

*UNIVERSITÉ MOHAMMED V-RABAT
FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE – RABAT*

ANNEE : 2016

THÈSE N° : 33

LES TECHNIQUES DE COLORATION EN HÉMATOLOGIE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le:.....2016

PAR

Mr ABDELKARIM EL BEKKALI

Né le 06 septembre 1989 à Nador

Pour l'Obtention du Doctorat en pharmacie

**MOTS CLES : coloration, frottis sanguin, MGG, hématologie,
automate de coloration des lames.**

MEMBRES DE JURY

Mr. A. MASRAR

Professeur d'Hématologie biologique

Mme. S. BENKIRANE

Professeur de d'Hématologie biologique

Mme. M. NAZIH

Professeur d'Hématologie biologique

Mr. A. DAMI

Professeur de Biochimie

PRÉSIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة الآية: 31

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ

Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa

Neurologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali

Pr. CHAHED OUZZANI Houria

Pr. EL YAACOUBI Moradh

Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah

Pr. LACHKAR Hassan

Pr. YAHYAOUI Mohamed

Radiologie

Gastro-Entérologie

Traumatologie Orthopédie

Gastro-Entérologie

Médecine Interne

Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib

Pr. DAFIRI Rachida

Pr. HERMAS Mohamed

Chirurgie Pédiatrique

Radiologie

Traumatologie Orthopédie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed

Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*

Pr. CHAD Bouziane

Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne –*Doyen de la FMPR*

Cardiologie

Pathologie Chirurgicale

Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid

Pr. HACHIM Mohammed*

Pr. KHARBACH Aïcha

Pr. MANSOURI Fatima

Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale

Médecine-Interne

Gynécologie -Obstétrique

Anatomie-Pathologique

Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia

Pr. AZZOUZI Abderrahim

Pr. BAYAHIA Rabéa

Pr. BELKOUCHI Abdelkader

Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif

Pr. BENSOUDA Yahia

Pr. BERRAHO Amina

Pr. BEZZAD Rachid

Pr. CHABRAOUI Layachi

Pr. CHERRAH Yahia

Pr. CHOKAIRI Omar

Pr. KHATTAB Mohamed

Pr. SOULAYMANI Rachida

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*

Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique

Décembre 1992

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

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD 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

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
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali

Urologie
Chirurgie Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie Obstétrique

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

Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

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

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - *Dir. HMIMV*
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

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*

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

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*

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Radiologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation

Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

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*

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

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

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

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie

Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

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. DRISSE Sidi Mourad*
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. SABBAB Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

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

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

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
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*
 Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie

Pr. EL HANCI 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

Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

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

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Cardiologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie (*mise en disponibilité*)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie

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

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

Octobre 2007

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

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
ORL
Parasitologie
Anesthésie réanimation **directeur ERSSM**
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Anesthésie réanimation

Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GANA Rachid
Pr. GHARIB Nouredine
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*
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMAHZOUNE Brahim*
Pr. AMINE Bouchra

Psychiatrie
Neuro chirurgie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologie biologique
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
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Rhumatologie

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*

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

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

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

Pr. ERRABIH Ikram	Gastro entérologie
Pr. LAMALMI Najat	Anatomie pathologique
Pr. LEZREK Mounir	Ophtalmologie
Pr. MALIH Mohamed*	Pédiatrie
Pr. MOSADIK Ahlam	Anesthésie Réanimation
Pr. MOUJAHID Mountassir*	Chirurgie générale
Pr. NAZIH Mouna*	Hématologie
Pr. ZOUAIDIA Fouad	Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed	Chirurgie Pédiatrique
Pr. ABOUELALAA Khalil*	Anesthésie Réanimation
Pr. BELAIZI Mohamed*	Psychiatrie
Pr. BENCHEBBA Driss*	Traumatologie Orthopédique
Pr. DRISSI Mohamed*	Anesthésie Réanimation
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna	Chirurgie Générale
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*	Médecine Interne
Pr. EL OUAZZANI Hanane*	Pneumophtisiologie
Pr. ER-RAJI Mounir	Chirurgie Pédiatrique
Pr. JAHID Ahmed	Anatomie pathologique
Pr. MEHSSANI Jamal*	Psychiatrie
Pr. RAISSOUNI Maha*	Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir	Pharmacologie – Chimie
Pr. AIT EL CADI Mina	Toxicologie
Pr. AMRANI HANCHI Laila	Gastro-Entérologie
Pr. AMOUR Mourad	Anesthésie Réanimation
Pr. AWAB Almahdi	Anesthésie Réanimation
Pr. BELAYACHI Jihane	Réanimation Médicale
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain	Anesthésie Réanimation
Pr. BENCHEKROUN Laila	Biochimie-Chimie
Pr. BENKIRANE Souad	Hématologie biologique
Pr. BENNANA Ahmed*	Informatique Pharmaceutique
Pr. BENSEFFAJ Nadia	Immunologie
Pr. BENSGHIR Mustapha*	Anesthésie Réanimation
Pr. BENYAHIA Mohammed*	Néphrologie
Pr. BOUATIA Mustapha	Chimie Analytique
Pr. BOUABID Ahmed Salim*	Traumatologie Orthopédie
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba	Anatomie
Pr. CHAIB Ali*	Cardiologie
Pr. DENDANE Tarek	Réanimation Médicale
Pr. DINI Nouzha*	Pédiatrie
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali	Anesthésie Réanimation
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa	Radiologie
Pr. ELFATEMI Nizare	Neuro-Chirurgie

Pr. EL GUERROUJ Hasnae	Médecine Nucléaire
Pr. EL HARTI Jaouad	Chimie Thérapeutique
Pr. EL JOUDI Rachid*	Toxicologie
Pr. EL KABABRI Maria	Pédiatrie
Pr. EL KHANNOUSSI Basma	Anatomie Pathologie
Pr. EL KHLOUFI Samir	Anatomie
Pr. EL KORAICHI Alae	Anesthésie Réanimation
Pr. EN-NOUALI Hassane*	Radiologie
Pr. ERRGUIG Laila	Physiologie
Pr. FIKRI Meryim	Radiologie
Pr. GHANIMI Zineb	Pédiatrie
Pr. GHFIR Imade	Médecine Nucléaire
Pr. IMANE Zineb	Pédiatrie
Pr. IRAQI Hind	Endocrinologie et maladies métaboliques
Pr. KABBAJ Hakima	Microbiologie
Pr. KADIRI Mohamed*	Psychiatrie
Pr. LATIB Rachida	Radiologie
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra	Médecine Interne
Pr. MEDDAH Bouchra	Pharmacologie
Pr. MELHAOUI Adyl	Neuro-chirurgie
Pr. MRABTI Hind	Oncologie Médicale
Pr. NEJJARI Rachid	Pharmacognosie
Pr. OUBEJJA Houda	Chirurgie Pédiatrique
Pr. OUKABLI Mohamed*	Anatomie Pathologique
Pr. RAHALI Younes	Pharmacie Galénique
Pr. RATBI Ilham	Génétique
Pr. RAHMANI Mounia	Neurologie
Pr. REDA Karim*	Ophthalmologie
Pr. REGRAGUI Wafa	Neurologie
Pr. RKAIN Hanan	Physiologie
Pr. ROSTOM Samira	Rhumatologie
Pr. ROUAS Lamiaa	Anatomie Pathologique
Pr. ROUIBAA Fedoua*	Gastro-Entérologie
Pr. SALIHOUN Mouna	Gastro-Entérologie
Pr. SAYAH Rochde	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. SEDDIK Hassan*	Gastro-Entérologie
Pr. ZERHOUNI Hicham	Chirurgie Pédiatrique
Pr. ZINE Ali*	Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Pr. GHOUNDALE Omar*	Urologie
Pr. ZYANI Mohammad*	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 OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootecnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE 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



Dédicaces



Je dédie cette thèse à...

A mes très chers parents

Amouh et Fatima

*Aucune expression, ni aucune dédicace ne pourrait exprimer mes
meilleures reconnaissances.*

*Vous avez guidé mes premiers pas, et vous étiez toujours une source
intarissable d'amour et de sacrifice.*

*J'espère réaliser en ce jour un de vos rêves, et être digne, toute ma
vie personnelle et professionnelle, de votre éducation et de votre
confiance.*

Puisse Dieu vous protéger, vous accorder santé et longue vie.

A mes très Chers Frères Samir, Jamal, Rachid, Nabil et Aziz

*En témoignage des profonds liens fraternels qui nous unissent. Ces
quelques lignes ne sauront exprimer toute l'affection et l'amour que je
vous porte. Puisse dieu vous procurer santé, bonheur, et prospérité
que vous méritiez.*

A tous mes oncles et mes cousins

*Que ce travail puisse vous exprimer mon profond attachement, mon
amour et mon respect.*

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

A Toute la famille EL BEKKALI

A mes très chers amis

*Ayoub, Yassine, Fayçal, Mohammed, Mohammed-
Amine, Abdelfttah, Hassane, Nidhal, Ahmed, Mamoun, Bouchra,
Mouna, Ikhlâs, Ibtissam, ...*

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous
exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des
confrères sur qui je peux compter.*

*En témoignage de l'amitié qui nous unie et des souvenirs de
tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce
travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

A tous mes amis et camarades de promotion

A tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail

Remerciements



A Allah

Tout puissant

Qui m'a inspiré

Qui m'a guidé dans le bon chemin

Je vous dois ce que je suis devenue

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde.

A

**NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE
MONSIEUR LE PROFESSEUR AZLARAB MASRAR
CHEF DE SERVICE HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE CHU**

*Vous nous avez accordé un immense honneur
et un grand privilège en acceptant la présidence de notre jury de
thèse.*

*Nous vous remercions aussi pour la gentillesse
et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce
travail.*

*Nous vous prions, cher Maître, d'accepter dans ce travail le
témoignage de notre haute considération,
de notre profonde reconnaissance et de notre sincère respect.*

A

NOTRE MAITRE ET DIRECTRICE DE THESE
MADAME LE PROFESSEUR SOUAD BENKIRANE
PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE

Merci pour m'avoir accueilli dans votre service et pour m'avoir accepté ce sujet de thèse, pour la confiance que vous m'avez accordée du début à la fin du travail et pour votre disponibilité.

Vous n'avez jamais lésiné ni sur votre temps ni sur votre savoir tout le long de ce travail.

Merci pour votre soutien, votre patience, vos encouragements et votre optimisme infailible, merci d'avoir trouvé les mots qu'il faut aux moments qu'il faut.

Je n'oublie pas enfin votre aide précieuse dans la relecture et la correction de ma thèse.

Je vous prie de trouver ici, chère Professeur, le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon immense respect.

A

NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE
MONSIEUR LE PROFESSEUR ABDELLAH DAMI
PROFESSEUR DE BIOCHIMIE

Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Nous sommes très sensibles à votre gentillesse, votre accueil très aimable, 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, cher maître, en nos sentiments les plus respectueux.

A

NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE
MADAME LE PROFESSEUR NAZIH MOUNA
PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE

Nous vous remercions vivement de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Votre compétence, votre dynamisme, ainsi que vos qualités humaines et professionnelles exemplaires ont toujours suscité notre admiration.

Qu'il soit permis, chère maître, de vous exprimer notre sincère reconnaissance, notre profond respect et notre plus grande estime

.



Illustrations

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** : Schéma de couleur de Romanowsky
- Tableau II** : Les colorants biologiques certifiés par "The biological stain Commission" 2009
- Tableau III** : Analyseurs hématologiques automatisés avec capacité de comptage à Trois-parties ou plus.
- Tableau IV** : Spécifications générales sur l'automate CELL-DYN SMS
- Tableau V** : Exemple d'un protocole de Coloration de Wright développé pour UniCel DxH-SMS Beckman Coulter
- Tableau VI** : Composition du Kit MCDh de RAL Stainer
- Tableau VII** : Protocole d'échantillonnage de l'automate MIDAS II
- Tableau VIII** : Les paramètres DxH-SMS par défaut et les paramètres modifiés pour réduire l'accumulation de précipité.
- Tableau. IX** : Paramètres de l'automate de préparation des frottis sanguins.
- Tableau. X** : Sous-groupe des échantillons anormaux. Tableau énumérant le diagnostic de tous les patients inclus dans cette étude
- Tableau. XI** : Les critères d'acceptation de lames. Notation utilisée pour évaluer la qualité du frottis sur des lames Préparées et colorées par le DxH SMS.
- Tableau. XII** : Résultat du test de transfert de cellules entre échantillons.
- Tableau. XIII** : Les données de répétabilité ont été générées avec un échantillon d'un patient normal.
- Tableau. XIV** : Classement du décalage à gauche (London Health Sciences **center**).

Tableau XV : Comparabilité des anomalies de formule leucocytaire et évaluation morphologique des globules rouges.

Tableau XVI : Critères pour la morphologie des globules rouges (LHSC)

Tableau XVII : Evaluation de la qualité des frottis sanguins. L'évaluation des frottis sanguins a été effectuée sur toutes les lames réalisées par le DxH-SMS.

Tableau XVIII : +, Réaction positive ; -, Réaction négative ; - / +, réaction négative ou positive ; ANAE, estérase de l'acétate α -naphthyle ; ANBE, estérase du butyrate α -naphthyle ; MPO, myéloperoxydase ; NASDA, estérase du naphthol AS-D chloroacétate ; PAS, acide périodique Schiff ; SBB, le noir du Sudan ;
* Réaction positive dans les myéloblastes, réaction négative dans normoblastes.

Tableau XIX : Les scores d'activité de la PAL

Tableau. XX : Résultats de la coloration à la phosphatase alcaline leucocytaire. (Ces résultats peuvent varier un peu avec les intervalles déterminés par chaque laboratoire)

Tableau XXI : Résultats de la coloration à la phosphatase acide. +, réaction positive ; -, réaction négative

Liste des figures

Figure.1 : Représentation du schéma de l'hématopoïèse

Figure.2 : Schéma d'un globule rouge

Figure.3 : une plaquette vue au microscope électronique

Figure.4 : vue au microscope électronique des globules blancs

Figure.5 : Schéma de la procédure de réalisation d'un frottis

Figure.6 : Exemples de frottis non acceptés, associés aux erreurs de réalisation les plus communes

Figure.7 : Les composants présents dans les colorants Giemsa et d'autres colorants

Figure.8 : Chromatographie sur couche mince d'échantillons commerciaux certifiés d'azur B et la coloration de Giemsa

Figure.9 : Coloration manuelle de Wright

Figure.10 : Myélogramme coloré à la coloration de Wright.

Figure.11 : Frottis sanguin coloré à Wright

Figure 12 : Morphologie des différentes cellules sanguines sur un frottis sanguin coloré au Wright

Figure.13 : Frottis sanguin coloré à la coloration de Wright-Giemsa

Figure.14 : Coloration MGG considérée comme optimale

Figure.15 : Coloration MGG considérée comme inadéquate

Figure.16 : Coloration MGG considérée comme correcte

Figure.17 : T récapitulatif de la morphologie des différentes cellules sanguines colorées à la méthode de MGG

Figure.18 : Unité de Préparation de Lame Hématologique Automatisée SP-1000i de Sysmex

Figure.19 : Distribution du sang sur la lame avec Sysmex SP-series

Figure.20 : L'automate CELL-DYN SMS de préparation et de coloration des lames

Figure.21 : Photo de l'automate de coloration ADVIA Autoslide (Siemens)

Figure.22 : Photo de l'automate ADVIA Autoslide (Siemens) ouvert

Figure.23 : Schéma du fonctionnement de l'automate ADVIA

Figure.24 : Description du protocole de coloration MGG

Figure.25 : L'automate de préparation et de coloration de lames DxH Beckman Coulter

Figure 26 : "Hemasphere" - DxH-SMS Beckman Coulter

Figure.27 : Schéma du chariot des lames

Figure 28 : Des exemples de coloration sur l'automate DxH SMS-Beckman Coulter

Figure.29 : Présentation de l'automate de coloration de lames RAL STAINER Sysmex

Figure.30 : Etapes d'installation des lames dans leur porteur

Figure.31 : Etapes de chargement de lames dans l'automate

Figure.32 : le Kit MCDh du RAL Stainer

Figure.33 : Photo de L'appareil Aerospray 7150

Figure.34 : Schéma du vue de face de l'automate Aerospray Hematology Slide Stainer

Figure.35 : L'automate de coloration des lames hématologiques Hematek 2000

Figure.36 : Systèmes de coloration

Figure.37 : Chargement des lames dans l'automate Hema-Tek 2000

Figure.38 : L'automate de coloration des lames MIDAS ii

Figure.39 : L'automate de coloration des lames Hemastainer

Figure.40 : Courbes de répétabilité pour la numération

Figure.41 : Courbes de numération de qualification

Figure.42 : Exemple d'un frottis acceptable. Préparé et coloré sur le DxH-SMS

Figure.43 : Un exemple de myélogramme colorée avec le protocole d'échantillonnage

Figure.44 : Drépanocytes- GR polychromatophiles- Plaquettes

Figure.45 : GR polychromatophiles- Plaquettes

Figure.46 : Blastos- PN dégranulées- PN pelger

Figure.47 : Cellules sanguines

Figure.48 : Lymphocytes velleux

Figure.49 : Cellules mononuclées hyperbasophiles

Figure.50 : Colorations cytochimiques

Figure.51 : Réaction positive à la MPO

Figure.52 : Forte réaction positive à la MPO dans les promyélocytes

Figure.53 : Réaction au Noir du Sudan

Figure.54 : Réaction positive à l'AS-D chloroacétate estérase

Figure.55 : Réaction à la coloration-naphtyle acétate estérase

Figure.56 : Positivité de l'estérase de butyrate d' α -naphtyle

Figure.57 : Réaction à la coloration d'acide périodique de Schiff

Figure.58 : Réaction positive à l'acide périodique de Schiff

Figure.59 : Réaction positive à la coloration du facteur VIII

Figure.60 : Echantillons colorés à la phosphatase alcaline

Figure.61 : Réaction positive de la phosphatase acide

Figure.62 : Les corps de Heinz

Figure.63 : Myélogramme coloré à la réaction de Perl's

Figure.64 : Coloration de Kleihauer-Betke

Liste des abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
AIHA	: anémie autoimmune hémolytique
ANAE	: estérase de l'acétate α -naphtyle
AUC	: aire sous la courbe
B	: basophile
BFU-E	: burst forming unit—erythroid
BSC	: biological stain commission
CAE	: chloroacétate estérase
CCMH	: concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CFU-Bas	: colony forming unit—basophil
CFU-E	: colony forming unit—erythroid
CFU-Eo	: colony forming unit—eosinophil
CFU-GEMM	: colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte
CFU-GM	: colony forming unit—granulocyte
CFU-L	: colony forming unit—lymphoid
CFU-M	: colony forming unit—monocytes/macrophage
CFU-Meg	: colony forming unit—megakaryocyte
CFU-N	: colony forming unit—neutrophil
CFU-NM	: colony forming unit—neutrophil, monocytes
CFU-S	: colony forming unit—spleen
CHU	: centre hospitalo-universitaire

E	: éosinophile
EDTA	: l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique
FISH	: hybridation in situ en fluorescence
fL	: femtolitre
GR	: globule rouge
Hb	: hémoglobine
Hb F	: hémoglobine foetale
HER-2/neu	: human epidermal growth factor receptor- 2
HPLC	: chromatographie liquide à haute performance
HST	: hématologique Sysmex total
Ht	: hématocrite
ICSH	: International Committee for Standardization in Hematology
IDA	: iron deficiency anemia (anémie par carence en fer)
ISET	: isolation by size of tumor cells
LAL	: leucémie aigue lymphoblastique
LCR	: liquide céphalorachidien
LHSC	: London health sciences center
LMA	: leucémie myéloide aigue
LMC	: leucémie myéloide chronique
LSC	: lymphoid stem cell
MGG	: May-Grunwald-Giemsa
MGUS	: gmmopathie monoclonale de signification indéterminée
MPO	: myéloperoxydase
N	: neutrophile
NASDA	: estérase du naphtol AS-D chloroacétate

NB	: normoblast
NFS	: numération formule sanguine
OMS	: organisation mondiale de la santé
PAL	: phosphatase alcaline leucocytaire
PAS	: acide périodique de schiff
PBS	: tampon phosphate salin
Pg	: pico gramme
pH	: potentiel hydrogène
PN	: polynucléaire
REG	: réticulum endoplasmique rugueux
SHU	: syndrome hémolytique et urémique
SMS	: slide maker stainer (préparateur et colorateur de lames)
SSB	: noir du soudan
TCMH	: teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
TRAP	: phosphatase acide tartrate résistante
V/V	: volume par volume
VGM	: volume globulaire moyen
WBC	: white blood count (numération leucocytaire)

SOMMAIRE

I-INTRODUCTION	1
II-GENERALITES	2
1-Les hématies :	3
2- Les plaquettes :	3
3-Les leucocytes :	4
III-HEMATOLOGIE.....	4
1-Hématologie cellulaire	4
a-Hémogramme (NFS).....	4
b-Frottis sanguin	5
b-1 Identification du frottis sanguin.....	6
b-2 Délais pour confectionner un frottis	6
b-3 Confection du frottis sanguin	6
c-Le frottis médullaire.....	7
IV-COLORATIONS EN HEMATOLOGIE	7
Historique :	7
A-TECHNIQUES DE COLORATIONS MANUELLES	10
1-COLORATION DE GIEMSA	10
1-1 Formulation de Giemsa	12
1-2 Les mécanismes de coloration.....	13
1-3 Procédure de Coloration :[12]	15
2-COLORATION DE WRIGHT ET WRIGHT-GIEMSA.....	16
2-1 COLORATION DE WRIGHT	16
2-2 COLORATION DE WRIGHT-GIEMSA.....	20
2-2-1 Les réactifs	20
2-2-2 Procédure de coloration	21
a- Méthode classique par recouvrement des frottis sanguins	21
b- Technique de bain pour la coloration des frottis sanguins	22
3- COLORATION DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA.....	24

3-1 Historique de la coloration de MGG.....	25
3-2 Principes de la coloration de MGG.....	25
3-3 Les constituants chimiques de la coloration de MGG	26
3-4 Étape pré-analytique : fixation par dessiccation + méthanol absolu	26
3-5 Les deux temps de la coloration	27
3-6 Mécanisme d'action	28
3-7 Choix du tampon, pH optimal	28
3-8 Dépôts non spécifiques	29
3-9 Appréciation morphologique de la coloration	29
3-9-1 les références de la littérature.....	29
4- COLORATION DE JENNER.....	33
4-1 Coloration de Jenner-Giemsa	33
5- COLORATION DE LEISHMAN	33
5-1 Procédure.....	33
6- METHODES DE COLORATIONS RAPIDES	34
6-1 Réactifs.....	34
6-2 Procédure.....	35
B-AUTOMATISATION EN HEMATOLOGIE	36
I-PRESENTATION	36
II-LES ANALYSEURS HEMATOLOGIQUES AUTOMATISES.....	36
III-AUTOMATES DE PREPARATION ET DE COLORATION DE LAMES	39
1-Unité de Préparation de Lame Hématologique Automatisée SP-1000i ^{MC} de Sysmex	39
1-1 Caractéristiques et avantages.....	40
1-2 La technologie de l'automate	41
2- l'automate CELL-DYN SMS	43
2-1 Description et technologie.....	43
2-2 Processus de coloration	45
3- L'automate ADVIA Autoslide® de Siemens.....	45
3-1 Vue d'ensemble	45
3-2 Technologie de fonctionnement	47
3-2-1 Protocoles de coloration.....	49

3-2-1-1 Méthode de May-Grünwald Giemsa	49
a) Principe de la procédure.....	50
3-2-2 Coloration automatisée des frottis réalisés manuellement	50
4-L'automate UniCel DxH SMS Beckman Coulter	50
4-1 Réalisation des frottis sanguins	51
4-2 Les réactifs.....	53
4-3 Coloration des frottis.....	54
4-4 Point de vue qualité.....	54
5- L'automate de coloration des lames RAL STAINER.....	56
5-1 Principes opérationnels	57
5-2 Performance.....	57
5-3 Réalisation de la coloration	58
5-4 La coloration.....	59
6- L'automate de coloration de lames Aerospray 7150	60
6-1 Principes de coloration	60
6-1-1 Coloration May-Grunwald-Giemsa	60
6-1-2 Principe de la méthode Elitech	60
6-2 Description de l'appareil	61
6-2-1 Programmation	63
6-2-2 Principe de fonctionnement du colorateur	63
6-2-3 Utilisation du rotor (carrousel)	63
7-Hema-Tek 2000 Slide Stainer – Bayer	64
7-1 Système de coloration	65
7-1-1 Panneau de contrôle du volume.....	65
7-1-2 Les pompes de solutions	65
7-1-3 Coloration.....	65
8- L'automate de coloration des lames MIDAS II.....	67
8-1 Réactifs.....	67
8-2 Procédure.....	67
9- L'automate Hemastainer de Geometric Data systems	69
C- EVALUATION DE LA PERFORMANCE DES AUTOMATES DE COLORATION DE LAMES	69

1-Evaluation initiale de la performance de l'UniCel DxH Slide maker/stainer	70
1-1 Introduction.....	70
1-2 Matériel et méthodes.....	71
a- Echantillons de sang	71
b- UniCel® DxH slide/maker stainer.....	71
c- CellaVision® DM96.....	73
d- Formule manuelle de référence	74
e- Analyse statistique	74
f- Possibilité de transfert de cellules entre échantillons	75
g- Répétabilité.....	75
h- Comparaison des lames préparées par l'automate et celles manuelles.....	76
i- Qualité des frottis sanguins	78
1-3 Résultats.....	79
a- Transfert de cellules entre échantillons.....	79
b- Répétabilité.....	80
c- Comparaison des formules leucocytaires obtenues	82
d- Comparabilité de la morphologie des globules rouges.....	85
e- Qualité du frottis sanguin	87
f- Discussion	89
g- Conclusion d'évaluation.....	93
2-Evaluation de l'automate Aerospray™.....	94
2-1 Introduction	94
2-2 Evaluation proprement dite	94
2-3 Résultats	95
a) Mise au point de la coloration	95
b) Reproductibilité de la coloration	95
c) Etude comparative avec la MGG.....	96
c-1 Lames normales	96
c-2 Evaluation des plaquettes	96
c-3 Etude de la morphologie des GR.....	97
c-4 Formule microscopique.....	97

c-5 Pathologie hématologique	97
c-6 Coloration des médullogrammes	99
c-7 Praticabilité.....	100
c-8 Maintenance quotidienne	100
d)Discussion	100
e)Conclusion.....	101
V- LES PRINCIPES DES COLORATIONS CYTOCHIMIQUES SPECIALES.....	102
V-1 Introduction et principes.....	102
V-2 Echantillons et fixateurs acceptables	104
V-3 Colorations et interprétations.....	104
1-La myéloperoxydase	104
1-1 Principe	105
1-2 Interprétation	105
2-Le Noir du Sudan B (SBB)	105
2-1 Principe	106
2-2 Interprétation	106
3-Les estérases	106
3-1 Principe	107
3-2 Interprétation	107
4-L'acide périodique de Schiff (PAS).....	109
4-1 Principe	109
4-2 Interprétation	110
5-Les anticorps anti-Facteur VIII.....	111
6-La phosphatase alcaline leucocytaire.....	113
6-1 Principe	113
6-2 Le système de score	114
6-3 Interprétation	116
7-phosphatase acide (résistante à l'acide tartrique)	117
7-1 Principe	117
7-2 Interprétation	117
8-Contrôles et diagnostic des anomalies	118

9-Les corps de Heinz.....	119
9-1 Principe	119
9-2 Procédure.....	120
9-3 Résultats	120
9-4 Notes de procédure	121
9-5 Applications cliniques.....	121
10-Coloration de Perl's	121
10-1 Principe	121
11-Détermination de l'hémoglobine F par élution acide : Test de Kleihauer et Betke, méthode modifiée par Shepard, Weatherall, et Conley.....	122
11-1 Principe	122
Conclusion	124
Bibliographie.....	128

I-INTRODUCTION

L'évaluation des types de cellules circulantes dans le sang en utilisant les frottis sanguins, est l'un des tests les plus utilisés de façon très fréquente pour des diagnostics cliniques et à la recherche des problèmes de santé.

Les frottis peuvent être utilisés sous différentes méthodes, le plus souvent en routine afin des analyses quantitatives et/ou qualitatives des différents éléments sanguins (globules rouges, globules blancs et plaquettes).[1]

L'utilité de l'examen morphologique est probablement plus importante que des fins quantitatives, étant donné l'amélioration des méthodes d'analyses quantitatives électroniques.

L'analyse morphologique des frottis sanguins est utilisée dans la méthode de référence pour la numération différentielle des globules blancs [1], afin des buts de contrôle et d'assurance de qualité et pour l'évaluation des méthodes basées sur les automates. [2], [3]

La préparation et la coloration des frottis en principe, est une simple procédure. Pourtant, la qualité des frottis réalisés dans la plupart des laboratoires est hautement variable.

D'autant la validité de l'évaluation du frottis, et particulièrement la numération des leucocytes, sont étroitement dépendants d'un frottis de bonne qualité, l'attention en procédure de préparation doit être respectée pour éviter tout problème potentiel [4].

Ce travail a pour but de rapporter les différentes techniques de colorations utilisées en routine en Hématologie, faisant partie de la procédure générale de la confection des frottis. Ainsi que de mettre la lumière sur l'apport potentiel de la coloration automatisée au sein de ce domaine.

II-GENERALITES

Les cellules du sang sont pour la plupart d'entre elles des cellules très différenciées, fonctionnelles. Elles proviennent de l'hématopoïèse qui s'effectue dans la moelle osseuse.[4]

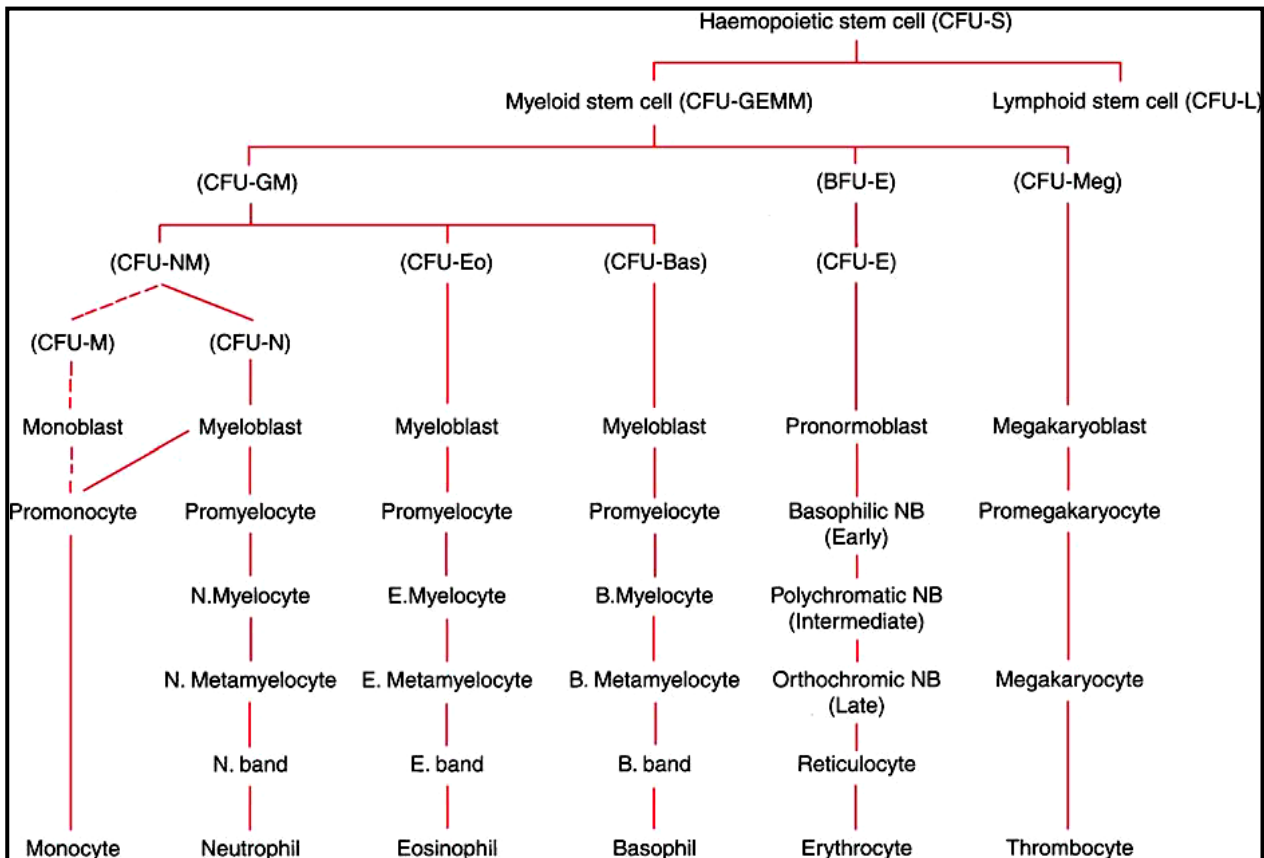


Figure.1 Représentation du schéma de l'hématopoïèse. CFU-S, colony forming unit—spleen. CFU-GEMM, colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte. LSC (CFU-L), lymphoid stem cell (colony forming unit—lymphoid).CFU-GM, colony forming unit—granulocyte; BFU-E burst forming unit—erythroid. CFU-Meg, colony forming unit—megakaryocyte; CFU-NM colony forming unit—neutrophil, monocytes; CFU-Eo, colony forming unit—eosinophil; CFU-Bas, colony forming unit—basophil; CFU-E, colony forming unit—erythroid; CFU-M, colony forming unit—monocytes/macrophage; CFU-N, colony forming unit—neutrophil; N, neutrophilic; E, eosinophilic; B, basophilic; NB, normoblast [4].

1-Les hématies :

(Ou globules rouges) sont des cellules anucléées. Elles donnent la couleur du sang de part l'hémoglobine qu'elles contiennent. Elles ont pour rôle essentiel le transport de l'oxygène. Ce sont les cellules les plus nombreuses du sang. Leur durée de vie est de 120 jours.[5]

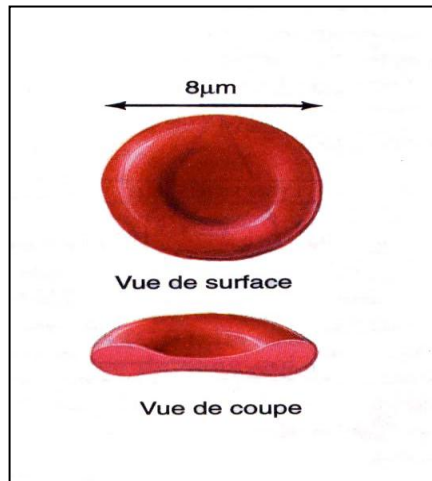


Figure.2 : Schéma d'un globule rouge [5]

2- Les plaquettes :

(Ou thrombocytes) sont également des cellules anucléées. Elles jouent un rôle essentiel dans la prévention et l'arrêt des hémorragies. Elles sont consommées au cours de l'hémostase. Leur durée de vie est d'environ une semaine. [5]



Figure.3 : une plaquette vue au microscope électronique.[5]

3-Les leucocytes :

(Ou globules blancs) sont des cellules nucléées globalement spécialisées dans la défense de l'organisme contre les agressions de l'extérieur (bactériologiques, chimiques, immunologiques...). Il s'agit en fait d'un groupe hétérogène de cellules aux caractéristiques, fonctions et durées de vie très différentes. On sépare les leucocytes en fonction de leur morphologie en "Polynucléaires" (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et en "mononucléaires" (lymphocytes et monocytes).[5]

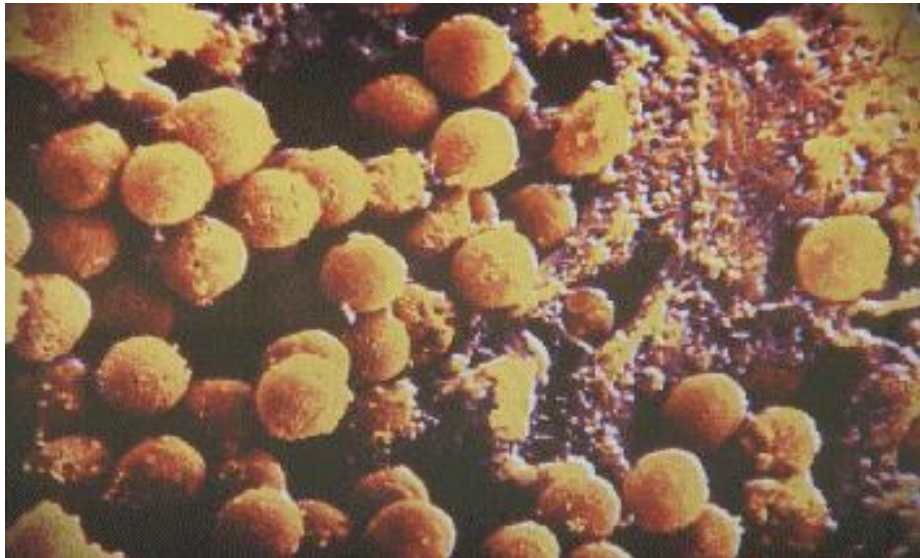


Figure.4 vue au microscope électronique des globules blancs [5]

III-HEMATOLOGIE

L'hématologie est la discipline médicale dédiée à l'étude de la physiologie et la pathologie du sang.[6]

1-Hématologie cellulaire

a- Hémogramme (NFS)

C'est l'étude quantitative et qualitative des éléments figurés du sang.

