1 Augmentation de la CCMH (>36 g/dl)

a- Hyperchromie vraie (CCMH > 36 g/dl)

Observée dans certaines situations pathologiques, elle est rarement révélée avec la technique de mesure par impédance, mais plus souvent par diffraction optique: la CCMH peut atteindre ou dépasser 41 g/dl. De telles valeurs caractérisent des pathologies constitutionnelles au cours desquelles les GR sont déshydratés, comme la sphérocytose héréditaire, diverses hémoglobinoses (CC, SC, C β thalassémie), et la xérocytose. Certaines anémies hémolytiques auto-immunes à anticorps chauds peuvent également présenter une CCMH augmentée après analyse par diffraction optique [107].

b- CCMH artificiellement augmentée

Une telle situation s'observe dans trois circonstances. Le plus souvent il s'agit d'une fausse diminution de la numération des GR liée à la présence d'agglutinines froides. Parfois il s'agit d'une fausse augmentation de l'Hb mesurée : excès de lipides plasmatiques ou d'immunoglobulines (et cryoglobulines), grandes hyperleucocytoses (mais provoquant parfois aussi une CCMH diminuée : voir plus loin), hémolyse in vivo et in vitro, excès de carboxyhémoglobine (> 20 %) ou de bilirubine (> 400 $\mu\text{mol/l}$). Enfin, bien que le mécanisme en soit mal connu, certains médicaments immunosuppresseurs peuvent légèrement augmenter la CCMH, mais habituellement pas au-delà de 37,5 g/dl [107, 115].

IV-3-2-2 Diminution de la CCMH

- CCMH artificiellement diminuée

En pathologie, l'hypochromie s'observe surtout au cours des anémies microcytaires, et plus rarement en association avec un VGM normal. À l'opposé, une hypochromie associée à une macrocytose est très inhabituelle en hématologie, et doit faire évoquer une erreur de mesure suite à une hyperglycémie, vraie ou induite (ponction veineuse proche d'une perfusion glucosée). Les grandes hyperleucocytoses peuvent générer un ensemble d'anomalies secondaires à l'inclusion de leucocytes dans l'analyse des GR, en provoquant les anomalies de la numération érythrocytaire, du VGM et de l'hématocrite, et en influant de manière variable sur la mesure de l'hémoglobine. Ceci peut aboutir in fine à une baisse de la CCMH. La conservation des échantillons sanguins influence la mesure du VGM, qui a tendance à augmenter avec le temps, ce qui augmente l'Ht et diminue la CCMH [105, 121].

V-PERTURBATION DE LA NUMERATION AUTOMATISEE DES RETICULOCYTES

La numération des réticulocytes sanguins est une partie essentielle du diagnostic et de la surveillance des patients anémiques, et doit être considérée à l'heure actuelle comme faisant partie de l'hémogramme. Si le décompte manuel par microscopie optique reste une méthode classique, les méthodes automatisées développées pendant les deux dernières décennies ont montré leur exactitude et leur précision, à un coût inférieur du fait du faible temps technique nécessaire. De plus, divers paramètres dérivés de l'analyse des réticulocytes (volume, concentration individuelle en hémoglobine, niveau de maturité), impossibles à obtenir par microscopie optique, sont maintenant proposés par tous les AHC récents à forte cadence d'analyse. Initialement réalisée à l'aide de cytofluoromètres en flux généralistes puis de cytomètres en flux dédiés, la numération automatisée des réticulocytes est maintenant incluse sous forme de technique soit semi-automatique (dilution manuelle puis analyse par l'AHC) soit totalement automatisée au sein de l'hémogramme. L'ARN des réticulocytes est coloré par le bleu de méthylène nouveau (certains automates Abbott et Beckman) ou l'oxazine (Siemens), ou par un colorant fluorescent qui peut être le thiazole orange (Horiba), l'auramine O (Sysmex), le CD4K530 (Abbott) ou la coriphosphine (Beckman). L'analyse est ensuite réalisée par cytométrie en flux [107, 123, 124].

Les perturbations peuvent affecter chaque étape de l'analyse des réticulocytes. Les Sources possibles d'interférence avec méthodes automatisées d'analyse de réticulocytes sont reprises dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Les Sources possibles d'interférence avec méthodes automatisées
d'analyse de réticulocytes [127]

Eléments cellulaires	Inclusions cellulaires	Divers
Amas plaquettaire	corps de Howell-Jolly	Autofluorescence
Plaquettes géantes	corps de Pappenheimer	Paraprotéine
Leucocytes	ponctuations basophiles	Agglutinines froides
Fragments leucocytaires	corps de Heinz	Hémolyse
Erythrocytes nucléés	inclusions d'Hb H	Coïncidence plaquettes/ érythrocytes
	parasites (malaria, babesia)	

V-1 Fenêtrage des réticulocytes

Il constitue une étape primordiale pour la détermination de décomptes exacts, car les colorants utilisés réagissent également avec l'ARN des PLT, et peuvent se combiner à l'ARN et l'ADN des cellules nucléées. Les GR et les réticulocytes étant d'une part, plus grands que les PLT et, d'autre part, plus petits que les leucocytes, une séparation utilisant le critère de taille est appliquée. Ce fenêtrage peut être rendu difficile si des composants du sang ont une taille inhabituelle, et/ou contiennent de l'ARN ou de l'ADN : PLT géantes ou amas plaquettaires, leucocytes anormaux ou en nombre anormalement élevé, et grands fragments leucocytaires sont les principales sources d'interférence potentielle. Les érythroblastes ne sont pas inclus en tant que tels parmi les réticulocytes mais peuvent cependant perturber la numération, vraisemblablement par le nombre élevé de très jeunes réticulocytes présents en même temps que les érythroblastes [107, 125].

V-2 Seuil de discrimination entre GR et réticulocytes

Un seuil plus ou moins fixe sépare ces deux populations, déterminé par exemple à partir de la mesure de l'autofluorescence des GR matures (Abbott). Des GR contenant du matériel coloré ou fluorescent mais ne correspondant pas à des réticulocytes peuvent perturber le positionnement de ce seuil : ce sont notamment les GR contenant des corps de Howell-Jolly, des corps de Pappenheimer ou des ponctuations basophiles. Cependant les AHC sont plus ou moins sensibles à ce type d'interférence. Beaucoup plus rarement une interférence comparable aux précédentes a été signalée en présence de corps de Heinz, d'inclusions d'Hb H, d'un nombre élevé de sphérocytes ou de drépanocytes. Les parasites intra-érythrocytaires (paludisme, babésiose), bien qu'habituellement faiblement colorés par les réactifs fluorescents, peuvent interférer avec la numération automatisée, et des valeurs augmentées jusqu'à six fois par rapport à valeur réelle ont été rapportées chez un patient dont 71 % des GR étaient infectés par *Plasmodium falciparum* [107, 126, 127].

V-3 Intensité de coloration ou de fluorescence des réticulocytes

Elle peut être quantifiée au sein de chaque réticulocyte par la plupart des AHC. Les réticulocytes les plus colorés (ou les plus brillants) sont les plus riches en ARN et donc considérés comme les plus jeunes : ceci a permis de définir de nouveaux indices, et notamment la fraction immature des réticulocytes (Immature Reticulocyte Fraction ou IRF). La présence d'un nombre élevé de leucocytes (intensément colorés) peut induire une estimation erronée des indices

réticulocytaires, avec un parallélisme entre l'importance de l'erreur et celle de l'hyperleucocytose. À l'opposé, les réticulocytes les plus matures ne contiennent que quelques ponctuations colorées et peuvent être détectés de manière insuffisante chez les nouveau-nés, peut-être du fait d'une concentration trop faible en matière colorante dans certains automates (Advia 120). Si la numération des réticulocytes est stable 24 à 48 heures à température du laboratoire et 72 heures à + 4 °C, la fraction immature des réticulocytes ne l'est que pendant 8 heures à 4 °C et 6 heures à température du laboratoire [107].

V-4 Autres situations perturbant la numération automatisée des réticulocytes

Diverses autres situations ont été rapportées comme ayant provoqué de manière occasionnelle une erreur dans la numération des réticulocytes : présence d'agglutinats de GR en présence d'agglutinines froides à titre élevé, auto-fluorescence des GR (porphyries, prise de médicaments), présence de substances fluorescentes intraveineuses à visée diagnostique, de fortes quantités d'immunoglobulines, ou hémolyse intense. Les messages d'alerte de la numération des réticulocytes sont habituellement générés lorsque l'une des anomalies mentionnées ci-dessus est présente, incitant le technicien à porter une attention particulière au résultat ou à réaliser une numération microscopique. Cependant des exceptions et une absence de message ont été rapportées avec les agglutinines froides ou la β thalassémie majeure [107, 127].



*Troisième partie :
Recommandations
pour la lecture microscopique
du frottis sanguin*



L'examen du frottis sanguin n'est pas systématique mais reste indispensable lorsque les données fournies par les AHC sont qualitativement ou quantitativement anormales ou demandent une confirmation.

D'après le document COFRAC « portées types d'accréditation » (SH INF 50) l'identification morphologique par microscopie optique fait partie de l'analyse « hémogramme » (Tableau XV) [128].

Domaine : Biologie médicale - Sous-domaine : Hématologie – Famille : Hématocytologie (HEMATOBM)

Tableau XV : Extrait du SH INF 50 «portées types d'accréditation »

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
HB1	Liquides biologiques d'origine humaine	Hémogramme (Numération-formule, plaquettes, avec cellules anormales et paramètres associés)	Méthode de type qualitatif et quantitatif Principe général des techniques : - Impédancemétrie, - Cytométrie en flux, - Cytochimie, - Spectrophotométrie, - Fluorescence, - Radiofréquence, - Calcul - Identification morphologique après coloration et/ou numération en cellule, par microscopie optique	Méthodes reconnues (A)	

Si la plupart des critères conduisant à l'examen du frottis sanguin sont largement reconnus et utilisés, les pratiques des laboratoires restent cependant très hétérogènes. Les attitudes et les seuils de décision peuvent en effet varier en fonction de nombreuses raisons : nombre d'hémogrammes réalisés, profils de recrutement des patients, expérience et habitudes des biologistes, type d'analyseur d'hématologie, ressources humaines disponibles, attentes des cliniciens, etc. Les efforts de rationalisation et de standardisation des pratiques de laboratoire, impulsés par les contraintes médico-économiques et la médicalisation de plus en plus reconnue du rôle des biologistes, ont donné lieu ces dernières années à la publication de recommandations dans la littérature internationale. Si des différences persistent, toutes les attitudes préconisées tendent vers la pertinence clinique de la revue du frottis sanguin et un message hémato-cytologique ayant pour objectif la prise en charge optimale des patients [129,130].