Le prélèvement est effectué sur tube EDTA

(Le sang de contrôle (haut, normal et bas) passé une à deux fois par jour selon le nombre de prélèvements doit donner des résultats inclus dans les normes établies par le laboratoire).[6]

Il doit comporter :

- la numération des cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes)
- l'étude des constantes hématologiques :
- Taux d'hémoglobine (Hb)
- Hématocrite (Ht)
- Volume globulaire moyen (VGM)

$VGM = Ht / \text{nombre de GR (en millions)} \times 10$

Il est exprimé en femtolitre (fL) ou en microns cube (μ^3)

- Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)

$TCMH = Hb / \text{nombre de GR (en millions)} \times 10$

Il est exprimé en pico gramme (pg)

- Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

$CCMH = Hb / Ht \times 100$

Il est exprimé en pourcentage

- L'étude morphologique des cellules sur frottis sanguin qui permet en outre d'établir la formule leucocytaire.[6]

b- Frottis sanguin

Selon les lignes directrices de l'OMS concernant l'Hématologie, les frottis sanguins doivent être **obligatoirement** examinés dans les cas suivants :

- une NFS avec des paramètres anormaux
- patients admis au service hématologie, à chaque visite
- chaque semaine pour les patients admis au service d'oncologie
- chaque semaine pour les patients sous radiothérapie ou sous chimiothérapie
- systématiquement sur les nouveaux nés et les patients du service pédiatrique
- patients présentant une adénopathie, une splénomégalie, une fièvre ou un symptôme pseudogrippal
- patients présentant une fièvre après un séjour en zone d'endémie de malaria
- quand un automate de numération sanguine fait une alerte (agglutination, fragments de cellules...etc.)[6]

b-1 Identification du frottis sanguin

Le frottis sanguin doit, au moins, porter une double identification, c'est à dire : nom et prénom du patient et numéro d'identification personnalisé. De plus, la date devrait être inscrite sur chaque frottis.[5]

b-2 Délais pour confectionner un frottis

Idéalement, pour un échantillon de sang avec EDTA, le frottis sanguin devrait être confectionné dans l'heure suivant le prélèvement. Cependant, un frottis sanguin de qualité acceptable peut être confectionné dans les délais suivants :[5]

- Pour un échantillon capillaire, dans un tube à micro-prélèvement contenant de l'EDTA, confectionner le frottis moins de 4 heures après le prélèvement [7].[8] Idéalement, deux frottis sanguins devraient être confectionnés directement à partir du site de ponction capillaire. Ceci élimine toute distorsion ou interférence due à l'anticoagulant [9].
- Pour un échantillon veineux avec EDTA, confectionner le frottis dans un délai moins de 4 heures. Ne pas réfrigérer le spécimen avant la confection du frottis [8].

b-3 Confection du frottis sanguin

La confection du frottis sanguin, qui consiste à étaler une goutte de sang sur une lame de verre, peut être effectuée manuellement ou mécaniquement à l'aide d'appareils automatiques et semi-automatiques.[8]

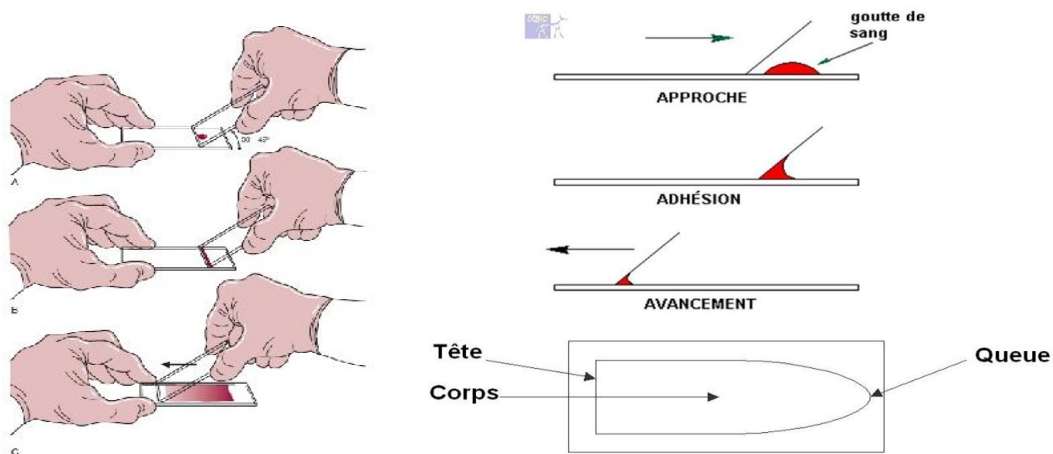
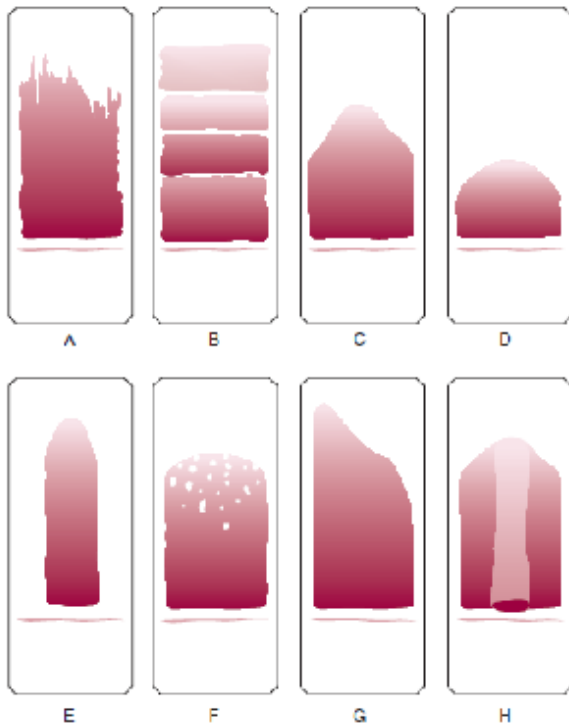


Figure.5 Schéma de la procédure de réalisation d'un frottis [8]

Le frottis sanguin doit répondre aux critères de qualité reconnus suivants :



- Être mince, régulier et uniforme ;
- Se terminer en pointe arrondie (pinceau) ou carrée ;
- Comporter des marges ;
- Être séché complètement et rapidement à l'air avant la coloration afin d'éviter la formation d'artéfacts et une altération de la morphologie des érythrocytes [10].

Figure.6 Exemples de frottis non acceptés, associés aux erreurs de réalisation les plus communes.[10]

c- Le frottis médullaire

L'échantillon de biopsie de moelle osseuse contient à la fois du tissu d'os et de la moelle osseuse. Même procédure s'applique.[10]

IV-COLORATIONS EN HEMATOLOGIE

Historique :

Les techniques de colorations en hématologie ont une longue histoire en biologie médicale. Ces procédures ont été pratiquées il y a plus de 100 ans.[11] La première utilisation en hématologie, d'une solution de coloration contenant du bleu de méthylène et de l'éosine était probablement en 1888 par C. Chenzinsky, afin de colorer les hématies infectées par le plasmodium. En 1890, F. Plehn et E. Malachowski ainsi que D. L. Romanowsky en 1891 ont décrit des solutions de coloration qui ont donné une variété de couleurs aux hématies, aux leucocytes et aux parasites. Très notamment, le noyau des leucocytes était de couleur pourpre

et les parasites étaient en rouge clair. Ces couleurs n'ont pas été obtenues par aucune autre technique, dans laquelle les deux colorants sont utilisés séparément.[11]

La thèse de Romanowsky (Russe), publiée en Allemagne, a noté que les couleurs désirées ne sont obtenues que par une solution de réserve de bleu de méthylène « assez vieux pour avoir de la moisissure à la surface ». Les propriétés de coloration de la solution du bleu de méthylène « mûr », ensuite sont étudiées par Unna, qui a publié en 1891, que le processus de maturation peut être facilement accéléré par la chaleur et l'alcalinité. Ainsi, le bleu de méthylène « polychrome » par la suite est utilisé artificiellement par les inventeurs des différentes techniques de coloration en hématologie, y compris L. Jenner 1899, B. Nocht 1899, W. Leishman 1901, R. May et L. Grunwald 1902 et J. Wright 1902.[11]

Tableau I. Schéma de couleur de Romanowsky

COMPOSANT CELLULARE	COULEUR
Nucléaire	
Chromatine	Pourpre
Nucléoles	Bleu clair
Cytoplasme	
Erythroblaste	Bleu foncé
Erythrocyte	Rose clair
Réticulocyte	Gris-bleu
Lymphocyte	Bleu
Métalymphocyte	Rose
Monocyte	Gris-bleu
Myélocyte	Rose
Neutrophile	Rose-orange
Promyélocyte	Bleu
Basophile	Bleu
Granules	
Promyélocyte	Rouge ou pourpre
Basophile	Pourpre-noir
Eosinophile	Rouge-orange
Neutrophile	Pourpre
Granules toxiques	Bleu foncé
Plaquettes	pourpre
Autres inclusions	
Corps d'Auer	Pourpre
Anneau de Cabot	Pourpre
Corps de Howell-Jolly	Pourpre
Corps de Dôhle	Bleu clair

A-TECHNIQUES DE COLORATIONS MANUELLES

1-COLORATION DE GIEMSA

Gustav Giemsa est né en 1867 à Hambourg, Allemagne. Il a travaillé comme chimiste et il a appliqué ses habilités en recherche médicale et microbiologique. Tous ses travaux sont en Allemand. Il a publié les plus importants de ses articles dans les premières années du dernier siècle. Il est mort en 1948. La technique de coloration qui porte son nom était désignée pour la première fois, en tant que méthode de diagnostic de malaria. La technique de coloration Giemsa a été adaptée à l'histologie pour la haute qualité de coloration de la chromatine et de la membrane nucléaire de toutes les cellules. Et comme résultat cette technique a été utilisée (surtout en Europe) pour décrire les propriétés colorantes et la structure des différents tissus et cellules.[12]

Plusieurs chercheurs ont apporté des modifications à cette méthode pour avoir de meilleurs résultats, et plus particulièrement afin de simplifier la technique et augmenter la valeur du bleu de méthylène comme colorant principal.[12]

Le mélange de solutions de coloration effectué par le bleu de méthylène polychrome et de l'éosine sont instables, car les ions des colorants de charges opposées se combinent pour former des sels, connus sous le nom d'éosinates d'azur, qui sont insolubles dans l'eau.

Les éosinates d'azur sont par contre solubles dans des alcools - un mélange de méthanol et de glycérol est couramment utilisé - Et ils se dissolvent dans l'eau en présence d'un excès de colorant de thiazine ou l'éosine. En outre, la poursuite de l'oxydation conduit au dépôt d'autres produits insolubles dans l'eau tels que le violet de méthylène (bernthsen) (Fig. 7).[12]

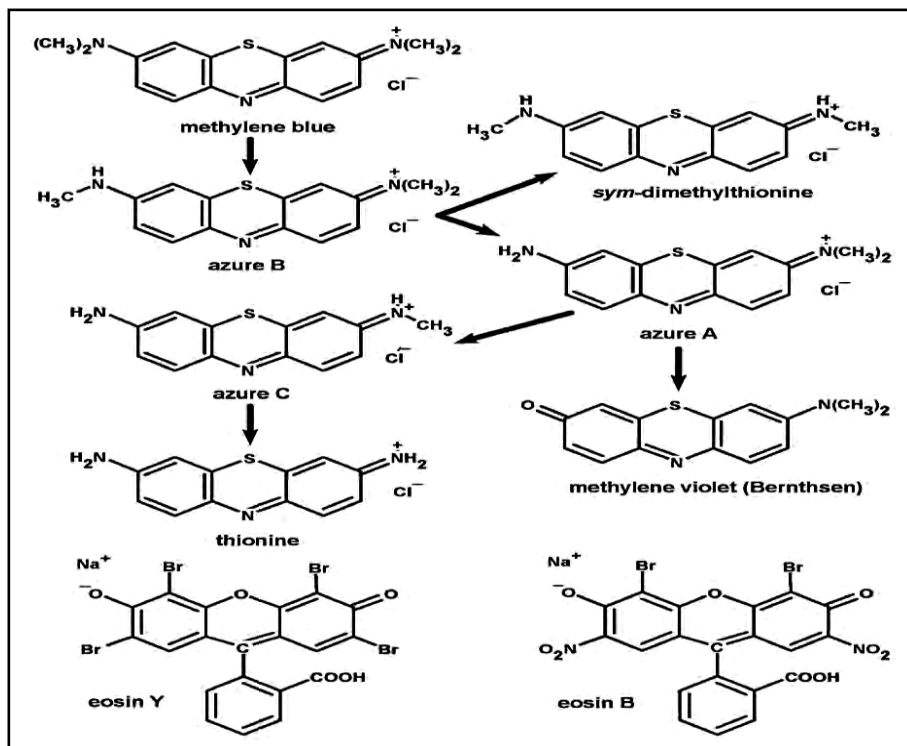


Figure.7 Les composants présents dans les colorants Giemsa et d'autres colorants. Les flèches indiquent la déméthylation et l'oxydation progressive du bleu de méthylène.[12]

1-1 Formulation de Giemsa

Gustav Giemsa cherchait à produire des mélanges de colorants qui seraient fiables à fournir le schéma de couleurs Romanowsky. Ces formulations ont été publiées en 1902-1904, la version la plus avancée étant une solution aqueuse contenant un excès important d'azur II par rapport à l'éosine Y. Azure II était un mélange délibéré de bleu de méthylène non oxydé et d'azur I. Azur I était le nom utilisé à l'époque pour le colorant maintenant appelé azur B. Les formulations modernes de la coloration Giemsa sont fabriquées en mélangeant l'éosinate d'azur B avec du bleu de méthylène. Dans le commerce ils sont disponibles sous forme de poudre Giemsa qui doit être dissous dans un mélange 50/50 de méthanol et du glycérol pour fournir un stock concentré de solution.[13]

Pour colorer la solution stock est diluée dans de l'eau qui est tamponnée à un pH approprié pour l'application prévue – pH 6,5-7,0 pour les frottis sanguins, inférieur pour coupes de tissus fixés au formol. Aux Etats-Unis, des échantillons des lots de bleu de méthylène, azurs A, B et C, le violet de méthylène (bernthsen) et poudres pour de Giemsa, Jenner et Wright sont testés par le « Biological Stain Commission » (BSC) par le dosage du contenu, spectrophotométrie, chromatographie en couche mince et HPLC et utilisation dans les procédures de coloration standardisées. Les lots satisfaisants sont certifiés, et chaque bouteille de colorant en poudre porte une petite étiquette supplémentaire, fournie par le BSC. L'azur B, le plus important ingrédient de ces colorants, ne doit pas nécessairement être ultra-pur, synthétisé directement pour répondre aux exigences de la BSC pour la certification.[13]

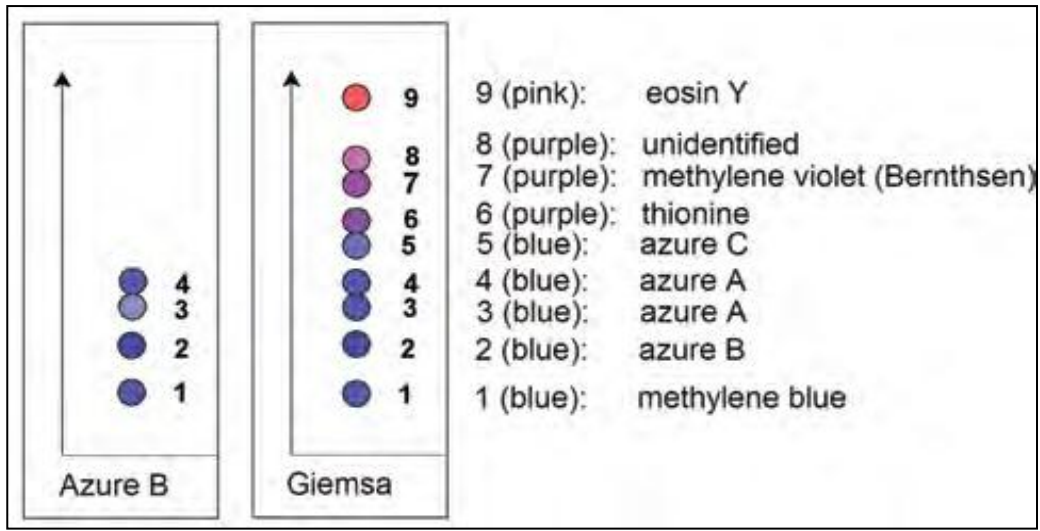


Figure 8. Chromatographie sur couche mince d'échantillons commerciaux certifiés d'azur B et la coloration de Giemsa, sur Unisil™ plaques de gel de silice [13]

1-2 Les mécanismes de coloration

Les études de l'interaction de l'ADN avec l'azur B indiquent que dans la solution du colorant, les cations sont présents sous forme de dimères, chacun avec deux systèmes cycliques plans maintenus ensemble par des liaisons de Van Der Waals. [14,15]

Les dimères sont attirés par les groupements phosphates négativement chargés de l'ADN et adhèrent à la macromolécule grâce aux interactions hydrophobes avec les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. L'attraction des anions de l'éosine par les charges positives des dimères d'azur B change la couleur de l'ADN du bleu au pourpre [16]. L'éosine est attirée de même par les amines à excès de protons et les groupes guanidines (principalement les chaînes de lysine et d'arginine). Ces acides aminés sont présents en hémoglobine des hématies et constituent la protéine de base des granules des éosinophiles ; [17]

Tableau.II Les colorants biologiques certifiés par "The biological stain Commission" 2009

Acid fuchsin, C.I. 42685	Chlorazol black E, C.I. 30235	Jenner stain 1899	Orcein
Alcian blue 8 GX, C.I. 74240	Congo red, C.I. 22120	Light green SF, C.I. 42095	Pararosaniline, C.I. 42500
Alizarin red S, C.I. 58005	Cresyl violet	Malachite green, C.I. 42000	Phloxin B, C.I. 45410
Aniline blue WS, C.I. 42755	Crystal violet, C.I. 42555	Martius yellow, C.I. 10315	Protargol S
Auramine O, C.I. 41000	Darrow red	Methyl orange, C.I. 13025	Pyronine B, C.I. 45010
Azocarmine B	Eosin B, C.I. 45400	Methyl violet 2B, C.I. 42535	Pyronine Y, C.I. 45005
Azocarmine G, C.I. 50085	Eosin Y, C.I. 45380	Methylene blue	Resazurin
Azure A, C.I. 52005	Erythrosin, C.I. 45430	Methylene blue, C.I. 52015	Rose Bengal, C.I. 45435
Azure B, C.I. 52010	Ethyl eosin, C.I. 45386	Methylene violet	Safranin O, C.I. 50240
Azure C, C.I. 52002	Ethyl green, C.I. 42590	(Bernthsen), C.I. 52041	Sudan black B, C.I. 26150
Basic fuchsin, C.I. 42510	Fast green F C F, C.I. 42053	Neutral red, C.I. 50040	Sudan III, C.I. 26100
Bismarck brown Y, C.I. 21000	Fluorescein	Nigrosin, C.I. 50420	Sudan IV, C.I. 26105
Brilliant cresyl blue, C.I. 51010	Isothiocyanate	Nile blue A, C.I. 51180	Tetrachrome stain (MacNeal)
Brilliant green, C.I. 42040	Giemsa Stain 1902,	Nuclear fast red, C.I. 60760	Thionine, C.I. 52000
Carmine, C.I. 75470	modified in 1904.	Oil Red O, C.I. 26125	Toluidine blue, C.I. 52040
	Hematoxylin, C.I. 75290	Orange G, C.I. 16230	Weigert 1878
	(Bohmer 1865)	Orange II, C.I. 15510	Wright stain (1908)
	Indigo carmine, C.I. 73015		
	Janus green B, C.I. 11050		

L'utilité de la coloration de Giemsa en hématopathologie a d'abord été reconnue dans des frottis sanguins, seule ou en combinaison avec le May-Grünwald.[18]

Karl Lennert et son groupe de Kiel ont publiés de nombreux articles et livres dans lesquels ils vantaient les avantages de la coloration Giemsa pour les tissus hémato-lymphoïdes. En effet, la classification de Kiel des lymphomes est basée sur l'étude de Frottis colorés au Giemsa, une procédure qui a été considéré comme supérieure à l'hématoxyline et l'éosine pour l'analyse des ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Il est nécessaire de mentionner que la coloration du contenu nucléaire n'est pas autant claire qu'avec l'hématoxyline-éosine. Pourtant, la coloration différentielle du cytoplasme et particulièrement les granules différenciées est meilleure que celle obtenue par l'hématoxyline-éosine.[12]

Actuellement, le Giemsa est abandonnée lentement, et les jeunes praticiens ne sont pas familiers avec la technique ni avec ses résultats. L'inconvénient le plus important de la coloration de Giemsa est peut-être sa disparition rapide, surtout si elle est exposée à la lumière ; par conséquent, les lames ne sont pas permanentes et ne peuvent pas être réexaminées après une période variable.[12]

En conclusion, la coloration de Giemsa est une méthode de coloration très riche en termes d'histoire, de l'applicabilité, et la beauté des résultats. Malheureusement, beaucoup de jeunes médecins ne parviennent pas à apprécier ses possibilités, et la coloration est lentement abandonnée en pratique médicale. [12]

1-3 Procédure de Coloration :[12]

- **Réactifs** :
 - Coloration Giemsa ;
 - Le méthanol à 100%
 - du papier absorbant ;
 - Microscope avec lentille de x100 et 10x10 grille oculaire
 - Huile à Immersion

- **Protocole** :

Coloration des frottis sanguins

- 1) Fixer les lames à 100% de méthanol pour ~ 30 "et rincer à l'eau du robinet.
- 2) Faire une solution fraîche de 10% de Giemsa dans de l'eau distillée.
- 3) Colorer ~ 30 '.
- 4) Rincez la lame à l'eau du robinet et séchez soigneusement en utilisant du papier absorbant pour tamponner.

2-COLORATION DE WRIGHT ET WRIGHT-GIEMSA

2-1 COLORATION DE WRIGHT

La coloration de Wright permet la réalisation de formule sanguine et médullaire. Elle est composée de colorants alcalins (bleu de méthylène et ses dérivés) et d'un colorant acide (éosine) à peu près dans un rapport de 2: 1. Le bleu de méthylène représente environ 75% des colorants basiques présents, tandis que ses dérivés (principalement azur B) comptent pour environ 25%. Aux États-Unis, elle est la plus couramment utilisée parmi les types de coloration de Romanowsky. [12]

Cette coloration peut varier considérablement d'un fabricant à fabricant dans sa capacité à marquer certains composants cellulaires. Trouver la marque du colorant de Wright le mieux adapté à son laboratoire, et à sa préférence personnelle est une question d'essais et d'erreurs. Même au sein d'une marque identique de Wright, il peut y avoir des variations considérables de coloration d'un lot à l'autre. La qualité de la coloration doit être réévaluée, et les temps de coloration re-déterminés chaque fois, avec chaque nouveau lot.

2-1-1 Réactifs :

-Colorant de Wright en solution : modifié à 0 .3% p/v, tamponnée à un ph=6.8 dans du méthanol.

-Tampon en solution pour Wright : un mélange de phosphate et de sodium et de phosphate de potassium 0.0083M, pH=7.2

2-1-2 Protocol opératoire

a-Techniques par recouvrement, temps de réalisation : 9min

-couvrir le frottis avec 1mL de colorant de Wright en solution pendant 2min

-Egoutter l'excédent sur papier filtre

-Couvrir le frottis avec le colorant de Wright dilué en solution au 1 /5 dans le tampon en solution pour Wright pendant 5min

-Rinçage dans deux bains de tampon en solution pour Wright. Laisser en contact 1 min pour chaque bain.[12]

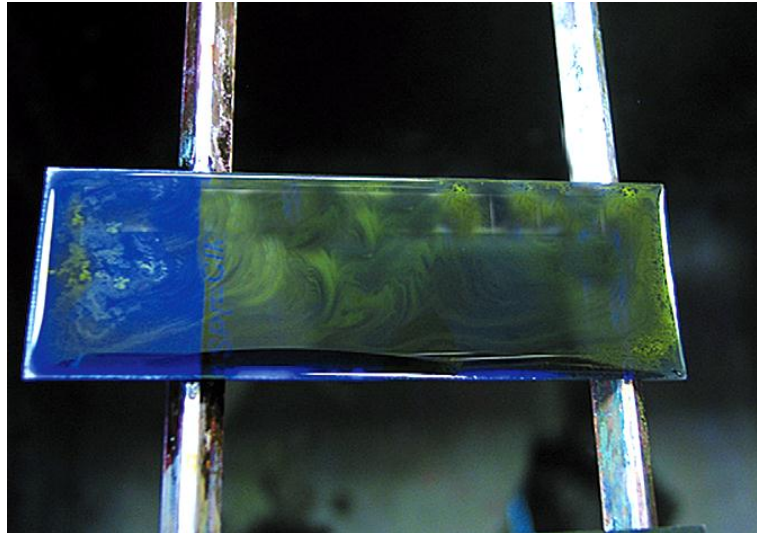


Figure. 9 Coloration manuelle de Wright. Le reflet métallique de teinture indique un bon mélange.[12]

b- Technique par Bain, Temps de réalisation : 11 min

-Bain de colorant de Wright en solution pendant 3min

-Bain de colorant de Wright en solution dilué au 1/6 dans le tampon en solution pour Wright pendant 6min

-Rinçage dans deux bains de Tampon en solution pour Wright. Laisser en contact 1 min dans chaque bain.

]

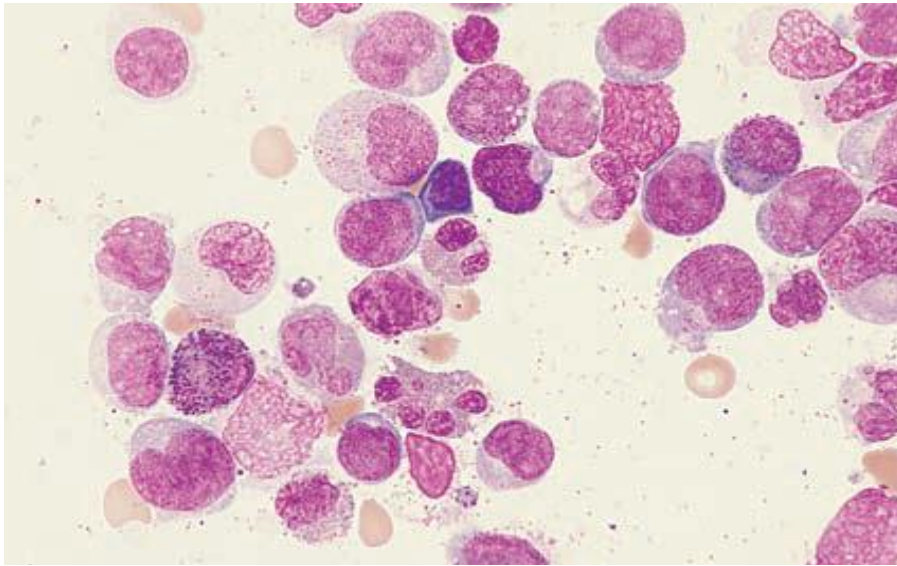


Figure 10. Myélogramme coloré à la coloration de Wright.[12]

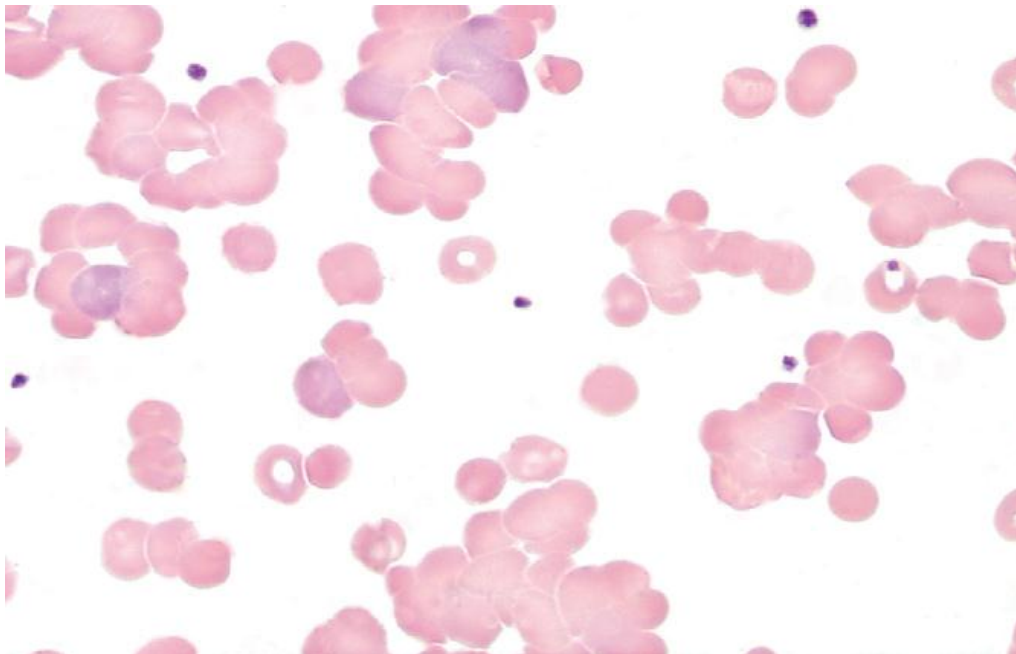
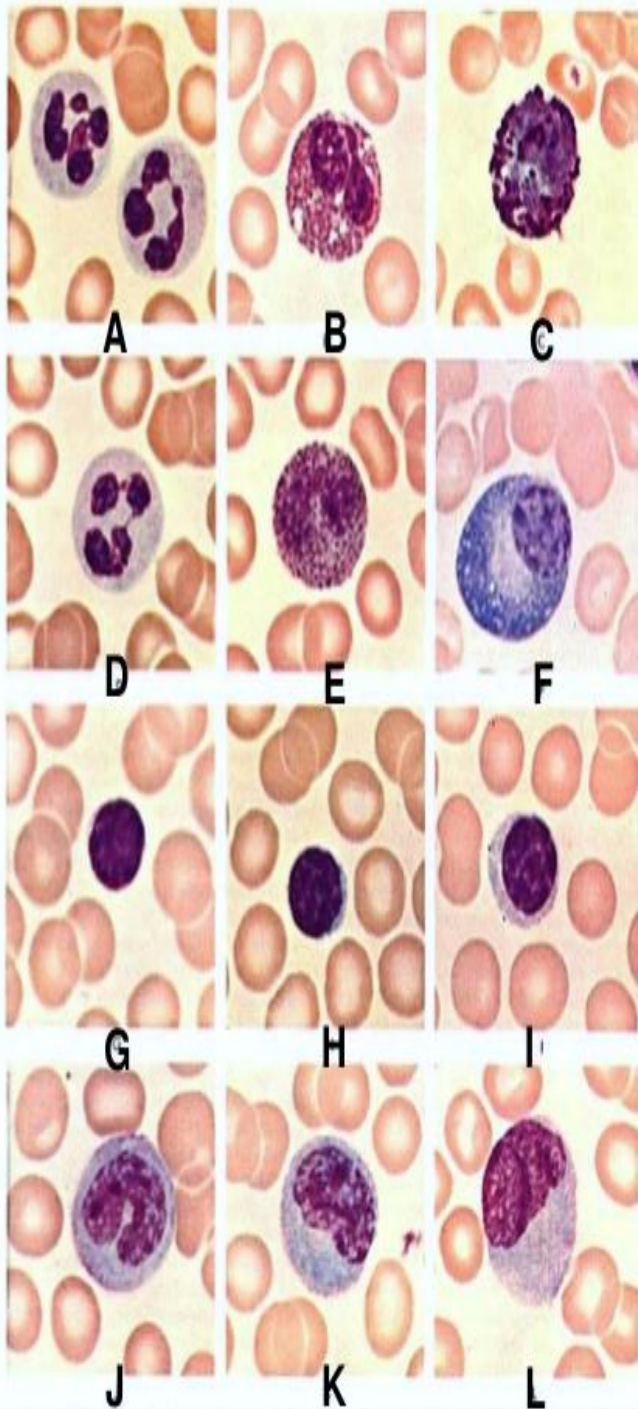


Figure.11 Frottis sanguin coloré à Wright montrant une agglutination des hématies.[12]



Smear from Wright's stain

A & D : Neutrophilic

B & E : Eosinophilic

C : basophilic

F : Plasma cell (not in blood)

G & H : small lymphocytes

I : medium lymphocytes

J, K & L : monocytes

Figure 12. Morphologie des différentes cellules sanguines sur un frottis sanguin coloré au Wright. [12]

2-2 COLORATION DE WRIGHT-GIEMSA

Une autre décision d'ajouter le Giemsa ou pas à la solution de coloration de Wright doit être prise. L'effet principal de Giemsa est d'intensifier la coloration pourpre. Si beaucoup de Giemsa est ajouté, alors les monocytes commencent à ressembler aux promyélocytes neutrophiles. La quantité de Giemsa à ajouter doit être soigneusement titrée et réévaluée avec chaque changement de lot de la coloration de Wright.[19]

La procédure de coloration des frottis comporte deux étapes :

1-La fixation

2-La coloration

En première étape le frottis sanguin séché à l'air, est recouvert de la coloration de Wright-Giemsa dissous dans du méthanol. Le méthanol pousse les protéines cellulaires à adhérer à la lame ; évitant les cellules d'être lavées de la surface de la lame comme il préserve aussi les structures cellulaires.

A cette étape aucune coloration n'est établie car les colorants ne sont pas ionisés. En deuxième étape la lame est recouverte de tampon qui va ajuster le pH, permettant aux colorants de s'ioniser et la coloration apparaît.[19]

2-2-1 Les réactifs

-Stock Wright-Giemsa solution

Expiration : 6 mois

- 13 g de poudre de Wright' stain
- 3 g de Wright stain
- 0.4 g de poudre Giemsa stain
- 4000 mL de méthanol absolu sans acétone

Préparer comme suit :

1. versez 2 L de méthanol dans un bécher, ajouter un barreau magnétique et mélanger.
2. Ajoutez les poudres des colorants, et le reste du méthanol. Placez du parafilm au-dessus du bécher
3. Mélangez pour 2 à 3 heures, et incubez la nuit à 37.5 °C.

4. Mélangez le lendemain pour 2 à 3 heures. La solution doit rester au moins 2 semaines avant utilisation, mais elle donne des résultats acceptables si elle est utilisée immédiatement après sa préparation. [19]

Filtrez la solution par du papier filtre avant utilisation.

-Solution de coloration Giemsa

Date d'expiration varie en fonction du lot.

- Stock de tampon phosphate

Expiration : 2 mois

26.52 g phosphate de potassium monobasique anhydre (KH_2PO_4)

10.24 g phosphate de potassium dibasique anhydre (Na_2HPO_4)

4000 g d'eau déminéralisée

Tamponner à pH to 6.4.

-Tampon de travail pour la solution de Wright

Expiration : 1 heure

200 mL de tampon phosphate

25 mL de solution Wright-Giemsa

25 mL de solution Giemsa [19]

2-2-2Procédure de coloration

a- Méthode classique par recouvrement des frottis sanguins

La méthode classique de coloration par recouvrement offre la possibilité d'assister à l'émergence de l'éclat métallique éphémère, une curieuse transformation de la solution de coloration Wright signalant le début de la coloration. Bien que, pas très bien comprise, la brillance est considérée être le résultat de l'ionisation des colorants, en particulier l'éosine, qui est un colorant fluorescent.

La méthode par recouvrement est utile lorsque seulement une ou deux lames doivent être colorées et l'on souhaite conserver les réactifs. Elle n'a pas été utilisé en routine dans les laboratoires cliniques, toutefois, parce qu'il est difficile d'obtenir régulièrement de bons résultats, en particulier lorsque plusieurs coloration lames sont colorées à la fois.

Le procédé est comme suit :[19]

1. Placer la lame, frottis vers le haut, sur une grille de coloration, le bord au côté opposé.
2. Fixer le frottis en l'inondant avec une solution de Wright-Giemsa. Laisser le contact durer environ 5 minutes.
3. Ajouter un à un-et-demi de volume égal de tampon phosphate goutte à goutte à la solution de Wright-Giemsa sur la lame.
4. Mélanger les solutions de colorant et de tampon sur la lame en soufflant doucement plusieurs fois sur la lame. Le mélange doit apparaître homogène, et un éclat vert métallique doit se former sur la surface.
5. Laisser le mélange rester sur le frottis pendant environ 15 minutes. Ne pas laisser les solutions sécher ou se drainer de la lame.
6. Rincer avec un courant d'eau déminéralisée.
7. À l'aide d'une pince, faire pencher la lame verticalement, et de continuer à laver jusqu'à ce que l'eau courante de la lame est incolore. Cette procédure de lavage en deux étapes pour prévenir la coloration précipitée de se fixer sur le frottis.
8. Placer la lame verticalement, sur un support de ventilateur à l'air sec.

b- Technique de bain pour la coloration des frottis sanguins

Cette méthode est très convenable pour l'utilisation en routine dans les laboratoires [20], car elle donne une haute qualité de résultats et une consistance remarquable. Elle permet aussi la coloration de plusieurs lames à la fois. Le « bain » peut être un récipient dans lequel le porteur de lames est noyé.

La méthode est comme suit :

- 1-placez les lames dans le porteur le bout du frottis en haut.
- 2-placez les lames dans le bain du méthanol (sans acétone) pour 2 min.
- 3-déplacez le porteur dans un bain de coloration Wright-Giemsa pour 3 min. Agitez.
- 4-déplacez le porteur de lames la solution tampon pour Wright pour 20 à 25 min. Agitez quelques fois.

Le temps de coloration peut varier en fonction du lot de la coloration de Wright. Assurez que le niveau de la solution de coloration est assez suffisant pour immerger les lames complètement.

5-Rincez dans un bain contenant approximativement 5 mL de Méthanol et 200 mL d'eau distillée.

6-Rincez successivement dans 3 bains d'eau distillée.

7-Si la coloration est présente sur le dos de la lame, essuyez avec du papier absorbant.

Placez les lames verticalement sur un support pour séchage à l'air.[19]

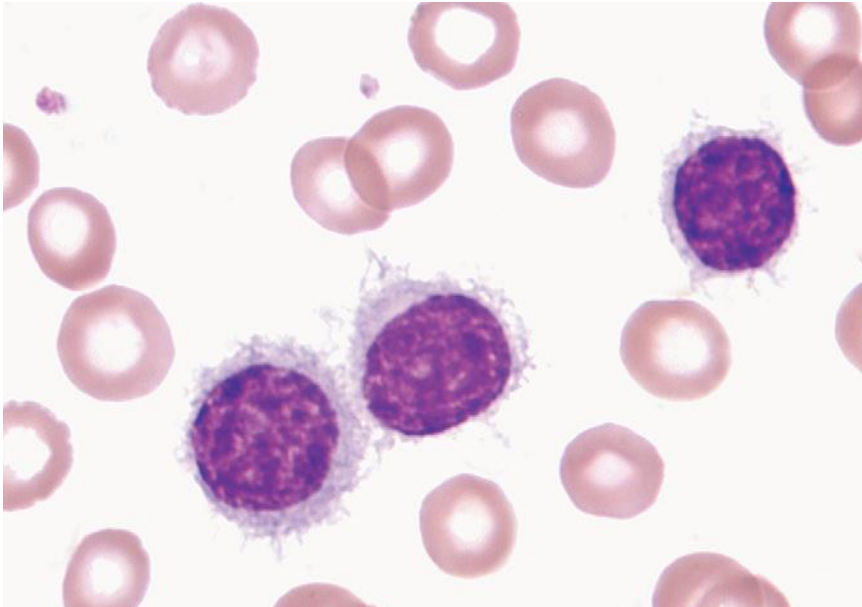


Figure.13 Frottis sanguin coloré à la coloration de Wright-Giemsa, montrant des tricholeucocytes.[19]

3- COLORATION DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) fait partie des colorations polychromes dites « de Romanowsky » avec celles de Leishman, de Giemsa et de Wright. Méthode de référence de l'hématologie, elle est quotidiennement utilisée en cytopathologie pour l'étude des appositions ganglionnaires, des étalements et des spots de centrifugation de liquides biologiques.[20]

Elle est devenue une coloration de base de la cytopathologie avec celle de Papanicolaou, applicable à la fois aux liquides biologiques (LCR, épanchements des séreuses) et aux ponctions à l'aiguille fine d'organes superficiels (thyroïde, glandes salivaires, sein. . .) ou profonds (poumon, médiastin, pancréas). Le grand mérite du MGG est de pouvoir être réalisé sur des préparations séchées l'air. La coloration obtenue est polychrome : elle permet une analyse fine de la basophilie (témoignant de la richesse en ergastoplasme et/ou en ribosomes libres) et des granulations cytoplasmiques, en particulier celles des leucocytes.[20]

La coloration de MGG a fait l'objet d'une série de publications dans les années 1970—80, essentiellement pour les applications hématologiques. Les études en cytopathologie sont rares et concernent surtout les comparaisons avec le milieu liquide. Pour autant, par exemple en oncologie pédiatrique il est fréquent qu'une cyto-ponction colorée par le MGG soit un geste de première intention : c'est dire l'importance qu'a prise cette technique pour le diagnostic rapide. Le MGG est aussi utilisé en recherche clinique pour la reconnaissance des cellules tumorales circulantes, notamment avec la méthode ISET [20]. C'est aussi une coloration utilisée pour le repérage cellulaire et l'analyse simultanée des aspects morphologiques et des anomalies chromosomiques (aneuploïdie, amplification de HER-2/neu. . .) détectés par hybridation in situ en fluorescence (FISH) . Après décoloration de lames colorées par le MGG, diverses techniques de biologie moléculaire peuvent ainsi être appliquées avec succès [21,22].

3-1 Historique de la coloration de MGG

Les principes de la coloration de MGG, issus des travaux de Chenzinsky et de Romanowsky sur les protozoaires (1891), ont été repris par Wright, May, Grünwald, Giemsa et Pappenheim (1902—14), puis développés par Lopez Cardozo (1973) et par Wittekind (1983) [23—24,25]. Comme le rappelle Lopez Cardozo [26], la découverte de la coloration provient d'une erreur de laboratoire en 1890 : le bleu de méthylène de la coloration de Löffler (diagnostic de malaria) ayant vieilli et s'étant oxydé, Chenzinsky et Romanowsky notèrent que les noyaux du *Plasmodium malariae* étaient devenus rouge pourpre sur les frottis sanguins [23, 26,27].

Romanowsky apporta une amélioration notable en combinant le mélange d'Ehrlich et le bleu de méthylène. Parmi les produits de déméthylation oxydative (perte de groupements CH₃) du bleu de méthylène qu'on identifia dès 1900, on découvrit l'azur B, à l'origine d'une partie des colorants utilisés par Wright en 1902. Ce fut ensuite Leishman en Angleterre, Wright aux États-Unis, May, Grünwald et Giemsa en Allemagne qui œuvrèrent pour obtenir un azur B de méthylène stable, encore utilisé de nos jours. Il fallut attendre Pappenheim (1908—14) pour que la solution de May-Grünwald soit ajoutée à l'azur B-éosine Y, donnant le MGG actuel.[28]

Les colorations dérivées de la méthode initiale (MGG, Wright, Giemsa, Diff-Quik®) dans lesquelles l'azur B et l'éosine Y sont mélangés en solution aqueuse sont appelées « colorations de Romanowsky » [28,29,30]. L'ICSH (1984) en donne la définition suivante : « la coloration consiste en un mélange d'azur B, colorant cationique et d'éosine Y, colorant anionique en solution aqueuse, dans une proportion variant de 6,5 à 7,3, les deux colorants agissant séparément ou de façon combinée. » [28].

3-2 Principes de la coloration de MGG

La méthode panoptique décrite en 1908 par Pappenheim consiste à faire agir successivement deux colorants neutres, le mélange de May-Grünwald (1902) issu du mélange de Romanowsky (1891) et le mélange de Giemsa (1904). Sur des préparations fixées par dessiccation rapide, la méthode de Pappenheim colore les cellules de façon très nuancée, mettant particulièrement en évidence le caractère basique ou acide des cytoplasmes et les granulations des leucocytes.[28]

3-3 Les constituants chimiques de la coloration de MGG

Comme le soulignent Ganter et Jolles [31] ainsi que Bessis[32], le mélange de May-Grünwald (authentique « mélange de Romanowsky » comme le rappelle Wright [33]) est théoriquement un éosinate d'azur de méthylène (éosine Y + azur II de méthylène) dissous dans l'alcool méthylique. A partir de 1902—04 (publications de Giemsa) [24,34], l'azur II a été utilisé comme un mélange délibéré de bleu de méthylène non oxydé et d'azur B (appelé à l'époque azur I), ce qui permet d'avoir deux sources internes de dérivés azurés qui interagissent avec l'éosine. Les formulations modernes associent l'éosinate d'azur B et le bleu de méthylène et sont disponibles en poudre ou bien en solution-mère alcoolique (méthanol + glycérol v/v). Le mélange de Giemsa (appelé à tort « mélange de Romanowsky » dans de nombreux ouvrages) quant à lui est également un colorant neutre, mélange complexe de bleu de méthylène, d'éosinate d'azur et de violet de méthylène. Il est volontiers dénommé « azur-éosine-bleu de méthylène selon Giemsa » par les industriels (Merck Millipore notamment).[34]

3-4 Étape pré-analytique : fixation par dessiccation + méthanol absolu

Les frottis ou appositions doivent être séchés très rapidement (agitation à l'air, lames préchauffées à 40°C sur platine, lampe à infrarouges, sèche-cheveux sur position « froid », hotte ventilée. . .) . Pour autant la dessiccation des frottis n'est pas une véritable fixation et il faut faire agir un fixateur comme le méthanol. Comme le rappelle Bessis « Lorsque les frottis sont destinés à être colorés par le MGG on utilise la fixation par le méthanol absolu » mais « en pratique la solution-mère de May-Grünwald est dissoute dans le méthanol qui sert de fixateur » [32].

C'est pourquoi dans toute coloration de MGG le premier temps (May-Grünwald pur) est une étape de fixation et les cellules qu'on examine à l'issue de ce temps ne présentent aucune coloration. Dans la plupart des équipes, on utilise soit la méthode de Bessis (3 minutes de solution alcoolique de May-Grünwald pure versée sur les frottis/appositions afin qu'ils soient entièrement couverts), soit le méthanol absolu (un minimum de 2 minutes, le temps optimal étant de 10 à 15 minutes pour Lopez Cardozo, 10 minutes étant la durée généralement

choisie par les équipes qui travaillent en récipients, que ce soit en méthode manuelle ou automatisée)[26].

3-5 Les deux temps de la coloration

Après le temps de fixation (3 à 5 minutes de May-Grünwald pur versé sur les frottis/appositions afin qu'ils soient entièrement couverts, ou 10 minutes de méthanol absolu en bac à coloration), on ajoute autant d'eau tamponnée qu'on aura utilisé de May-Grünwald : 2 à 3 minutes (Wright) [33], 3 minutes (Bessis) [32] ou 5 minutes (Koss) [35]. Ce n'est que lorsque le May-Grünwald est dilué pour moitié avec de l'eau tamponnée qu'on obtient une coloration. Wright(1902) [33] précise que l'application du mélange de Romanowsky (l'actuel May-Grünwald) donne aux hématies une teinte bleue, et que la coloration différentielle ne se développe qu'avec le rinçage à l'eau en fin de coloration (de préférence distillée), les hématies devenant « verdâtres, puis jaunâtres et finalement orangées ou rosées », la décoloration prenant 1 à 3 minutes et l'eau de rinçage résultant de la décoloration étant bleue.[33]

Après le temps de coloration au May-Grünwald dilué on doit éliminer le colorant et, sans laver, passer les lames dans la solution de Giemsa. On doit préparer la solution de Giemsa extemporanément : Bessis [32] préconise de préparer « 30 mL d'eau distillée dans une éprouvette avec 15 gouttes de Giemsa près de la surface : le colorant reste à la partie supérieure de l'eau sans se mélanger. Puis on verse le contenu de l'éprouvette sur les lames, frottis à la face inférieure pour éviter que des précipités ne tombent sur la surface colorée ». La durée de la coloration est de 10 à 30 minutes (Bessis) [32] ou de 15 minutes (Koss) [35]. Les frottis sont ensuite lavés sous un fort courant d'eau du robinet (*running water* : 1 à 3 minutes pour Wright, 1 à 2 minutes pour Koss) , ce qui permet de développer tous les aspects de la polychromie, puis séchés. [33,35],

Ces précisions appellent deux commentaires : dans la dilution de la solution-mère de Giemsa, Bessis ne conseille pas d'utiliser de l'eau tamponnée mais seulement de l'eau distillée, ce que reprennent Ganter et Jolles [31] ainsi que Koss [35] y compris dans l'édition de 2006, page 1616 [35], et colorer à l'envers, c'est le principe de fonctionnement de l'automate fermé Bayer Hématek®2000 (cf. infra). Bessis (1972) ainsi que Lopez Cardozo

(1973) recommandent de ne pas monter les lames avec des lamelles (pratique répandue dans les laboratoires de biologie polyvalente et en hématologie) [33,26].

3-6 Mécanisme d'action

Le mélange de May-Grünwald, comme les autres mélanges de Romanowsky est donc un colorant neutre, un sel résultant de la combinaison d'une base et d'un acide : le premier composé est une base cationique bleue : le bleu de méthylène ou l'azur B de méthylène qui sont des thiazines (composés organiques ayant un cycle contenant quatre atomes de carbone, un atome d'azote et un atome de soufre). Tous deux ont une charge électrique nominale de +1. Le deuxième composé est un acide anionique rouge : l'éosine, qui est un xanthène (composé organique tricyclique constitué d'un cycle de pyrane entouré de deux cycles benzéniques). La charge électrique nominale de l'éosine B et de l'éosine Y est de (-) 2.[36]

Au contact des cellules et en présence d'eau, le mélange de May-Grünwald va se dissocier grâce à la dilution du bleu de méthylène et/ou de l'azur B en des sous-produits basiques bleus de type azur A, azur C, violet de méthylène et thionine [36,37]. Le colorant de May-Grünwald va se fixer essentiellement sur les noyaux et les acides nucléiques cytoplasmiques, donc sur l'ergastoplasme (REG) et sur les ribosomes libres des cellules à forte activité de biosynthèse protéique. En effet les dimères d'azur B, unis par des forces de van der Waals et chargés positivement sont attirés par les charges électronégatives des groupements phosphate de l'ADN et par des interactions hydrophobes avec les bases puriques (A,G) et pyrimidiques (C, T). L'éosine, quant à elle, se fixe préférentiellement sur les protéines ayant des charges positives (groupements aminés et chaînes latérales de la lysine et de l'arginine), c'est-à-dire sur les membranes et sur les cytoplasmes ainsi que sur l'hémoglobine [29,37].

3-7 Choix du tampon, pH optimal

Bessis [33] donne comme plage optimale un pH de 6,6 à 7 selon les concentrations respectives d'hydroxyde de soude (NaOH) et de phosphate mono-potassique (KH₂PO₄). Lopez Cardozo donne comme pH optimal une valeur de 6,8 de même que Spriggs et

Boddington [38]. C'est la valeur qui est donc retenue dans les recommandations actualisées. Notons toutefois que le tampon PBS à pH 7 est une bonne solution dégradée. [26]

3-8 Dépôts non spécifiques

Les dépôts qui se forment en surface de la phase liquidienne, par dessiccation ou précipitation des sels de colorants sont particulièrement notés en MGG dans toutes les techniques (manuelles ou automatisées) qui fonctionnent avec les lames à l'horizontale, colorant au-dessus (donc au contact de l'air), même si on travaille en « chambre humide fermée ». La seule solution pour éviter les dépôts non spécifiques est de travailler intégralement en milieu liquide (lames immergées dans le méthanol ou le May-Grünwald pur au début, puis May-Grünwald dilué et enfin Giemsa au 10 e).[26]

3-9 Appréciation morphologique de la coloration

3-9-1 les références de la littérature

Pour Ganter et Jolles [31], la coloration de MGG (ou de Pappenheim) colore les noyaux en « rouge violet et rose », si la coloration est parfaitement réussie Figures 14 ; 15

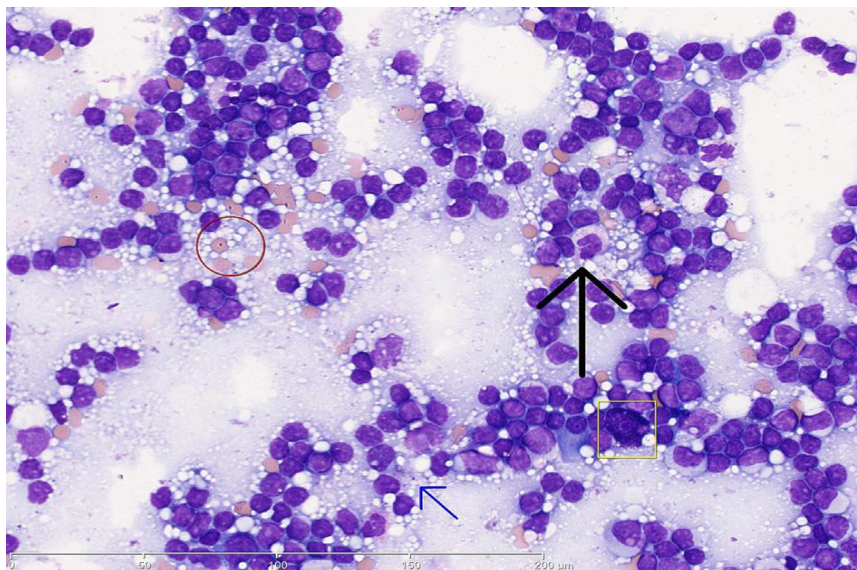


Figure 14. Coloration considérée comme optimale : les hématies (cercle rouge) sont rose orangé ou « chamois », le cytoplasme des polynucléaires est quasi transparent et les granulations bien visibles (flèche noire), les granulations des mastocytes sont violet sombre (carré jaune) et les corps lymphoglandulaires sont bien visibles (flèche bleue). MGG × 400. [31]

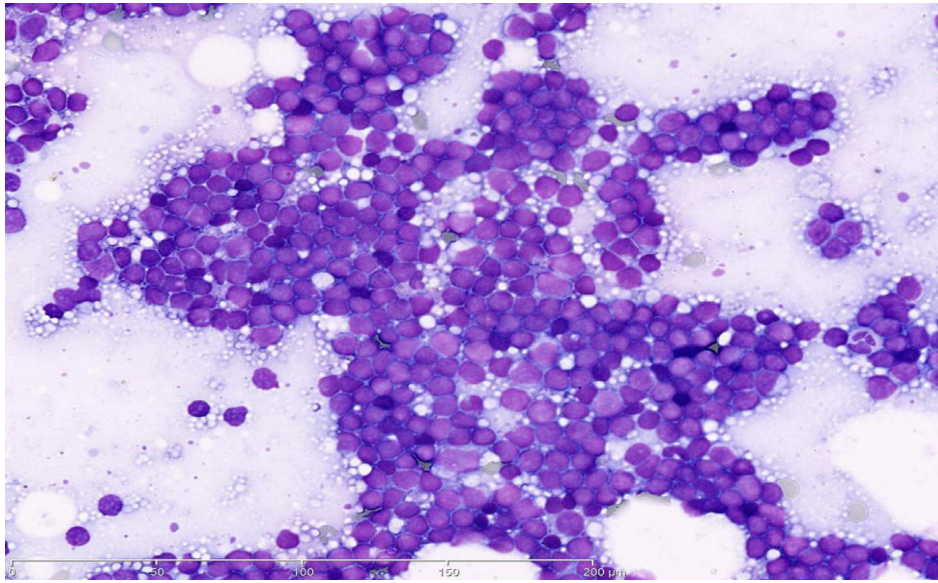


Figure 15. Coloration considérée comme inadéquate : les hématies sont verdâtres, ce qui démontre l’usage d’une solution de dilution/rinçage alcaline. MGG \times 400.[31]

Avec les protocoles couramment utilisés, les noyaux sont souvent d’un violet tirant sur le bleu. Toutefois les hématologistes considèrent que la chromatine doit avoir un aspect « bien foncé » : rouge violet ou violet rose, et pas violet bleu. Pour Koss , le MGG permet de bien voir les granules et inclusions des cytoplasmes, les nucléoles, le mucus et le colloïde, mais il est plus réservé sur la description de la chromatine : «Chromatin features are difficult to assess ».[35]

Selon Koss , les cytoplasmes basophiles doivent être «bleu ciel à bleu foncé », les cytoplasmes acidophiles « rouge clair ou rosé », tandis que les cytoplasmes polychromatophiles apparaissent « grisâtres ou violacés ». Les granulations leucocytaires acidophiles sont « orangées », les neutrophiles sont « marron rose sale », les basophiles « violet foncé », les azurophiles « pourpre ou violet pourpre », tandis que les granulations basophiles des érythrocytes (il s’agit en fait des réticulocytes) sont « bleu cobalt ». Il est évident à la lecture de ces critères qu’il s’agit de la description de l’ouvrage de Bessis, elle-même issue (Bessis les cite tous) des ouvrages de Jolly (1923), de Baker (1942) et de Cartwright(1968). (Figure. 16) [33]

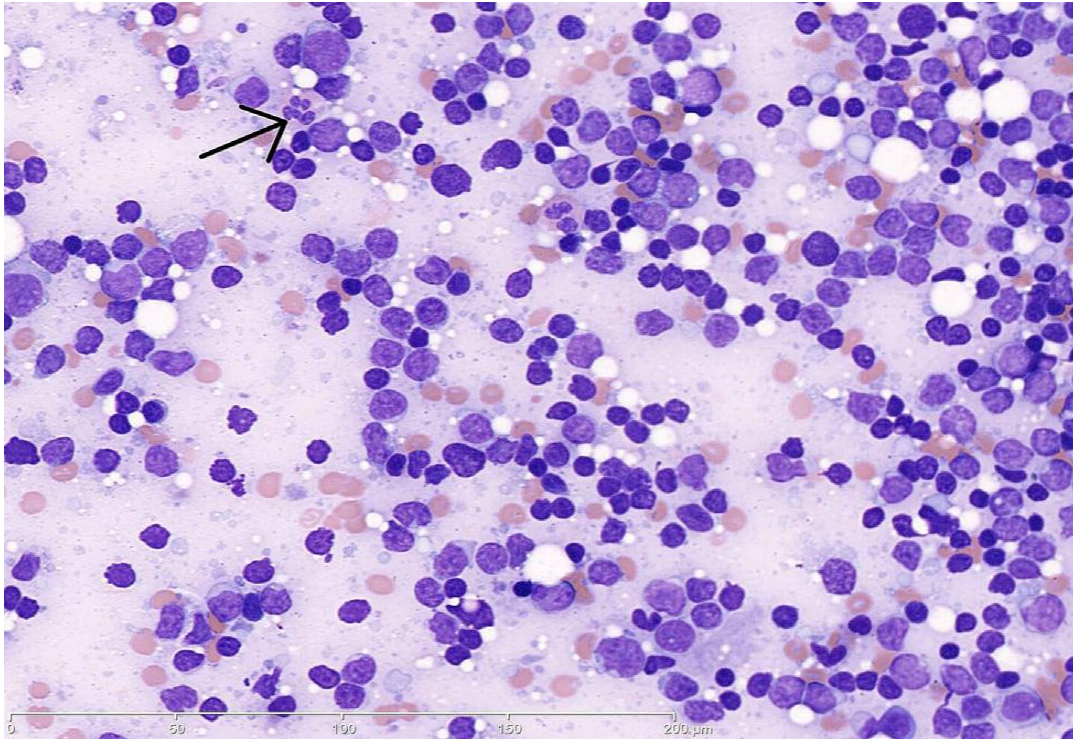


Figure 16. Coloration considérée comme correcte : les hématies sont rose orangé ou « chamois » et le cytoplasme des polynucléaires est rosé (flèche noire). Les corps lympho-glandulaires sont bien visibles. MGG $\times 400$. [31]

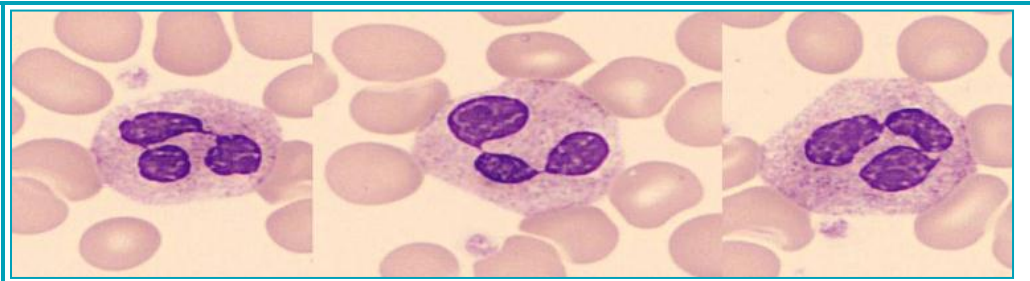
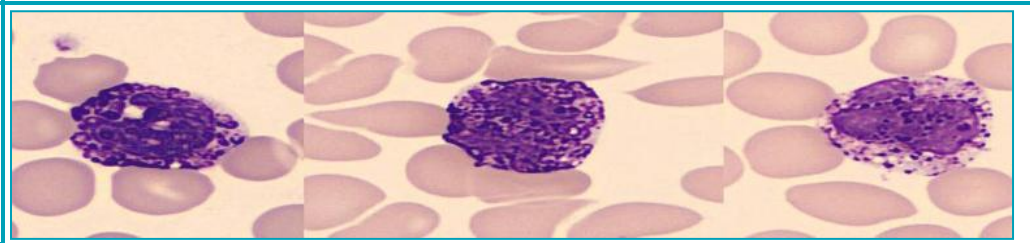
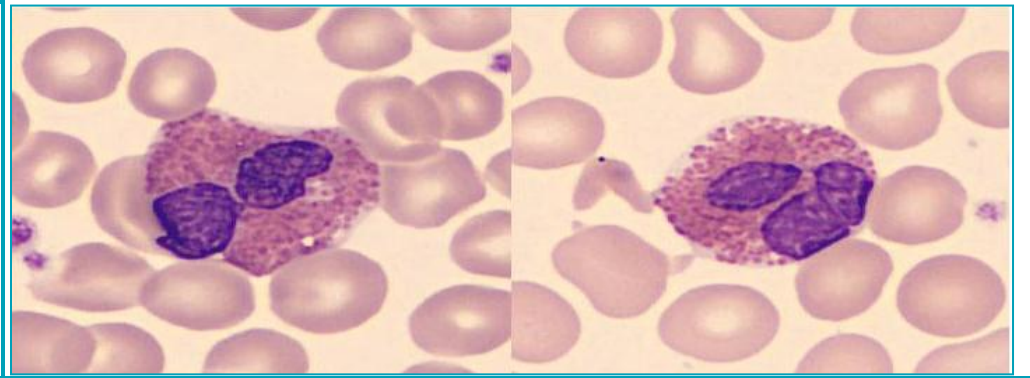
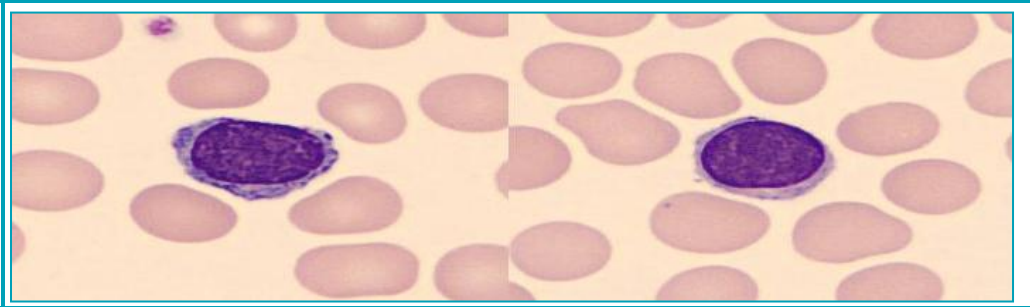
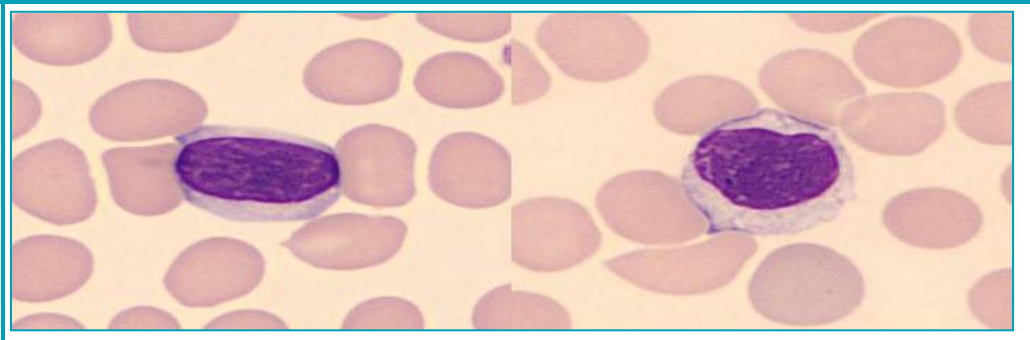
<p>POLYNUCLEAIRE NEUTROPILE</p>	
<p>POLYNUCLEAIRE BASOPHILE</p>	
<p>POLYNUCLEAIRE EOSINOPHILE</p>	
<p>MONOCYTE</p>	
<p>LYMPHOCYTE</p>	

Figure. 17 récapitulatif de la morphologie des différentes cellules sanguines colorées à la méthode de MGG.[33]

4- COLORATION DE JENNER

Préparer une solution de 5 g/l dans du méthanol de la même façon comme décrit précédemment pour la coloration de de May-Grünwald.[39]

4-1 Coloration de Jenner-Giemsa

La coloration de Jenner peut être substituée au May-Grünwald dans la technique décrite à la coloration de MGG. Les résultats sont un peu moins satisfaisants. La coloration est utilisée avec 4 volumes d'eau tamponnée et les frottis, après étant fixés dans le méthanol pour environ 4 minutes, sont plongés dans la solution de Giemsa. Ils devraient rester dans la dernière solution pour 7-10 min. La différenciation est réalisée comme décrit plus tôt.[39]

5- COLORATION DE LEISHMAN

La coloration de Leishman qui était largement utilisée dans le laboratoire d'hématologie de diagnostic, n'a pas été appréciée par une touche scientifique depuis quelques décennies comme les autres colorants de Romanowsky. Sauf dans le travail de Woronzoff-Daschkoff où elle constituait l'un des plusieurs composants qui font partie du colorant de complexe [39].

5-1 Procédure

Peser 0,2 g de colorant en poudre, transférer à un flacon de 200-250 ml de capacité. Ajouter 100 ml de méthanol et chauffer le mélange à 50°C pendant 15 minutes, en agitant. Laisser refroidir le ballon et filtrer la solution. Il est alors prêt à l'emploi, mais donne de meilleurs résultats au repos.

Sécher le frottis à l'air et inonder la lame avec la coloration. Après 2 min, ajoutez le double du volume d'eau et colorer la lame pour 5-7 min. Puis laver dans un flux d'eau tamponnée jusqu'à ce qu'il ait acquis une teinte rosâtre (jusqu'à 2 min). Après que le dos de la lame a été nettoyée, laisser à sécher.[39]

6- METHODES DE COLORATIONS RAPIDES

La méthode de Field a été introduite pour apporter une réponse rapide à la coloration des frottis épais pour les parasites du paludisme. Avec quelques modifications, elle peut être utilisée de façon assez satisfaisante pour la coloration rapide des frottis minces. Les colorations sont disponibles dans le commerce prêt à l'emploi, ou ils peuvent être préparés comme suit.[39]

6-1 Réactifs

- **Coloration A**

Bleu de méthylène.....	1,3 g
Hydrogénophosphate de sodium (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	12,6 g
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	6,25 g
Eau.....	500mL

Dissoudre le bleu de méthylène et de l'hydrogénophosphate de sodium phosphate dans 50 ml d'eau. Puis faire bouillir la solution dans un bain d'eau jusqu'à l'ébullition pour « polychromer » le colorant. Ajouter le phosphate de potassium monobasique et 500 ml d'eau fraîchement bouillie. Après agitation pour dissoudre la coloration, mettez à côté la solution pendant 24 h avant de filtrer. Filtrez à nouveau avant utilisation. Le pH est de 6,6 à 6,8.

En variante, l'azur B peut être ajouté au bleu de méthylène dans la proportion de 0,5 g d'azur B à 0,8 g de le bleu de méthylène, et les colorants combinés sont ensuite dissous directement dans la solution de tampon phosphate.

- **Coloration B**

Eosine.....	1,3 g
Hydrogénophosphate de sodium (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	12,6 g
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	6,25 g
Eau	500 mL

Dissoudre les phosphates dans l'eau fraîchement bouillie chaude et puis ajouter le colorant. Filtrer la solution après l'avoir laissé reposer pendant 24 h.

6-2 Procédure

Fixer le frottis pendant 10-15 secondes dans le méthanol. Décanter le méthanol et déposer sur la lame 12 gouttes diluées de la coloration B (1 volume de colorant pour 4 volumes d'eau). Immédiatement, ajouter 12 gouttes de coloration A. Agiter la lame pour mélanger les colorations. Après 1 min, rincer la lame dans l'eau, puis plonger le frottis pendant 5 secondes dans le tampon phosphate à pH 6,6, laver la lame dans l'eau, puis placez-la sur la fin pour drainer et sécher.[39]

B-AUTOMATISATION EN HEMATOLOGIE

I-PRESENTATION

Les capacités étendues des analyseurs multiparamétriques en hématologie ont donné lieu à moins de frottis examinés par microscopie visuelle, surtout après les critères tels que les critères du groupe international Consensus (Barnes et al. 2005) qui sont appliquées sur les résultats des analyseurs. Le reste des frottis examinés sont principalement constitués d'échantillons anormaux, où l'obligation pour chacun des frottis d'être de bonne qualité est plus grande.

Comme les laboratoires d'hématologie sont devenus plus automatisés, l'utilisation des automates de préparation et de coloration des frottis a augmenté. Actuellement, les automates de préparation et de coloration des frottis sont incontournables pour les laboratoires. Ils fournissent des résultats de coloration rapides, économiques et uniformes. Ils sont avancés dans un multiple de paramètres.

Les caractéristiques de performance de ces systèmes ne sont pas bien connus, parce que la littérature est extrêmement faible concernant les études de performances, d'autre part parce que les laboratoires placent ces instruments habituellement utilisés, sans études de performance autres que formelles, confirmant uniquement le fonctionnement mécanique satisfaisant.

II-LES ANALYSEURS HEMATOLOGIQUES AUTOMATISES

La numération formule sanguine (NFS) a parcourue un long chemin à partir d'être juste une mesure de l'hémoglobine et des composants cellulaires dans le sang périphérique. Le développement et l'adaptation des différentes technologies a cédé une grande variété de différents paramètres cellulaires, certains très utiles et certains ont encore à prouver leur valeur. En parallèle avec la technique de mesure automatisé des instruments ont été développés peuvent analyser de très petites quantités de sang en utilisant un échantillonnage à tube fermé et des débits d'échantillonnage très élevées.

Les nombreuses mesures fournies par les automates et les instruments semi-automatisés sont pour la plupart des modifications des techniques manuelles d'origine, mais il

y a plusieurs applications passionnantes de nouvelles technologies. Ces instruments sont précis et exacts, et les mesures sont reproductibles. Il existe plusieurs fabricants d'instruments utilisant des technologies et des systèmes de mesure similaires, mesurant le même paramètre par différentes façons. Il y a des avantages et des inconvénients pour tous les systèmes.

Les paramètres principaux sont :

1. Hémoglobine.
2. Globules rouges.
3. Réticulocytes et globules rouges nucléés
4. Globules blancs.
5. Plaquettes.

La plupart analyseurs différentiels automatisés qui sont maintenant disponibles utilisent la cytométrie de flux incorporé, dans un sang complet. Les comptages sont effectués sur sang total dilué dans lequel les globules rouges sont soit lysées ou sont rendus transparents.

Une numération différentielle en trois parties attribue les cellules à des catégories habituellement désignées : (1) «granulocytes» ou «grosses cellules» ; (2) «lymphocytes» ou «petites cellules » ; et (3) «monocytes», «cellules mononucléaires», ou «cellules moyennes ». En théorie, la catégorie de granulocytes comprend les éosinophiles et les basophiles, mais en pratique, il est possible qu'une proportion appréciable de cellules de ce type soit exclue de la catégorie de granulocytes et être comptées comme des monocytes. Les deux, compteur d'impédance et compteur à diffusion de lumière sont capables de produire la numération en trois-parties d'un seul canal.

D'autre part, la numération cinq à sept-parties, classent les cellules en tant que neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes, et dans une formule leucocytaire prolongée elle peut également inclure les granulocytes immatures ou grandes cellules immatures (composée de blastes et des granulocytes immatures) ainsi que les lymphocytes atypiques (y compris les petits blastes). La plupart des numérations cinq à sept-parties ont besoin de deux ou plusieurs canaux dans lesquels le volume cellulaire et d'autres caractéristiques sont analysés par diverses modalités.

Tableau III Analyseurs hématologiques automatisés avec capacité de comptage à Trois- parties ou plus.

INSTRUMENTS & FABRICANTS	TECHNOLOGIE UTILISEE
Beckman Coulter GEN-S, LH series, DxH	-Impédance avec courant électromagnétique à basse fréquence -Impédance avec courant électromagnétique à haute fréquence -Diffusion de la lumière laser
Sysmex SE, X-series	-Impédance avec courant continu à basse fréquence -Impédance avec courant de radiofréquence -Cytométrie de flux par fluorescence
Siemens Technicon H series, Advia series	-Diffusion de la lumière et absorbance après la réaction de la peroxydase -Dispersion de la lumière différentielle à deux-angles suivant décapage cytoplasmique
Abbott Cell-Dyn 3500, 4000, Sapphire	Diffusion de la lumière à quatre paramètres : lumière vers l'avant, dispersion orthogonale de la lumière, diffusion de la lumière à angle étroit et dispersion orthogonale de la lumière dépolarisée
Horiba Medical Pentra Series	-Impédance électrique -Absorbance de la lumière
Bayer Advia 60, ADVIA 120, 2120, H1,H2 and H3	-Cytochimie -Impédance de flux concentré -Absorbance de la lumière -La cytométrie de flux -Diffusion de la lumière après la réaction de la peroxydase -Absorbance de la lumière après la réaction de la peroxydase -Diffusion de la lumière suivant décapage de cytoplasme des cellules autre que les basophiles par un agent lytique à faible pH

III-AUTOMATES DE PREPARATION ET DE COLORATION DE LAMES

Les instructions du fabricant doivent être toujours suivies, à moins que l'expérience locale a démontré que la variation de la technique recommandée réalise de meilleurs résultats.

Un frottis de sang doit être effectué dès que possible après la collecte de sang. Des changements morphologiques importants se produisent si les échantillons sont conservés pour une période plus longue. Les meilleurs résultats du frottis sont obtenus dans les 3 heures après la collecte de sang, Il est conseillé de stocker le sang à 4 ° C, mais pas plus de 8 heures.

Lorsque le sang n'est pas frais les changements de stockages suivants (artefacts) commencent à apparaître :

- Vacuoles cytoplasmiques dans les monocytes et les neutrophiles
- liaison nucléaire et de l'enflure dans les lymphocytes et monocytes
- diminution de l'expression de granulation toxique
- caryorrhexie dans les neutrophiles

Une fois que le frottis de sang est effectué, il doit être séché avant d'être coloré. La coloration d'un frottis de sang humide provoque des artefacts. Les frottis sanguins, préparés manuellement, sont séchés pendant une période de 5 - 10 minutes à température ambiante avant d'être colorées.

1-Unité de Préparation de Lame Hématologique Automatisée SP-1000i^{MC} de Sysmex

Le « **Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina** » est équipé de cet automate. Le SP-1000i est la troisième génération de produits de préparation et de coloration de lame intégrés éprouvés, développés, fabriqués et soutenus par Sysmex. Dans le cadre de l'exploitation de routine, le SP-1000i offre une préparation automatisée rapide des frottis de sang périphérique pour aider les laboratoires à satisfaire et standardiser le délai d'exécution de réexamen de frottis. [40]

1-1 Caractéristiques et avantages

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 Alpha ou d'un système HST intégré.