Un certain nombre de règles d'expertise conduisant à la revue microscopique du frottis sanguin en se basant sur les recommandations du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC) sera détaillé ci après, certaines de ces règles d'expertise sont basés sur des critères quantitatifs et qualitatifs et s'appliquent dès la réception par l'automate du résultat brut obtenu lors du premier passage du tube . D'autres règles d'expertise s'appliquent directement lors de l'enregistrement de la demande en fonctions des analyses prescrites.

I- PRESENTATION DU GROUPE DU TRAVAIL ELABORANT LES RECOMMANDATIONS DU GFHC

Un groupe de travail constitué de 17 experts francophones en hématologie cellulaire adulte et/ou pédiatrique représentant 39 laboratoires : 29 laboratoires d'hématologie de Centres Hospitaliers Universitaires (CHU), 7 laboratoires polyvalents de Centres Hospitaliers Généraux (CHG), 3 laboratoires d'exercice libéral.

Les Propositions du groupe sont basées sur :

- Recommandations publiées dans la littérature
- Questionnaire sur les seuils et les critères d'étalement utilisés
- Considérations préalables : le GFHC tient pour acquis le strict respect des recommandations en vigueur concernant la phase préanalytique.
- Bonne connaissance de l'automate et de sa qualification selon la norme ISO15189 par le biologiste pour adapter au mieux les recommandations à sa pratique quotidienne.

Les avantages du GFHC :

- Proposition de seuils clairement définis pour les adultes et la pédiatrie
- Recommandations représentant des bases applicables pour la majorité des laboratoires
- Recommandations adaptables sur base des spécificités et des attentes du laboratoire
- Recommandations indépendantes du type d'analyseur [129]

II- DEFINITIONS DES TERMES UTILISES ET CONVENTIONS

II-1 Notions de situation initiale

Pendant la validation biologique conduisant à l'examen du frottis sanguin, une situation ou une anomalie de l'hémogramme est considéré comme «initiale » (« première fois », « first time ») dans trois cas :

- Absence d'antériorité d'hémogramme disponible pour le patient ;
- Anomalie non présente sur l'hémogramme précédent ;
- Hémogramme réalisé au-delà d'un certain délai écoulé depuis le dernier examen cytomorphologique (> 90 jours pour un adulte, > 30 jours pour un enfant).

Dans les trois cas, le résultat anormal peut être observé pour la première fois chez le patient, traduisant une situation clinique nouvelle ou évolutive, que l'examen du frottis pourra aider à diagnostiquer ou à préciser.

Dans le troisième cas, l'anomalie observée peut aussi être déjà connue, au cours d'une pathologie chronique par exemple : un nouvel examen cytomorphologique se justifie alors au-delà d'un certain délai pour détecter une possible modification de la situation hématologique du patient (par exemple, l'apparition au cours du temps d'anomalies morphologiques ou d'un petit nombre de blastes circulants dans le cadre d'un syndrome myélodysplasique). Par convention, on retient donc comme repère la dernière antériorité comportant un examen microscopique du frottis sanguin et non le dernier hémogramme du patient. Une même anomalie constatée sur des hémogrammes consécutifs chez un patient adulte (âge supérieur ou égal à 15 ans) étant très souvent liée à une

pathologie chronique, peut justifier de ne pas réitérer trop souvent et inutilement l'examen du frottis, tout en n'ignorant pas cependant la survenue d'une situation nouvelle. Au vu des différentes anomalies considérées, un délai maximal de 90 jours entre deux examens du frottis est un bon compromis pour valider les résultats de l'hémogramme. Chez l'enfant (âge inférieur à 15 ans), le délai retenu est de 30 jours, les anomalies de l'hémogramme traduisant des situations cliniques beaucoup plus souvent aiguës que chroniques [129].

II-2 Situation de suivi « follow up »

En dehors de ces situations décrites comme initiale, le patient est considéré en « suivi » et le contexte clinico-biologique est supposé suffisamment bien identifié par le biologiste: en l'absence de tout élément nouveau ou de critère imposant l'examen systématique du frottis, le résultat pourra être validé sans recourir à un nouvel étalement, celui-ci ne présentant a priori pas de réelle valeur ajoutée [129].

III- RECOMMANDATIONS GFHC DE REVUE MICROSCOPIQUE DU FROTTIS SANGUIN

Les indications proposées par GFHC ont été établies en considérant individuellement chaque type d'anomalie ou de situation. Les biologistes peuvent adapter ses recommandations en cas d'association de plusieurs types d'anomalies ou de l'existence d'autres indicateurs donnés par les automates d'hématologie [129].

III-1 Recommandations relatives aux informations concernant le patient

Les critères d'étalement liés à une information relative au patient sont présentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux informations concernant le patient.

Âge		Médecin prescripteur ou service d'hospitalisation		Information patient	Prescriptions spécifiques
adulte	Enfants	Adulte	Enfants	Adulte/Enfant	Adulte/Enfant
Sans objet	-Enfant < 8 jours, situation initiale ; - < 12 mois, pédiatrie spécialisée, situation initiale	Sans objet	Enfant Onco-hématologie pédiatrique, première analyse	Message permanent (ex. : cryoglobulinémie connue, leucoagglutination connue, etc.)	-Prescription spécifique d'analyse morphologique -Prescription associée de myélogramme ou d'immunophénotypage -Recherche de schizocytes : mode opératoire spécifique du laboratoire

III-1-1 Revue des frottis sanguin en fonction de l'âge des patients

L'âge du patient n'apparaît pas un critère en soi chez l'adulte.

Au cours de la première semaine de vie après la naissance, l'examen du frottis est préconisé au moins lors d'un premier hémogramme, en raison de la fréquente érythroblastémie. Chez l'enfant de moins d'un an hospitalisé en service de pédiatrie spécialisée, le frottis systématique lors du premier hémogramme est conseillé, la plupart des pathologies hématologiques constitutionnelles se déclarant lors de la première année de vie et ne se traduisant pas toujours par un hémogramme automatisé anormal (par exemple : sphérocytose héréditaire, elliptocytose héréditaire, maladie de surcharge).

En dehors de ce contexte, un résultat rendu par l'automate ne présentant pas d'anomalie quantitative ou qualitative peut être validé. Cependant, en pratique à cet âge, les alarmes qualitatives des automates sont très fréquentes et nécessitent presque systématiquement la revue du frottis sanguin.

III-1-2 Médecin prescripteur ou service d'hospitalisation

Une relecture systématique du frottis est retenue comme nécessaire pour les patients d'onco-hématologie pédiatrique, non connus ou sans examen cytomorphologique récent disponible, du fait notamment de la mauvaise sensibilité des automates à détecter les lymphoblastes quand ceux-ci sont présents en faible nombre. Hormis ce cas particulier, le critère n'est pas retenu comme devant justifier à lui seul l'examen du frottis : le biologiste peut « faire confiance » à son automate, à la condition de respecter les autres critères d'étalement et d'avoir préalablement qualifié l'automate.

III-1-3 Renseignement permanent associé aux informations concernant le patient

Chez un patient présentant une anomalie identifiée une première fois, l'enregistrement d'un commentaire permanent associé aux informations le concernant peut être utile pour traiter et valider de façon plus sécurisée et plus rapide les hémogrammes réalisés ultérieurement. Par exemple, la présence de cryoglobuline ou encore un phénomène de leucoagglutination, peut constituer un piège de la numération globulaire, parfois même sans qu'aucune anomalie quantitative ou qualitative ne soit associée et ne permette de déceler l'erreur analytique. Un message permanent signalant le fait chez le patient peut être utilisé comme critère pour déclencher une action spécifique comme une analyse à 37°C de l'échantillon ou la revue du frottis sanguin.

III-1-4 Prescription spécifique d'analyse morphologique

Elle implique nécessairement un examen du frottis et le rendu d'un commentaire explicite à l'attention du médecin prescripteur. En absence de cellules anormales

(Réactionnelles ou tumorales), la formule automatisée, plus précise, est rendue préférentiellement à la formule microscopique. La demande de recherche de schizocytes peut être gérée différemment, le biologiste responsable pouvant décider de la nécessité ou non d'un étalement selon qu'il utilise – et a qualifié pour cela – un automate détectant et quantifiant les fragments érythrocytaires. En cas de dénombrement requis, les schizocytes seront comptés selon les recommandations récemment publiées

III-1-5 Prescription associée à l'hémogramme d'un myélogramme ou d'un immunophénotypage

L'examen du frottis sanguin est de bonne pratique, sinon indispensable pour guider ou compléter l'interprétation de ces examens.

III-2 Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la numération globulaire rendu par les AHC

Les critères d'étalement liés à une anomalie de la numération globulaire sont présentés dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la numération globulaire [129].

Les paramètres	Age (adulte/enfant)	Indications d'examen du frottis sanguin
Leucocytes	Adulte/enfant	Patients atteints d'hémopathie maligne, en sortie d'aplasie (leucocytes $\geq 1,0$ G/l sur le résultat actuel et $< 1,0$ sur le résultat précédent)
Plaquettes	Adulte	< 100 , en situation initiale > 450 , en situation initiale
	Enfant	< 150 , en situation initiale
VPM (Fl)	Adulte/Enfant	< 7 , en situation initiale avec plaquettes < 150 G/l $>$ valeur limite supérieure (fournisseur), en situation initiale avec plaquettes < 150 G/l
Hb (g/dl)	adulte	< 8 , en situation initiale < 10 , en situation initiale avec réticulocytes > 120 G/l
	Enfant	< 9 , en situation initiale
VGM (Fl)	Adulte	> 105 , en situation initiale < 75 , en situation initiale
	Enfant	> 85 (6 mois à 2 ans), > 95 (2 à 15 ans), en situation initiale < 70 (6 mois à 2 ans), < 72 (2 à 6 ans), < 75 (au-delà de 6 ans), en situation initiale
CCMH (g/dl)	Adulte/Enfant	$>$ limite normale supérieure, en absence d'interférence
IDR (CV %)	Adulte/Enfant	> 22 %, en situation initiale, hors contexte connu de transfusion de globules rouges
Réticulocytes (G/l)	Adulte/Enfant	> 120 , en situation initiale

III-2-1 Numération leucocytaire

a) Anomalies quantitatives

En situation initiale, la valeur de la leucocytose n'apparaît pas en soi un bon critère décisionnel pour la réalisation d'un frottis, les données quantitatives et/ou qualitatives de la formule automatisée semblant plus utiles. En cas de leucopénie ou d'hyperleucocytose, il est recommandé d'analyser l'échantillon en mode formule automatisée si cette dernière n'est pas systématiquement réalisée d'emblée.

En situation de suivi, dans le cas particulier des patients recevant ou ayant reçu une chimiothérapie myélosuppressive, il est recevable de ne pas réaliser de formule leucocytaire en cas de leucopénie $< 1,0 \text{ G/l}$, si un accord passé entre le prescripteur et le laboratoire le prévoit. En dessous de ce seuil, si le suivi clinique requiert impérativement la numération des polynucléaires neutrophiles, le résultat de l'automate peut être délivré, le compte rendu mentionnant que la formule leucocytaire est celle de l'automate. Pour les patients atteints d'hémopathie, la récupération d'un taux de leucocytes $\geq 1 \text{ G/l}$ est une indication à l'examen du frottis sanguin, celui-ci devant s'attacher à rechercher des cellules anormales témoignant d'une mauvaise réponse au traitement reçu. Le biologiste rend alors la formule la plus adaptée, du microscope ou de l'automate, selon qu'il a ou non observé la présence de cellules pathologiques.

b) Alarmes qualitatives

Tout message de l'analyseur traduisant un manque de fiabilité du compte des leucocytes doit faire interpréter et valider le résultat avec une grande vigilance et selon les directives préconisées par le fabricant. Une revue microscopique du frottis sanguin est utile pour identifier certains types d'interférences et pour guider la validation technique du résultat.

III-2-2 Numération plaquettaire et indices plaquettaires

a) Anomalies quantitatives

➤ Thrombocytose

En cas de thrombocytose (plaquettes > 450 G/l) observée en situation initiale, un examen du frottis peut être utile pour mettre en évidence certaines causes d'interférences à l'origine d'un compte faussement élevé des plaquettes (cryoglobulines, fragments d'hématies, débris cellulaires...). Une fois le résultat des plaquettes considéré comme exact, le frottis sanguin peut orienter mais ne revêt pas de caractère impératif, n'apportant généralement pas d'argument formel pour affirmer l'existence d'un syndrome myéloprolifératif (fragments de mégacaryocytes circulants possibles au cours de la thrombocytémie essentielle, ou encore excès de basophiles, mal identifiés par certains types d'automates, pouvant révéler une exceptionnelle leucémie myéloïde chronique dans une forme thrombocytémique pure...). Les résultats avec thrombocytose observés ultérieurement ne nécessitent pas de nouvel étalement.

➤ **Thrombopénie**

Dans le cadre d'une thrombopénie (plaquettes < 150 G/l), observée soit en situation initiale, soit au cours d'un suivi mais avec un résultat hors delta-check, la recherche d'une interférence à l'origine d'un compte faussement diminué des plaquettes est la première étape systématiquement menée (recherche de caillot, d'amas, de fibrine, de macroplaquettes...). Sur la base des courbes publiées par Berend Houwen, le delta-check retenu est de 50 %, avec un calcul se basant sur le résultat antérieur. En l'absence d'interférence identifiée, l'examen cytomorphologique du frottis sanguin est impérativement réalisé chez l'adulte si la thrombopénie est inférieure à 100 G/l, seuil en dessous duquel la mise en évidence d'anomalies d'intérêt clinique devient plus fréquente. Liberté est bien entendu laissée aux biologistes le désirant d'utiliser un seuil plus «contraignant», compris entre 100 et 150 G/l, ce d'autant qu'il existe d'autres anomalies/cytopénies associées. L'examen se concentrera sur la recherche d'anomalies leucocytaires (cellules anormales malignes ou réactionnelles, signes de dysmyélopoïèse), érythrocytaires (schizocytes, parasites intra-érythrocytaires...), et plaquettaires. Chez l'enfant de moins de 15 ans, la possibilité d'une anomalie constitutionnelle des plaquettes fait préférer le seuil de 150 G/l pour décider de l'examen microscopique.

➤ **Anomalie du volume plaquettaire moyen**

Le volume plaquettaire moyen (VPM) ne fait pas partie des paramètres à rendre systématiquement sur le compte rendu de l'hémogramme, mais est déterminé par la plupart des analyseurs d'hématologie. Sa valeur est sujette à une grande variabilité selon le type ou la marque de l'automate utilisé, mais les

valeurs de 6 ou 7 fl semblent cependant correspondre à la valeur inférieure à la normale pour tous les types d'appareils actuellement sur le marché. Chez un patient non connu présentant une thrombopénie $< 150 \text{ G/l}$, un examen cytomorphologique des plaquettes en cas de VPM $< 7 \text{ fl}$ est potentiellement utile, de même en cas de VPM retrouvé au-delà de la valeur normale haute indiquée par le fournisseur, ou en cas d'autre paramètre éventuellement rendu témoignant de la présence de grandes plaquettes.

b) Alarmes qualitatives et anomalies des graphes de l'analyseur

➤ Suspicion d'amas plaquettaires

Quel que soit le résultat de numération plaquettaire rendu par l'analyseur, l'opérateur doit en situation initiale contrôler l'absence de coagulation dans l'échantillon puis rechercher des agrégats plaquettaires, soit par examen du frottis sanguin coloré, soit par examen au microscope en contraste de phase d'une goutte de sang à l'état frais entre lame et lamelle.

En cas de présence d'amas plaquettaires, le résultat de la numération plaquettaire est remplacé sur le compte rendu par le terme «amas» ou «agglutinats ». Si, pour indication au médecin clinicien, le biologiste souhaite délivrer le résultat par défaut rendu par l'automate, il doit le rendre sous forme d'un commentaire, afin que le résultat mentionné ne soit pas pris à tort comme un résultat exact. La conduite à tenir sera la même en cas de répétition de l'alarme sur les prélèvements ultérieurs.

En absence d'amas plaquettaires ou autre interférence diminuant artificiellement le nombre des plaquettes, le résultat de la numération plaquettaire peut être rendu et la vérification réalisée doit être tracée. Si l'alarme se répète lors de l'analyse des échantillons suivants, la recherche d'amas peut ne pas être réalisée de nouveau et le résultat des plaquettes peut être rendu.

➤ **Autres alarmes ou anomalies des graphes dédiés aux plaquettes**

Elles sont pour la plupart redondantes avec celles liées à la numération et la répartition des globules rouges pour lesquelles les recommandations de revue du frottis sont exposées ci-après.

III-2-3 Numération érythrocytaire, taux d'hémoglobine et indices érythrocytaires, réticulocytes

a) Anomalies quantitatives

➤ **Polyglobulie**

Devant un résultat montrant une polyglobulie (taux d'hémoglobine > normale pour l'âge et le sexe), l'examen du frottis sanguin n'apporte pas de valeur ajoutée en situation initiale comme dans le suivi.

➤ **Anémie**

La constatation d'une anémie peut dans certaines situations permettre de détecter un problème préanalytique ou analytique, ou une pathologie chez le patient. L'orientation, après vérification de l'absence de coagulation dans le tube, est souvent guidée par la variation associée d'autres paramètres (volume globulaire moyen, leucocytes, plaquettes, réticulocytes...).

Chez l'adulte, en dehors de tout contexte évident d'hémorragie, devant une anémie normo- ou macrocytaire < 10 g/dl observée, soit initialement, soit au cours du suivi avec une différence > 25 % par rapport au résultat précédent, il est conseillé de réaliser en premier lieu une numération des réticulocytes. Cette démarche vise essentiellement à détecter rapidement les situations d'anémie hémolytique et l'examen du frottis est alors préconisé en cas d'hyper-réticulocytose. Bien que la Société Française d'Hématologie retienne un nombre de réticulocytes > 150 G/l pour qualifier une anémie de « nettement régénérative », le groupe préconise d'utiliser un nombre > 120 G/l pour décider de l'étalement sanguin.

En cas d'anémie sévère non connue (< 8 g/dl, seuil clinique de discussion transfusionnelle), l'examen du frottis sanguin est indispensable, à la recherche d'anomalies morphologiques ou de cellules anormales. Si l'anomalie est à nouveau constatée ultérieurement, la revue du frottis sanguin n'offre pas de valeur ajoutée si l'ancienneté du dernier examen morphologique ne dépasse pas 90 jours.

Chez l'enfant, une numération des réticulocytes est conseillée devant la découverte d'une anémie normo- ou macrocytaire < 9 g/dl. Un examen morphologique du frottis sanguin est préconisé devant toute anémie < 9 g/dl observée, soit en première analyse, soit avec une différence > 25 % par rapport au résultat précédent. La revue du frottis n'offre pas de valeur ajoutée si l'ancienneté du dernier examen morphologique ne dépasse pas 30 jours.

➤ **Anomalie du volume globulaire moyen (VGM)**

Chez les enfants âgés de moins de 6 mois, le VGM n'est pas un paramètre suffisamment informatif pour décider d'un étalement.

Au-delà de cet âge, en première visite et après avoir éliminé une situation artéfactuelle, une macrocytose (> 85 fl de 6 mois à 2 ans ; > 95 fl de 2 à 15 ans ; > 105 fl chez l'adulte) justifie la recherche d'une étiologie par la réalisation d'une numération des réticulocytes et l'examen cytomorphologique du frottis sanguin. Lors des hémogrammes ultérieurs, tant que le dernier résultat n'excède pas 90 jours chez l'adulte et 30 jours chez l'enfant, la revue du frottis sur la base de ce seul critère n'offre pas de réel intérêt. On tiendra compte cependant d'éventuelles variations importantes du VGM ($> 5\%$) pour dépister les erreurs d'identité ou les prélèvements effectués sur voies de perfusion (macrocytose hypochrome).