- Il améliore et standardise le temps nécessaire pour préparer le frottis :
- Une préparation rapide du frottis avec une préparation et une coloration de lame, première entrée première sortie
- Il aspire uniquement le sang des échantillons qui nécessitent un frottis
- Il a la capacité d'utiliser des lames colorées pour aider à différencier les échantillons STAT des échantillons de routine
 - 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 micro-échantillon aspire 60 µL de volume d'échantillon pour préparer et colorer des frottis de qualité
 - Il produit de manière constante des frottis de qualité :
- Il utilise un processus unique qui combine la cassette de lame avec la coloration sans bain
- Il ajuste automatiquement l'angle, la vitesse et le volume de sang en fonction de la valeur HT de l'échantillon
 - 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 [40]



Figure 18. Unité de Préparation de Lame Hématologique Automatisée SP-1000iMCde Sysmex[40]

1-2 La technologie de l'automate

○ **Préparation des lames :**

- Utilise une lame d'étalement robuste et autonettoyante pour préparer des frottis monocouches
- Imprime directement sur la lame porte-objets des informations selon les options définies par le laboratoire qui peuvent comporter :
 - Une ou plusieurs étiquettes de code à barres uni- ou bidimensionnelles
 - Le nom du patient
 - Le numéro de code à barres
 - Le résultat spécifique à l'instrument
- Sèchent automatiquement les frottis avant coloration
- Abrivent les lames dans des cassettes individuelles
- Deux tours d'entreposage latéraux intégrés offrent la capacité d'abriter des lames de couleurs différentes afin de différencier visuellement les frottis STAT des autres frottis.[40]

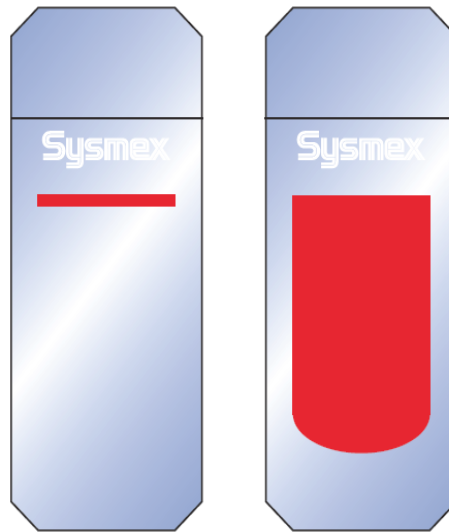


Figure. 19 Distribution du sang sur la lame avec Sysmex SP-series[40]

○ **Réactifs** :[40]

Selon le fabricant, ces réactifs sont recommandés pour utilisation sur l'instrument :

- Coloration de May-Grunwald
- Coloration de Wright
- Coloration de Giemsa
- Tampon Phosphate
- Eau de rinçage

○ **Coloration** : [40]

- 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
- Sèche automatiquement les frottis colorés avant qu'ils n'arrivent à la zone de sortie

2- l'automate CELL-DYN SMS

Le nouveau CELL-DYN SMS est le premier instrument de Abbott pour automatiser tous les aspects de de la préparation des frottis sanguins, y compris un système de coloration véritablement flexible. Les modes "colorer seulement" et "STAT" sont disponibles pour maximiser la polyvalence de la SMS. L'opérateur charge simplement les tubes d'échantillons des patients et marche loin. Le SMS intègre une technologie prouvée optimisée pour produire systématiquement des frottis de sang de haute qualité.[41]



Figure. 20 L'automate CELL-DYN SMS de préparation et de coloration des lames.[41]

2-1 Description et technologie

Le CELL-DYN SMS produit constamment des frottis sanguins de haute qualité. Des paramètres strictes ont été optimisés, assurant des frottis sanguins compatibles et réduisent la nécessité de procéder à des ajustements pour les échantillons avec des valeurs significativement élevées ou basses en hémocrite. Dans le mode de prélèvement fermé, les mélanges auto-charge 50 positions, identifie l'échantillon, et aspire seulement 200 uL. Seulement 30 uL de l'échantillon est nécessaire dans le mode d'échantillonnage ouvert. Chaque lame est identifiée positivement avec plusieurs lignes définissables par l'utilisateur imprimé directement sur la lame. Un mode « colorer seulement » est disponible. [41] (Voir Tab. IV)

Tableau IV : Spécifications générales sur l'automate CELL-DYN SMS

PARAMETRE	SPECIFICATIONS
Débit	Jusqu'à 80 lames/heure
Volume d'aspiration	Mode ouvert : 200 µL Mode fermé : 30 µL
Volume du diluent	11 +/- 1 mL
Lames	(Peint à la fin) recommandé, 25 x 75 x 1 mm Largeur 24.5 to 27.0 mm Longueur 75.0 to 76.5 mm Epaisseur 0.9 to 1.5 mm
Capacité de stockage des lames	150
Tube d'échantillons	75 x 13 mm tubes de prélèvement avec des bouchons perçables (e.g. Becton-Dickinson® Vacutainer® Hemogard® Closure acceptably Greiner® Vacuette®, Surstedt®)2
Capacité de tubes à échantillons	50 tubes
Porteur de lames	20 Lames par porteur
Maximum de tubes colorés par protocole	5
Volume du tube de coloration	300 mL
Rinçage	Rinçage à eau non-circulante
Stations de séchage	1 ambiante et 1 four à air chaud
Four de séchage	Peut-être ajuster de 40° C à 60° C

2-2 Processus de coloration

Le système robotique de coloration reçoit les porteurs de lames contenant les échantillons préparés. Le Protocole de coloration est préréglé par l'opérateur qui remplit les cuves de coloration et les place dans le bac de coloration dans l'ordre dicté par le protocole. Le robot transfère les porteurs à travers le processus de coloration pour les temps spécifiés dans le protocole, puis transporte les lames colorées sur le côté de sortie du convoyeur. Le convoyeur déplace le porteur à la droite de la cellule-DYN SMS pour être ramassé par l'opérateur.[41]

Le système de coloration utilise les composants suivants :

- Robot
- Porteur-convoyeur de lames
- Tube de coloration
- station de rinçage
- Four de séchage.

3- L'automate ADVIA Autoslide® de Siemens [42]

3-1 Vue d'ensemble

Le ADVIA® Autoslide, préparateur et colorateur de lames est connecté au système ADVIA 2120 / 2120i hématologique et commandé par son logiciel. Il peut automatiquement préparer et colorer un frottis sanguin de haute qualité sur une lame de microscope. Le système prépare des frottis et les colore à base de critères qu'on peut personnaliser dans le logiciel du système. On peut également choisir de préparer des frottis sans les colorer. [43]

Le système permet d'avoir des frottis à partir des échantillons aspirés dans le mode d'auto-échantillonneur uniquement. (Fig. 14)

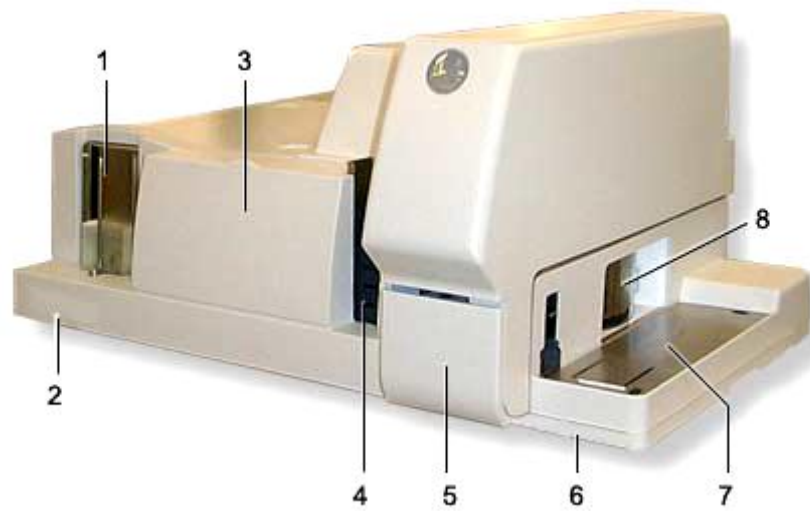


Figure. 21 Photo de l'automate de coloration ADVIA Autoslide (Siemens) : 1 distributeur de lames ; 2 plateau de lames cassées ; 3 Porte d'accès avant ; 4 chargeur ; 5 porte d'entrée Manuel / STAT ; 6 bac de collecte de débordement du colorant ; 7 zone de collecte ; 8 porte d'accès à l'appareil.[42]

3-2 Technologie de fonctionnement

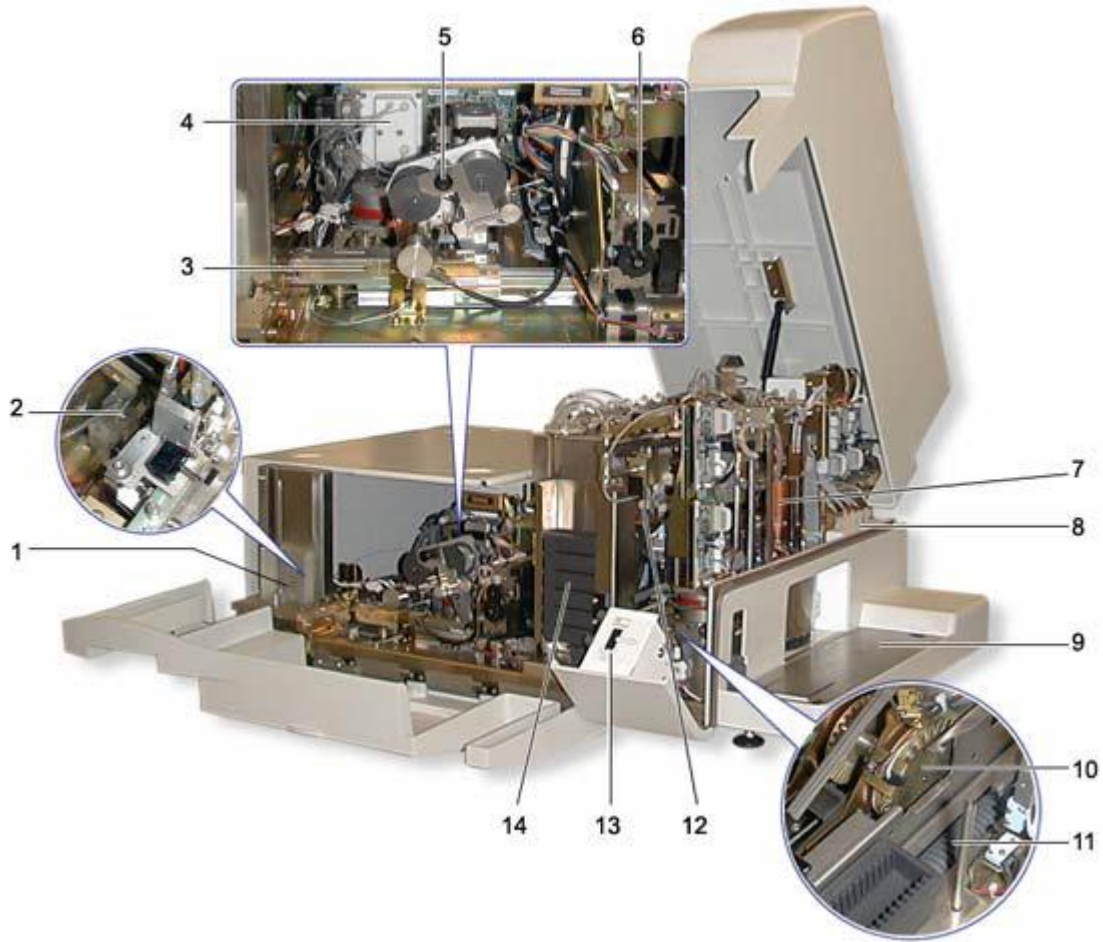


Figure.22 Photo de l'automate ADVIA Autoslide (Siemens) ouvert avec différentes composants : 1 Distributeur de lames ; 2 aiguille ; 3 porteur de lames ; 4 seringues d'échantillonnage ; 5 étaleur ; 6 Imprimante ; 7 montage du colorateur ; 8 seringues de réactifs ; 9 file d'attente ; 10 verticalisateur ; 11 chariot de transfert ; 12 transfert/récupérateur de lames ; 13 entrée manuelle ; 14 chariot de chargement.[42]

Le fonctionnement est comme suit (Fig.23) :[42]

1. L'aiguille dispense une goutte de l'échantillon sur une lame. Elle distribue le reste de l'échantillon dans le bain de rinçage et elle est rincée.
2. L'étaleur réalise le frottis en grâce la tension de surface du sang. Le coin de l'étaleur est positionné sur la lame avant d'être mise en contact avec le sang, en attente du sang

à migrer le long du coin de l'étaleur. Le temps d'attente, la taille des gouttelettes, la vitesse de l'étalement, et l'angle sont tous des paramètres ajustables par l'utilisateur. Le système tire alors la lame en arrière, produisant le frottis. Après étalement, le système soulève la tête de l'étaleur et la bande d'étalement se déplace vers une section propre prête pour la prochaine lame.

3. La lame pénètre dans l'imprimante, qui peut imprimer des données des patients ou d'autres informations directement sur la lame.
4. Après l'impression, la lame se déplace dans le verticalisateur, qui la transfère pour être colorée ou bien directement à un chariot selon les besoins.
5. Si la coloration est requise, la lame se déplace dans l'automate de coloration, un plateau rotatif de 32 puits contenant de coloration. Une plaque d'aiguille supporte les aiguilles en des emplacements réglables pour distribuer des liquides dans les puits ou pour aspirer le liquide des puits. La lame est colorée selon le procédé de coloration en cours d'utilisation.
6. Une fois que la coloration est terminée, la lame est transférée à un chariot et le processus est terminé.

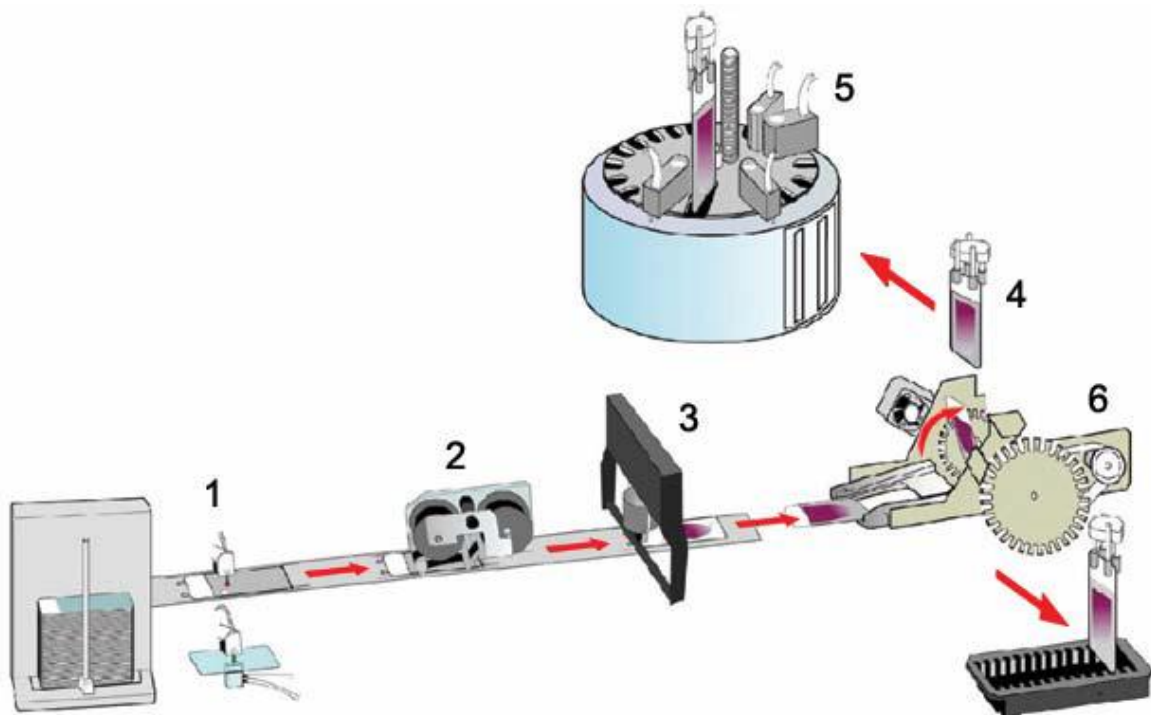


Figure. 23 Schéma du fonctionnement de l'automate ADVIA Autoslide de Siemens.[42]

3-2-1 Protocoles de coloration

3-2-1-1 Méthode de May-Grünwald Giemsa

La méthode de May-Grünwald Giemsa est à usage diagnostique in vitro dans la coloration différentielle du sang, des frottis de la moelle osseuse et des fluides corporels sur l'ADVIA Autoslide Maker/Stainer.[39,42]

Les réactifs sont :

- Coloration 1 May-Grunwald : - Méthanol, 99.65 %
- Bleu de méthylène – Eosine, 0.35 %
- Coloration 2 Giemsa : - Méthanol, 56 %
- Glycérol, 43 %
- Bleu de méthylène – Eosine 1 %
- Tampon pour May-Grunwald: -Tampon phosphate.
- Méthanol ≥ 99.8 % [42]

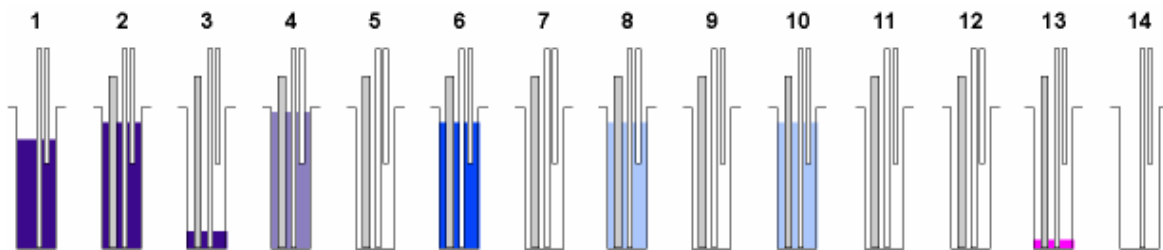


Figure.24 Description du protocole de coloration MGG [42]

1. Distribution de la coloration May-Grünwald (Coloration 1).
2. Introduction de la lame.
3. Vidange partielle de la coloration May-Grünwald.
4. Distribution du tampon pour diluer la coloration 1.
5. Vidange.
6. Distribution de la coloration 1 diluée.
7. Vidange.
8. Distribution de l'eau de rinçage (eau distillée).
9. Vidange.
10. Distribution de l'eau de rinçage (eau distillée).
11. Vidange.

12. Vidange.
13. Distribution du méthanol.
14. Enlèvement de la lame.

a) Principe de la procédure

Les 2 mélanges de colorations utilisées par ce protocole ont des propriétés très distinctes. Le May-Grünwald (Coloration 1) colore les sites de cellules acidophiles et les granulations neutrophiles de leucocytes, tandis que le Giemsa (Coloration 2) colore le cytoplasme des monocytes et lymphocytes, ainsi que la chromatine nucléaire. Les frottis colorés sont examinés au microscope [42,44].

3-2-2 Coloration automatisée des frottis réalisés manuellement

On peut utiliser le module Autoslide pour colorer des lames qui ont été réalisées manuellement loin du système :[42]

1. Assurer que le système de ADVIA 2120/2120i ne traite pas des échantillons et qu'il est inactif.
2. Dans le menu Opérations, sélectionnez Contrôle Autoslide.
3. Dans l'onglet Contrôle Autoslide, sélectionnez l'option porte « Manuel / STAT » puis sélectionnez Démarrer.
4. Lorsque la porte s'ouvre, insérer la lame dans la porte de support avec frottis de sang sur la droite. Assurez-vous que la lame soit bien en place dans le support.
5. Fermez la porte d'entrée « manuel / STAT ».
6. A la fin du cycle, la lame est chargée dans une armoire et la porte d'entrée manuelle s'ouvre.

4-L'automate UniCel DxH SMS Beckman Coulter

Le DxH-SMS est un système entièrement automatisé intégré, de préparation et de coloration destiné au laboratoire d'hématologie. Il est disponible soit comme un seul instrument ou comme partie intégrante de la configuration DxH Workcell.[45]

Le DxH-SMS est capable de traiter à la fois des échantillons veineux et capillaires via cassette ou présentation à un seul tube, et un lecteur de code à barres numérique avec capacités 2D assurant l'identification positive pour tous les échantillons présentés au mécanisme d'aspiration.[46]Le DxH SMS traite des échantillons de patients et envoie les données au System Manager. Le « System Manager » : • contrôle les processus, tels que la réalisation et la coloration des frottis sanguins, et les procédures de diagnostic. • Gère les données, tels que la commande de test, l'interface LIS et l'enregistrement.[45]

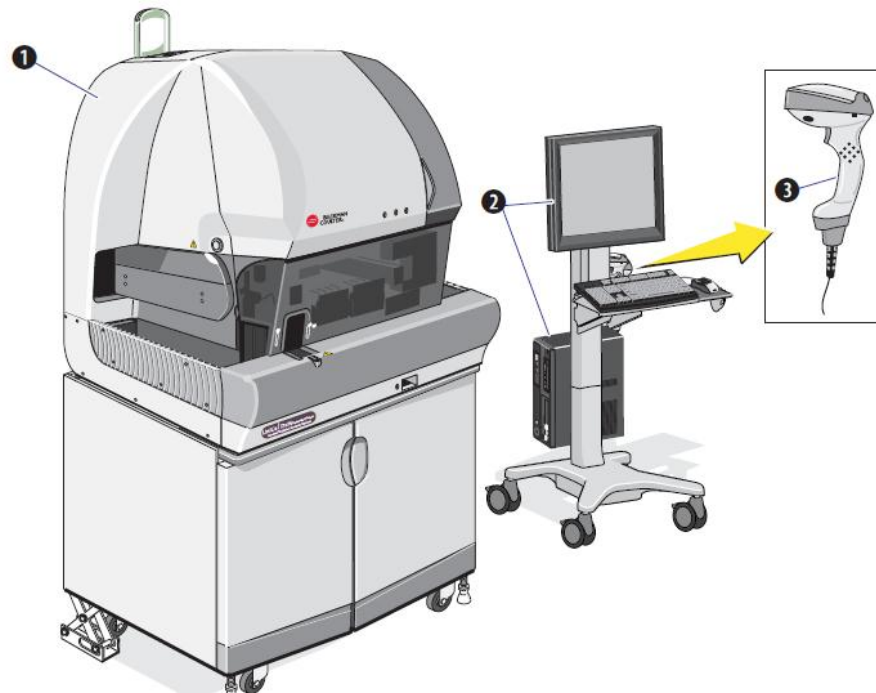


Figure. 25 L'automate de préparation et de coloration de lames DxH Beckman Coulter.

1-DxH SMS.

2-Système manager.

3-Lecteur de code à barre.[45]

4-1 Réalisation des frottis sanguins

La sonde d'aspiration d'échantillon aspire 90 μ L de sang total, elle est capable de la préparation d'un maximum de quatre frottis de sang provenant d'une seule aspiration. Un dispositif unique et breveté, la « **Hemasphere** », est incorporé dans le système pour mesurer

«l'attachement résiduel» de l'échantillon de sang à une surface interne d'un analogue de la manière où le sang se comportera une fois étalé sur un verre de lame (profil de mouvement). Ceci élimine le besoin pour les résultats de NFS pour déterminer un diaporama de vitesse de décision et l'angle de diffusion, qui s'ajustera automatiquement en cas d'augmentation ou diminution de masse de globules rouges, globules blancs, ou en cas de présence protéines plasmatiques anormales. (Fig.26)[45]

L'échantillon aspiré est transporté à travers « l'hemasphere », un détecteur de sang, et enfin dans la sonde de distribution où 25 uL de l'échantillon sera éliminé. La sonde se déplace à la position de placement de la goutte. Environ 4 uL de sang est placé sur la lame située dans la navette des frottis. [45]

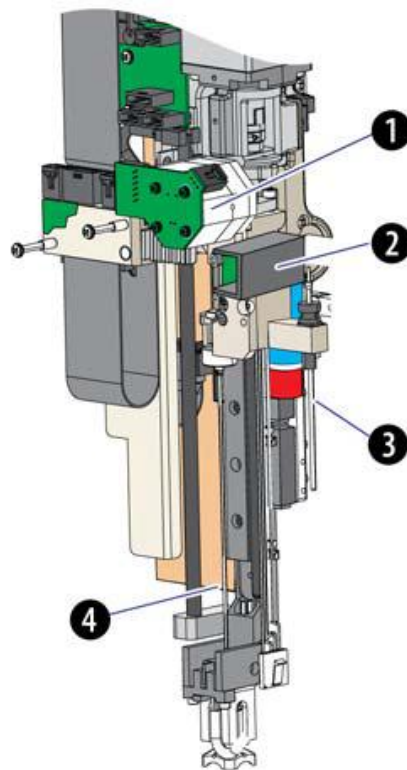


Figure .26 “Hemasphere” - DxH-SMS Beckman Coulter.

- 1- Hemasphere.
- 2- Détecteur du sang.
- 3- Sonde de distribution.
- 4- Sonde d'aspiration.[45]

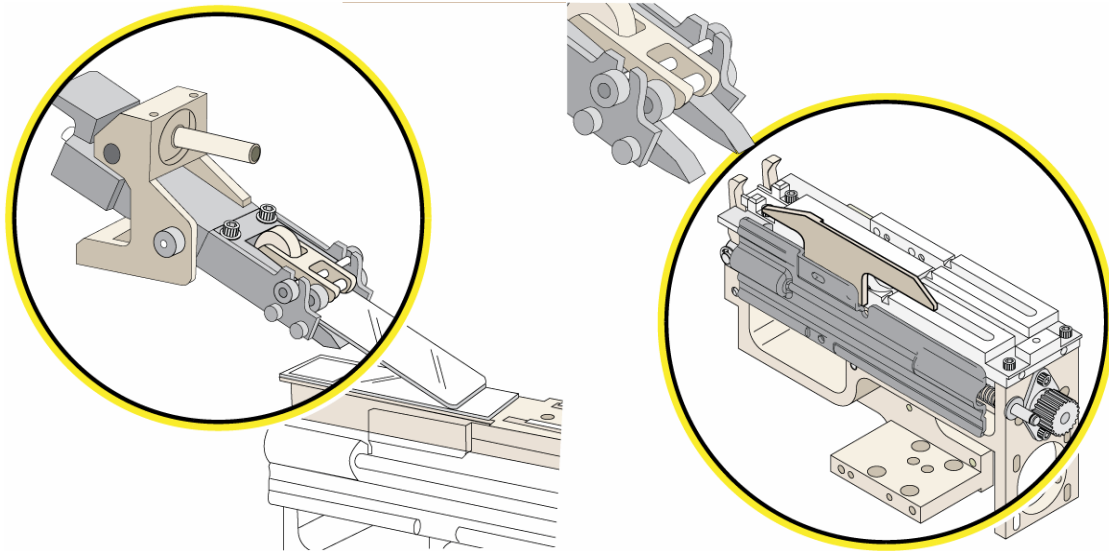


Figure. 27 Schéma du chariot des lames (à gauche) et navette de lames (à droite).[45]

Le DxH-SMS a aussi une option 'colorer seulement' pour les frottis sanguins préparés manuellement tels que ceux préparés à partir de faible volume d'échantillons capillaires pédiatriques, moelle osseuse ou fluide corporel.[45]

4-2 Les réactifs

Selon les recommandations du fabricant :[45]

-Nettoyant DxH : un agent de nettoyage destiné à être utilisé sur les composants du système DxH qui entrent en contact avec des échantillons de sang.

- Colorations et tampons :

-Coloration de Wright « TruColor » et tampon de Wright « TruColor ».

-Coloration de Wright-Giemsa « TruColor » et tampon de Wright-Giemsa « TruColor ».

-Coloration de May-Grunwald-Giemsa et son tampon.

- Lames : Beckman Coulter recommande des lames développées spécialement pour la DxH-SMS.

- Fixateur : Méthanol 99.8%.

- Eau distillée.

4-3 Coloration des frottis

Le système peut être personnalisé pour soutenir les méthodes de coloration Wright, Wright-Giemsa, ou May-Grunwald-Giemsa selon la préférence de l'opérateur. L'utilisateur contrôle également l'aspect du frottis sanguin par rapport à la forme et la longueur, la position sur la lame, et l'optimisation du protocole de coloration préféré.

Le panier contenant les frottis réalisés est plongé dans chaque bain (1 à 5) pendant un temps de coloration dépendant de protocole actif. Chaque bain est configuré pour recevoir un réactif d'une source d'alimentation prédéterminée, configurée par l'utilisateur. Chaque bain contient un maximum de 250 ml de réactif. La coloration est conçue de telle sorte que les réactifs sont automatiquement rechargés (mise hors tension automatique).

Les lames sont séchées après coloration. Le panier de lames colorées est placé dans le côté droit du séchoir où l'excès d'eau est éliminé du panier. Le bras de robot déplace le panier du côté gauche pour achever le cycle de séchage.[45]

Tableau V Exemple d'un protocole de Coloration de Wright développé pour UniCel DxH-SMS Beckman Coulter

Bain	Réactif	Pourcentage	Durée
1	Méthanol	100	1 min
2	Coloration de Wright	100	5 min
	Rien	N/A	
3	Coloration de Wright	95	6 min
	Tampon de Wright	5	
4	Rien	N/A	N/A
5	Eau distillée	100	3 min

4-4 Point de vue qualité

Beckman Coulter a développé les réactifs « TruColor » et des protocoles par défaut, pour être utilisés sur l'UniCel DxH SMS. Les protocoles par défaut Beckman Coulter ont été optimisés pour une spécification de coloration prédéfinie. Vu que la coloration est subjective,

l'optimisation des protocoles et/ou des réactifs peut être nécessaire pour répondre aux critères individuels de colorations.[45]

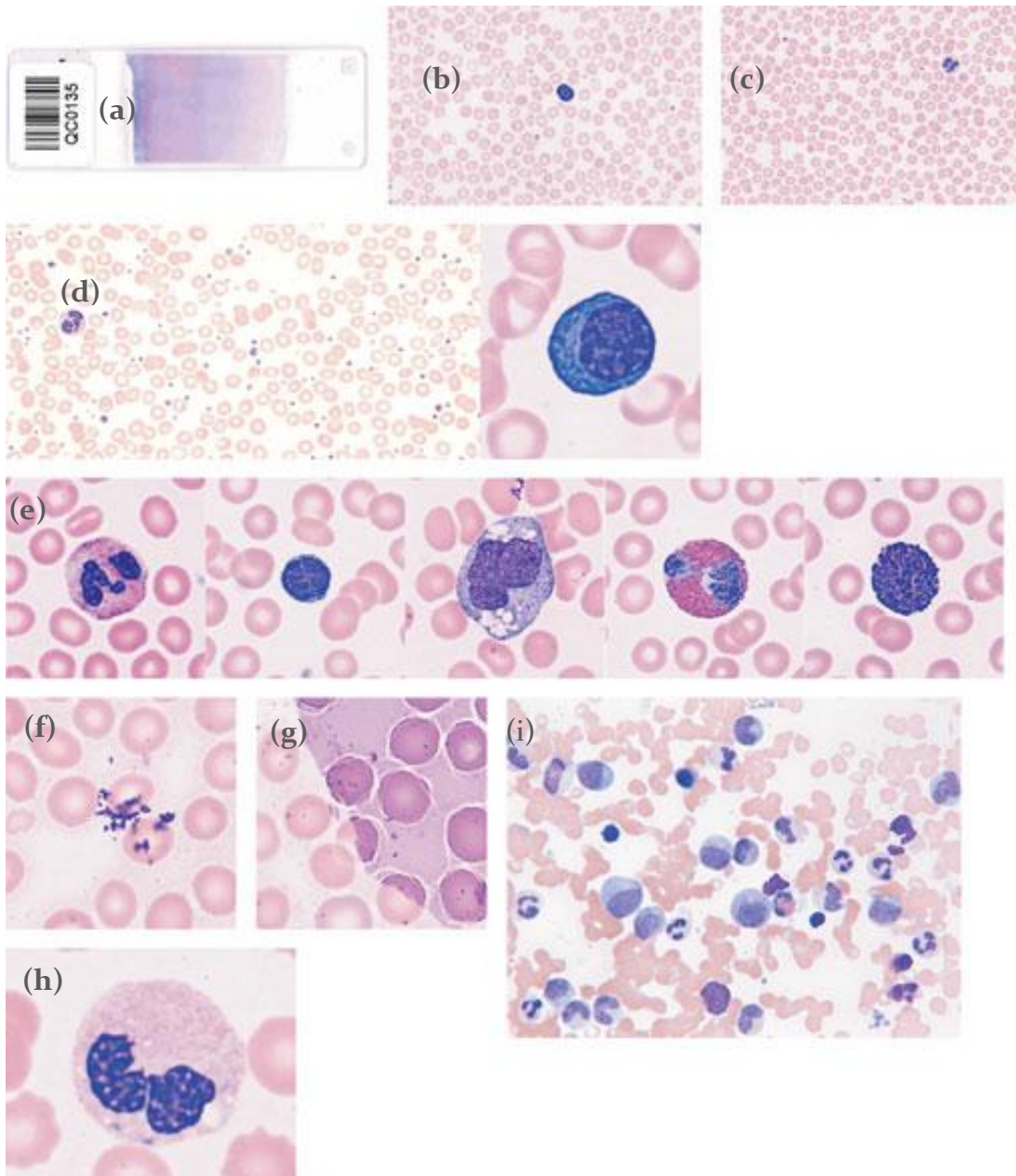


Figure .28 Des exemples de coloration sur l'automate DxH SMS-Beckman Coulter[45]

- (a) Un exemple d'un frottis sanguin acceptable d'une perspective macroscopique.
- (b) Un exemple de masse de globules rouges diminuées vu dans l'anémie à carence en fer.

- (c) Un exemple d'augmentation de la masse de globules rouges vu dans les cas de polyglobulie essentielle.
- (d) Un exemple de l'augmentation de protéines plasmatiques observé dans le cas de myélome multiple.
- (e) Un exemple du schéma de coloration typique des cinq types de globules blancs normaux. De gauche à droite, neutrophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles, et basophiles
- (f) et (g) sont représentant de la forme particulière de la coloration précipitée.
- (h) Un exemple de modifications toxiques (vacuolisation et corps de Dôhle) vu dans le sepsis
- (i) Un exemple de myélogramme coloré avec le protocole d'échantillonnage comme celui utilisé pour le sang périphérique.

5- L'automate de coloration des lames RAL STAINER

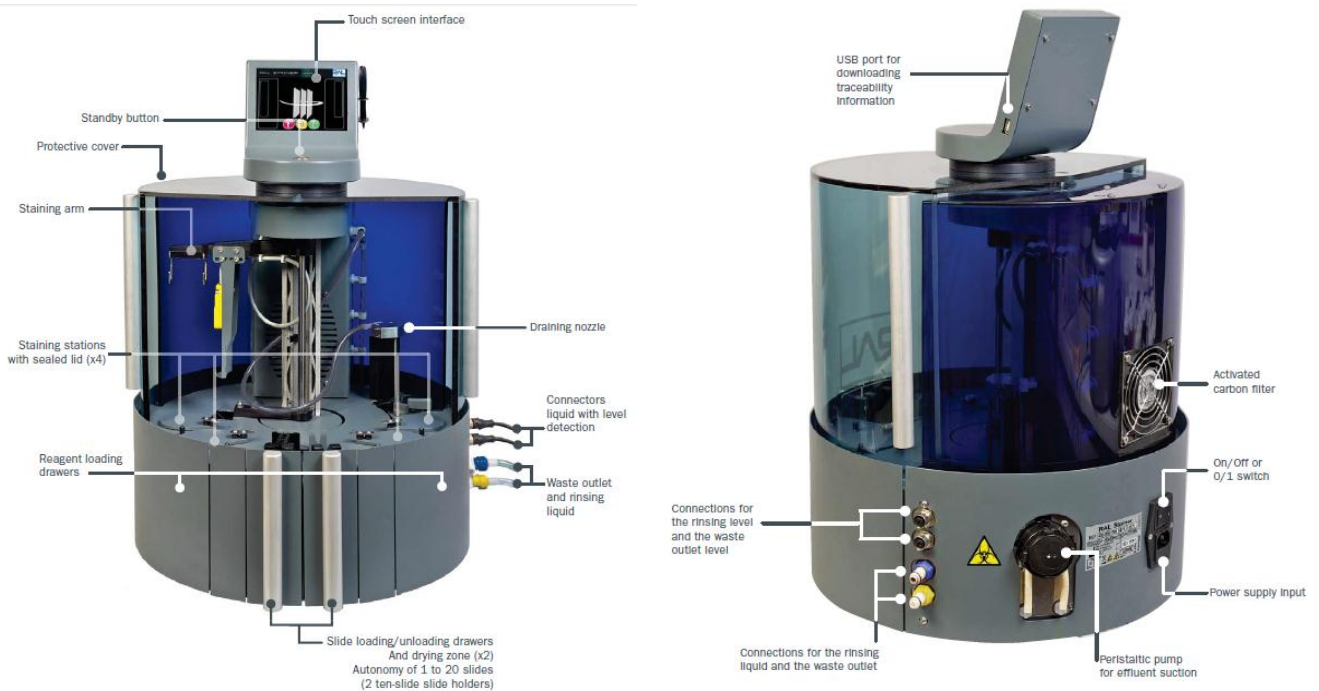


Figure.29 Présentation de l'automate de coloration de lames RAL STAINER Sysmex.[47]

5-1 Principes opérationnels

RAL Stainer est un appareil automatique de bain de coloration. Un bras qui suit une trajectoire circulaire et verticale successivement :

- accroche le porteur de lames déposé par l'utilisateur ;
- Apporte le porteur de lames dans chaque réservoir de coloration et ensuite dans le réservoir de rinçage en fonction de l'enregistrement protocole ;
- fait retourner le porteur de lames à sa position initiale.
- Les lames sont ensuite séchées.