En cas de microcytose (VGM < 70 fl entre 6 mois et 2 ans ; < 72 fl entre 2 ans et 6 ans ; < 75 fl au-delà de 6 ans), l'étude de la morphologie érythrocytaire est éventuellement utile lors d'un premier prélèvement pour dépister et orienter le diagnostic d'une anomalie constitutionnelle de l'hémoglobine.

Une prestation de conseil formulée à partir de l'interprétation des valeurs de l'hémoglobine et des autres paramètres érythrocytaires sera souvent d'un meilleur rapport, signalant l'existence d'une probable carence martiale et l'intérêt d'un bilan martial et inflammatoire, ou la possible existence d'une hémoglobinopathie pouvant justifier la réalisation d'une électrophorèse de l'hémoglobine.

➤ **Anisocytose érythrocytaire**

En situation initiale et en dehors d'un contexte connu de transfusion avec double population érythrocytaire, le GFHC recommande – comme l'ISLH – l'examen du frottis en cas d'anomalie importante de la répartition volumétrique des hématies (IDR, indice de distribution des globules rouges ou CVGR, coefficient de variation du volume des globules rouges > 22 %). Outre la recherche d'anomalies morphologiques, le résultat est à interpréter avec le graphe de distribution des hématies et l'existence ou non d'une anémie associée. Le VGM perdant dans ce cas son caractère informatif, un commentaire « anisocytose avec macrocytose, et/ou anisocytose avec microcytose » peut être associé au résultat. Il n'apparaît pas utile de renouveler l'examen pour ce seul critère dans la période de suivi.

➤ **Anomalie de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)**

Une valeur anormalement élevée de la CCMH (> 36 ou 37g/dl selon l'automate) nécessite en premier lieu de rechercher une interférence. En l'absence de celle-ci, l'examen du frottis est préconisé à la recherche d'une anomalie corpusculaire (sphérocytes, hématies en cibles évocatrices d'hémoglobinoase C). Il apparaît redondant de déclencher l'étalement du frottis en raison d'une valeur basse de la CCMH, celui-ci étant généré par ailleurs selon la valeur de l'hémoglobine et/ou du VGM.

➤ **Anomalie de la numération des réticulocytes**

Un nombre de réticulocytes > 120 G/l (anomalie initiale) correspond à une augmentation de l'érythropoïèse médullaire et justifie une analyse morphologique des hématies à la recherche d'anomalies en rapport avec une hémolyse.

Cette recommandation est indépendante du taux d'hémoglobine associé, celui-ci pouvant être normal ou subnormal en cas d'anémie hémolytique bien compensée.

b) Alarmes qualitatives et anomalies des graphes des analyseurs :

➤ **Alarme « Fragments érythrocytaires »**

La revue du frottis est préconisée en cas d'association de cette alarme avec une anémie et/ou une thrombopénie.

➤ **Double population érythrocytaire**

Alarme généralement associée à une anisocytose importante (voir plus haut), justifiant l'examen du frottis en situation initiale et hors contexte connu de transfusion.

➤ **Résistance à la lyse des globules rouges**

La revue du frottis est nécessaire pour une analyse morphologique des hématies et la réalisation de la formule leucocytaire, celle rendue par l'automate étant potentiellement erronée.

➤ **Rejet de la numération des réticulocytes ou anomalie du graphe des réticulocytes**

L'analyse critique du graphe en cas d'anomalie ou d'alarme générée par l'automate est importante pour décider d'une numération des réticulocytes au microscope sur frottis coloré au bleu de Crésyl. Sur les automates fournissant l'information, il est important de vérifier la cohérence entre la valeur absolue des réticulocytes et leur niveau de fluorescence. En cas d'hyperréticulocytose >120 G/l, il est conseillé de réaliser un frottis sanguin pour rechercher des anomalies morphologiques des hématies.

III-3 Indications relatives à la formule leucocytaire

Les critères d'étalement liés à une anomalie de la formule leucocytaire sont présentés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Indications d'examen du frottis sanguin relatives aux résultats de la formule leucocytaire [129].

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

III-3- 1 Présence de cellules anormales sur l'antériorité

Chez un patient présentant des cellules malignes détectées lors de la formule leucocytaire immédiatement précédente, il n'est pas licite de rendre la formule automatisée sans examen préalable du frottis sanguin (même si le résultat est assorti d'un commentaire mentionnant que le patient est connu avec des cellules pathologiques).

Si l'examen montre la persistance des cellules malignes, la formule est à réaliser au microscope. Dans le cas particulier du suivi de la leucémie lymphoïde chronique, c'est la formule automatisée qui est préférentiellement rendue, en raison du risque de surestimation des populations non lymphocytaires au microscope. Dans le cadre des autres hémopathies lymphoïdes chroniques à petites cellules matures, les cellules lymphoïdes normales et anormales peuvent être regroupées dans le compte lymphocytaire, le compte rendu signalant par un commentaire la persistance de cellules lymphoïdes pathologiques.

III-3- 2 Présence d'érythroblastes

Qu'ils soient ou non comptabilisés par l'automate, la première détection d'érythroblastes circulants chez un patient (en dehors de la période néonatale) revêt un caractère pathologique et justifie la réalisation d'un frottis sanguin à la recherche d'anomalies associées des autres lignées. S'ils n'ont pas été quantifiés par l'automate, les érythroblastes seront décomptés en parallèle des leucocytes afin de corriger le nombre de ceux-ci. La présence d'érythroblastes sur l'antériorité d'un patient justifie le passage sur l'automate dans un mode permettant la détection des érythroblastes (formule ou canal spécifique). Le frottis n'est pas nécessaire pour le suivi en dehors du cas où l'automate ne quantifie pas les érythroblastes, justifiant alors la réalisation d'une formule microscopique.

III-3-3 Présence d'une anomalie quantitative d'une sous-population leucocytaire

a) Neutropénie

En cas de neutropénie $< 1,5$ G/l observée en situation initiale, l'examen microscopique du frottis sanguin est impératif, afin de détecter les fausses neutropénies par agglutination, de rechercher la présence de cellules pathologiques ou de détecter des anomalies morphologiques.

Une technique de leucoconcentration ou le paramétrage spécifique d'un microscope automatisé le cas échéant, peut éventuellement être mis en œuvre pour rendre plus sensible la recherche des cellules anormales. En l'absence d'anomalie sur le frottis, il est préférable de rendre la formule de l'automate en raison des imprécisions liées au décompte sur 100 éléments pour des éléments peu représentés. Pour les hémogrammes réalisés ultérieurement chez un adulte, le frottis sanguin est conseillé si l'examen microscopique précédent date de plus de 90 jours, a fortiori si la neutropénie se majore (une différence de 30 % est proposée). Il sera refait au-delà de 30 jours s'il s'agit d'un enfant.

b) Polynucléose neutrophile

Contrairement à ce que préconise l'ISLH, la réalisation d'un frottis selon GFHC ne paraît pas devoir être motivée par une polynucléose neutrophile, quelle que soit son importance si elle reste isolée. L'examen microscopique n'offre pas dans cette situation de véritable valeur ajoutée au résultat de l'automate et il n'existe pas d'interférence analytique morphologiquement identifiable pouvant se traduire isolément par ce type d'anomalie.

c) Hyperéosinophilie

En situation initiale, la revue du frottis est préconisée en cas de nombre de polynucléaires éosinophiles $> 1,5$ G/l. L'examen permettra parfois la mise en évidence de microfilaires, ou de cellules lymphomateuses, certains lymphomes (surtout de la lignée T) pouvant être associés à une hyperéosinophilie.

En situation de suivi, la revue du frottis n'apporte pas d'information supplémentaire.

d) Hyperbasocytose

En situation initiale, un nombre de polynucléaires basophiles $> 0,3$ G/l et/ou représentant > 3 % des leucocytes justifie l'examen microscopique afin de rechercher des anomalies en faveur d'un syndrome myéloprolifératif ou la présence de leucocytes anormaux parfois classés en polynucléaires basophiles par certains automates (cellules lymphomateuses, cellules de surcharge dans le cadre des mucopolysaccharidoses). En cours de suivi, la revue du frottis n'est pas nécessaire.

e) Hyperlymphocytose

En situation initiale chez l'adulte et l'enfant de plus de 12 ans, la revue du frottis sanguin est recommandée pour la recherche de cellules anormales (réactionnelles ou malignes) en cas de lymphocytose > 5 G/l. Chez l'enfant de moins de 12 ans, les seuils proposés sont de 11 G/l (âge < 2 ans), 9 G/l (âge ≥ 2 ans et < 6 ans), et 6 G/l (âge ≥ 6 ans et < 12 ans). En l'absence de cellules anormales, la formule de l'automate est préférable à la formule microscopique.

Pour une hyperlymphocytose à nouveau observée sur les hémogrammes ultérieurs, la réalisation d'un frottis sanguin est recommandée si le dernier examen microscopique remonte à plus de 90 jours chez un adulte et à plus de 30 jours chez un enfant.

f) Lymphopénie

La constatation d'une lymphopénie sur un résultat d'hémogramme est une situation relativement fréquente, mais en identifier la cause par l'examen du frottis sanguin est en revanche une occurrence trop rare pour retenir cette anomalie comme critère d'étalement. Les lymphoagglutinations in vitro EDTA-dépendantes sont exceptionnelles et restent sans conséquences cliniques.

g) Monocytose

La revue du frottis sanguin est préconisée devant une monocytose > 1.5 G/l découverte sur un premier hémogramme, quel que soit l'âge du patient. Elle permet de vérifier la réalité de la monocytose, diverses situations pouvant rendre malaisée l'identification des monocytes par les automates d'hématologie (déficit en myéloperoxydase, présence de cellules anormales localisées près du nuage monocytaire, activation des monocytes au cours des états infectieux sévères...).

Elle permet également de rechercher des anomalies morphologiques et/ou des cellules malignes pouvant orienter vers une pathologie monocytaire aiguë ou chronique.

Au cours du suivi, une monocytose $> 1,5$ G/l persistant plus de 30 jours fait recommander un nouvel examen du frottis, particulièrement orienté vers la recherche d'anomalies en faveur d'une leucémie myélo-monocytaire chronique

ou d'une leucémie myélo-monocytaire juvénile. Une monocytose apparaissant en cours d'hospitalisation est le plus souvent réactionnelle et transitoire (dans un contexte chirurgical par exemple) ; elle justifie un contrôle morphologique si elle est importante (seuil à définir par chaque laboratoire).

h) Monocytopénie

Une monocytopénie sanguine absolue est presque toujours observée au cours de la leucémie à tricholeucocytes et sa constatation sur l'hémogramme automatisé devrait en théorie représenter un bon critère pour déclencher la recherche microscopique de ces éléments pathologiques.