La coloration est terminée.[47]

5-2 Performance

- Écran tactile LCD.
- Capacité 2 x 10 Lames.
- 4 Stations de coloration.
- 2Tiroirs de chargement/déchargement pour l'une à 10 lames, chacun avec un ventilateur pour séchage à la fin du cycle.
- Jusqu'à 10 programmes de coloration en mémoire.
- 10 utilisateurs peuvent être paramétrés, avec quatre niveaux d'autorisation : Administrateur, Expert, User et Maintenance.
- Système RFID avec auto-reconnaissance des kits et des protocoles de coloration correspondants optimisés par RAL Stainer.
- Utilisation polyvalente.
- Traçabilité de la coloration : il est possible d'imprimer un rapport donnant la corrélation des dates de travail, les utilisateurs, la coloration et le lot de produit utilisé. [47]

5-3 Réalisation de la coloration

- **Installation des lames :**



1 -Tourner le support de lames et libérer la mâchoire en plaçant le bouton sur le O(Open)



2-Placer jusqu'à dix lames (identification maintenu).



3-Bloquer la mâchoire par le déplacement de la manette sur la position C "Closed"

Figure.30 Etapes d'installation des lames dans leur porteur. [47]

- **Chargement du porteur de lames dans l'appareil :**



Placer le porteur de lames correctement sur son support dans le tiroir



Fermer le tiroir jusqu'à entendre un click indiquant la fermeture.

Figure. 31 Etapes de chargement de lames dans l'automate [47]

Durant le processus de coloration, il est possible de charger un second porteur de lames ou de retirer un porteur de lames en attente.

5-4 La coloration

L'automate RAL Stainer propose comme coloration hématologique le **Kit RAL Stainer MCDh. (Fig.32)**



Figure.32 le Kit MCDh du RAL Stainer.[47]

MCDh est une coloration panoptique de type **May-Grünwald Giemsa (MGG)**. Formulée **sans méthanol**, elle permet de réaliser les formules sanguines par l'utilisation successive de quatre réactifs spécifiques. Cette **coloration nouvelle génération** s'inscrit dans une démarche de standardisation du diagnostic. A la différence des colorations classiques, tous les réactifs de la coloration MCDh sont rapides, prêts à l'emploi et ne nécessitent aucune dilution assurant ainsi reproductibilité et standardisation.

Les propriétés chimiques de chaque réactif donnent un effet de type Romanowsky pour révéler progressivement les éléments du sang et de la moelle, et plus particulièrement la chromatine, les plaquettes et les granules des neutrophiles.[47]

Tableau.VI Composition du Kit MCDh de RAL Stainer

Nom	Référence	Conditionnement
MCDh 1	-	2 x 200 mL
MCDh 2	-	2 x 200 mL
MCDh 3	-	1 x 100 mL
MCDh 4, Concentré	-	1000 mL

6- L'automate de coloration de lames Aerospray 7150 Elitech

6-1 Principes de coloration

6-1-1 Coloration May-Grunwald-Giemsa

- **Composition des réactifs**

Le colorant de May-Grünwald (MG) est une solution de bleu de méthylène-éosine dilués dans du méthanol ; le colorant de Giemsa (G) est une solution d'azur de méthylène-éosine dilués dans du méthanol et le tampon phosphate, un mélange de phosphate monopotassique et de phosphate disodique anhydre à pH 7.[48]

- **Méthode**

3 minutes dans le MG pur.

5 minutes dans un MG dilué à 25 % dans un tampon à pH 6,9.

15 minutes dans un G dilué à 5 %.

5 minutes de rinçage tampon.

Séchage devant le ventilateur d'au moins 5 minutes.

Donc une durée totale d'un peu plus de trente minutes.[48]

6-1-2 Principe de la méthode Elitech

L'éosine est un colorant acide réagissant avec les composés cellulaires basiques comprenant de nombreux constituants cellulaires comme les granulations et l'hémoglobine. Les formes actives de la thiazine dont le bleu de méthylène sont des colorants basiques

donnant une teinte bleu-violet aux composants cellulaires acides tels les acides nucléiques et les nucléoprotéines.[48]

- **Composition des réactifs :**

L'éosine est une solution de formaline, d'hydroxyde de potassium et d'éosine Y disodique ; la thiazine est une solution d'éthanol, d'imidazole, de triton X-100, d'hydroxyde de potassium, d'acide maléique, d'azur B et de bleu de méthylène.

Remarque : la thiazine est un nom générique de colorants dont le bleu de méthylène.

Le tampon est à pH 7.2. [48]

- **Méthode**

Fixation au méthanol anhydre.

Rinçage avec un tampon à pH 7.2.

Mélange réglable de thiazine et éosine pulvérisé sur la lame.

Rinçage avec le tampon.

Mélange thiazine et éosine pulvérisé sur la lame pour affiner la coloration.

Rinçage tampon.

Séchage

Le temps de coloration moyen est de 15 minutes [48]

6-2 Description de l'appareil

Cet appareil (**Fig. .33**), l'Aerospray modèle 7150 de la société Elitech France, est à la fois colorateur et cyto centrifugeuse. Il est programmable selon quatre types de coloration : rapide, Wright, MGG et une quatrième programmable au choix (touche PROG). Le colorateur MGG comporte quatre réactifs : le méthanol, l'éosine et la thiazine qui sont prêts à l'emploi, et le tampon de rinçage à pH 7,2 qui est conditionné en 30 ml pour un volume final de 5030 ml à préparer.



Figure. 33 Photo de L'appareil Aerospray 7150. [48]

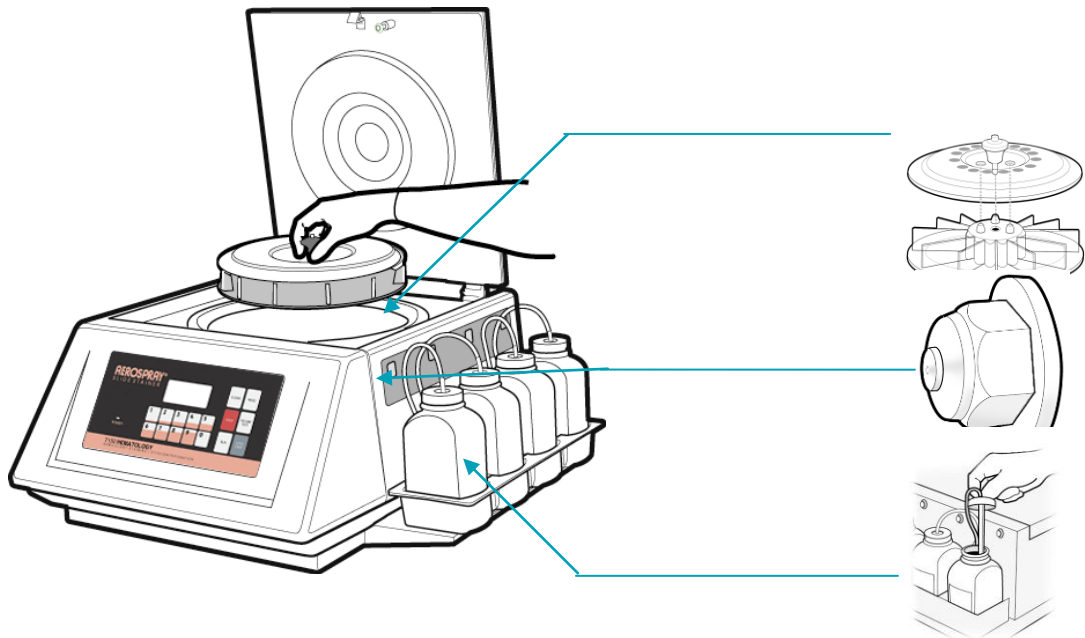


Figure. 34 Schéma du vue de face de l'automate Aerospray Hematology Slide Stainer. [48]

6-2-1 Programmation

La coloration MGG est préprogrammée mais, il est possible de modifier, à sa convenance.

1. « Set Intensity » : joue principalement sur la couleur des globules rouges (GR) : une échelle de 1 à 9 permet de régler le ratio thiazine-éosine : 1 = 100 % d'éosine et 9 = 100 % de thiazine.
2. « Set Fixation » : contrôle la fixation à l'alcool, il est réglable sur une échelle de 0 à 9 ; 0 = pas de fixation.
3. « Adjust Stain » : sert à affiner les différentes caractéristiques d'un globule blanc avec 3 sous-menus :
 - RATIO thiazine/éosine réglable de 0 à 9 essentiellement dirigé sur la couleur du cytoplasme, plus la valeur sera augmentée, plus le cytoplasme sera bleuté ;
 - SPIN TIME réglable de 0 à 9 essentiellement utilisé pour le réglage de l'intensité des granulations et de la chromatine (coloration diluée dans du tampon) ;
 - RINSE assure le rinçage de la lame, réglable de 0 à 9, plus la valeur sera augmentée plus la lame sera propre. [48]

6-2-2 Principe de fonctionnement du colorateur

- La technicienne choisit le mode de coloration désiré, puis charge les lames à colorer sur le carrousel qui est déposé sur l'axe du colorateur.
- Elle tape sur le colorateur le nombre de lames à colorer puis appuie sur la touche RUN pour exécuter la coloration des lames.
- La coloration se fait par **pulvérisation** des réactifs sur chaque lame.
- A la fin de la coloration, la vitesse de rotation sera augmentée automatiquement afin de sécher les lames. [48]

6-2-3 Utilisation du rotor (carrousel)

Le rotor contient jusqu'à 12 lames, il est nécessaire :

- s'il doit être complètement rempli, de disposer les lames sur le rotor en suivant la numérotation et de les équilibrer ;

– s’il ne doit pas être plein, de mettre des lames d’arrêt au niveau des détecteurs afin de standardiser l’ensemble des colorations sur le rotor. [48]

7-Hema-Tek 2000 Slide Stainer – Bayer

Le « Slide Stainer Hematek 2000 » est conçu pour produire des lames colorées de qualité constante dans un processus continu. Ceci est réalisé en ayant une durée de temps déterminée pour chacune des trois phases de coloration, tampon, et rinçage, ainsi que d'un rapport prédéterminé de volumes colorant/tampon dans la phase tampon. [49]



Figure. 35 L’automate de coloration des lames hématologiques Hematek 2000[49]

Une lame correctement colorée est le résultat d'un processus interactif impliquant les volumes pompés, le processus de mélange, et le rapport colorant/tampon. Un ratio minimum de 1 : 2 est conseillé ; Toutefois, si la platine se remplit correctement, un bon mélange se produira, et la lames colorées seront acceptables sous le microscope, le rapport colorant/tampon ne devrait pas être ajusté. [49]

7-1 Système de coloration

7-1-1 Panneau de contrôle du volume

Le panneau de contrôle du volume contient trois boutons de réglage gradués. Le volume du réactif étant livré peut être ajustée en tournant la molette de commande respective dans le sens horaire pour augmenter le volume ou dans le sens antihoraire pour diminuer le volume. [49]

7-1-2 Les pompes de solutions

L'instrument comporte trois ensembles de pompes, une pour chaque solution. Chaque assemblage est constitué d'un moteur de la pompe, quatre rouleaux fixés à la face inférieure d'un couvercle de la pompe, et un bras de pompe. [49]

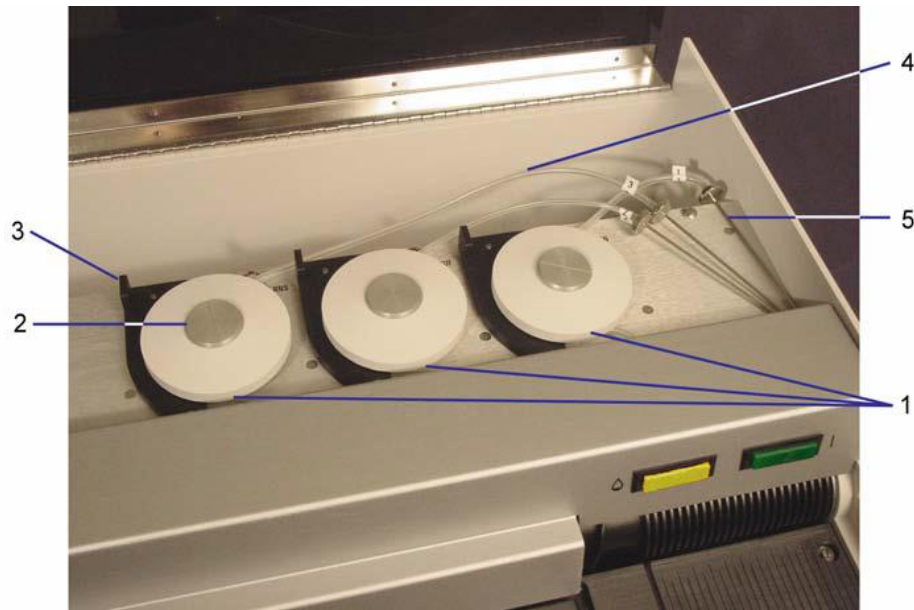


Figure. 36 Systèmes de coloration : 1 Assemblage de la pompe ; 2 Couvercle de la pompe ; 3 Bras de la pompe ; 4 tubulure de la pompe ; 5 canule [49]

7-1-3 Coloration

Cet automate supporte de « pack » de coloration :

-L'Hematek Stain Pak – Wright's Stain (Coloration de Wright).

-L'Hematek Stain Pak – Wright-Giemsa stain (Coloration de Wright-Giemsa). [49]

- **Chargement des frottis sanguins :**

Placer les lames correctement préparées, dans les rainures des spirales du convoyeur avec le côté du frottis sanguin à gauche de l'opérateur et le bord biseauté du frottis vers l'arrière de l'instrument. (Fig.37) [49]

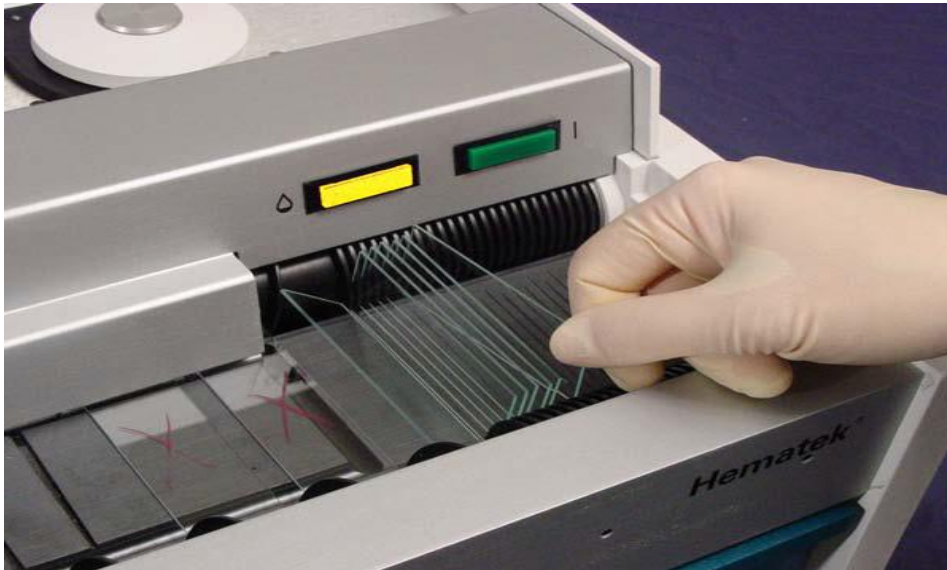


Figure. 37 Chargement des lames dans l'automate *Hema-Tek 2000*. [49]

- **Coloration des frottis sanguins :**

L'instrument effectue les étapes suivantes :

1. Trois commutateurs de détection sont déclenchés successivement. Chaque commutateur détecte la lame et transmet les informations à un autre commutateur, qui active sa pompe respective de la solution correspondante. Les pompes de solutions mesurent et livrent la coloration, le tampon, puis rincent l'espace capillaire entre la lame et le plateau.
2. Après la coloration et le rinçage, la lame est séchée par un courant d'air d'un ventilateur à faible vitesse.
3. La lame est livrée dans le tiroir des lames, prête pour l'examen. [49]

8- L'automate de coloration des lames MIDAS II

L'automate Midas ii de coloration des lames, peut être utilisé pour la coloration du sang ou d'autres échantillons avec plusieurs procédures, y compris la coloration de Wright. Il peut également être utilisé pour la coloration microbiologique. Cet instrument est commandé par un microprocesseur, et dispose de six programmes définissables par l'utilisateur, contenant chacun, jusqu'à 25 étapes de traitement possibles. Jusqu'à 20 lames peuvent être colorées en moins de 4 minutes. [50]

8-1 Réactifs

Disponibles à partir de « EM Diagnostic Systems » : coloration de Wright, tampon phosphate pH 6,4 et la solution fixatrice "Hemacolor".

Une solution de travail colorant-tampon, doit être préparée en mélangeant 50 ml du colorant de Wright, 30 ml de tampon phosphate (pH 6,8) et 220 ml d'eau distillée. Mélanger et laisser colorer pendant 10 minutes avant utilisation. Pour une coloration plus éosinophile, utiliser un tampon avec un pH de 6,4. [50]

8-2 Procédure

Un protocole d'échantillonnage pour cet instrument, en utilisant la coloration de Wright, consiste à ajouter les solutions suivantes à l'instrument : [50]

Tableau. VII Protocole d'échantillonnage de l'automate MIDAS II

Solution	Numéro de la cuve	Temps
Fixateur	2	30 secs
Coloration de Wright	3	3 min
Colorant-Tampon	4	6 min
Eau distillée	5	1 min 30 secs
Stade de séchage	6	3 min

Les lames sont chargées dans un support coulissant amovible. Le support est monté sur le bras porteur. Pendant le fonctionnement, le support de lames se déplace d'une station à

l'autre en une séquence programmée. Le bras du support monte et descend automatiquement toutes les 2 secondes dans la cuve de coloration. Si la station n ° 6 a été programmée, les lames sont séchées à l'air chaud. Lorsque la séquence est terminée, le support coulissant se déplace vers le début de la séquence et alerte l'opérateur. [50]



Figure. 38 L'automate de coloration des lames MIDAS ii [50]

9- L'automate Hemastainer de Geometric Data systems

C'est un instrument de coloration automatisée, qui colore jusqu'à cinquante lames à la fois. Les lames sont chargées dans un panier glissant et plongée, dans chacune des six stations du processus de la coloration. Cinq, des minuteries réglables, contrôlent les cinq premières stations. Les six stations se composent de : méthanol, colorant, un deuxième colorant, rinçage à l'eau, rinçage au tampon phosphate, et enfin, séchage par air forcé. Les deux colorations couramment utilisées sont la coloration May-Grunwald et Giemsa dilué.

L'Hemastainer est vendu comme une partie composante du « Geometric Data automated differential system ». Les réactifs sont disponibles auprès de plusieurs fabricants. Un cycle complexe de coloration Wright prend environ 7-9 minutes, plus le temps de séchage automatique. Les temps de coloration sont réglables.



Figure.39 L'automate de coloration des lames Hemastainer.

C- EVALUATION DE LA PERFORMANCE DES AUTOMATES DE COLORATION DE LAMES

Dans cette partie on va s'intéresser par l'évaluation de la performance des automates de coloration des frottis sanguins. Plus particulièrement 2 cas de figures seront abordés, le premier étant l'évaluation de la performance de de l'automate *UniCel DxH Slide Maker/Stainer (Beckman Coulter)* puis l'évaluation de l'automate *Aerospray (Elitech)*.

1-Evaluation initiale de la performance de l'UniCel DxH Slide maker/stainer

1-1 Introduction

Cette étude a été réalisée au London Health Sciences Centre (LHSC) ; un hôpital situé à Ontario, en Canada. Le LHSC reçoit annuellement 900.000 entre patients et visiteurs. Il offre des services spécialisés en soins critiques/traumatologie, cardiologie, néphrologie, orthopédie, neurochirurgie, oncologie hématologique et chirurgicale, la transplantation (organe solide et cellules souches) ainsi que les soins de la pédiatrie et de la santé des femmes. [51]

Le laboratoire où cette étude a eu lieu est situé dans le site principal responsable des soins de traumatismes, les soins de cancer, ainsi que la santé des femmes et des enfants. Il est équipé de trois UniCel (Miami, FL, USA) DxH 800 Coulter (Miami, FL, USA) Cellular analysis system et deux MIDAS (Darmstadt, Allemagne) II Slide Stainer pour faire face à la demande de ses patients. Le laboratoire embrasse entièrement l'autovérification (AV) des résultats hématologiques et réalise un taux d'AV quotidienne moyenne de 66% des 1000 échantillons / jour de la charge du travail. Les règles numériques pour l'autovérification ressemblent étroitement aux lignes directrices consensuelles publiées par l'« ISLH » (International Society of Laboratory Hematology) [51, 52,53].

L'autovérification est également empêchée dans des situations où les résultats sont signalés par l'instrument. Les 34% des échantillons qui échappent à l'AV sont examinés de près par les technologues médicaux, qui appliquent les règles de cohérence et de différence Delta. Une moyenne de 17% des échantillons exige une évaluation microscopique. Des frottis sanguins sont préparés manuellement sur les échantillons exigeant un examen morphologique. Ils sont par la suite colorés avec la coloration de Wright-Giemsa. De manière significative,

des échantillons anormaux sont en outre évalués et interprétés par l'un des six hématologistes du personnel. Ces hématologistes ont aussi la responsabilité de fournir le diagnostic et l'interprétation du myélogramme coloré de la même façon que le frottis sanguin périphérique. [51]

Reconnaissant que l'évaluation morphologique est très subjective et dépend de la qualité du frottis en cours d'évaluation, l'objectif principal de l'étude était de déterminer si, oui ou non, l'UniCel DxH-SMS va pouvoir préparer constamment et de façon reproductible des frottis sanguins colorés de qualité exemplaire, sans transfert entre les échantillons. Etant donné l'impact négatif de la préparation et la coloration manuelle des frottis sanguins, que peut y avoir sur les résultats d'évaluation morphologique des différents types de cellules [4], l'équipe de l'étude s'est intéressée à étudier la comparabilité de ces deux mesures sur les frottis sanguins préparés par le DxH-SMS, par rapport à ceux de référence préparés et colorés manuellement. [51]

1-2 Matériel et méthodes

a- Echantillons de sang

Un total de 131 échantillons (46 morphologiquement normaux et 85 anormaux de point de vue hématologique) a été choisi pour cette étude, dans un mélange d'échantillons cliniques analysés, mobilisés du campus de London Health Sciences Centre (LHSC) spécialisée dans le traitement du cancer, de la pédiatrie, et l'obstétrique. Ces échantillons étaient anticoagulés avec l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique dipotassique (EDTA K2) et ont été stockés à température ambiante. Tous les tests ont été effectués dans les 8 heures du prélèvement, et les frottis sanguins de test ont été préparés à 1 h de préparation du frottis sanguin de référence. [51]

b- UniCel® DxH slide/maker stainer

Aux fins de cette étude, tous les paramètres 'par Défaut' ont été utilisés liée à la préparation et la coloration. Le protocole de coloration Wright-Giemsa avec rinçage rapide a été choisi, grâce à sa ressemblance de celui utilisé en routine dans le laboratoire où les frottis sanguins de référence seraient colorés. Les réactifs utilisés étaient Coulter TruColor™

(Miami, FL, USA) Wright-Giemsa, Coulter TruColor™ Wright-Giemsa tampon, Coulter DxH diluant, et Coulter Cleaner DxH (Tab.8 et 9). Les contrôles quotidiens et les procédures de nettoyage recommandées, qui comprenait le drainage et l'essuyage de tous les bains de coloration et sondes de dispensation de réactifs, est réalisé avec du méthanol. Ainsi que le remplissage des bains de coloration avec des réactifs frais, et la reconstitution du stock de lames de verre, qui sont effectuées chaque jour sur le DxH-SMS. Un échantillon de sang frais est traité selon les procédures de nettoyage quotidien. Le frottis sanguin a été évalué macroscopiquement et sous le microscope en ce qui concerne son apparence et la qualité sa la coloration. [51]

Tableau. VIII Les paramètres DxH-SMS par défaut et les paramètres modifiés pour réduire l'accumulation de précipité.

		Paramètres par défaut		Paramètres LHSC	
		Durée (min)		Durée (min)	
Temps de séchage avant coloration		7		2	
Type du réactif	Durée (min)	Fréquence de Vidange-Recharge (heur)	Duration in Station (min)	Fréquence de Vidange-Recharge (heur)	
Méthanol	1	24	1	12	
Wright-Giemsa	2	24	2	24	
Wright-Giemsa (10%) + Tampon (90%)	6	24	6	8	
Rinçage rapide : Méthanol (25%) + Eau distillée (75%)	1/6	24	1/4	6	
Eau distillée	2	Chaque 5 paniers	2	Chaque 5 paniers	
		Chaque position utilisée dans la mise en panier (20 Lames/ Panier)		Chaque position utilisée dans la mise en panier (Lames/Panier)	

Tableau. IX Paramètres de l'automate de préparation des frottis sanguins.

Longueur	Par défaut
Epaisseur	Par défaut
Bord	Par défaut
Position de la chute	Par défaut
Placement de la goutte de sang	Par défaut
Facteur de vitesse du frottis	1.00
Taille de la goutte (□l)	4
Temps d'évacuation (s)	0.4
Position d'évacuation (inches)	0.000
Position de la goutte de sang (inches)	0.000

c- CellaVision® DM96

Le CellaVision (Lund, Suède) DM96 est un dispositif automatisé d'imagerie pour les frottis sanguins périphériques coloré à la méthode de Romanowsky. Il effectue une analyse préliminaire de la numération leucocytaire (WBC= White blood count), classification des globules non-blancs, la caractérisation des globules rouges, et la fonction de l'estimation plaquettaire [51, 54,55].

Le DM96 identifie la zone optimale d'examen selon des lignes directrices CLSI H20-A2 [49] pour trouver, capturer et réaliser une pré-classification des cellules. L'opérateur est en mesure d'afficher les classes de cellules côte à côte ou dans un affichage à plein écran. Des observations supplémentaires peuvent être ajoutées. Les résultats préliminaires nécessitent une vérification par un morphologiste formé ; si nécessaire, la classification peut être changée par glisser-déposer dans la cellule appropriée. Un test de l'emplacement de la cellule, ce que le fabricant recommande comme procédure de contrôle de la qualité, était effectué quotidiennement sur un frottis de sang périphérique normal ($GB \geq 7.0 \cdot 10^9/L$) préparé

manuellement et coloré sur le MIDAS ainsi qu'un autre préparé et coloré par la DxH-SMS. Le test établit le pourcentage de cellules nucléées trouvées sur la lame. La performance acceptable pour ce test est $\geq 95\%$. Un résultat de 100% a été obtenu de façon constante. [51]

d- Formule manuelle de référence

Quatre frottis sanguins ont été préparés manuellement et colorés avec la méthode de routine du laboratoire, de Wright- Giemsa sur l'automate MIDAS, moins de 1 h de ceux colorés par le DxH-SMS. Les frottis sanguins ont été identifiés avec une unique identification (ID) et ainsi numérotés 1, 2, 3, ou 4. En utilisant le CellaVision® DM96 comme analyseur cellulaire, deux examinateurs qualifiés, des technologistes avec plus de 30 ans d'expérience comme morphologistes, ont examiné la pré-classification de toutes les cellules, et ont vérifié 200 cellules de globules blancs et globules rouges à base de la caractérisation morphologique soit sur la lame 1 (lecteur 1) ou la lame 2 (lecteur2). [51]

L'estimation de la numération plaquettaire n'a pas été effectuée, mais chaque lame a été examinée pour la présence d'amas de plaquettes ou de plaquettes géantes. Les formules obtenues à partir des 200 cellules, ont été examinées pour la cohérence entre les lecteurs et ensuite combinées pour produire la formule de référence des 400-cellules requises comme critère. [51]

En outre, tous les frottis sanguins ont été évalués macroscopiquement et examinés microscopiquement avec un microscope optique traditionnel. Dans les circonstances où il y avait une discordance entre lecteurs, un troisième technicien terminait l'évaluation sur la lame 3 comme arbitre. La lame 4 a été conservée comme une lame rechange. [51]

e- Analyse statistique

L'analyse de corrélation et de régression a été réalisée à l'aide de Microsoft Excel et GraphPad Prism. Les biais ont été déterminés sur toutes les données appariées et exprimés comme un pourcentage de polarisation de la référence. Des intervalles de confiance de 95% ont été calculés selon CLSI H20-A2. En plus des recommandations du CLSI, les taux de faux positifs et de faux négatifs ont été déterminés en se basant sur l'examen de la lame fait manuellement pour déterminer la vraie positivité ou la négativité. Ces chiffres ont été ensuite

utilisés pour déterminer la sensibilité $[VP / (VP + FN)]$ et la spécificité $[VN / (VN + FP)]$ pour le DxH-SMS par rapport à la méthode de référence manuelle. Une courbe de l'opérateur de récepteur (ROC) a été générée pour le DxH-SMS. [51]

L'aire sous la courbe (ASC ou AUC en anglais) a été déterminée à partir de l'analyse ROC [50]. Plus le nombre ASC est grand, meilleure est la performance, avec 0,50 indiquant une performance aléatoire et 1,00 indiquant une performance parfaite. Les valeurs-*P* significatives étaient inférieures à 0,05, les valeurs supérieures à cette valeur n'étaient pas significativement différentes. [51]

f- Possibilité de transfert de cellules entre échantillons

Deux échantillons ont été sélectionnés pour effectuer cette étude, évaluant le degré de transfert cellulaire potentiel, qui peut se produire dans des circonstances, où un échantillon avec une extrême leucocytose est suivi par un autre avec une extrême leucopénie. Le premier échantillon, un cas de leucémie lymphoïde chronique avec des lymphocytes morphologiquement anormales et d'ombres de Gümprécht (smudge cells en anglais), avait une numération leucocytaire de $135,2 \times 10^9/L$, et le second a été une déleucocytation d'échantillon normal avec une numération leucocytaire de $0,054 \times 10^9/L$. Le DxH-SMS a été mis à préparer et colorer un seul frottis sanguin par aspiration. Cette combinaison a été exécutée deux fois supplémentaires, résultant en la préparation de six frottis sanguins. Un examen complet de la zone de travail de la lame déleucocyté est réalisé par microscopie traditionnelle, pour rechercher des preuves de transfert potentiel de cellules. [51]

g- Répétabilité

Cinq échantillons de sang frais normaux ont été sélectionnés pour cette étude avec une formule leucocytaire variant de 43-77% neutrophiles, lymphocytes, 16-44% et 5-13% de monocytes. Le DxH-SMS a été programmé pour préparer et colorer 10 frottis sanguins consécutifs par échantillon. Tous les dix frottis par échantillon ont été préparés et colorés en 45 min. Utilisant le CellaVision DM96, la formule leucocytaire des 200 cellules a été réalisée par un lecteur, sur chaque lame, et la moyenne, l'écart-type et erreur type de la moyenne ont été calculés pour chaque paramètre de la formule. [51]

h- Comparaison des lames préparées par l'automate et celles préparées manuellement

Le test de comparabilité a été réalisée sur l'ensemble d'échantillons qui contenaient à la fois les échantillons hématologiquement normaux ($n = 40$, $GB=4,3$ à $9,4 \cdot 10^9 / L$) et les échantillons anormaux ($n = 84$, $GB=0,1$ à $330,6 \cdot 10^9 / L$). Comme cela est montré dans le (**Tableau X**). Le sous-groupe anormal comprend un large éventail de malignités, des troubles de globules rouges et d'autres maladies où des changements dans la différenciation des globules blancs, ou la morphologie des globules rouges sont commun. [51]

Tableau. X Sous-groupe des échantillons anormaux. Tableau énumérant le diagnostic de tous les patients inclus dans cette étude

Diagnostic	Quantité
Paludisme - Plasmodium ovale	1
Syndrome hémoglobinopathie	5
Polyglobulie de Vaquez-JAK II positif	5
Leucémie lymphoïde chronique	13
Troubles lymphoprolifératifs	6
Syndrome myéloprolifératif	4
Myélome, MGUS	3
Leucémie myéloïde aigue	7
Leucémie lymphocytaire aiguë	3
Leucémie myéloïde chronique	3
Sepsis	3
cancer du sein sur le G-CSF	3
Pneumonie	1
Maladie rénale	2
saignement gastro-intestinal GI	2
cancer d'organes solides sous traitement	10
Grossesse	3
Schizophrénie sous traitement	1
Pancréatite	1
Blastome	1
Abcès infecté	1
Anémie (IDA, AIHA, SHU)	6
Drépanocytose	1
Total	85

Un certain nombre d'échantillons a été inclut en raison de l'interférence potentielle à la production d'un frottis sanguin de bonne qualité, vu la présence de protéines plasmatiques, globules blancs fragiles, masse de globules rouges augmentée ou diminuée. [51]

Quatre frottis sanguins sont préparés sur chaque échantillon et identifiés de façon unique. Une analyse de la formule leucocytaire a été réalisée sur deux des frottis préparés et colorés par le DxH SMS et comparés avec le frottis sanguin de référence préparé manuellement. Les deux autres frottis ont été déposés et étaient disponibles pour l'arbitrage. Une formule leucocytaire étendue et une évaluation des globules rouges du sang a été achevée sur l'ensemble d'échantillons anormaux (deux frottis), et les résultats générés sur les frottis sanguins réalisés par le DxH-SMS ont été comparés à ceux de référence préparés manuellement. [51]

i- **Qualité des frottis sanguins**

La qualité des 248 frottis sanguins préparés pour l'étude de comparabilité (80 hématologiquement normaux et 168 anormaux) sur le DxH-SMS, a été examinée à la fois macroscopiquement et sous le microscopique pour évaluer l'acceptabilité selon les critères énoncés dans CLSI H20-A2 Section 6.3, [56]. La présence de précipitation de la coloration a été classé comme « aucune », « légère (1-50) », « modéré (51 à 150) », ou « lourde (> 150) » sur la base du pourcentage d'éléments non relevant, vérifiés sur la CellaVision DM96. Le degré d'interférence du précipité de colorant, dans l'exécution de la formule leucocytaire et l'évaluation de la morphologie des globules rouges était également considéré. [51]

En outre, la distribution des globules blancs à travers le frottis sanguin a été évaluée dans un sous-ensemble d'échantillons, avec Numération leucocytaire $\geq 4.0 \times 10^9/L$ (n = 102) en énumérant les cellules prédominantes d'intérêt, identifiées sur 30 champs le long des bords marginaux et la tête du frottis, par rapport avec le nombre de cellules comptées dans un total de trente champs sur le corps du frottis sanguin. La distribution a été jugé comme acceptable si le nombre de cellules comptées dans les marges du frottis sanguin, ne dépasse pas ce qui a été compté dans le corps par deux à trois fois (ratio de la somme des bords à la somme du corps ne dépasse pas 2 ou 3). [51]

Tableau. XI Les critères d'acceptation de lames. Notation utilisée pour évaluer la qualité du frottis sur des lames Préparées et colorées par le DxH SMS.

Un minimum de 2,5 cm de long, se terminant à 1 cm de l'extrémité terminale de la lame	Coloration appropriée des éléments cellulaires
Marges lisses et égales de lame (côtés et la queue	Distribution égale des cellules dans la zone de travail
Epaisseur avec transition graduelle à l'extrémité de queue	Morphologie acceptable
Zone d'observation suffisante	Précipitation minimale de la coloration
Largeur du frottis étroite que la largeur de la lame	Pas d'artefacts dans la zone de lecture ou la queue

1-3 Résultats

a- Transfert de cellules entre échantillons

Les résultats ont été définis comme acceptables si une cellule, ou moins, de l'échantillon avec une leucocytose, dans ce cas, un lymphocyte anormal ou une ombre de Gümprrecht, a été trouvé dans la zone de travail du frottis réalisé à partir de l'échantillon déleucocyté. Le tableau 12 montre la répartition des cellules identifiées sur la lame à haute numération leucocytaire, notamment > 60 lymphocytes anormaux et > 1000 ombres de Gümprrecht. [51]

Tableau. XII Résultat du test de transfert de cellules entre échantillons.