En pratique cependant, les tricholeucocytes sont dans la plupart des cas comptés à tort comme des monocytes par les analyseurs et la formule automatisée ne montre alors pas de monocytopénie. De ce fait, c'est bien davantage la constatation d'une neutropénie chez un adulte d'âge mûr qui doit à notre sens inciter le biologiste à rechercher des tricholeucocytes sur le frottis sanguin.

III-3-4 Alarmes qualitatives et anomalies des graphes leucocytaires

➤ Alarme « Déviation gauche »

La revue du frottis et la réalisation d'une formule optique ne sont pas nécessaires dans ce cas. Les indices de diffraction permettant de détecter une hyposegmentation ou une hypogranularité semblent plus intéressants à utiliser lorsqu'ils sont disponibles, afin de détecter la dysplasie granulocytaire.

➤ Alarme « Granulocytes immatures »

En situation initiale ou en suivi, cette alarme nécessite la réalisation d'une formule optique si l'automate n'effectue pas la quantification de cette population. Avec les automates qualifiés pour ce type de numération et en fonction des recommandations du fabricant, il est préconisé de revoir le frottis en situation initiale, mais celui-ci n'apparaît pas indispensable au cours du suivi.

➤ Alarmes « Lymphocytes anormaux ? » et « Blastés ? »

Ces alarmes imposent, à chaque fois, la réalisation du frottis sanguin. En l'absence de cellules anormales (réactionnelles ou malignes), la formule de l'automate est préférentiellement rendue.

➤ Graphe leucocytaire anormal, sans alarme générée par l'automate

En cas de mauvaise séparation des sous-populations leucocytaires et chaque fois que l'anomalie se présente, une formule microscopique doit être réalisée.



Conclusion



La tendance à augmenter le degré de l'automatisation des LBM concerne toutes les disciplines, l'hématologie ne fait pas exception, les progrès technologiques actuels assurent une analyse des échantillons sanguins avec une cadence élevée et fournissent des résultats précis et reproductibles concernant tous les paramètres de l'hémogramme grâce à l'utilisation d'une combinaison de principe de mesure qui diffère selon le type d'AHC (impédance, diffraction optique d'un rayon laser, cytochimie sélective, courant à haute fréquence, cytométrie de flux par fluorescence, lyse chimique, spectrophotométrie, marquage spécifique par des marqueurs visant les antigènes membranaires des cellules sanguines). Cependant diverses conditions préanalytiques ou inhérentes au principe d'analyse des paramètres de l'hémogramme sont susceptibles d'induire des résultats erronés, ce qui exige au biologiste la bonne connaissance du principe de fonctionnement de son automate et sa qualification préalable, la vigilance pendant la validation des résultats et la mise au point des procédures dégradées, mentionnant comment il faut agir sur le plan technique et sur le plan biologique, ainsi que les niveaux de pertinence et d'urgence médicale surtout pour les anomalies qui sont suffisamment fréquentes.



Résumés



RESUME

Titre: Automatisme en hématologie cellulaire

Auteur: NQUILA Faiza

Mots clés: automates d'hématologie, compteurs de cellules, erreurs de décompte, hémogramme automatisé

A la fin du XX^{ème} siècle, Walter et Joseph Coulter ont inventé un dispositif de comptage des hématies et des leucocytes. Celui-ci présente le début du progrès technique en hématologie cellulaire. L'automatisation apporte encore aujourd'hui de nouvelles innovations qui améliorent la qualité des analyses et permet l'identification d'autres paramètres, impossibles d'obtenir par microscopie optique, qui se sont avérés utiles dans plusieurs conditions cliniques.

Dans notre travail, nous avons souligné l'importance des méthodes automatisées de l'hémogramme par rapport aux méthodes manuelles, tout en mettant en relief l'aide inestimable qu'apporte l'usage des automates. Nous nous sommes intéressés aux anomalies et erreurs de numération de tous les paramètres de l'hémogramme.

L'hématimétrie manuelle comprend un examen quantitatif, examen qualitatif et le calcul des indices érythrocytaires.

Selon le type d'AHC plusieurs méthodes de mesure sont utilisées en différentes association : impédance, diffraction optique d'un rayon laser, cytochimie sélective, courant à haute fréquence, cytométrie de flux par fluorescence, lyse chimique, spectrophotométrie, immunomarquage cellulaire visant les antigènes membranaires des cellules sanguines.

Malgré le perfectionnement des AHC, dans certaines situations ; dues non seulement aux automates mais aussi à des particularités de la pathologie du patient, à différentes conditions préanalytiques ou à des modifications induites après le prélèvement, les AHC peuvent conduire à des résultats erronés. Ces erreurs concernent tous les paramètres de l'hémogramme que les biologistes doivent détecter afin d'éviter aux patients des procédures diagnostiques et thérapeutiques inutiles et coûteuses.

D'où la nécessité d'être vigilant, pendant la validation des résultats, d'exiger la qualification continue des automates, et élaborer des plans d'action techniques et biologiques. Les plans d'action incluent des règles d'expertise pour le recours à l'examen du frottis sanguin.

ABSTRACT

Title: Automation in cellular hematology

Author: NQUILA Faiza

Keywords: automated hematology, cell counters, counting errors, automated blood count

At the end of the twentieth century, Walter and Joseph Coulter invented a device for counting of red blood cells and white blood cells. This one present the beginning of technical progress in cellular hematology. Automation brings even today's new innovations that improve the quality of analysis and allows identification of other parameters that are impossible to obtain by optical microscopy, which have proved useful in various clinical conditions.

In our work, we have emphasized the importance of automated methods of blood counts over manual methods while highlighting the invaluable support given by the use of automated. We were interested to count anomalies and errors of all parameters of the blood count.

The Manual blood cell count comprises a quantitative examination, qualitative examination and the calculation of the erythrocyte indices.

According to the type of AHC several methods of measurement are used into different association: impedance, optical diffraction of a laser beam, selective cytochemistry, high frequency current, cytometry of flow by fluorescence, chemical lysis, spectrophotometry, specific marking by markers aiming at the membrane antigens of the blood cells.

Despite the perfection of automats, in some situation; owed not only to automats, the AHC can lead to erroneous results. These errors relate to all the parameters of the blood count that the biologists must detect to avoid the patients of the useless and expensive diagnostic procedures and therapeutic.

Where from the necessity of being vigilant, during the validation results, the requirement of the qualification continue automats, and the elaboration of the technical and biological action plans. The action plans include rules of expertise for the recourse in the examination of the blood smears.

ملخص

العنوان: التحكم و الأتمتة في علم الدم الخلوي

من طرف: انقيلة فايزة

الكلمات الأساسية: الآلي، عدادات الخلايا، عد الدم الكامل باستخدام الآلي، مشاكل العد

في أواخر القرن العشرين، قام والتر وجوزيف كولتر باختراع جهاز لعد خلايا الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء . وهذا يدل على بداية التقدم التقني في علم الدم الخلوي. الأتمتة يجلب حتى اليوم ابتكارات جديدة من شأنها تحسين جودة التحليل ويسمح بتحديد مجموعة من البارامترات الأخرى التي من المستحيل الحصول عليها بواسطة المجهر الضوئي ، والتي تبين أنها مفيدة في العديد من الحالات الطبية.

لقد سلطنا الضوء في عملنا وأكدنا على أهمية أساليب الآلي لعد الدم مقارنة بالطرق اليدوية مع إبراز القيم التي يجلبها استخدام الآلي. كما اهتمنا أيضا بالشذوذ والأخطاء التي يمكن الوقوع فيها بالنسبة لجميع معلمات عد الدم الكامل.

عد الدم اليدوي يضم الفحص الكمي لعدد خلايا الدم، والفحص النوعي وحساب مؤشرات كرات الدم الحمراء. اعتمادا على نوع الآلي هناك عدة طرق تستخدم للقياس في تركيبات مختلفة : مقاومة ، الحيود الضوئي من شعاع الليزر ، الكيمياء الخلوية الإنتقائية ، الترددات الحالية المرتفعة ، التدفق الخلوي الفلوري ، التحلل الكيميائي ، الطيفي ، وسم باستعمال علامات خاصة بمستضدات غشاء خلايا الدم.

أيا كانت المنهجية التحليلية للآلي فهو يمكن من تحسين جذري في نوعية النتائج، لضمان استنساخ ودقة أفضل. لكن في بعض الحالات التي لا ترتبط فقط بالآلي وإنما أيضا بخصوصيات علم الأمراض عند مريض معين وفي مختلف ظروف ما قبل التحليل، أو التعديلات التي قد تطرأ بعد سحب عينة من الدم، يمكن للآلي أن يؤدي إلى نتائج خاطئة. وتتعلق هذه الأخطاء بجميع معلمات عد الدم الكامل. يجب على علماء الأحياء الكشف عن هذه المزالق لتجنب الإجراءات التشخيصية والعلاجية غير الضرورية والمكلفة. ومن هنا تتبين الحاجة إلى توخي الحذر أثناء المصادقة على صحة النتائج، ويجب اشتراط التأهيل المستمر للآلي ووضع خطط عمل تقنية وبيولوجية. وتشمل هذه الخطط قواعد الخبرة من أجل فحص مسحات الدم.



Références



- [1] **Gruyer M**, automatisme : origine du mot[en ligne]. L'aaAGR [cité le 02 /7/ 2015] ; [environ 2 écrans]. Disponible à l'URL : <http://Automatisme-alfred-georges-regner.fr>
- [2] **Bernard J, Leporrier M**. HÉMATOLOGIE [En ligne]. Encyclop Univer [cité le 01 9/2015].Disponible à l'URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedia/hematologie/>
- [3] **Bryon PA**. Et hématologie cellulaire. Rev Fr des Labo, janvier/février 2000;(319) : 11
- [4] **Moquin JP**. Comment maximiser les données de la formule sanguine. Le Médecin du Québec[en ligne]. 2003 ; 38(10) : 42-48. Disponible à l'URL : <http://lemedecinduquebec.org/Media/78445/042-048MOQUIN1003.pdf>
- [5] **Coulter W**. High Speed Automatic Blood Cell Counter and Cell Size Analyzer. National electronics conférence Chicago[en ligne].3/10/1956[cite le15/9/2015] ; [11pages]. Disponible à L'URL : <http://whcf.org/wp-content/uploads/2015/05/1956-WHC-NEC-Paper.pdf>
- [6] **Bohuon C**. L'évolution des outils. Ann Biol Clin. 2000; 58(1):7.
- [7] Leblond PF. Failles et secrets des automates d'Hématologie (cellulaire). In : Nathalie Rodrigue, dir. congrès 2013 OPTMQ, être l'épicentre de sa compétence ; 6-8 juin 2013 ; Québec. 2013. p 1-22. Disponible à l'URL : http://www.academia.edu/5742951/201303_1_Failles_et_secrets_des_automates_d_H%C3%A9matologie_cellulaire_
- [8] **Bernard J, levy JP, Varet B, Clauvel JP, Rain JD, Sultan Y**. Hématologie. 7ème édition. Paris : MASSON ; 1990.
- [9] **Bessis M**. Cellules du sang normal et pathologique. Paris : MASSON ET Cie; 1972

- [10] **Pierson A.** Techniques et procédures de laboratoires Techniques Hématologiques Dosage de l'hémoglobine[en ligne].GLOBE, 11/ 2008[mise à jour 11/2015 ; cité le 20 /9/2015]; [environ 2 écrans].disponible à l'URL : <http://www.globe-network.org/fr/biologie/enseignement-a-distance/fiches-techniques-et-et-procedures/bioltrop/dosage-de-l-hemoglobine>
- [11] **Amou Ch.** Confession, coloration et examen des frottis[en ligne]. Université d'Abomey- Calavi biologie et médecine, 2002[mise à jour 10/2015 ; cité le 30/9/2015] ; [environ 4 écrans].disponible à l'URL : http://www.memoireonline.com/10/13/7583/m_Confession-coloration-et-examen-des-frottis0.html
- [12] **Demas V.** Hémogramme : Indications et Interprétation1[en ligne]. Université Médicale Virtuelle Francophone, 2009[11/2015; cité le 2/10/2015] ; [23pages]. Disponible à l'URL: http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem3/module14/316%20Hemogramme%20%20Indications_Interpretation.pdf
- [13] **Lfrah N, Cahn JY.** Hématologie. 2^{ème} édition. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2014.
- [14] **Haralad T, Heinz D, Torsten H.** Atlas de poche d'hématologie. 2ème édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences.2006.
- [15] **Dolisi G.** Réalisation d'un frottis sanguin coloré [En ligne]. BioTop [Mise à jour le 7/11/ 2013 ; cité le 20/10/2015] ; [environ 2 écrans]. Disponible à l'URL : http://www.bio-top.net/Microbio/TP/Frottis_realisation.htm
- [16] **Mollard JF.** Hématocrite : les techniques de mesure et leurs limites dans le cadre de la gazométrie sanguine. Annales de Biologie Clinique. 2003;61(2):165-74.

- [17] **Münster M.** SEED Hématologie : Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex Bulletin d'information SEED-Afrique(4) [En ligne]. Sysmex, 2012[cité le 4/11/ 2015] ; [8 pages]. Disponible à l'URL : http://www.sysmex.co.za/fileadmin/media/fl12/SEED/French/Sysmex_SEED_4_2012_FR-RED_CELL_INDICES_150_DPI.pdf
- [18] **Flamand B.** Automatisation de l'Hémogramme[En ligne].IUT Dijon. [Cité le 23/9/2015]; [68 écrans]. Disponible à l'URL : http://public.iutenligne.net/biologie/flamand/hematocyto/4_Automatisation_Hemogramme.ppt
- [19] **Steiger A.** L'analyse automatisée de l'hémogramme de la lignée rouge. Pt vue hémato[en ligne]. 2010 [cité le 11/11/2015] ; (4) : [2 pages]. Disponible à l'URL : http://www.mqzh.ch/cm/images/bph/bp_2010_4_2.pdf
- [20] **Berge F, Maggiore G, Frenkian A.** Cahier technique. Point sur les avancées technologiques en hémocytométrie aux JIB 2011. IRBM News. 2012 ; 33 (3).
- [21] Le Grand conseil de la République et canton de Genève .Projet de loi PL 10508 ouvrant un crédit au titre d'indemnité d'investissement de 2 500 000 F pour financer l'acquisition d'une chaîne automatisée de laboratoire au service de médecine génétique et de laboratoire des Hôpitaux Universitaires de Genève[En ligne]. Projet présenté par le Conseil d'Etat Date de dépôt : 26/6/ 2009. Disponible à l'URL : <https://www.ge.ch/grandconseil/data/texte/PL10508.pdf>
- [22] **DAUNIZEAU A, PERRIER JJ.** Automatisation et gain de productivité au laboratoire. Spectra biol. 2006 ;(151): 21-24.

- [23] **Agostini A, Fournier J, Luthi R.** Protocoles d'analyses du sperme et des interactions spermatozoïdes : glaire cervicale- Identification de leucocytes par coloration des peroxydases[En ligne]. FGFRM, 7/ 2015 [Cité le 08/10/2015] ; [environ 2 écrans]. Disponible à l'URL : http://www.gfmer.ch/Livres/Lab_andrologie/identification_de_leucocytes.htm
- [24] **LOUATI N, BEN AMOR I, CHERIF J, TRABELSI J, REKIK H, FEKI H, GARGOURI J.** Hémoglobine predon : intérêt de l'hémofast®. J.I. M. Sfax. 2010; 19(20) :20 – 24.
- [25] **CUTTÉ P.** Hématologie de l'automate de NF à l'analyse cellulaire : aboutissement de l'automatisation de l'hématologie. IRBM News 2008 ; 29 (3-4): 24-31.
- [26] **Münster M, SEED** Hématologie : Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex Bulletin d'information SEED-Afrique(5) [En ligne]. Sysmex, 2011[cité 10 /11/2015] ; [6pages]. Disponible à l'URL : [http://www.sysmex.co.za/fileadmin/media/fl12/SEED/French/SYSMEX SEED5_Hematologie_de_base.pdf](http://www.sysmex.co.za/fileadmin/media/fl12/SEED/French/SYSMEX_SEED5_Hematologie_de_base.pdf)
- [27] **dos Santos de Bitencourt ED, Voegeli CF, dos Santos Onzi G, Cardoso Boscato S, Ghem C, Munhoz T.** Validation of the Sysmex sp-1000i automated slide preparer-stainer in a clinical laboratory. Rev bras hematol hemoter.2013 ; 35(6) : 404-8.
- [28] **SYSMEX.** Unité de Préparation de Lame Hématologique Automatisée SP-1000iMC de Sysmex. [En ligne], 2015. Disponible à l'URL : <https://www.sysmex.com/ca/fr/Products/Hematology/Sysmex-Hematology-Automation/Pages/Sysmex-Hematology-Automation.aspx>
- [29] **RAL DIAGNOSTICS.** Biologie humaine hématologie. Colorations de Wright. RAL DIAGNOSTICS [Cité 22/11/ 2015]. Disponible à l'URL : <http://www.ral-diagnostics.fr/solutions/biologie-humaine-hematologie/coloration-de-wright/>

- [30] **College of American Pathologists.** Hematologyanalyzers [en ligne].CAP TODAY. 12 /2012[cité le 15/12/ 2015] ; [11 pages].Disponible à l'URL : http://www.cap.org/apps/docs/cap_today/1212/1212g_in_hematology.pdf
- [31] **Larcher Ch. LES UNOPETTES®[En ligne].** [Cité le 24/2/ 2016] ; [Environ 2 écrans]. Disponible à l'URL : <http://christelle.larcher.free.fr/IMG/pdf/6-unopettes.pdf>
- [32] **Vesseron S, Hyvert A, Margas JM, Massei A.** Le congrès annuel 2014 de l'American Association of Clinical Chemistry (AACC) ; 27 au 31 juillet ; Chicago. IRBM News 2015 ; 36 (1) Elsevier Masson.
- [33] **Margas JM.** Hématologie cytologique : les évolutions. IRBM News 2014; 35 (2): 1-3.
- [34] **SYSMEX. XE-5000MC** Système Hématologique Automatisé Un Choix Complet[En ligne].Sysmex [cité aout 2015]. Disponible à l'URL : <https://www.sysmex.com/ca/fr/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-5000-Hematology-Analyzer.aspx>
- [35] **Abbott diagnostics.** CELL-DYN SMS SlideMaker/Stainer[en ligne]. Abbott diagnostics, 2015 [Cité le 24 février 2015] ; [environ 3 écrans]. Disponible à l'URL : https://abbottdiagnostics.com/region_advance_int_en_US.html?requestedURI=/en-int/products/CELL-DYN-SlideMaker-Stainer.html®ion=OUS
- [36] **Beckman coulter.** UniCel DxH Slidemaker Stainer Coulter Cellular Analysis System [En ligne]. Beckman coulter, 2015[Cité le 24 février 2016] ; [environ 3écrans]. Disponible à l'URL : <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/diagnostics/clinical-products/hematology/unicel-dxh-slidemaker-stainer-coulter-cellular-analysis-system/index.htm>

- [37] **CHEVALIER B, BUISSOH Y, MEYRAH M.** Choix d'automates en hématologie : Guide d'utilisation. Rev franc labo. 1996 ; 1996(284) : 83-8.
- [38] **COFRAC**, Section santé humaine. SH-GTA-04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. [En ligne].2011. Disponible à l'URL : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
- [39] **COFRAC**, Section santé humaine. SH-GTA-06 : Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. [En ligne].2012. Disponible à l'URL : <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>
- [40] **Marteau-Tessier A, Geneviève F, Godon A, Macchi.L, Zandecki M.** Anomalies et erreurs de détermination de l'hélogramme avec les automates d'hématologie cellulaire Partie 1. Les plaquettes sanguines. Ann Biol Clin. 2010 ; 68 (4): 393-407.
- [41] **Imbert M, Jouault H.** Difficultés de validation d'un hélogramme sur automate : indications du recours à des techniques manuelles. Rev fran des lab, mars 2005 ;(371): 25-32.
- [42] **NakuI-Aquaronne D, El Yakine A, Starck B, Bayle J.** Les pièges de la numération automatique des plaquettes. Rev fran des lab, novembre 2002; (347): 21-5.
- [43] **Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A.** Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. Int J Lab Hematol. 2007 Feb; 29(1):4-20.
- [44] **Hincker B, Bethesda-Sleidan, Erstein P et al.** THROMBOPENIE ET AGREGATS PLAQUETTAIRES -MORPHOLOGIE DES ROUGES. Laboratoire BIO67-BIOSPHERE : Lettre d'information Octobre 2015; (47):1-2.