	Neutrophiles	Lymphocytes anormaux	Monocytes	Eosinophiles	Basophiles	Ombres de Gümprecht
Exécution 1						
GB élevés	3	69	6	1	0	>1000
GB faibles	1	0	0	0	0	0
Exécution 2						
GB élevés	7	62	6	1	0	>1000
GB faibles	1	0	0	0	0	0
Exécution 3						
GB élevés	11	69	4	1	0	>1000
GB faibles	1	0	0	0	0	0

Dans chacune des trois exécutions, il n'y avait pas de lymphocytes anormaux, vus dans la lame préparée à partir de l'échantillon normal déleucocyté, ni d'ombres de Gümprecht. En outre, un seul neutrophile pensé être endogène et représentant de son échantillon, était présent dans chacun des trois examens microscopiques des échantillons à faible numération leucocytaire. [51]

b- Répétabilité

Les résultats ont été définis comme acceptables si l'écart type de la population des neutrophiles était <6, de la population de lymphocytes <5 et de la population de monocytes <3. Pour le graphique avec 95% des limites de confiance (**Fig. 40**), l'acceptable a été déterminé que pas plus de 5% des chiffres doivent se situer en dehors des intervalles de confiance à 95%. Pour les trois types cellulaires, les attentes d'imprécision ont été atteintes. (**Tab. XIII**) [51]

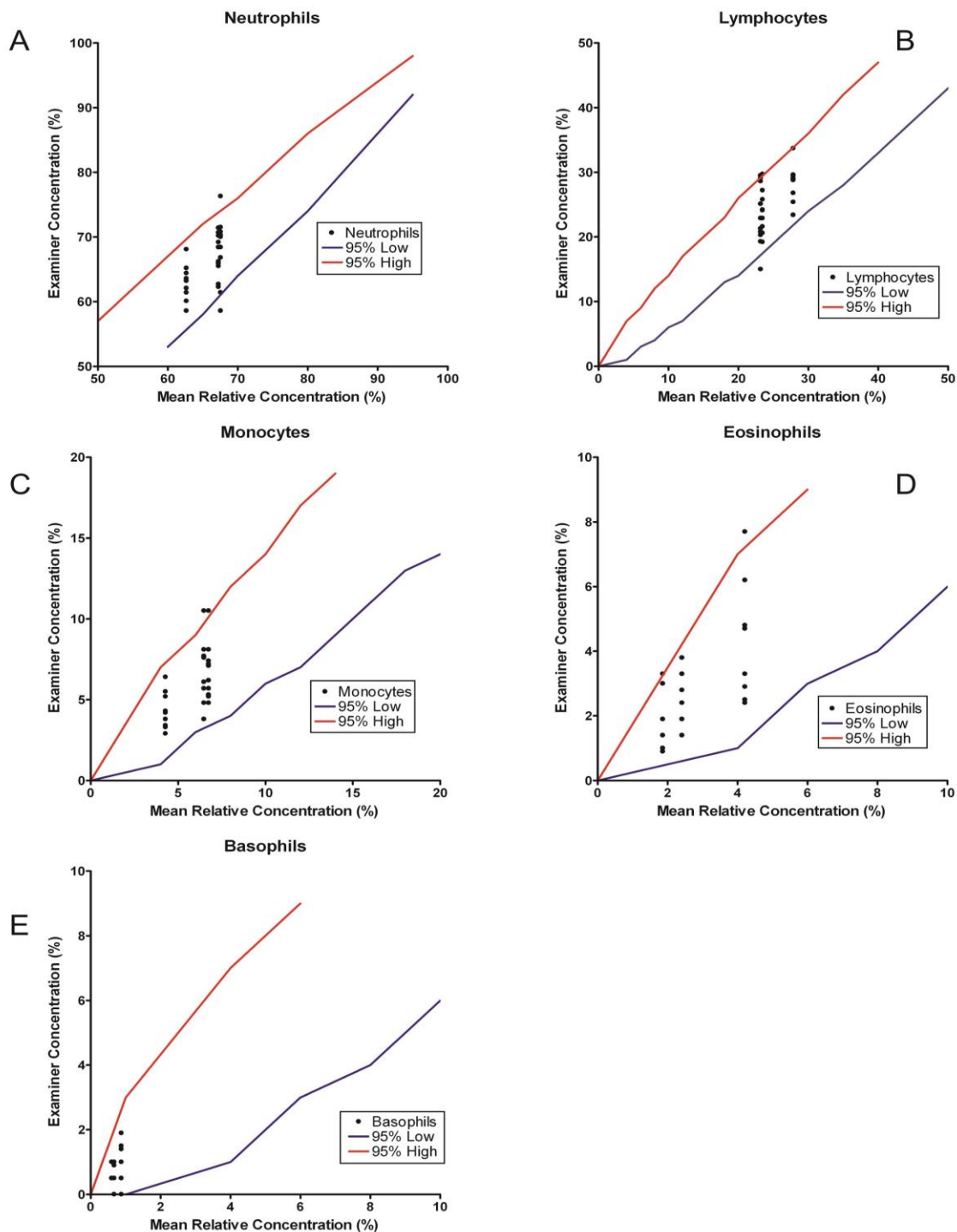


Figure. 40 Courbes de répétabilité pour la numération des neutrophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles et des basophiles, avec des intervalles de confiance à 95%. La moyenne de la numération d'échantillons tracé par rapport à la numération de l'examineur. L'acceptabilité a été définie, lorsque moins de deux points ne relevaient pas des intervalles de confiance à 95%. (a) numération des neutrophiles. (b) des lymphocytes. (c) des monocytes. (d) d'éosinophiles. (e) et des basophiles. [51]

Tableau. XIII Les données de répétabilité ont été générées avec un échantillon d'un patient normal.

	Neutrophiles	Lymphocytes	Monocytes
Echantillon 1 (moyenne%)	62.68	27.04	6.48
Echantillon 2 (moyenne%)	70.99	20.61	6.13
Echantillon 3 (moyenne%)	67.15	23.31	4.28
Echantillon 4 (moyenne%)	69.60	19.97	6.13
Echantillon 5 (moyenne%)	72.64	18.20	6.54
<i>n</i>	10	10	10
<i>Ecart-type</i>	3.59	3.19	1.71
<i>Erreur type de la moyenne</i>	1.14	1.01	0.54

c- Comparaison des formules leucocytaires obtenues

L'Analyse jumelé (DxH-SMS contre un frottis de référence manuel) de tous les échantillons (normaux et pathologiques) a été examinée, et intentionnellement inclus les échantillons qui posaient des défis uniques, soit en évaluation morphologique ou dans la préparation des frottis sanguins. Des points ont été également reportés sur la courbe des frottis sanguins réalisés manuellement par rapport à ceux réalisés par le DxH-SMS (**Fig.41**). Les intervalles de confiance à 95% ont été ajoutés à ces courbes pour déterminer si les points reposaient extérieur de l'enveloppe. Si plus de 5% du total les points étaient à l'extérieur de l'enveloppe, alors une importante différence a été notée. Pour chaque sous-population dans la formule leucocytaire, il y avait légèrement un peu plus de 5% des points à l'extérieur de l'enveloppe. [51]

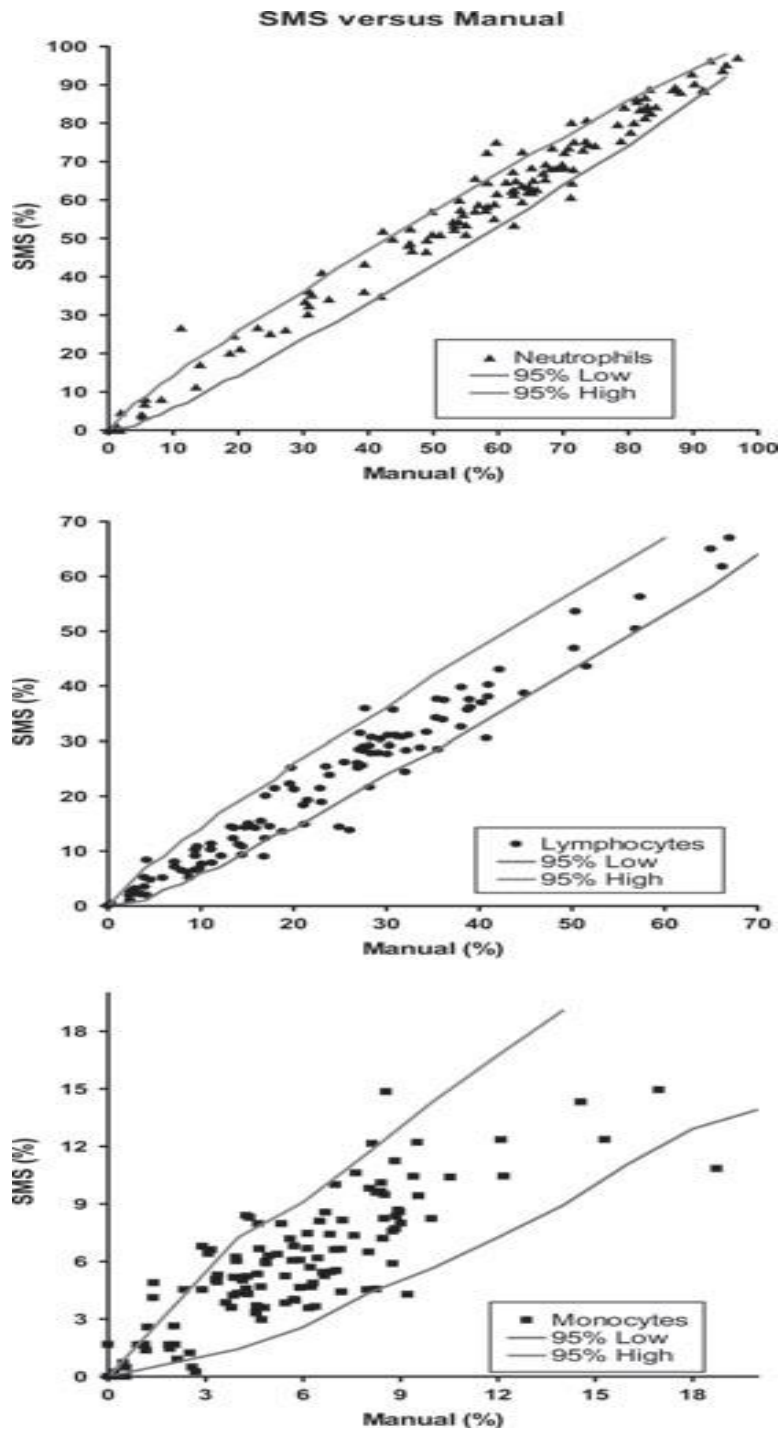


Figure.41 Courbes de numération de qualification pour les neutrophiles, lymphocytes, et monocytes avec intervalles de confiance à 95% ,des frottis manuels et des frottis réalisés par le DxH-SMS. (a) nombre de neutrophiles. (b) nombre des lymphocytes. (c) nombre de monocytes. Les lignes représente l'intervalle de confiance de 95%, tel que calculé par le document CLSI H20-A2 pour SEP. [51]

L'identification positive de types de cellules anormales spécifiques et la comparabilité entre les frottis sanguins préparés par le DxH-SMS et les frottis sanguins manuels de référence, étaient l'intérêt principal de l'analyse du sous-groupe anormal. La présence d'un décalage à gauche a été classée selon des lignes directrices souscrites au centre où l'étude a été réalisée. (LHSC) (**Tab. XIV**). [51]

Tableau. XIV Classement du décalage à gauche (London Health Sciences center).

léger	Modéré	Marqué
0 à 2 métamyélocytes +/- 5 à 10 bandes	2 à 5 métamyélocytes ou myélocytes +/- 10 à 20 bandes	>5 métamyélocytes ou myélocytes +/- >20 bandes

Les différences statistiques entre décalage à gauche léger, modéré et marqué ont été déterminées par le test exact de Fischer. L'identification et la numération des blastes, des lymphocytes atypiques, globules rouges nucléés, et mégathrombocytes sont également d'intérêt dans la comparaison. Aucune différence significative entre les analyses de types cellulaires ($P > 0,05$) n'a été notée, à l'exception des plaquettes géantes. [51].

Tableau. XV Comparabilité des anomalies de formule leucocytaire et évaluation morphologique des globules rouges.

<i>(a) Anomalies de la formule leucocytaire</i>				
Identification	<i>n</i>	Biais (SMS/Manuel)	Significativement différent	Discordance (Valeur- <i>P</i>)
Décalage à gauche léger	12	RIEN	NON	$P > 0.05$
Décalage à gauche modéré	4	RIEN	NON	$P > 0.05$
Décalage à gauche marqué	4	RIEN	NON	$P > 0.05$
Blaste +	5	< 5 %	NON	$P > 0.05$
Lymphocytes atypiques	12	< 1 %	NON	$P > 0.05$
Erythroblastes(NRBC)	38	< 1 %	NON	$P > 0.05$
Plaquettes géantes	79	+ 9	OUI	$P < 0.001$
<i>(b) Evaluation de la morphologie des globules rouges sanguins.</i>				
Sensibilité				98 %
Spécificité				95 %
Rendement				98 %
Aire sous la courbe				90 %
Taux de FN (Faux négatifs)				1/65
Taux de FP (Faux positifs)				1/19

(a) Les biais entre les lames successives faites préparées manuellement et sur le DxH-SMS ont été calculés avec une signification statistique montré en utilisant la lame préparée manuellement comme référence.

(b) Comparaison de la morphologie des globules rouges entre les lames préparées manuellement et les lames sur le DxH-SMS. Les taux de faux négatifs, faux positifs, ou autres calculs ont été réalisées comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ».

d- Comparabilité de la morphologie des globules rouges

Une approche standard dans l'évaluation de la morphologie des globules rouges était suivie par les deux observateurs expérimentés, qui indépendamment examinaient à la fois un

frottis sanguin préparé par le DxH SMS et la lame de référence préparée manuellement de l'ensemble du sous-groupe anormal ($n = 84$). Des anomalies de la taille, la forme, la pâleur, et de la distribution ont été notées comme «présentes» si se trouvaient avec des quantités cliniquement significatives dans une zone équivalente à un champ de grossissement (à l'huile d'immersion) de x 50 sur le CellaVision DM96 (**Tab. XVI**). Étant donné la nature subjective de ces examens, la comparabilité a été mesurée sur la base de consensus entre les lecteurs. [51]

Tableau. XVI Critères pour la morphologie des globules rouges (LHSC)

Forme d'anomalie		Quantité significative / 50X HPF
-polychromasie -microcytes -macrocytes -codocytes (target cells) ou cellules cibles -elliptocytes -ovalocytes -dacryocytes -stomatocytes -acanthocytes -echinocyte -pointillage basophile -schizocytes		≥ 2
-Drépanocytes -Corps de Howell-Jolly -Corps de Pappenheimer -Parasites	-Rouleaux -Agglutination des hématies	Quelconque

L'accord entre les observateurs d'une côté, et entre le test et la référence était excellent. Le tableau. 13 reflète les statistiques de comparaison sur la base de l'apparition d'un seul faux positif et d'un seul faux négatif. Dans ces deux conclusions aberrantes, l'anomalie morphologique était la présence de schizocytes. [51]

e- Qualité du frottis sanguin

Chacun des 248 frottis sanguins préparés par le DxH-SMS a été examinée à fond, par deux observateurs expérimentés. Et sur la base des qualités spécifiques souhaitées d'un frottis sanguin de bonne qualité, un frottis est jugé comme acceptable ou inacceptable (**Tab XVII**). L'examen macroscopique a été centré sur la longueur, les marges, la transition en épaisseur du frottis sanguin, l'artefact ou les distorsions potentiellement introduites sur le frottis sanguin au cours du processus de sa préparation. La (**Figure. 42**) représente un exemple d'un frottis sanguin acceptable du point de vue macroscopique. [51]

Tableau. XVII Evaluation de la qualité des frottis sanguins réalisées par le DxH-SMS.

Jugement	Longueur	Marges	Transition	Artéfacts	Zone d'observation	Distribution	Coloration	Morphologie
Inacceptable	18	3	1	0	1	0	1	0
Acceptable	230	245	247	248	247	248	247	248
Total	248	248	248	248	248	248	248	248
% Inacceptable	7.2	1.2	0.4	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0
Degré de la précipitation de la coloration				Quantité		Pourcentage		
Absent				11		4.4		
Léger				147		59.3		
Modéré				57		23.0		
Lourd				33		13.3		



Figure.42 Exemple d'un frottis acceptable. Préparé et coloré sur le DxH-SMS. [51]

Dix-huit, des 248 frottis sanguins (7,2%) ont été jugés comme inacceptables par rapport à la longueur. Dix-sept étaient plus longs que l'idéal, se terminant à 1 cm de l'extrémité de la lame au lieu de 2,5 cm, et 1 était excessivement court. Trois des 248 frottis sanguins (1,2%) ont été jugés inacceptables en raison des marges pauvres, où deux étaient trop étroits et 1 était trop large et étendu sur les côtés et à l'extrémité de la lame. Ce même frottis sanguin (0,4%) a échoué dans l'évaluation d'une transition acceptable d'épaisseur. Tous les 248 frottis étaient sans artéfacts tels que des stries, des bulles, ou des trous. Le domaine de l'observation, défini comme la zone où approximativement 50% des érythrocytes montrent une forte tendance à orientation linéaire [57], a été évaluée au microscope sous faible puissance en utilisant un microscope optique standard. La zone de travail a été considérée comme acceptable, si elle était suffisante en taille, et la majorité des globules blancs sont distribués uniformément en son sein. Un frottis sanguin (0,4%) n'a pas réussi à répondre aux critères d'acceptabilité. C'est le même frottis qui était trop large et étendu sur les côtés et à l'extrémité de la lame. [51]

Il y avait un frottis sanguin dans les 248 (0,4%), où l'observateur a noté une zone de la lame où les cellules semblaient être pâles par rapport au reste. Cela a été jugé comme un événement inacceptable à l'égard de la qualité de la coloration. Les 247 frottis sanguins restants ont démontré une qualité de coloration exemplaire de globules blancs, globules rouges et les plaquettes. [51]

La distribution des globules blancs dans la zone d'observation a été évaluée sur un sous-groupe d'échantillons, lorsque la numération des globules blancs était $\geq 4.0 \cdot 10^9/L$ ($n =$

102). Dans 83 de ces échantillons, le nombre de monocytes dans les bords marginaux ne dépassait pas celui observé sur le corps du frottis sanguin. Ils ont été jugés tous comme acceptables. [51]

Dans les 19 échantillons restants, où il y avait une absence d'une population de monocytes, d'autres cellules prédominantes d'intérêt ont été identifiées (comme les neutrophiles, blastes et lymphocytes anormaux) et énumérées avec une approche similaire, et dans tous ces cas, la distribution était également acceptable. Deux formes de précipité du colorant ont été identifiées et graduées par un schéma subjectif développé pour cette évaluation. Le CellaVision DM96 initialement a catégorisé ces événements comme artefacts. Les observateurs ont reclassé ceci comme précipité de colorants dans cette étude. Le nombre des événements de précipité de colorants a été énuméré en tant que non-globule blanc et exprimé en pourcentage. Les critères de classement qui ont été appliqués reposent sur le pourcentage énuméré comme, aucun, si aucun événement étaient vu, léger (1 à 50), modéré (51 à 150), ou lourd (> 150). Il y avait onze des 248 (4,4%) où il n'avait aucune preuve de précipité. 147 des 248 (59,3%) ont été classés comme légers, 57 (23,0%) modérés, et 33 des 248 (13,3%) comme lourds. Dans 12 des frottis sanguins, lorsqu'une quantité de précipité lourde a été observée, ces frottis ont été exclus de l'étude. [51]

f- Discussion

La population diversifiée de patients traités au « **London Health Sciences Centre** », a met le laboratoire face à des échantillons avec certaines des anomalies hématologiques les plus difficiles. L'amélioration de l'instrumentation liée à la détection des types de cellules anormales, l'autovérification des résultats, ainsi que les efforts investis pour se déplacer vers les pratiques les plus efficaces, en adoptant des critères de décision sur la base de la signification clinique, ont conduit à un environnement où l'attention est placée sur les échantillons anormaux, qui sont en besoin de l'examen le plus minutieux. Ce processus sélectif de la préparation des frottis sanguins élève l'importance chaque frottis, et la plus haute la qualité n'est pas négociable [58]. La précision de la formule leucocytaire manuelle, l'évaluation morphologique ainsi que la compétence de ceux qui effectuent les examens, sont directement affectées par la qualité du frottis sanguin en cours d'examen [51,59].

Une zone d'observation sans artefacts gênants, avec une distribution cellulaire égale, une coloration des éléments de noyaux, cytoplasme et les inclusions, sont toutes des qualités essentielles d'un frottis sanguin bien préparé. L'évaluation précise du frottis sanguin périphérique commence avec la maîtrise de la préparation. [51]

La qualité du produit fini était de préoccupation initiale dans cette évaluation. L'acceptabilité du frottis sanguin du DxH-SMS a été mesurée par une évaluation de transfert cellulaire entre échantillons, la répétabilité de la distribution des globules blancs, la comparaison de la distribution des globules blancs, et la morphologie des cellules rouges par rapport aux méthodologies de référence, ainsi que le classement des critères d'acceptation macroscopiques et microscopiques. [51]

Il y avait une bonne concordance entre le DxH-SMS et la référence manuelle pour les cinq sous-types des populations de cellules blanches, avec aucun biais dans quelconque des populations ; cependant, un peu plus de 5% du total des échantillons étaient en dehors des courbes de confiance. L'hypothèse sur cette différence (Fig.41), bien que mineure, est probablement en relation avec l'épaisseur du frottis sanguin de la DxH SMS par rapport au frottis sanguin préparé manuellement et la zone de la lame dans laquelle la CellaVision DM96 identifiait une monocouche et capturerait des images. [51]

Cette hypothèse a été testée, et une résolution pour le biais a été trouvée en ajustant les paramètres de la DxH-SMS en relation avec l'épaisseur, la longueur du frottis sanguin, ainsi que le placement de la goutte de sang sur la lame, par rapport à son extrémité étiquetée [59]. Une combinaison de raccourcissement du frottis sanguin (1,05), l'augmentation de l'épaisseur (4,8), et le déplacement de la position de la goutte de sang encore loin de l'étiquette (0,052), ont conduit à la modification souhaitée, où la CellaVision DM96 a identifié le domaine de l'observation, éliminant ainsi les différences observées. [51]

En ce qui concerne les résultats morphologiques anormaux, spécifiquement la présence d'un décalage vers la gauche, l'identification et l'énumération des blastes, des lymphocytes atypiques (les deux, néoplasiques et réactifs) et les globules rouges nucléées, la comparaison du frottis sanguin du DxH-SMS et celui de référence manuellement préparé, était excellente avec aucune différence significative démontrable. [51]

L'identification de tous les stades de développement des neutrophiles a été sans effort, étant donné la coloration exemplaire de ces cellules par le DxH-SMS. De même, les globules rouges nucléés ont été facilement distingués des lymphocytes, et la catégorisation des lymphocytes atypiques n'a posé aucun défi. [51]

Statistiquement, il y avait une plus grande prévalence de plaquettes géantes signalées sur des frottis sanguins préparés par le DxH-SMS par rapport avec les lames manuelles. Aucune explication évidente pour ceci n'a été déterminée, mais il se peut que la plus grande zone d'observation produite par le DxH SMS, a amélioré la détection des plaquettes anormales. [51]

L'équipe de l'étude a été très impressionnée par la cohérence de l'aspect macroscopique et microscopique des frottis sanguins préparés par le SMS-DxH, et l'absence d'artefacts tels que les stries, les bulles, ou les trous. Il y avait un certain nombre de frottis sanguins (18 des 248) qui ont été rejetés en rapport avec la longueur inadéquate du frottis. Dix-sept des 18 frottis qui étaient plus longs que la norme, étaient tous des échantillons où le niveau d'hémoglobine était inférieur à 100 g/L et la formule leucocytaire sur la CellaVision DM96, était en bon accord avec la référence manuelle. [51]

Il semblerait que la technologie de l'« hémasphère » (Fig.26) qui ajuste l'angle et la vitesse de l'étaleur, en fonction de la mesure du profil de déplacement de l'échantillon sanguin, conduit à la préparation des frottis plus long. Un des résultats les plus impressionnants de l'évaluation de l'acceptabilité de la qualité du frottis sanguin, était l'abondance et la consistance de la zone d'observation. Même pour les échantillons qui ont posé un défi, suite à une masse de globules rouges diminuée en cas d'anémie ferriprive, augmentation de la masse de globules rouges dans la polyglobulie de Vaquez, ou des protéines plasmatiques accrues comme dans le myélome multiple. La zone d'observation a été toujours plus que suffisante pour établir la formule leucocytaire réalisée par 200, et l'évaluation morphologique des globules rouges sur la CellaVision DM96. [51]

La qualité de la réaction de coloration dépend de la proportion appropriée des colorants et tampon et de la synchronisation précise de chaque étape du protocole de la coloration. La qualité de la coloration est particulièrement important si on utilise un système

d'imagerie numérique comme la CellaVision DM96, où le réseau de la reconnaissance des cellules est dépendant des normes acceptables d'intensité et de clarté de la couleur. [51]

Comme mentionné, les paramètres par défaut du fabricant, concernant le Protocole de coloration Wright-Giemsa (Coloration de type Romanowsky) ont été utilisés dans cette évaluation. Les attentes ont été satisfaites, à l'égard de la brillance de la coloration, la balance appropriée de la coloration des granulations cytoplasmiques, la capacité de distinction de la maturité nucléaire grâce à la texture de la chromatine, et la identification claire des nucléoles lorsqu'ils étaient présents. Les anomalies à basse fréquence, tels que les changements toxiques (vacuolisation et corps de Döhle) étaient facilement perceptibles. L'une des approches uniques prises en ce qui concerne l'évaluation de la qualité du frottis sanguin impliqué, est la catégorisation du précipité de colorant et la capacité de le classer avec la CellaVision DM96.

La précipitation de la coloration est inévitable avec Wright-Giemsa, mais des quantités mineures n'interfèrent pas généralement avec l'évaluation morphologique. Un système de notation arbitraire a été mis au point dans le but de la présente évaluation, où le nombre d'événements classés comme précipité de colorant a été énumérés par 200 globules blancs, exprimée en pourcentage et interprété comme « aucun », « léger », « modéré » ou « marqué ». La majorité des lames (59,3%) avait une quantité modérée de précipité. Bien que ce n'est pas idéal, il y avait un nombre relativement restreint de frottis sanguins (12/248), où la quantité du précipité était prohibitive de l'établissement de la formule leucocytaire par 200 sur la CellaVision DM96. L'équipe de l'étude a spéculé que l'augmentation du temps Rinçage rapide et/ou le changement de bain de coloration tamponnée, plus fréquemment, permettrait de réduire, sinon éliminer le problème. Une étude postérieure réalisée, a montré qu'un certain nombre de modifications du protocole de coloration, permettra une réduction significative du précipité. [51]

Bien que, faisant pas partie de l'évaluation initiale, l'équipe de l'étude étaient intéressée à partir d'un point de vue clinique, si oui ou non, le protocole de coloration serait approprié pour les myélogrammes ou les préparations centrifugées. Avec l'option «colorer seulement» autorisée, la préparation manuelle de ces frottis avec coloration sur le DxH-SMS, a impressionné l'équipe de l'étude. L'éclat de la couleur et la coloration différenciée ont été

les mêmes que celles vues avec les frottis de sang périphérique (**Fig.43**). Aucun ajustement au protocole de coloration n'était nécessaire pour ces types d'échantillons alternatifs.[51]

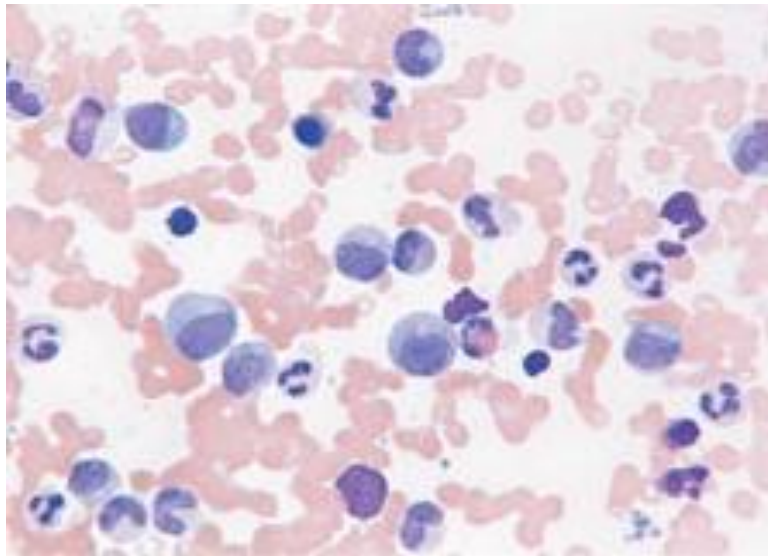


Figure. 43 Un exemple de myélogramme coloré avec le protocole d'échantillonnage comme celui utilisé pour le sang périphérique. [51]

g- Conclusion d'évaluation

Les frottis sanguins préparés par le DxH-SMS sont d'excellente qualité. Les exigences de nettoyage nécessaires sont simples, le logiciel est intuitif, et la de qualité en rapport avec les réactifs c'est la charge du fabricant. Toutes ces raisons ont porté à croire que l'équipe de l'étude a fait le bon choix, en intégrant le DxH-SMS dans la configuration de son instrumentation clinique.[51]

2- Evaluation de l'automate Aerospray™

2-1 Introduction

Le laboratoire d'hématologie du CHU Purpan, a par jour, une activité d'environ 400 hémogrammes dits de « routine », pour lesquels il y a autour de 15 % de contrôle sur frottis qui sont étalés et colorés par l'automate d'hématologie, de 100 hémogrammes des services d'hématologie avec lecture obligatoire au microscope des formules leucocytaires et de 150 hémogrammes de médecine préventive avec un contrôle microscopique inférieur à 1 %. D'autre part, environ 15 myélogrammes et 3 liquides céphalo-rachidiens (LCR) par jour qui sont colorés au MGG et lus au microscope. [60]

2-2 Evaluation proprement dite

L'évaluation s'est déroulée sur 3 semaines fin janvier-début février 2007 selon le schéma suivant :

1. La mise au point de la coloration : elle a été faite pendant les premiers trois jours. En commençant avec le réglage standard proposé par la société, et progressivement l'affinage des différents paramètres afin d'obtenir une coloration qui convienne.
2. L'étude des lames de sang standard : elle a duré environ 2 semaines. On a coloré des lames correspondant aux formules du laboratoire, à contrôler au microscope et on les a comparées aux lames des mêmes patients colorées au MGG. On a prévu un nombre d'au moins 100 tests et un test de reproductibilité sur le même tube étalé plusieurs fois et coloré à différents moments de la journée.
3. Une étude de sangs pathologiques : elle nous a permis de contrôler différents critères importants pour la classification d'hémopathies tels que la basophilie des cytoplasmes des lymphocytes, la granularité des polynucléaires (PN), la condensation chromatinienne des cellules matures et des plus immatures, et la morphologie des blastes.
4. Une évaluation de la praticabilité de l'appareil dans le laboratoire. [60]

2-3 Résultats

a) Mise au point de la coloration

Dans un premier temps, la programmation a été affinée à la recherche des temps qui donneront la meilleure coloration, et pour cela une modification des paramètres l'un après l'autre est suivie. Différents problèmes ont été rencontrés, tels que l'aspect fade de la coloration de l'ensemble des cellules, l'absence ou la mauvaise coloration des granulations des PN, l'hyperbasophilie des cytoplasmes des lymphocytes ou des GR trop verdâtres. Egalement un problème de « fonds » de lame sale avec de nombreux dépôts gênant surtout l'évaluation des plaquettes, et/ou de réfringence des GR dus, semble-t-il, à la mauvaise installation de l'appareil dans le laboratoire a été posé. En effet, l'évacuation des déchets ne se faisait pas de façon verticale, et leur stagnation, par mauvaise élimination, entraînait ce phénomène. [60]

Pour avoir une coloration la plus proche du MGG auquel le laboratoire est habitué, la programmation retenue était la suivante :

- « INTENSITY » à 9 : les hématies sont orangées, un peu plus claires que le rose saumoné normalement requis ;
- « FIXATION » à 7 : les étalements tiennent très bien la coloration ;
- « RATIO » T/E à 5 pour une bonne coloration des cytoplasmes soit 4,3 ml d'éosine pour 7,2 ml de thiazine ;
- SPIN TIME à 2 : les granulations apparaissent parfaitement et la chromatine est normalement condensée ;
- « RINSE » à 4 : à une action sur le temps de rinçage. Plus il augmente plus la lame est propre mais il faut l'augmenter avec précaution car la coloration peut devenir fade. A partir de ce moment, nous avons commencé l'évaluation. [60]

b) Reproductibilité de la coloration

Un même échantillon sanguin étalé plusieurs fois, que l'équipe de l'étude a coloré à différents moments de la journée. Aucune modification importante de cette coloration n'a été constatée, en dehors de quelques irrégularités ponctuelles. Le test a été effectué sur frottis de sang et de moelles. [60]

c) Etude comparative avec la MGG

c-1 Lames normales

250 frottis ont été colorés par les deux méthodes et étudiés. Il s'agit de patients contrôlés au microscope pour différentes raisons. [60]

c-2 Evaluation des plaquettes

On a une très bonne coloration de la structure plaquettaire. Aucun problème n'a été rencontré pour l'évaluation sur lame. [60]

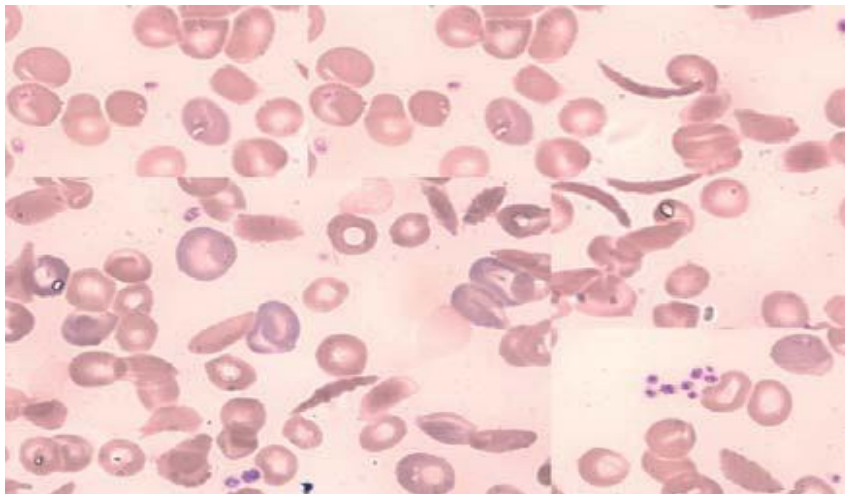


Figure.44 Drépanocytes- GR polychromatophiles- Plaquettes. [60]

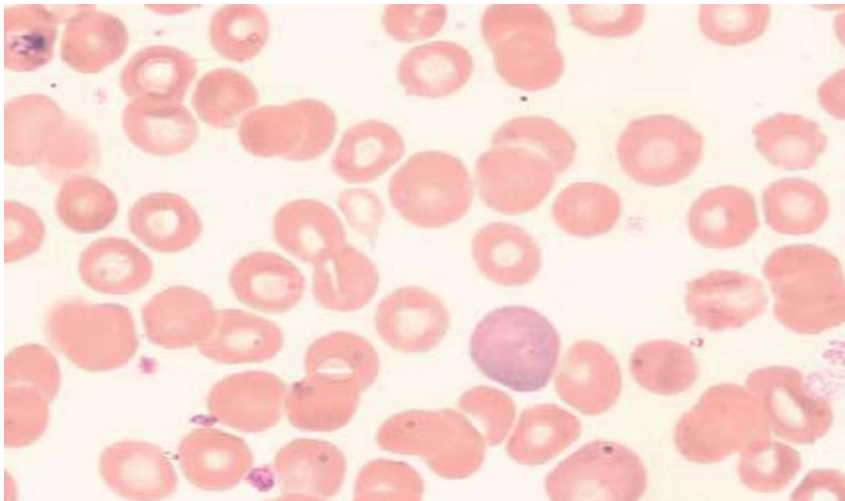


Figure. 45 GR polychromatophiles- Plaquettes. [60]

c-3 Etude de la morphologie des GR

La coloration des GR est très facilement adaptable. Les GR orangés apparaissent avec des contours et un centre clair bien nets. Différentes inclusions comme des corps de Jolly ou des granulations basophiles apparaissent nettement et les GR polychromatophiles ont été colorés parfaitement (Fig. 44 et 45). [60]

c-4 Formule microscopique

Les polynucléaires ont des granulations azurophiles bien apparentes et les granulations spécifiques neutrophiles, éosinophiles ou basophiles, sont bien mises en évidence. Les cytoplasmes des lymphocytes sont clairs bleutés et celui des monocytes ont leur classique coloration gris bleuté. [60]

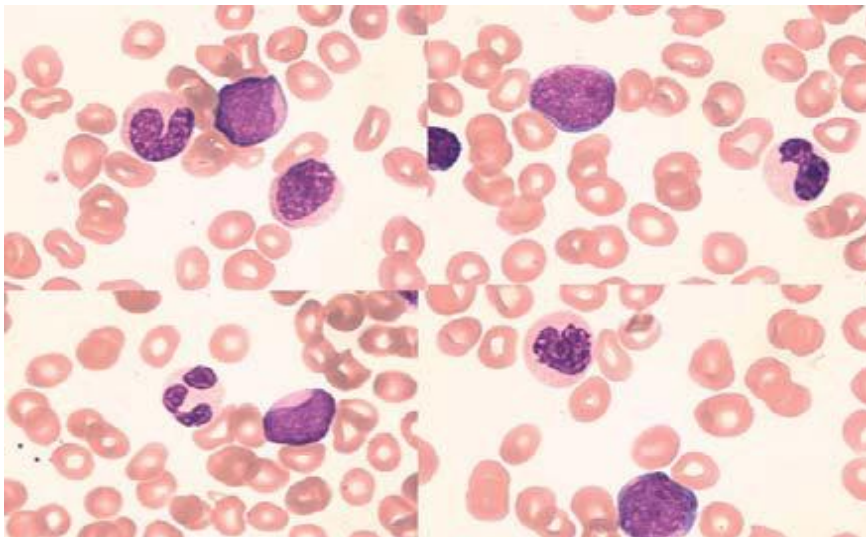


Figure. 46 Blastes- PN dégranulées- PN pelger. [60]

c-5 Pathologie hématologique

Différentes lames pathologiques ont été étudiées, pour voir si cette coloration ne se mettait pas en défaut dans des situations où la coloration est fondamentale :

– formes dégranulées des PN contre PN normaux sur 7 cas nous avons retrouvé les mêmes résultats que sur la MGG du laboratoire (Fig.47) [60]

– présence de blastes : sur 21 lames, les résultats ont été exactement comparables. Les chromatines apparaissent fines et les cytoplasmes bleu ciel (**Fig. 47**) [60]

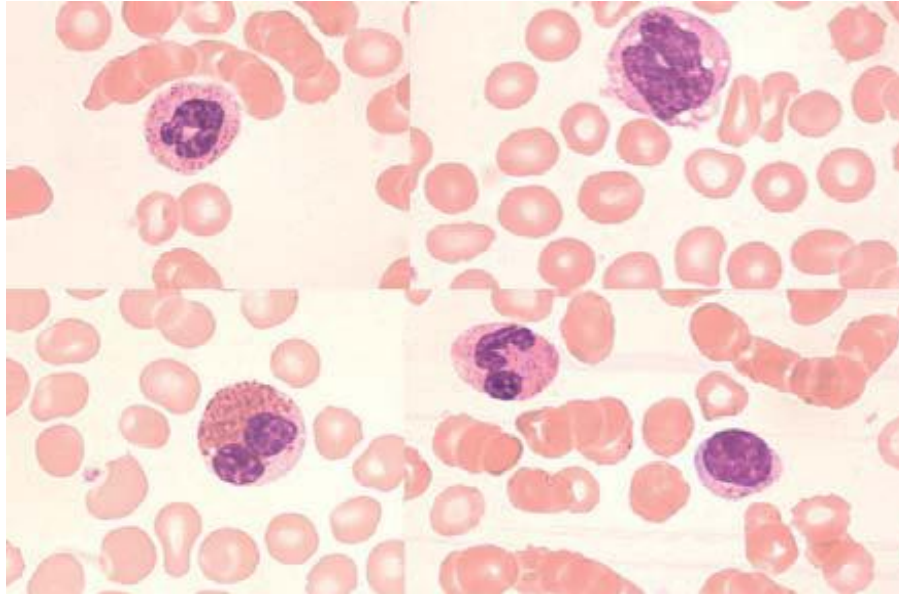


Figure. 47 Cellules sanguines. [60]

– basophilie des cytoplasmes nous permettant d’identifier sur la population lymphocytaire des lymphocytes stimulés. Dans 3 cas, aucune différence entre les deux colorations n’a été trouvée. (**Fig.48**) ; [60]

– identification de cellules pathologiques : au cours de cette étude, certaines pathologies sont de vrais diagnostics cytologiques comme des lymphocytes « vilieux » (**Fig.49**) ou des myéloblastes de leucémies aiguës myéloïdes. [60]

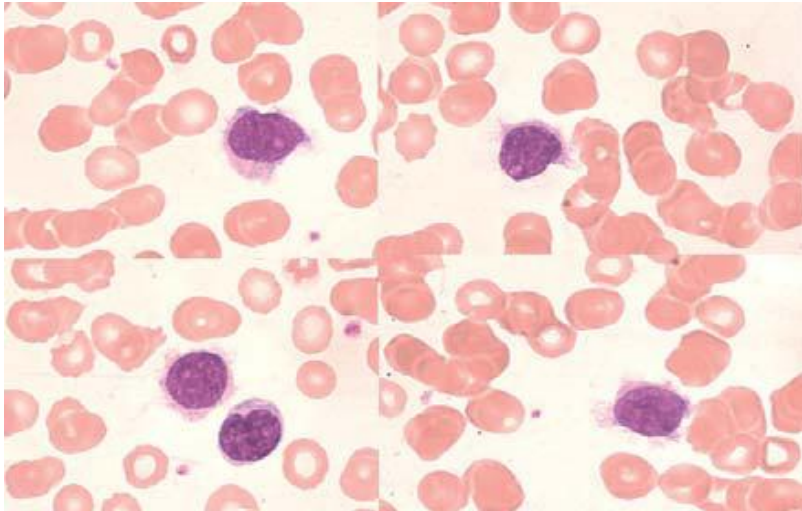


Figure. 48 Lymphocytes velleux. [60]

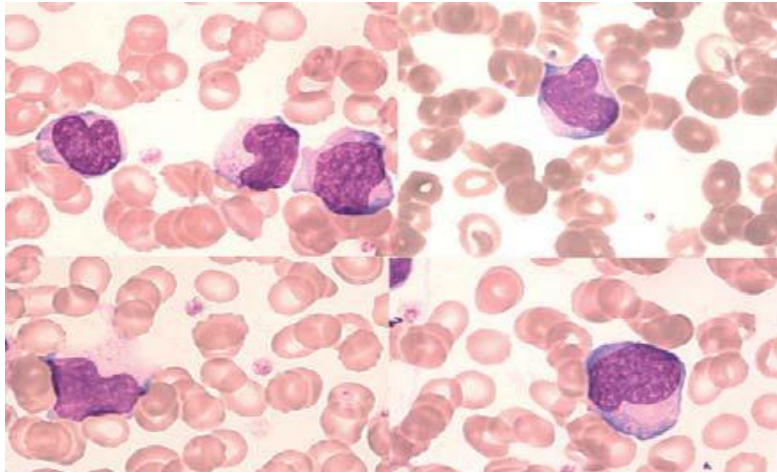


Figure. 49 Cellules mononuclées hyperbasophiles. [60]

c-6 Coloration des médullogrammes

Des étalements de moelle ont subi la même coloration que sur les étalements de sang sans changer la programmation de l'appareil, et l'étude a été faite en double avec un MGG. Sur 21 étalements de moelle, aucune différence fondamentale n'a été constatée, et la coloration apparaît même bien plus vive sur les médullogrammes qui sont dans l'ensemble bien plus épais que les étalements de sang. [60]

c-7 Praticabilité

Les deux derniers jours de l'évaluation, la praticabilité de l'Aerospray™ a été testée, en n'utilisant que cet appareil de coloration dans le laboratoire. On a coloré, le premier jour, 51 lames de sang et 36 lames de moelle (3 lames de chaque), et le jour suivant 47 lames de sang et 33 lames de moelle. [60]

La technicienne, présente ces deux jours-là, n'avait aucune expérience de cet automate. Elle l'a utilisé à partir de la fiche technique préparée pour elle sans aucune difficulté mais avec toutefois deux recommandations :

- précaution particulière sur le positionnement endroit/envers des lames dans le rotor ;
- nécessité d'enlever les lames rapidement à la fin de la coloration sous peine d'encrassement des buses si on n'utilise pas l'appareil.

La coloration est très rapide d'environ 10 à 15 minutes séchage inclus. [60]

c-8 Maintenance quotidienne

A la fin de chaque cycle de coloration, un nettoyage se déclenche automatiquement après le chargement d'un carrousel vide. La maintenance quotidienne se résume à appuyer sur la touche « Clean1 ». Dès que le rotor a été retiré, si on ne lance pas une nouvelle coloration, on doit remettre un rotor vide et un « Clean Nozzel » se fait automatiquement. Si l'attente est supérieure à 30 minutes ou si l'on arrête le colorateur, il faut lancer un « Clean2 ». Donc la coloration demande une certaine vigilance à laquelle nous ne sommes pas habitués avec le MGG et cet entretien conditionne la bonne homogénéité de la coloration. [60]

Pour l'élimination des déchets, il n'existe pas de procédure particulière. Le recueil des effluents, beaucoup moins abondants que pour le MGG puisqu'il s'agit d'une méthode de coloration par vaporisation et non par trempage, se fait dans un bidon qui est vidé régulièrement par nos services techniques. [60]

d) Discussion

L'Aerospray™ a été utilisé pendant 3 semaines dans le laboratoire. Après les réglages nécessaires pour avoir la coloration désirée, on a pu le tester, et l'utiliser pendant deux jours comme appareil de coloration du laboratoire. Sur le plan coloration, on peut dire que l'équipe

de l'étude a été satisfaite des caractéristiques tinctoriales de cette technique réglée de façon à avoir des teintes très proches de la MGG standard de référence. De la bonne installation de l'appareil dans le laboratoire, en particulier de l'évacuation de ses déchets, dépend une certaine qualité de cette coloration.

La stabilité dans le temps de cette coloration est assurée par le caractère « captif » des réactifs. Il est très difficile de supporter un changement régulier des réactifs qui, sous une appellation identique, livrés au laboratoire sans aucun avertissement alors qu'ils ont des caractéristiques chimiques différentes. Il est vrai que l'intérêt que l'on trouve dans cette stabilité est contrebalancé par une dépendance au constructeur. La négociation financière sur les réactifs devient plus difficile puisque le fournisseur est unique, et l'administration, dans le cas où un autre industriel proposerait un système plus intéressant sur le plan financier, pourrait obliger à le tester. Le coût par lame donné par le fabricant est estimé à 0,05 à 0,08 euros par lame. La fourchette est très large du fait de l'intervention de nombreux facteurs : nombre de lames par cycle, réglages de coloration choisis qui conditionnent la quantité de réactifs et fréquence d'utilisation. La qualité des lames semble importante dans cette technique mais on n'a pas pu tester ce point particulier. L'utilisation de cet automate est facile et rapidement accessible.

Il est en circuit fermé, sans odeur ni évaporation, ce qui est très apprécié des techniciens pour des raisons d'hygiène et sécurité. Mais différentes recommandations s'imposent :

- le remplissage du rotor : la mise en place des lames est plus facile et la coloration de meilleure qualité lorsque ce rotor est plein ;
- l'entretien de l'appareil doit être très rigoureux sous peine de bouchage. [60]

e) Conclusion

La coloration proposée par l'Aerospray™ de la société Elitech paraît tout à fait apte à remplacer la coloration MGG classique, mais sans toutefois ne pas perdre à l'esprit sa moindre souplesse administrative. [60]

V- LES PRINCIPES DES COLORATIONS CYTOCHIMIQUES SPECIALES

V-1 Introduction et principes

La cytochimie est l'étude des constituants chimiques des cellules. Ces éléments peuvent être enzymatique (par exemple, la peroxydase) ou non enzymatique (par exemple, des lipides et de glycogène). Les colorations cytochimiques spéciales (**Fig.50**), peuvent être utilisées comme sources d'information supplémentaires pour l'identification et la différenciation des leucémies. Ces colorations reflètent la composition chimique des cellules, par l'utilisation de réactions colorées, sans endommager la cellule au point auquel elle ne peut plus être reconnue.

Les colorations cytochimiques comprennent :

- Noir du Sudan B (SSB)
- myéloperoxydase (MPO)
- L'acide périodique de Schiff (Coloration PAS)
- Coloration du Naphtol AS-D chloroacétate estérase (CAE)
- Alpha-naphtyle acétate-butyrates estérase avec inhibition au fluorure (ANAE)
- Phosphatase alcaline leucocytaire (PAL)
- La phosphatase acide, avec ou sans inhibition par l'acide tartrique [61]






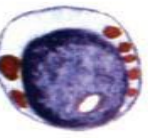

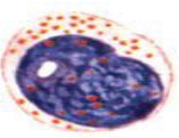
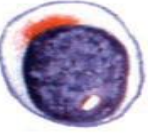


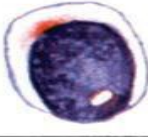
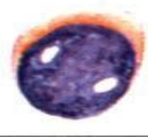
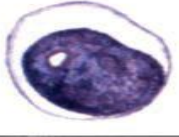

Reaction	LYMPHOID	MYELOID	MONOCYTOID
MPO			
SBB	—		
PAS			
ANAE			
ANAE/NaF			
CAE	—		—

Figure.50 Leucémie lymphoblastique aiguë, leucémie myéloblastique, et leucémie myélomonocytaire. Colorations cytochimiques. PAS ; CAE ; SSB ; MPO ; NaF Fluorure de sodium ; ANAE, (avec et sans fluorure d'inhibition). [61]

L'immunophénotypage, les études cytogénétiques haute résolution, et les analyses génétiques moléculaires ont réduit l'importance de tests cytochimiques. La technologie des biopuces peut quantifier l'expression des milliers de gènes par une seule analyse. [62,63] Cependant, les tests cytochimiques ont encore un usage limité dans de nombreux laboratoires, en particulier dans les cas équivoques ou lorsque la technologie plus sophistiquée n'est pas disponible. [64,65]

V-2 Echantillons et fixateurs acceptables

De nombreux types d'échantillons sont adéquats pour les études cytochimiques. Les frottis et les empreintes réalisées à partir de la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la rate ou du sang périphérique, sont préférées. Dans les techniques enzymatiques, les frottis frais sont utilisés chaque fois que possible, pour assurer l'activité enzymatique optimale. Les frottis pour colorations non enzymatiques, tels que l'acide périodique de Schiff (PAS) ou le noir du Sudan B (SSB), peuvent rester stables pendant des mois si conservé à température ambiante. [61]

V-3 Colorations et interprétations

1- La myéloperoxydase

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme présente dans les granules primaires des neutrophiles, les éosinophiles, et, à une certaine mesure, les monocytes (**Fig.51** et **52**). Les lymphocytes ne présentent pas l'activité MPO. Cette coloration est utile pour différencier les blastes de la leucémie myéloïde aiguë (LMA) de ceux de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL). [61]

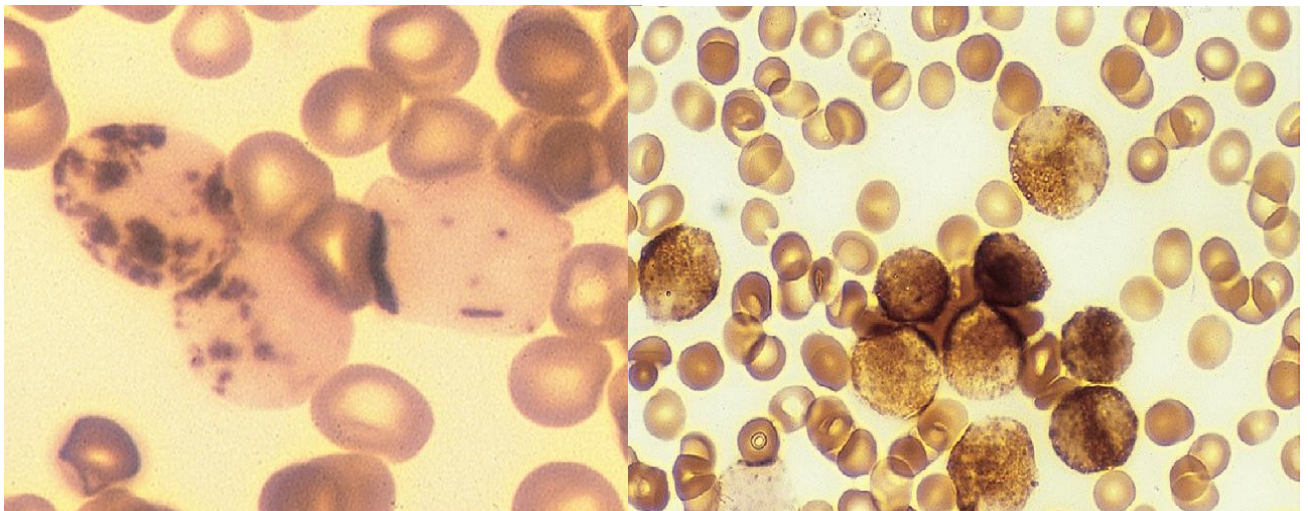


Figure.51 Réaction positive à la MPO dans les cellules myéloïdes précoces. (Moelle osseuse, $\times 1000$) [61]

Figure. 52 Forte réaction positive à la MPO dans les promyélocytes à partir d'un patient atteint de leucémie promyélocytaire aiguë (moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

1-1 Principe

Lorsque le peroxyde d'hydrogène est présent, la MPO oxyde les substrats de colorants, ce qui crée une coloration noire à brun-rouge (en fonction du substrat) sur le site de l'activité. La benzidine avait été le substrat le plus souvent utilisé, mais à cause de ses propriétés cancérogènes, d'autres substrats tels que le 3,3'-diaminobenzidine ou p-phénylènediamine et du catéchol sont actuellement utilisés. [61, 66,67]

1-2 Interprétation

La MPO est présente dans les granulations primaires des cellules granulocytaires, en commençant à l'étape de promyélocyte et tout au long de la maturation. Les myéloblastes leucémiques sont aussi généralement positifs pour MPO. Dans de nombreux cas des LAM (sans maturation, avec maturation, et leucémie promyélocytaire), il a été trouvé que plus de 80% des blastes montrent l'activité MPO. Les corps d'Auer trouvés dans blastes leucémiques et promyélocytes sont fortement MPO positifs. En raison de leur forte positivité MPO, beaucoup de corps d'Auer qui ne pourraient pas être vus avec une coloration de Wright-Giemsa, peuvent être vu avec la coloration MPO. [61]

Les monocytes sont MPO négatives à faiblement positives. En revanche, les lymphoblastes et les cellules lymphoïdes sont MPO négatives ; chez les patients atteints de LAL, moins de 3% des blastes montrent une positivité MPO. [68,69] Il est important que la réaction dans les blastes soit le facteur déterminant pour la différenciation des leucémies aiguës. Ceci est vrai pour la MPO et pour d'autres colorations cytochimiques utilisées dans la détermination de la lignée de cellules. Le fait que les granulocytes en cours de maturation sont MPO positifs est normal, et n'a pas de signification diagnostique. [61]

2- Le Noir du Sudan B (SBB)

La coloration SBB (**Fig.53**) est une autre technique utile pour la différenciation des LAM des LAL. Le schéma de coloration est tout à fait similaire à celui de la MPO ; La coloration au Noir du Sudan B, est peut-être un peu plus sensible pour les cellules myéloïdes précoces. [61]

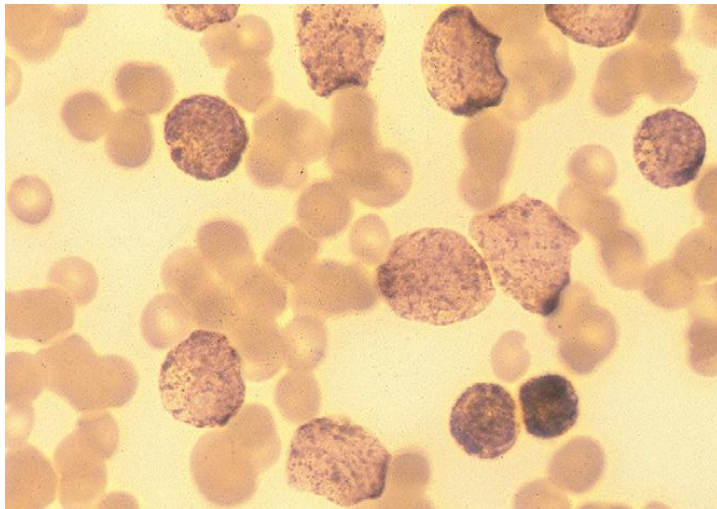


Figure.53 Réaction SBB. La positivité augmente avec la maturité de la cellule myéloïde (moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

2-1 Principe

Le Noir du Sudan B colore les lipides, tels que les stérols, les lipides neutres et des phospholipides, en raison de la solubilité du colorant dans des particules lipidiques. Ces lipides sont présents dans les granules primaires et secondaires des neutrophiles, et dans les granules lysosomales des monocytes. [70,71]

2-2 Interprétation

Les granulocytes (neutrophiles) montrent une réaction positive au SBB à partir de myéloblaste à travers la série de maturation. La coloration devient plus intense comme la cellule arrive à maturité à la suite de l'augmentation du nombre de granules primaires et secondaires. Les cellules monocytaires peuvent montrer une coloration négative à faiblement positive, reflétant une activité diffuse. Les cellules lymphoïdes généralement ne colorent pas. Dans les LAL, moins de 3% des blastes montrent une réaction positive.[68,69]

3- Les estérases

Les réactions aux estérases sont utilisées pour différencier les myéloblastes et les granulocytes neutrophiles, des cellules d'origine monocytaires. Neuf isoenzymes d'estérases sont présents dans les leucocytes. Deux esters de substrats couramment utilisés sont l'acétate d' α -naphtyle et naphtyle α -butyrate (les 2 non spécifiques). Chloroacétate de naphthol AS-D

(spécifique) peut également être utilisé. "Spécifique" fait référence au fait que seules les cellules granulocytaires montrent la coloration, tandis que les colorants non spécifiques peuvent produire des résultats positifs dans d'autres cellules. [61]

3-1 Principe

Les estérases hydrolysent un ester. Un composé de naphthol libéré se combine avec un sel de diazonium (généralement, la pararosaniline hex-azotée, nouvelle fuchsine hex-azotée), en produisant un composé de couleur vive sur le site d'activité enzymatique. [66,72]

3-2 Interprétation

Les colorations aux estérases peuvent être utilisées pour distinguer les leucémies aiguës granulocytaires de celles qui sont principalement d'origine monocyttaire. Lorsque le chloroacétate de naphthol AS-D est utilisé comme substrat, la réaction est positive dans les cellules granulocytaires et négative à faible, dans les cellules monocytaires (**Fig. 54**). La chloroacétate estérase est présente dans les granules primaires des neutrophiles. Les myéloblastes leucémiques présentent généralement une réaction positive. Les corps d'Auer se montrent également positifs. [61]

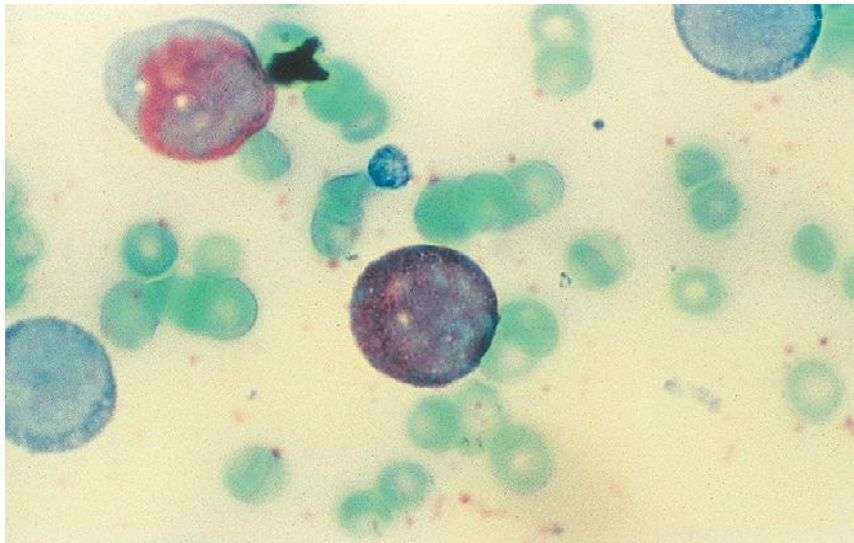


Figure.54 Réaction positive à l'AS-D chloroacétate estérase dans deux cellules granulocytaires (de la moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

L' α -naphthyle acétate, à la différence du chloroacétate de naphthol AS-D, révèle une forte activité estérase dans les monocytes, qui peut être inhibée par l'ajout de fluorure de sodium [60,64]. Les granulocytes et des cellules lymphoïdes montrent généralement un résultat négatif sur la coloration non spécifique d'estérase (**Fig. 55**). Une réaction positive à l' α -naphthyle butyrate estérase est également observée dans les monocytes. L' α -naphthyle butyrate est moins sensible que l'acétate α -naphthyle, mais il est plus précis. [61]

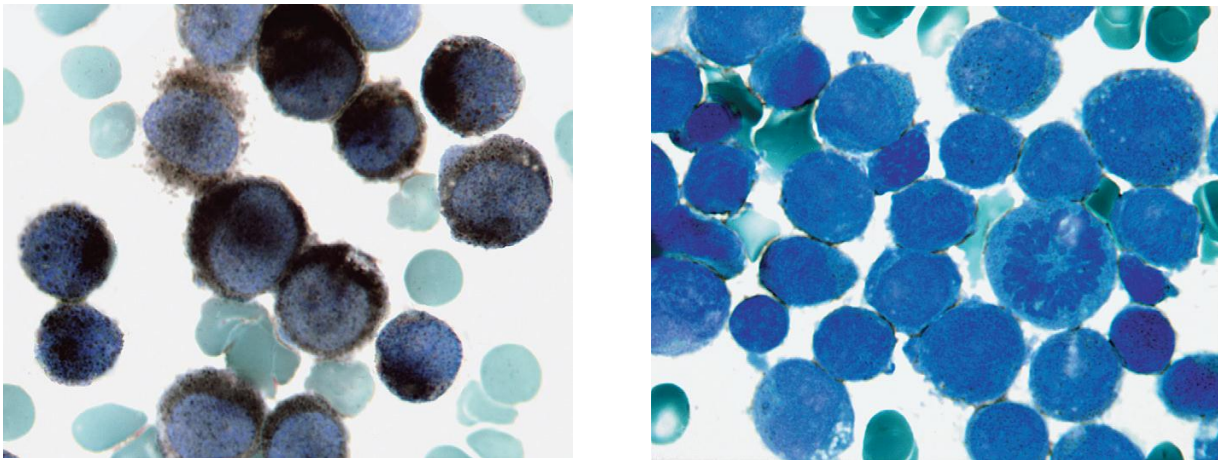


Figure.55 A (à gauche), Réaction positive à la coloration α -naphthyle acétate estérase dans les monocytes (moelle osseuse, $\times 1000$). **B (à droite)**, Echantillon identique avec addition de fluorure de sodium. La réaction d'estérase dans les monocytes est inhibée (moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

Les granulocytes et les cellules lymphoïdes montrent généralement une réaction négative (**Fig. 56**). Dans la leucémie myélomonocytaire, l'activité positive du chloroacétate AS-D, et l'activité positive du butyrate α -naphthyle ou de l'acétate α -naphthyle devraient être considérées, car les cellules myéloïdes et monocytaires sont présents. Dans la leucémie myélomonocytaire, au moins 20% des cellules doit montrer une différenciation monocyttaire, estérase positive non spécifique, et qui est inhibée par le fluorure de sodium. [61]

Dans les leucémies monocytaires pures, 80% ou plus des blastes sont estérase non spécifique positifs, et estérase spécifique négatifs. [61]

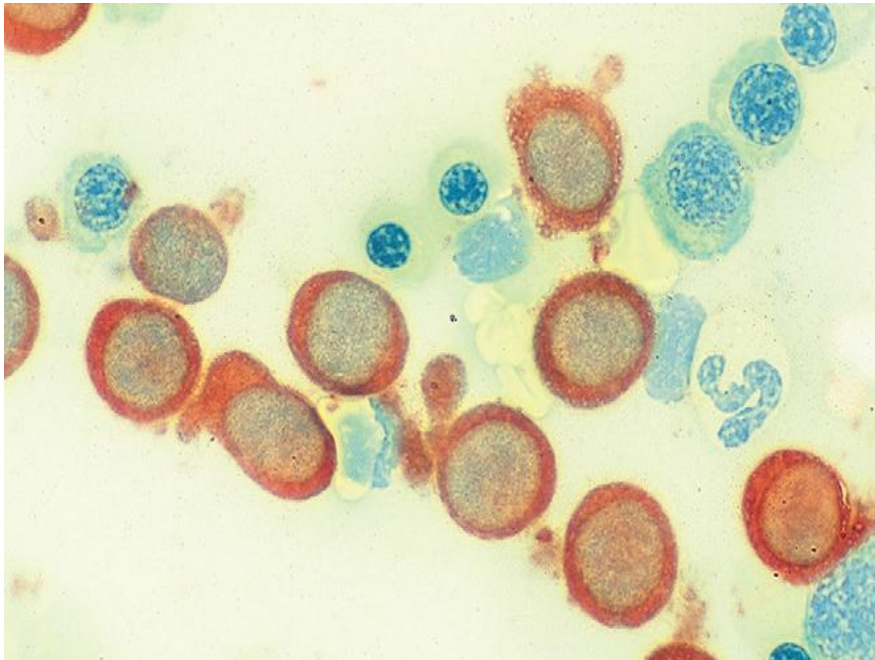


Figure. 56 Positivité de l'estérase de butyrate d' α -naphyle dans des cellules d'origine monocyttaire provenant d'un patient avec leucémie monocyttaire/monoblastique aiguë. Notez la négativité des précurseurs myéloïdes et érythroïdes (moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

4- L'acide périodique de Schiff (PAS)

La coloration PAS peut être utile dans le diagnostic de certaines LAL et le type érythroïde de LAM, ainsi que dans l'identification des précurseurs érythroïdes anormaux dans les syndromes myélodysplasiques. [61]

4-1 Principe

De nombreux types différents de cellules contiennent du glycogène. L'acide périodique oxyde le glycogène, les mucoprotéines, et d'autres hydrates de carbone de poids moléculaire élevé, en aldéhydes. Ces aldéhydes réagissent avec le réactif de Schiff incolore, qui se traduit par une coloration rouge-rose vive. L'intensité de la coloration dépend du nombre de groupes aldéhydes libérés par l'acide périodique. Le motif de coloration par le PAS peut être fine et diffuse, grossier et granuleux (bloc), ou un mélange des deux. [61]

4-2 Interprétation

Les granulocytes sont positives à la coloration PAS ; l'intensité de la coloration augmente à mesure que la cellule vieillit. Les mégacaryocytes présentent une coloration finement diffuse, alors que les plaquettes tournent intensément rouge-rose. Les précurseurs des érythrocytes normaux ne se colorent pas. [61]

Les LAL peuvent montrer un modèle de bloc grossier de l'activité, un motif finement diffus ou une combinaison des deux modèles, ou ils peuvent montrer aucune coloration (**Fig.57**). Les cellules de lymphome de Burkitt généralement ne se colorent pas [69,71]

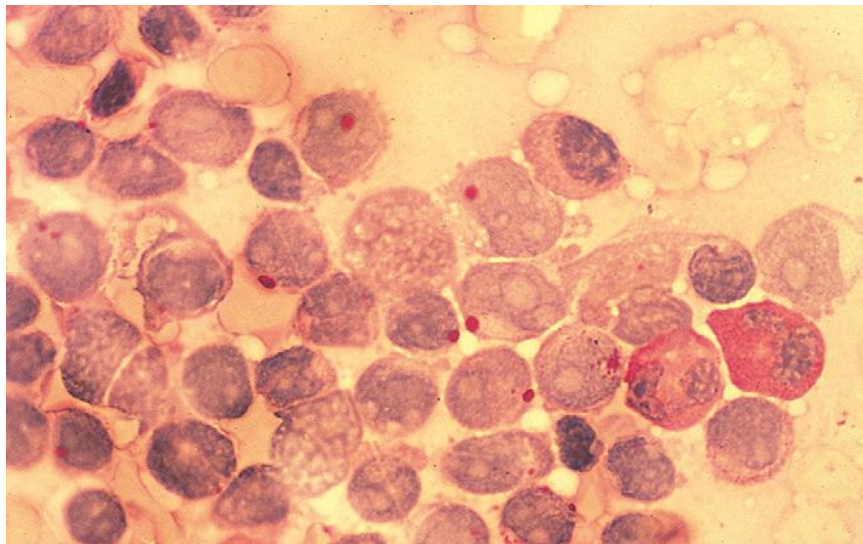


Figure.57 Réaction PAS montrant une grossière (bloc) positivité dans un échantillon provenant d'un patient atteint de leucémie lymphoblastique aiguë (moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

Dans le type érythroïde de LAM, et les syndromes myélodysplasiques, les précurseurs érythroïdes PAS-positifs peuvent être trouvés. Le schéma de coloration peut être grossier et granuleux, surtout dans les normoblastes précoces, ou diffus, qui est plus communément vu dans normoblastes à fin de maturation. (**Fig. 58**). [73,74]

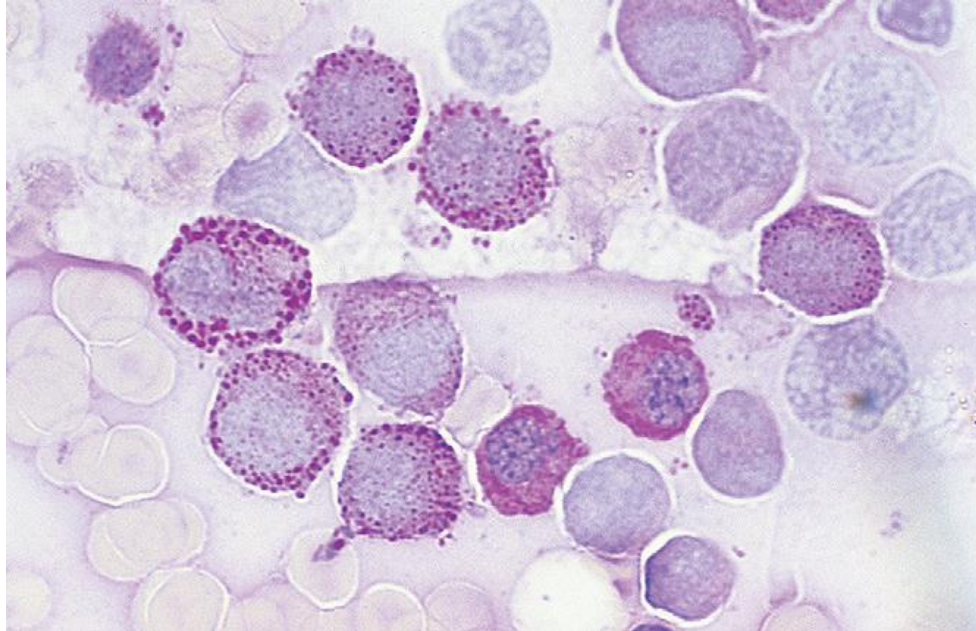


Figure.58 Réaction PAS-positive montrant une positivité granulaire grossière autour du noyau des précurseurs érythroïdes précoces, dans un échantillon provenant d'un patient atteint de leucémie aiguë érythroïde (moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

5- Les anticorps anti-Facteur VIII

La leucémie mégacaryoblastique nécessite des colorations immunocytochimiques pour un diagnostic précis. Les anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre l'antigène du facteur VIII ou la glycoprotéine plaquettaire, ont donné des résultats positifs dans la leucémie mégacaryoblastique (**Fig.59**). [75] Des réactions cytochimiques simplifiées, destinées pour une référence rapide sont indiquées au (**Tab. XVIII.**) [61]

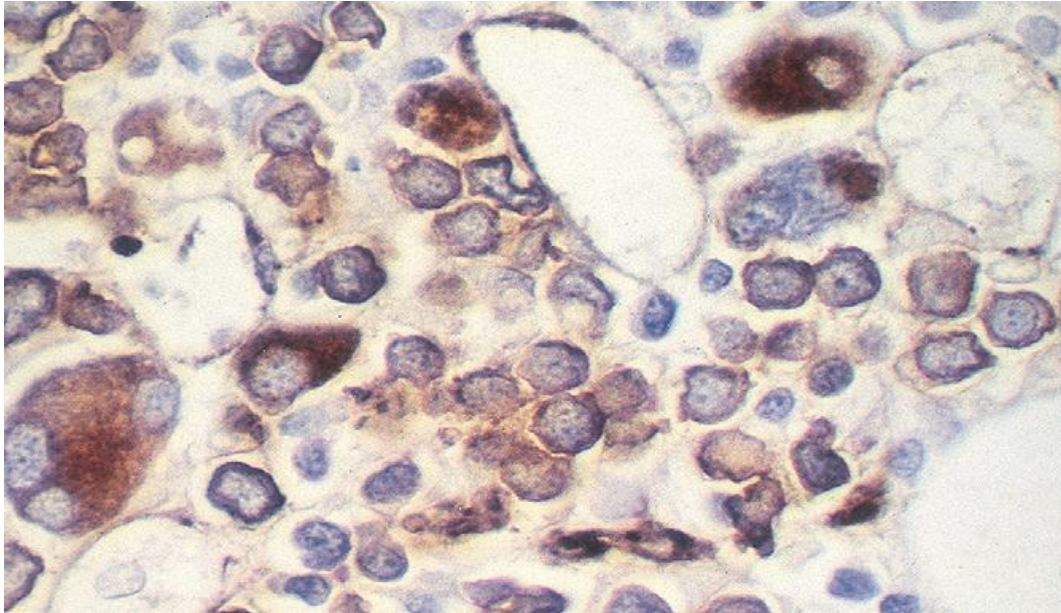


Figure. 59 Réaction positive à la coloration du facteur VIII dans un échantillon d'un patient atteint de leucémie aiguë mégacaryocytaire (de la moelle osseuse, $\times 1000$). [61]

Tableau. XVIII : +, Réaction positive ; -, Réaction négative ; - / +, réaction négative ou positive ; ANAE, estérase de l'acétate α -naphtyle ; ANBE, estérase du butyrate α -naphtyle ; MPO, myéloperoxydase ; NASDA, estérase du naphtol AS-D chloroacétate ; PAS, acide périodique Schiff ; SBB, le noir du Sudan ; * Réaction positive dans les myéloblastes, réaction négative dans normoblastes.