- [45] **Gérôme P, Cardon N, Crevon L, Ehrmann P, Dusseau JY, Masseron T, Chaulet JF, Bercion R.** Un artefact de laboratoire à dépister : la pseudothrombocytopénie liée à l'EDTA. *Ann Biol Clin.*2003; 61(1): 88-93.
- [46] **Silvestri F, Virgolini L, Savignano C, Zaja F, Velisig M, Baccarani M.** Incidence and diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a consecutive outpatient population referred for isolated thrombocytopenia. *Vox Sang* 1995; 68(1): 35-9.
- [47] **Kamath V, Sarda P, Chacko MP, Sitaram U.** Pseudothrombocytopenia observed with ethylene diamine tetra acetate and citrate anticoagulants, resolved using 37°C incubation and Kanamycin. *Indian J Pathol Microbiol.* 2013; 56: 306-8.
- [48] **Sawazaki A, Nakamura N, Jyokaji H, Nakamura N et al.** Guillain-Barre Syndrome and Ethylene Diamine Tetraacetic Acid-Dependent Pseudothrombocytopenia Associated with Mumps. *INTER MED.* JANUARY.1997; 35(12): 996-9.
- [49] **Michelson AD.** PLATELETS, Second Edition. California: Academic Press; 2007.
- [50] **Drachman JG.** Inherited thrombocytopenia: when a low platelet count does not mean ITP. *Blood* 2004. Jan 15; 103(2):390-8.
- [51] **Yoshikawa T, Nakanishi K, Maruta T, Takenaka D, Hirota S, Matsumoto S, Saigo K, Ohno Y, Fujii M, Sugimura K.** Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia occurring after transcatheter arterial embolisation for hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2006 Aug; 36(8): 527-31.
- [52] **Sane DC, Damaraju LV, Topol EJ, Cabot CF, Mascelli MA, Harrington RA, Simoons ML, Califf RM.** Occurrence and clinical significance of pseudothrombocytopenia during abciximab therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Jul; 36 (1):75-83.
- [53] **Dalal BI, Brigden ML.** Artifacts that may be present on a blood film. *Clin Lab Med.* 2002 Mar; 22(1):81-100.

- [54] **Bizzaro N.** EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol* 1995; 50: 103–9.
- [55] **Casonato A, Bertomoro A, Pontara E, Dannhauser D, Lazzaro AR, Girolami A.** EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet GPIIB-IIIA. *J Clin Pathol* 1994; 47: 625-30.
- [56] **Rotoli B.** Transplacental transmission of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Haematologica*. 1999; 84: 664.
- [57] **Kunicki Th J, Newman PJ.** The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood*. 1992; 80: 1386–404.
- [58] Association de biologie praticienne. Résultats des confrontations en cytologie hématologique. Sous-estimation modérée de la numération plaquettaire par satellitisme des plaquettes autour des neutrophiles[En ligne]. 5/2010[cité le 15/12/2015] ; [2pages]. Disponible à l'URL : <http://www.abioprati.com/resultats/cytohemato/cytohe10%202.pdf>
- [59] **Dauendorffer JN, Latger-Cannard V, Lesesvre JF, Lecompte T.** Satellitisme des plaquettes aux polynucléaires neutrophiles. *Ann Biol Clin*. 2000;58(1): 91-3.
- [60] **Debourgogne A, Latger-Cannard V, Montagne K, Plénat F, Lecompte T.** Satellitisme plaquettaire et lympho-agglutination exclusivement aux lymphocytes atypiques révélant un lymphome B de la zone marginale. *Annales de Biologie Clinique*. 2007;65(3):287-90. doi:10.1684/abc.2007.0053.
- [61] **Espanol I, MUÑIZ-DIAZ E, DOMINGO-CLARÓ A.** Platelet satellitism to granulated lymphocytes. *Haematologica* .2000; 85:1322.
- [62] **Siegenthaler M, Spertini O.** Spurious Platelet Count. *N Engl J Med*. 2006; (354):1936

- [63] **Deschènes Dion S, Bérard M, Callaghan Sh, Debbie Provencher M, Cousineau D.** Hématologie-règles normatives. L'O.P.T.M.Q[en ligne]. 2001 : 4-9. Disponible à l'URL :
<http://optmq.org/wp-content/uploads/2012/08/HEMATO.pdf>
- [64] **Trimoreau F, Perroud P, Boyer J, Gachard N.** Constantes pré-analytiques en hémocytométrie-cytologie. Rev Fr Lab. 1999; (317): 71-80
- [65] **Trimoreau F, Martin C, Gachard N, Feuillard J.** Phase pré-analytique en hématologie cellulaire de routine. Jr de Bio Med. Avr-Juin 2013 ; 2(5) : 20-6
- [66] **Fohlen-Walter A, de Maistre E, Vigneron C, Lecompte T, Lesesve, JF.** Risque de sous estimation de la numération plaquettaire par augmentation du volume plaquettaire moyen enfin de grossesse. Ann Biol Clin. 2003 ; (61): 589-92
- [67] **Latger-Cannard V.** Thrombopénies constitutionnelles. Hématologie [en ligne]. 2008 ;(14): 387-91. Disponible à l'URL :
https://www.workspace.swe.siemens.com/content/10000003/academie/secmat/2013-%20-%20AF5%20Physiologie%20et%20pathologie%20plaquettaires%20-%2011%20avril%202013/Pr%C3%A9sentation%20V.Latger-Cannard_AF5_11%20avril%202013.pdf
- [68] **Boutroux H, Tabone MD, Lapillonne H, Favier R, Leverger G.** Les thrombopénies constitutionnelles. Réalit pédiatriq. Janvier 2014 ;(183) : p 32
- [69] **Fenneteau O, Hurtaud-Roux MF, Schlegel N.** Aspect cytologique normal et pathologique du sang chez le nouveau-né et le jeune enfant. Ann Biol Clin. 2006;64(1):17-36.
- [70] **Latger-Cannard V, Salignac S, Salmon A, Mansuy L, de Maistre E, Botte C, Bordigoni P, Schlegel N, Lecompte T.** Validation et classification clinicobiologique d'une thrombopénie. Ann Biol Clin. 2005; 63(6):599-610.

- [71] **Trichet C, Beauchamp-Nicoud A, Proulle V, Bader-Meunier B, Tchernia G, Dreyfus M.** Constitutional thrombocytopenia: from clinical features to biological findings. *Hémato*. 2003;9(6):439-55.
- [72] **Boyer-Neumann C.** Hémostase physiologique de la grossesse. *Rev Francoph des Labo*. Février 2012 ;(439) :7-9
- [73] **Haute autorité de santé.** Purpura thrombopénique immunologique de l'enfant et de l'adulte Protocole national de diagnostic et de soins. HAS. 2009.
- [74] **Latger-Cannard V, Lacroix F, Devignes J, Salignac S, Bensoussan D, Salmon A et al.** Thrombopénie persistante chez un enfant : l'examen morphologique des plaquettes a conduit au diagnostic de syndrome de Wiskott-Aldrich. *Ann Biol Clin*. 2008; 66(1): 100-4.
- [75] **Latger-Cannard V, Proust A, Devignes J, Salignac S, Bensoussan D, Salmon A et al.** Syndrome de Wiskott-Aldrich chez un enfant révélé par l'examen morphologique attentif des plaquettes. *Hématologie*. 2008;14(5): 387-91.
- [76] **Aladjidi N, Bordeaux.** Quand évoquer une thrombopénie constitutionnelle et comment s'orienter ? SHIP [en ligne].1/2015 [Cité le 18 /11/2015] :15-42. Disponible à l'URL :

http://www.adrhecduhemostasecliniquelyon.com/DIU_CLINIQUE/Cours_Hemorragie/4%20Jeudi%20PDF%20DIU%20THC/5%20DIU%20THC%20%202015%20Thrombop%E9nies%20constitutionnelles%2020115.pdf
- [77] **Moreno A, Menke D.** Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. *Clin Lab Med*. 2002 Mar; 22(1):193-213.
- [78] **Dubois-Galopin F, Lamballais F, Rapatel Ch, Berger MG.** XE-2100 : amas de plaquettes ou de leucocytes, telle est la question.... *Ann Biol Clin*. 2010;68(4): 480-84.

- [79] **Lesesve JF, Haristoy X, Thouvenin M, Latger-Cannard V, Buisine J, Lecompte T.** Pseudoleucopénie par leuco-agglutination in vitro des polynucléaires neutrophiles : expérience d'un laboratoire, revue de la littérature et conduite proposée. *Ann Biol Clin.* 2000; 58(4):417-24.
- [80] **Shimizu M, Yamamoto M, Miyachi H, Shinohara Y, Ando Y.** Simple, rapid, and automated method for detection of hyperaggregability of platelets using a hematology analyzer. *Am J Hematol.* 2003 Apr; 72(4): 282-3.
- [81] **Schved JF, Sarlat C, Gris JC.** Recommandations pratiques pour la réalisation des tests d'hémostase: du prélèvement au contrôle de qualité. *Rev Franç Labo.* janvier 1995; (272) : 19-25.
- [82] **Agouram T.** Les cahiers d'hématologie : Cahier d'hématologie N° 2 : la cytologie hématologique. University of aberdeen. Harvad medical
- [83] **van der Meer W, MacKenzie M A, Dinnissen J W B, de Keijzer M H.** Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. *J Clin Pathol.* 2003; (56):772- 4.
- [84] **Gloster ES, Strauss RA, Jimenez JF, Neuberg RW, Berry DH, Turner EJ.** Spurious elevated platelet counts associated with bacteremia. *Am J Hematol* 1985; (18): 329-32.
- [85] **Kakkar N.** Spurious rise in the automated platelet count because of bacteria. *J Clin Pathol.* 2004; 57(10): 1096-7.
- [86] **Gérard J, Lebas E, Godon A, Blanchet O, Geneviève F, Mercat A, Zandecki M.** Présence de bactéries libres et intraleucocytaires sur l'étalement sanguin : une situation rare mais de pronostic vital. *Ann Biol Clin.* 2007 ; 65 (1) : 87-91.