Coloration Cytochimique							
Condition	MPO	SBB	NASDA	ANBE	ANAE	PAS	Facteur VIII
LAL	-	-	-	-/+	-/+	Variée	-
LAM	+	+	+	-	-	Variée	-
LAMM Leucémie aigue myéomonocytaire	+	+	+	+	+	Variée	-
AMoL Leucémie aigue monocytaire	-	-/+	-	+	+	Variée	-
Leucémie érythrocytaire	*	*	*	-	-	+	-
Leucémie Mégacaryocytaire	-	-	-	-	+	-/+	+

6- La phosphatase alcaline leucocytaire

L'activité de l'enzyme phosphatase alcaline leucocytaire (PAL) est utile pour différencier la leucémie myéloïde chronique (LMC) d'une réaction leucémoïde qui peut être vu dans les infections graves. [61]

6-1 Principe

La phosphatase alcaline est une enzyme présente dans les membranes des granules secondaires des neutrophiles. Le substrat phosphate de naphtol AS -BI est hydrolysé par l'enzyme à un pH alcalin. Ce substrat hydrolysé, en combinaison avec un colorant comme le

rouge-violet rapide LB ou le bleu rapide BB, produit un précipité coloré au niveau du site de l'activité enzymatique. [61]

6-2 Le système de score

L'activité de PAL est marquée dans les cellules matures et des bandes segmentées seulement. Les scores d'activité vont de 0 à 4+ (**Fig.60**). Les scores de 100 cellules matures segmentées et les bandes sont ajoutés pour déterminer le score de PAL. Par exemple :

Tableau XIX Les scores d'activité de la PAL

SCORE	N° de CELLULES	SCORE x N° CELLULES
0	20	0
1	45	45
2	25	50
3	5	15
4	5	20
TOTAL	100	130

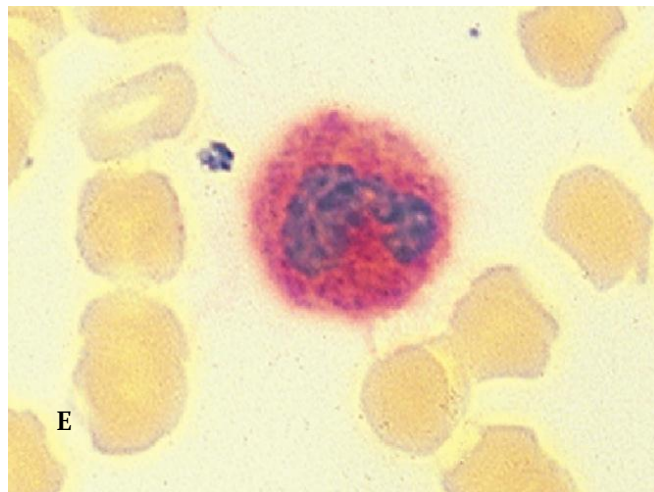
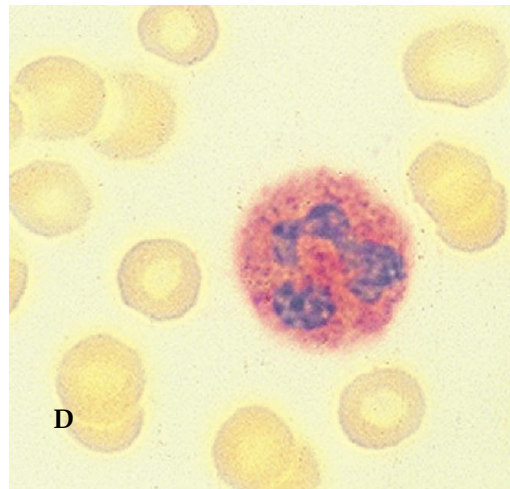
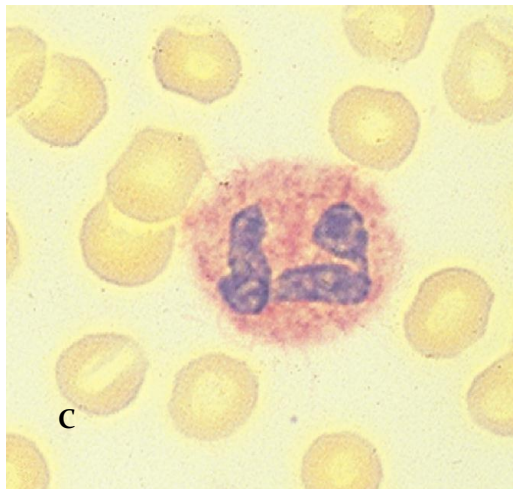
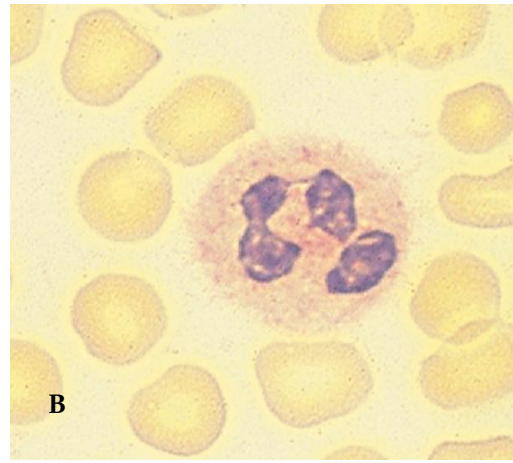


Figure.60 Echantillons colorés à la phosphatase alcaline montrant des scores de 0 à 4+ (sang périphérique, $\times 1000$). A, 0. B, 1+. C, 2+ .D, 3+. E, 4+. [61]

Vu que le système de score est subjectif, il est recommandé que deux lames soient analysées par deux personnes. Les scores de PAL devraient différer de moins de 10%. Si les scores ne sont pas en accord, une troisième lame du patient doit être analysée. Les éosinophiles ne montrent pas l'activité de phosphatase alcaline, et ne doivent pas être confondus avec les neutrophiles matures avec un score de zéro. Les éosinophiles peuvent être distingués par leurs granulations plus grandes. [61]

6-3 Interprétation

Un score de PAL normal devrait être entre 20 et 100, mais en raison de la subjectivité de l'analyse, la gamme peut se prolonger aussi bas que 15 ou aussi haut que 170.

Ainsi, il est important pour chaque laboratoire d'établir ses propres intervalles de référence. Les échantillons provenant de personnes atteintes de LMC non traités ont des scores PAL diminués ; ceux des personnes ayant des réactions leucémoïdes ont des scores allant de normal élevé, à « augmenté ». [61]

Autres conditions associées à des scores élevés, sont le troisième trimestre de la grossesse et de la maladie de Vaquez. Le score est normal en cas de polyglobulie secondaire. D'autres conditions dans lesquelles les scores sont diminués, comprennent l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, l'anémie sidéroblastique, et les troubles myélodysplasiques. Un résumé de l'interprétation de l'activité PAL est donné dans le (**Tab. XX**). [61]

Tableau. XX Résultats de la coloration à la phosphatase alcaline leucocytaire. (Ces résultats peuvent varier un peu avec les intervalles déterminés par chaque laboratoire)

CONDITION	SCORE
Normal	20-100
Leucémie myéloïde chronique	< 13
Réaction leucémoïde	> 100
Polyglobulie de Vaquez	100-200
Polyglobulie secondaire	20-100

7- phosphatase acide (résistante à l'acide tartrique)

Presque toutes les cellules sanguines contiennent sept isoenzymes non érythroïdes de la phosphatase acide : 0, 1, 2, 3, 3b, 4 et 5[68]. Les tricholeucocytes produisent l'isoenzyme 5 en abondance. Cela rend la coloration à la phosphatase acide un outil de diagnostic utile pour la confirmation de la leucémie à tricholeucocytes. [61]

7-1 Principe

La phosphatase acide hydrolyse le substrat acide naphthol AS-BI phosphorique. Lorsque il est hydrolysé, ce substrat se couple avec un colorant tel que le grenat rapide GBC, et produit un précipité rouge sur le site de l'activité enzymatique. Quand L - (+) - acide tartrique est ajouté, toutes les isoenzymes sont inhibées, sauf l'isoenzyme 5. L'isoenzyme 5 est tartrate résistante. Le terme TRAP (phosphatase acide tartrate-résistante) coloration est souvent utilisé pour désigner ce phénomène. [61]

7-2 Interprétation

La plupart des cellules hématopoïétiques montrent l'activité de la phosphatase acide. Les granulocytes, les lymphocytes et les monocytes sont tous positifs dans une certaine mesure de cette activité jusqu'à ce que l'acide L - (+) - tartrique est ajouté. L'activité est inhibée en l'absence de l'isoenzyme 5. Les tricholeucocytes, qui contiennent l'isoenzyme 5, reste positives même avec l'addition de l'acide L - (+) - tartrique. Dans la leucémie à tricholeucocytes, au moins deux ou plusieurs cellules contiennent 40 ou plusieurs granulations rouges (**Fig.61, Tab.XXI**) [66]

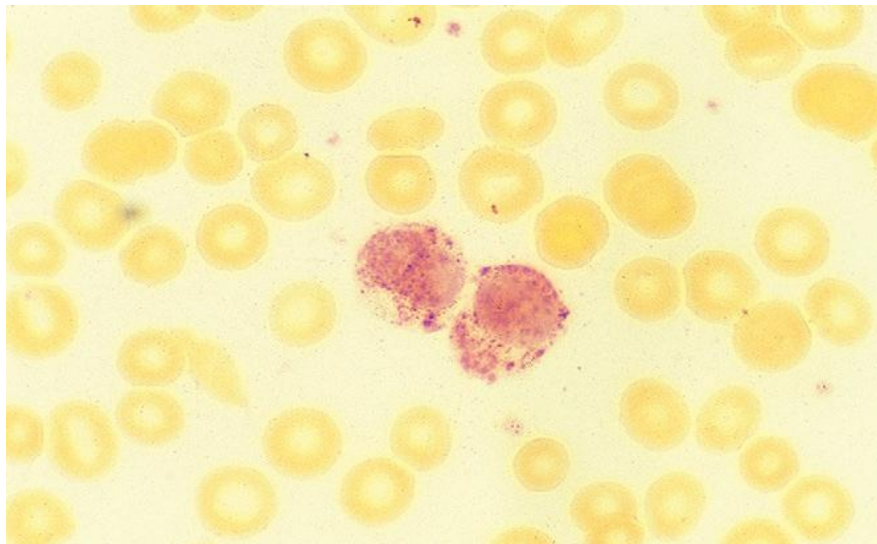


Figure.61 Réaction positive de la phosphatase acide. Si les tricholeucocytes sont présentes, les résultats de la coloration restent positifs après l'addition de l'acide tartrique au mélange d'incubation (de sang périphérique, $\times 1000$). [61]

Tableau.XXI Résultats de la coloration à la phosphatase acide. +, réaction positive ; -, réaction négative

Type cellulaire	Sans tartrate	Avec tartrate
Lymphocytes	+	-
Tricholeucocytes	+	+

8- Contrôles et diagnostic des anomalies

Pour la plupart des colorations cytochimiques mentionnés dans ce chapitre, un frottis sanguin normal, contenant des neutrophiles, des lymphocytes, et des monocytes est suffisant comme un échantillon de contrôle. Quelques cellules hématopoïétiques normales contenues dans l'aspiration de la moelle osseuse, peuvent servir comme contrôle interne de la coloration. Pour la leucémie à tricholeucocytes, un frottis sanguin normal peut être utilisé pour tester l'inhibition par l'acide L - (+) - tartrique, mais il est plus difficile d'obtenir un contrôle pour la

résistance au tartrate. Seulement un frottis sanguin d'un patient connu pour avoir la leucémie à tricholeucocytes peut être utilisé. [61]

Lorsque les lames de contrôle ne présentent pas le schéma de coloration approprié, par exemple en ne montrant aucune activité, alors qu'ils devraient être positives, ou présentant la mauvaise couleur de précipité, l'enquête devrait inclure la possibilité qu'un mauvais réactif, aucun réactif ou un réactif périmé a été utilisé dans le test. Un réactif peut être contaminé ; si c'est le cas, l'examineur doit préparer ou ouvrir un nouveau lot de réactif. Si le réactif est acceptable, l'examineur doit réviser la procédure pour veiller à ce que toutes les étapes ont été suivies correctement. Un autre aspect à considérer est la qualité du frottis et comment il a été stocké. Certaines enzymes diminuent d'activité au fil du temps. [61]

Les frottis frais sont toujours les meilleurs. Les frottis avec l' α -naphthyle acétate estérase, l'acétate α -naphthyle estérase avec le fluorure de sodium, et les colorations de TRAP (Phosphatase acide tartrate-résistante) ne doivent pas être sous une lamelle, car les colorations seront fades. Toutefois, un milieu de montage neutre peut être utilisé, ou les frottis colorés peuvent être visualisés directement sous immersion dans l'huile sans effet sur la réaction [76]

Si les résultats du contrôle sont inacceptables, la coloration cytochimique en question doit être répétée. Des instructions spécifiques pour les performances du test sont incluses dans les kits de test ou peuvent être trouvés dans un atlas de cytochimie. [66, 77]

9- Les corps de Heinz

9-1 Principe

Du sang total est mélangé avec du violet de Gentiane et ensuite incubé. Les préparations humides du mélange de sang et du colorant sont examinées, à la recherche des corps de Heinz dans les érythrocytes. Les corps de Heinz représentent des types d'hémoglobine instable, qui sont dénaturés par les colorants, tels que le violet de gentiane ou le bleu de crésyl brillant, et apparaissent comme des corps intra-érythrocytaires colorés. (**Fig. 62**). [61]

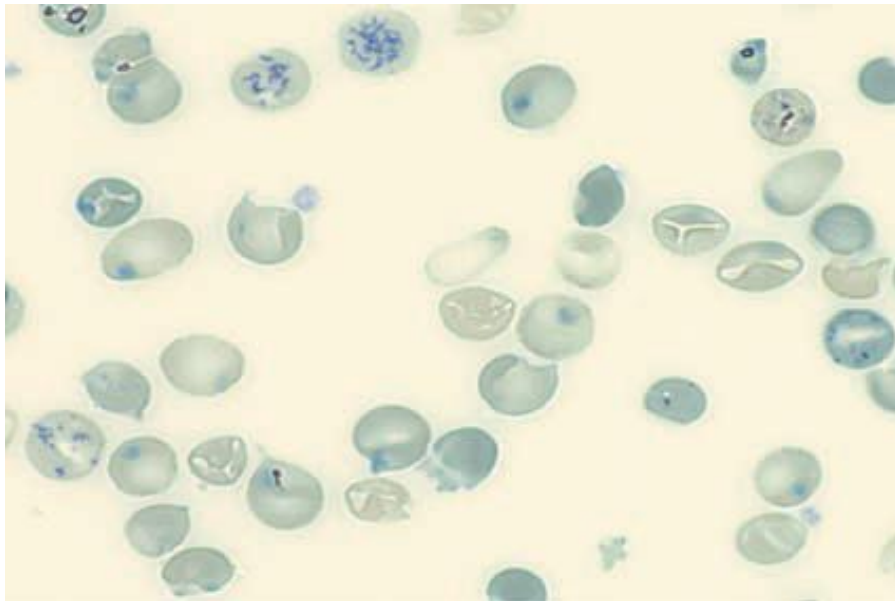


Figure.62 Les corps de Heinz ;. Type de cellule : hématies ; Description : inclusions réfractives trouvées sur la périphérie de la cellule lorsqu'ils sont colorés avec un colorant supravital. [61]

9-2 Procédure

1. Placer 1,0 ml de sang total bien mélangé dans un tube à essai.
2. Ajouter 0,5 ml de la solution de bleu de crésyl brillant.
3. Mélanger et laisser incuber à 37 ° C pendant un maximum de 2 heures.
4. À intervalles de 30 minutes, 1 heure et 2 heures, préparer les échantillons pour l'examen.

Cette procédure consiste à re-mélanger la solution de sang et de colorant et de placer une petite

goutte du mélange sur une lame de verre. Placez une lamelle sur cette préparation.

5. Examiner les lames non colorées immédiatement après la préparation (100 x) objectif. [61]

9-3 Résultats

Les corps de Heinz apparaissent comme des inclusions intra-cytoplasmiques réfractives, en bleu. Ce sont des corps de formes irrégulières, de tailles allant jusqu'à 2 mm de

diamètre, se trouvant à proximité de la membrane cellulaire. Il peut y avoir plus d'un corps de Heinz présent dans un érythrocyte. [61]

9-4 Notes de procédure

Les corps de Heinz sont détectables dans des préparations par voie humide et à l'aide de colorations supravitales tels que le bleu de crésyl brillant, nouveau bleu de méthylène N, violet de méthyle ou le violet de gentiane. Les corps de Heinz ne sont pas vus lorsqu'ils sont colorés avec Wright ou Wright-Giemsa. Pour les patients dont les érythrocytes ont des systèmes réducteurs défectueux, un grand nombre (45% à 92%) des érythrocytes peuvent comporter cinq ou plusieurs corps de Heinz. [61]

9-5 Applications cliniques

Les corps de Heinz sont formés lorsque les enzymes glycolytiques des érythrocytes ne sont pas capables d'empêcher l'oxydation de l'hémoglobine. De ce fait, l'hémoglobine est dénaturée par la suite et précipité pour former des corps de Heinz. Les systèmes enzymatiques érythrocytaires diminuent à mesure que la cellule vieillit ; donc, des corps de Heinz seront observés dans le sang normal. L'augmentation du nombre de corps de Heinz représente les formes instables de l'hémoglobine qui sont présentes dans un certain nombre des troubles hémolytiques. Les corps de Heinz se produisent dans des troubles tels que G6PD ou déficience de glutathion, secondaires à l'action de certains médicaments oxydants et en présence d'hémoglobines instables comme Hb H et Hb Zurich. [61]

10- Coloration de Perl's

10-1 Principe

La réaction du bleu de Prusse précipite le fer libre en petits granules bleus ou bleu-vert dans les érythrocytes. Le fer libre n'est pas identifiable sur les frottis sanguins colorés au Wright ou Wright-Giemsa. Un érythrocyte mature ou immature contenant le fer libre est considéré comme un sidéroblaste ou sidérocyte, respectivement. L'augmentation du nombre de sidérocytes est vue dans les troubles tels que la thalassémie majeure ou chez des patients après une splénectomie. Lorsque les granules de fer encerclent le noyau de l'érythrocyte, ceci

est appelé un sidéroblaste en couronne. Bien que l'alcoolisme soit la cause la plus fréquente de sidéroblastes en couronne, ils peuvent également être vus dans les cas de saturnisme ou de l'anémie. [61]

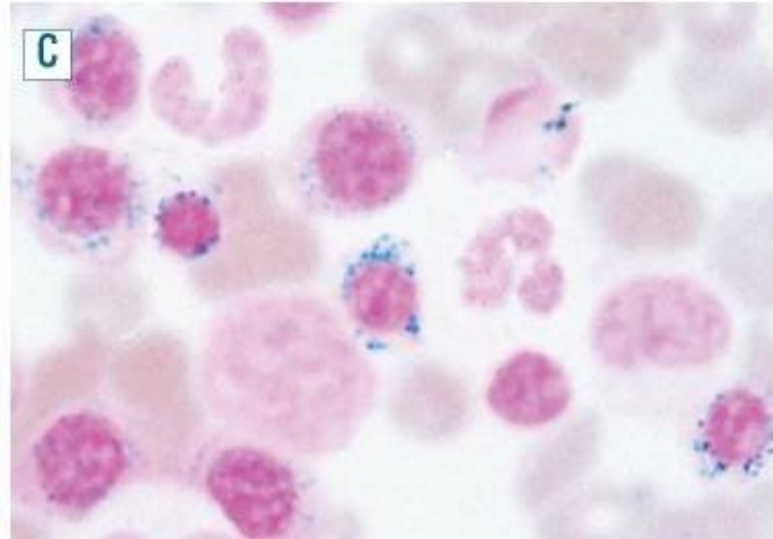


Figure.63 Myélogramme coloré par la réaction de Perl's montrant plusieurs sidéroblastes en couronne. [61]

11- Détermination de l'hémoglobine F par élution acide : Test de Kleihauer et Betke, méthode modifiée par Shepard, Weatherall, et Conley

11-1 Principe

Après que les frottis sanguins sont fixés avec de l'alcool éthylique, une solution tampon acide-phosphate élimine (élué) l'hémoglobine à l'exception de Hb F des érythrocytes. L'Hb F (hémoglobine fœtale) que les érythrocytes contiennent, est visiblement identifiable sur l'examen microscopique après coloration appropriée (**Fig. 64**). Peu de temps après la naissance, le taux de l'Hb F des humains diminue à de faibles niveaux. Des quantités accrues de Hb F se trouvent dans diverses hémoglobinopathies telles que la persistance de l'hémoglobine fœtale héréditaire, la drépanocytose, et les thalassémies. [61]

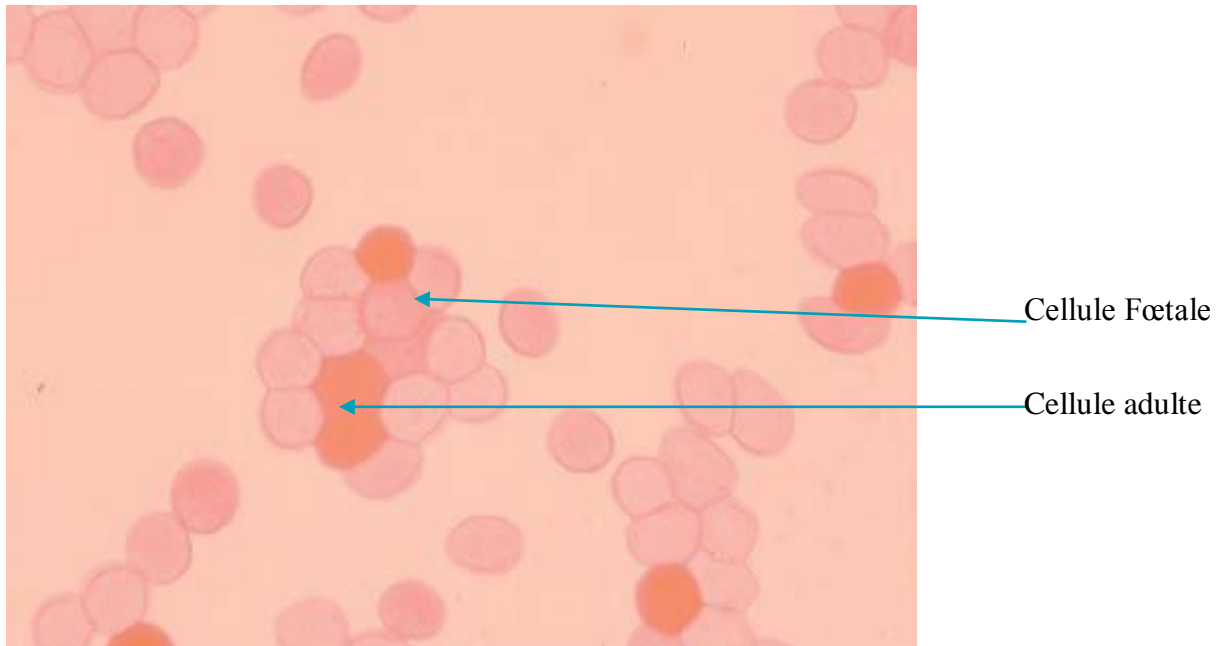


Figure.64 Coloration de Kleihauer-Betke. Type de cellule : Hématies. Description : Les cellules contenant l'hémoglobine F apparaîtront rose au rouge ; les cellules ne contenant pas de l'hémoglobine F auront seulement leur membrane externe (cellules fantômes) visible. [61]

Conclusion

Les techniques de colorations hématologiques datent depuis très longtemps (plus de 100 ans). Ce sont des pratiques et des procédures simples, mais indispensables pour chaque laboratoire d'hématologie quel que soit ses moyens.

Plusieurs colorations sont disponibles, que ce soit des colorations panoptiques ou cytochimiques.

Leurs intérêts n'est pas discutable. Elles sont utilisées selon leurs utilités, leurs couts, ou tout simplement selon le choix du praticien.

Actuellement, les pratiques manuelles de ces colorations sont de plus en plus abandonnées. Les automates de préparation et/ou de coloration des lames de dernière génération, ont prouvé leur efficacité, exploitation simple et totalement autonome, standardisation des résultats ainsi que leur économie d'argent et de temps.

L'évaluation individuelle, la validation des protocoles et la maintenance de routine pour chaque automate, reste le choix optimum à adopter par le laboratoire

RESUME

Titre : Les techniques de coloration en hématologie

Auteur : Abdelkarim El bekkali

Mots clés : coloration ; frottis sanguin ; MGG, hématologie ; automate de coloration des lames

Les techniques de colorations hématologiques font partie intégrante des procédures d'analyses biomédicales d'intérêt élevé.

On distingue les **colorations panoptiques** : Giemsa, Wright, Wright-Giemsa et May-Grunwald-Giemsa (MGG) la plus utilisée ; qui adoptent en commun le schéma de couleur de Romanowsky ; et les **colorations cytochimiques** dites spéciales comme : la myéloperoxydase (MPO), la phosphatase alcaline (PAL), la phosphatase acide, les estérases et etc...

Ces techniques peuvent être appliquées soit manuellement ou à l'aide d'automates de coloration.

Plusieurs automates de préparation et/ou de coloration des lames sont sur le marché, selon leurs fonctionnalités, les laboratoires peuvent adapter le profil de choix convenable.

L'installation réussie de l'automate de coloration dépend de plusieurs facteurs, y compris une évaluation objective basée sur une efficacité et une qualité prouvée.

Les résultats très satisfaisants obtenus à partir de ces automates font que les pratiques manuelles sont de plus en plus abandonnées.

ABSTRACT

Title: Staining techniques in hematology

Author: Abdelkarim El bekkali

Keywords: Staining; blood film; MGG; hematology; automated slide stainer

Staining techniques in hematology are part of the whole procedures of biomedical tests, with highly significance.

Among these techniques, we have **the panoptical stainings** such as: Giemsa, Wright, Wright-Giemsa and May-Grünwald-Giemsa (MGG) the most used one. All of them have in common the Romanowsky effect; on the other hand, we got **the cytochemical stainings** also known as special stainings, like: the myeloperoxydase (MPO), alkaline phosphatase (PAL), acid phosphatase, esterases etc...

The application of these techniques can be done either manually or by using automated slide maker stainers.

A lot of automated slide maker and/or stainers are on the stock, up to their specific functionalities, the laboratories can make up their own choice.

Successful installation of the automated slide stainer depends on many factors; among them, an objective evaluation based on efficiency and proven quality.

The satisfying results obtained through this automated slide stainers; makes manual practices more and more abandoned.

ملخص

العنوان : تقنيات التلوين في علم الدم
من طرف : البقالي عبد الكريم
الكلمات الأساسية: شريحة دموية – علم الدم – جهاز تلوين الشرائح الدموية

تعتبر تقنيات التلوين في علم الدم جزءا لا يتجزأ من إجراءات التحاليل الطبية الحيوية ذات الأهمية الكبرى. تتميز تقنيات التلوين شاملة الإراة (البانوبتيكية) كالغيمزا، رايت، رايت-غيمزا وماي-جرونوالد-غيمزا، الأكثر استخداما. تعتمد هذه التقنيات نظام ألوان مشترك لرومانووسكي؛ كما تتميز من جهة أخرى التقنيات السيتوكيميائية والتي تسمى أيضا تقنيات التلوين الخاصة، وهي على النحو التالي: الميلوبيروكسيداز، الفوسفاتاز القلانية، الفوسفاتاز الحمضية، أنزيمات الحلمأة وغيرها.

هذه التقنيات يمكن تطبيقها إما يدويا أو عبر الاستعانة بمعدات تلوين آلية. يوجد العديد من معدات تلوين الشرائح الدموية في السوق، وفقا لقدراتها، يمكن للمختبرات ضبط اختيار مناسب لمتطلباتها.

التثبيت الناجح لمعدات تلوين الشرائح الدموية، يعتمد على عدة عوامل، من ضمنها تقييم موضوعي على أساس الكفاءة والجودة.

النتائج المرضية للغاية التي يتم التوصل إليها عبر هذه المعدات، يجعل الممارسات اليدوية لتقنيات تلوين الدم أمرا يتم التخلي عنه بشكل متزايد.

Bibliographie

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Villanova, PA: NCCLS approved standard document H20-A, 1992.
2. Lewis SM. *Blood film evaluations as a quality control activity*. Clin. Lab. Haematol. 1990; 12(Suppl1):119–27.
3. Bentley SA. *Quality control and the differential leukocyte count*. Clin Lab Haematol 1990;12(Suppl 1):101–9.
4. Houwen B. *Blood film preparation and staining procedures*. In: Pierre RV, editor. Clinics in laboratory medicine. Philadelphia: Saunders, 2002;22:1–14.
5. MCCALL, Ruth E., et Cathy M. TANKERSLEY. *Phlebotomy Essentials*. Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1993, 291 p.
- 6-AHMAD Iyane Sow. *Manuel des procédures techniques des laboratoires d'analyses médicales*. RNL 2004 ; p97-12
7. BECTON DICKINSON. « Vacutainer systems. Microtainer Brand Tubes (package Insert 2001) », Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey.
8. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods*, Approved Standard, Pennsylvania, NCCLS, H20-A, 1992, 55 p.

9. BAIN, Barbara J. *Blood Cells a Practical Guide*, Second Edition, London (Great Britain), Blackwell Science, 1995.
10. L'ITALIEN, Roselyne, et Hélène LORD DUBÉ. *Hématologie*, deuxième édition, Sainte-Foy (Québec), Le Griffon d'argile, 1998, 434 p.
11. WHO. Rapid staining of thin film with field stain. In: *WHO Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory*. Geneva: WHO; 1980:395
12. Barcia, Juan Jose. *The Giemsa stain: its history and applications*, Int J Surg Pathol. 2007 Jul;15(3):292-6
13. Marshall PN. *Romanowsky-type stains in haematology*. *Histochem J* 1978;10:1-29.
14. Muller-Walz R, Zimmermann HW. *Über Romanowsky-Farbstoffe und den Romanowsky-Giemsa-Effekt. 4. Mitteilung: Bindung von Azur B an DNA*. *Histochemistry* 1987;87:157-172.
15. Friedrich K, Seiffert W, Zimmermann HW. *Romanowsky dyes and Romanowsky-Giemsa effect. 5. Structural investigations of the purple DNA-AB-EY dye complexes of Romanowsky-Giemsa staining*. *Histochemistry* 1990;93:247-256.
16. Horobin RW, Walter KJ. *Understanding Romanowsky staining. I. The Romanowsky-Giemsa effect in blood smears*. *Histochemistry* 1987;86:331-336.
17. Weller PF, Ackerman SJ, Smith JA. *Eosinophil granule cationic proteins: major basic protein is distinct from the smaller subunit of eosinophil peroxidase*. *J Leukocyte Biol* 1988;43(1):1-4.

18. Clark G, Kasten FH. *History of Staining*. 3rd ed. London: England: Williams & Wilkins; 1983.
19. Special Hematology Laboratory Procedure Manual, Procedure 2.2: *Wright Stain—Smears*. Minneapolis, MN, Fairview-University Medical Center, 1987
20. Hofman VJ, Ilie MI, Bonnetaud C, Selva E, Long E, Molina T, et al. *Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method: promises and pitfalls*. *Am J Clin Pathol* 2011;135:146—56.
21. van Lom K, Hagemeyer A, Smit EM, Löwenberg B. *In situ hybridization on May-Grünwald Giemsa-stained bone marrow and blood smears of patients with hematologic disorders allows detection of cell-lineage-specific cytogenetic abnormalities*. *Blood* 1993;82:884—8.
22. Nizzoli R, Guazzi A, Naldi N, Fraciosi V, Bozzetti C. *HER-2/neu evaluation by fluorescence in situ hybridization on destained cytologic smears from primary and metastatic breast cancer*. *Acta Cytol* 2005;49:27—30.
23. Romanowsky DL. *Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria*. *St Petersburg Med Wschr* 1891;16:307—16.
24. Giemsa G. *Zur Schnellfärbung (Romanowsky-Färbung) von Trockenausstrichen*. *Cbl Bakt I Orig* 1914;73:493—6.
25. Wittekind DH. *On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view*. *Histochem J* 1983;15:1029—47.
26. Lopez Cardozo P. *Atlas of clinical cytology*. The Netherlands: Targa b.v.'s Hertogenbosch; 1973. p. 632—9.

27. Woronzoff-Dashkoff KK. *The Wright-Giemsa stain. Secrets revealed.* Clin Lab Med 2002;22:15—23.
28. International Committee for Standardization in Haematology. *ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain).* Br J Haematol 1984;57:707—10.
29. Horobin RW, Walter KJ. *Understanding Romanowsky staining. I: the Romanowsky-Giemsa effect in blood smears.* Histochemistry 1987;86:331—6.
30. Wittekind DH, Kretschmer V. *On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and the Romanowsky-Giemsa effect. II. A revised Romanowsky-Giemsa staining procedure.* Histochem J 1987;19:399—401
31. Ganter P, Jolles G. *Histochimie normale et pathologique.* Paris:Gauthier-Villars; 1969. p. 70.
32. Bessis M. *Cellules du sang normal et pathologique.* Paris : Masson et Cie; 1972. p. 17—25.
33. Wright JH. *A rapid method for the differential staining of blood films and malarial parasites.* J Med Res 1902;7:138—44.
34. Giemsa G. *Farbenmethoden für Malaria parasiten.* Zentralbl Bakteriol 1 1902;31:429-30 [Zentralbl Bakteriol 1, 32: 1902;307—13].
35. Koss LG. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*, II, 4th ed. Lippincott Raven; 1992. p. 1504 [5th ed., Lippincott Raven, vol. II: 2006; p. 1616].

36. Kiernan JA. Histology FAQ. *Staining, Histochemistry and Histotechnology*. Version 1.6, Sept. 2014
37. Kiernan JA. *On chemical reactions and staining mechanisms*. In: Education guide special stains and H & E. DAKO North America, Carpinteria, CA (USA). Copyright; 2010. p. 172-4
38. Spriggs AI, Boddington MM, Heineman W. Medical books Ltd. 2nd ed; 1989. p. 53. Kluwer Acad. Publishers 1989, pp. 127—9.
39. Woronzoff-Dashkoff KP. *The Erlich-Cheminsky-Grumwald-Leishman-Ruxter-Wright-Giemsa-Lillie-Roe-Wilcox stain. The mystery unfolds*. Clin Lab Med. 1993;13:759-771.
40. Sysmex SP-1000i *OPERATOR's MANUAL*
41. Abbott CELL-DYN SMS *Operating Manual*
42. ADVIA Autoslide Stainer *Operating Manual*
43. Langeron M., *Precis de microscopie, Masson, Paris 6eme ed. Pp 566-585 (1942)*
44. White WL, Erickson MM, Stevens SC. *Practical Automation for the Clinical Laboratory*. St. Louis, MO, CV Mosby Co., pp 476-487 (1972)
45. UniCel(R) DxH slide maker/stainer Coulter(R) cellular analysis system *Operating Manual*
46. La Porta AD, Bowden AS, Barr S. Workflow improvement and *impact of the new Beckman Coulter LH 1500 high throughput automated hematology workcell*. Lab Hematol 2004;10:95–101.
47. RAL Stainer *Operating Manual*

48. Elitech Aerospray Stainer *Operating Manual*
49. Hematek® Slide Stainer *Operating Manual* Bayer-HealthCare, 2003-04; 99D44889
50. MIDAS-ii Stainer *Operating Manual*
51. Brown, W. Keeney, M. Hedley, B D. *Initial performance evaluation of the UniCel(R) DxH slide maker/stainer Coulter(R) cellular analysis system*. International journal of laboratory hematology 2014 Apr; 36(2):172-83.
52. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005;11:83–90.
53. The International Society for Laboratory Hematology. 2013. Disponible sur: www.islh.org/web/consensus_rules.php.
54. Cornet E, Perol JP, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Int J Lab Hematol* 2008;30:536–42.
55. Ceelie H, Dinkelaar RB, van Gelder W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J Clin Pathol* 2007;60:72–9
56. Koepke JA, Van Assendelft OW, Brindza LJ, Davis B, Fernandes B, Gewirtz AS, Rabinovitch A. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard, 2nd edn. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.

57. Beck JR, Shultz EK. The use of relative operating characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:13–20.
58. Simson E, Gascon-Lema MG, Brown DL. Performance of automated slidemakers and stainers in a working laboratory environment- routine operation and quality control. *Int J Lab Hematol* 2009;32:e64–76.
59. Bain BJ. *Blood Cells: A Practical Guide*, 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006
60. Eliane Duchaynea. ; Claudie Aldeberta. *Evaluation de l'automate de coloration Aerospray (Elitech.)*. *Revue francophone des laboratoires*- Novembre 2008 N 406 p 81-85.
61. Bernadette F. Rodak *Cytochemistry* .HEMATOLOGY: CLINICAL PRINCIPLES AND APPLICATIONS. *Fourth* Ed. Elsevier Inc. Chap.30 p:436-444.
62. Haferlach T, Kohlmann A, Bacher U, et al: Gene expression profiling for the diagnosis of acute leukemia. *Br J Cancer* 96:535-540, 2007.
63. Basso G, Case C, Dell'Orto MC: Diagnosis and genetic subtypes of leukemia combining gene expression and flow cytometry. *Blood Cells Mol Dis* 39:164-168, 2007.
64. Bain BJ: Routine and specialized techniques in the diagnosis of haematological neoplasms. *J Clin Pathol* 48:501-508, 1995.
65. Orazi A: Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. *Pathobiology* 74:97-114, 2007.
66. Li C-Y, Yam LT, Sun T: *Modern modalities for the diagnosis of hematologic neoplasms: color atlas/text*, New York, 1996, Igaku-Shoin.

67. Sheibani K, Lucas FV, Tubbs RR, et al: Alternate chromogens as substitutes for benzidine for myeloperoxidase cytochemistry. *Am J Clin Pathol* 75:367-370, 1981.
68. Scott CS, Den Ottolander GJ, Swirsky D, et al: Recommended procedures for the classification of acute leukemias. *Leuk Lymphoma* 11:37-50, 1993
69. Head DR: Revised classification of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1826-1831, 1996.
70. Li C-Y, Yam LT: Cytochemistry and immunochemistry in hematologic diagnoses. *Hematol Oncol Clin North Am* 8:665- 681, 1994.
71. Hayhoe FJG: The cytochemical demonstration of lipids in blood and bone marrow cells. *J Pathol Bacteriol* 65:413-421, 1953.
72. Li C-Y, Lam KW, Yam LT: Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 21:1-12, 1973.
73. Davey FR, Abraham N, Brunetto VL, et al: Morphologic characteristics of erythroleukemia (acute myeloid leukemia; FAB-M6): a CALGB study. *Am J Hematol* 49:29-38, 1995.
74. Quaglino D, Hayhoe FGJ: Periodic-acid–Schiff positivity in erythroblasts with special reference to Di Guglielmo’s disease. *Br J Haematol* 6:26-33, 1960.
75. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). *Ann Intern Med* 103:460-462, 1985.

76. Hoyer JD, Li C-Y, Yam LT, et al: Immunohistochemical demonstration of acid phosphatase isoenzyme 5 (tartrateresistant) in paraffin sections of hairy cell leukemia and other hematologic disorders. *Am J Clin Pathol* 108:308-315, 1997.

77. Sun T, Li C-Y, Yam LT: *Atlas of cytochemistry and immunocytochemistry of hematologic neoplasms*, Chicago, 1985, American Society of Clinical Pathologists Press.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *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 méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحس بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- 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 أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



تقنيات التلوين في علم الدم

أطروحة:

قدمت ونوقشت علانية يوم

من طرف

السيد: عبد الكريم البقالي

المزداد في 06 شتنبر 1989 بالناضور

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: التلوين - شريحة دموية - علم الدم - جهاز تلوين الشرائح الدموية

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة:

رئيس

السيد : عز العرب مسرار

أستاذ في علم الدم البيولوجي

مشرفة

السيدة : سعاد بنكيران

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيدة : نزيه مونة

أستاذة في علم الدم البيولوجي

أعضاء

السيد : عبد الله دامي

أستاذ في علم الكيمياء الحيوية