- [87] **Szymanowicz A et al.** Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux. SPECTRA BIOLOGIE. Septembre - Octobre 2007 ;(161) : 47-58.
- [88] **Fohlen-Walter A, Lesesve JF, Jacob C, Latger-Cannard V, de Maistre E, Hulin C et al.** Diagnostic d'hémopathies lymphoïdes à partir de la découverte d'une cryoglobulinémie. Ann Biol Clin. 2001; 59(1):84-9.
- [89] **Kakkar N, John MJ, Mathew A, Chawla R.** Spurious platelet count due to cryoglobulins in a patient with smoldering myeloma 2014 ; 57 (3): 476-79.
- [90] Association de biologie praticien. Confrontations ABP en cytologie hématologique. Thrombopénie masquée par une cryoglobulinémie [Enligne]. 2010 [cité le 20/12/2015] ; [environ 12 écrans]. Disponible à l'URL: <http://hematocell.univ-angers.fr/confrontationsabp/dossiers.php?act=view&id=100>
- [91] **Geneviève F, Godon A, Marteau-Tessier A, Zandecki M.** Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire Partie 2. Numération et formule leucocytaires. Ann Biol Clin 2012; 70 (2): 141-54.
- [92] **Cantero M, Conejo JR, Jimenez A.** Interference from lipemia in cell count by hematology analysers. Clin Chem 1996; (42): 987-8.
- [93] **Ileri NS, Buyukasik Y, Karaahmetoglu S, Demiroglu H, Muftoglu O, Dundar S.** Pseudoleukocytosis and Pseudothrombocytosis in Cryoglobulinemia. Tr. J. of Medical Sciences. 1998; (28): 299-302.
- [94] **Fohlen-Walter A, Jacob Ch, Lecompte Th, Lesesve JF.** Laboratory Identification of Cryoglobulinemia From Automated Blood Cell Counts, Fresh Blood Samples, and Blood Films. Am J Clin Pathol. 2002; 117: 606-14.
- [95] **Lesesve JF, Haristoy X, Fisher B, Goupil JJ, Lecompte T.** Agglutination in vitro EDTA-dépendante des lymphocytes. Ann Biol Clin. 2001;59(4):497-501.

- [96] **Jean-François Lesesve, Liliana Vila, Pierre Blonski, Henry Pierson, Caroline Penn, Xavier Troussard.** Agglutination EDTA-dépendante des lymphocytes. *Hémato.* 2009;15(2):154-60.
- [97] **Whiteway AJ, Bain BJ.** Artefactual elevation of an automated white cell count following femoral vein puncture. *Clin Lab Haematol.* 1999 Feb; 21(1):65-8.
- [98] **Lesesve JF, Khalifa MA, Denoyes R, Braun F.** Peripheral blood candidosis infection leading to spurious platelet and white blood cell counts. , *Int. Jnl. Lab.* JUNE 2008; 1-6
- [99] **Elghetany MT, Hudnall SD.** Spurious automated white cell count with Coulter STKS in the myelodysplastic syndromes suggests the presence of a red cell membrane defect. *Am J Hematol.* 1996; (52): 69.
- [100] **Briggs C, dacosta A, Freeman L, Aucamp I, Ngubeni B, Machin SJ.** Development of an automated malaria discriminant factor using VCS technology. *Am J Clin Pathol.* 2006; (126): 691-8.
- [101] **Buttarelo M, Plebani M.** Automated blood cell counts. State of the art. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130: 104-16.
- [102] **Ducrest S, Meier F, Tschopp C, Pavlovic R, Dahinden CA.** Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers. *Allergy.* 2005; (60): 1446-50.
- [103] **Hur M, Lee YK, Lee KM, Kim HJ, Cho HI.** Pseudobasophilia as an erroneous white blood cell differential count with a discrepancy between automated cell counters: report of two cases. *Clin Lab Haem.* 2004; (26): 287- 90.

- [104] Jin Huh H, Young Oh G, Won Huh J, Lae Chae S.** Malaria detection with the Sysmex XE-2100 hematology analyzer using pseudoeosinophilia and abnormal WBC Scattergram. *Ann Hematol.* 2008; (87): 755–9.
- [105] Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R.** Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; (126): 336-42
- [106] Imeri F, Herklotz R, Huber AR, Risch L et al.** Stability of hematological analytes depends on the hematology analyzer used : a stability study with bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica Chimica Acta.* 2008 ; (397): 68-71.
- [107] Godon A, Genevieve F, Marteau-Tessier A, Zandecki M.** Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire Partie 3. Hémoglobine, hématies, indices érythrocytaires, réticulocytes. *Ann Biol Clin.* 2012; 70(2): 155-68.
- [108] Heller Ch, Hinzmann R, Hofmann M, Kaißbold S, Henkel E, Oe Her ich M.** Lipid Interference in the Determination of the Concentration of Haemoglobin in Plasma Using the AC A SX Analyzer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996; (34): 811- 6.
- [109] Sandberg S, Sonstabo K, Christensen NG.** Influence of lipid and leukocytes on the haemoglobin determination by Coulter Counter S Plus III, Technicon H6000, Technicon H1, LK540, Reflotron, and Hemocap. *Scand J Clin Lab Invest.* 1989; (49): 145-8.
- [110] Roberts WL, Fontenot JD, Lehman CM.** Overestimation of hemoglobin in a patient with an IgA-k monoclonal gammopathy. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; (124): 616-8.

- [111] **McMullin MF, Wilkin HJ, Elder E.** Inaccurate haemoglobin estimation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Pathol.* 1995; (48): 787.
- [112] **Goodrick MJ, Boon RJ, Bishop RJD, Copplestone JA, Prentice AG.** Inaccurate haemoglobin estimation in Waldenström's macroglobulinaemia: unusual reaction with monomeric IgM paraprotein. *J Clin Pathol.* 1993; (46): 1138-9.
- [113] **Nikousefat Z, Javdani M, Hashemnia M, Haratyan A, Jalili A.** Cold Agglutinin Disease; A Laboratory Challenge. *Iran Red Crescent Med J.* 2015 October; 17(10): e18954.
- [114] **Leporrier M.** Anémies hémolytiques auto-immunes. *Hématologie.* 2008;14(6):432-41.
- [115] **Babics A, Sanchez C.** Anomalie de la numération sanguine par interférence. *Feuillets de Bio.* SEPTEMBRE 2015; (326): 1-5.
- [116] **Van Duijnhoven HL, Treskes M.** Marked interference of hyperglycemia in measurements of mean (red) cell volume by Technicon H analyzers. *Clin Chem.* 1996; 42 (1): 76-80.
- [117] **Ecran S, Caliskan M, Koptur E.** 70-year old female patient with mismatch between hematocrit and hemoglobin values: the effects of cold agglutinin on complete blood count. *Biochemia Medica.* 2014; 24(3): 391–5.
- [118] **Boisvert AM, Tvedten HW, Scott MA.** Artifactual effects of hypernatremia and hyponatremia on red cell analytes measured by the Bayer H*1 analyser. *Vet Clin Pathol.* 1999; 28(3): 91-6.
- [119] **Goossens W, Van Duppen V, Verwilghen RL.** K2- or K3- EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology ? *Clin Lab Haematol.* 1991; (13): 291-5.

- [120]** **Hinchliffe RF, Bellamy GJ, Lilleyman JS.** Use of the technicon H1 hypochromia flag in detecting spurious macrocytosis induced by excessive K2-EDTA concentration. Clin Lab Haematol. 1992; (14): 268-9.
- [121]** **Hedberg P, Lehto T.** Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire haematology analyzer. Int Jnl Lab Hem. 2009; (31): 87-96.
- [122]** **Imeri F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M, Risch GM, et al.** Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. Clinica Chimica Acta. 2008; (397): 68-71.
- [123]** **Pierre RV.** Reticulocytes. Their usefulness and measurement in peripheral blood. Clin Lab Med. 2002; (22): 63-79.
- [124]** **Corberand JX.** Reticulocyte analysis using flow cytometry. Hematol Cell Ther. 1996; (38): 487-94.
- [125]** **Pappas AA, Owens RB, Flick JT.** Reticulocyte counting by flow cytometry. A comparison with manual methods. Ann Clin Lab Sci 1992; (22): 125-32.
- [126]** **Laurencet FM, Martinez T, Beris P.** Spurious extreme reticulocytosis with an automated reticulocyte analyzer. NEngl J Med 1997; (337): 1922-3.
- [127]** **Riley RS, Ben-Ezra JM, Tidwell A, Romagnoli G.** Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. Hematol Oncol Clin N Am. 2002; (16): 373– 420.
- [128]** **COFRAC, section santé humaine. SH INF 50 rév 01** « portées types d'accréditation » [En ligne].2014. Disponible à l'URL : <http://www.cofrac.fr/fr/search/?find=documentation%5BSH%20INF%2050%5D>

- [129] GENEVIÈVE F, GALOISY AC, MERCIER-BATAILLE D et al.** Revue microscopique du frottis sanguin : propositions du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Feuillet de Biol. 3/2014; (317): 7-16.
- [130] Gulati G, Song J, Dulau Florea A et al.** Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review, Ann Labo Med. 2013; (33): 1-7.



Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir 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 méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوماً وفياً لتعاليمهم.
- ◀ أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبداً في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفيع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- ◀ لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو احتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

والله على ما أقول شهيد

جامعة محمد الخامس – الرباط
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 48

سنة : 2016

التحكم والأتمتة في علم الدم الخلوي

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرفه

الآنسة: فائزة انقبيلة

المزودة في 12 غشت 1990 بالأوداية مراكش

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: الآلي – عدادات الخلايا – عد الدم الكامل باستخدام الآلي – مشاكل العد.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرفة

أعضاء

السيد: عز العرب مسرار

أستاذ في علم الدم البيولوجي

السيدة: سعاد بنكيران

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيدة: مونة نزيه

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيد: عبد الله دامي

أستاذ في الكيمياء الحيوية