



HAL
open science

Applications de l'analyse d'image en cytologie: identification et numération des schizocytes et des plaquettes

Sylvain Salignac

► **To cite this version:**

Sylvain Salignac. Applications de l'analyse d'image en cytologie: identification et numération des schizocytes et des plaquettes. Sciences pharmaceutiques. 2001. hal-01738786

HAL Id: hal-01738786

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738786>

Submitted on 20 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
FACULTE DE PHARMACIE
2001

Ph N 2001/4
Double

M/PH/N/2001/4

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement

Le 24 Septembre 2001

Par

Sylvain SALIGNAC



Conformément aux dispositions de l'Arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**APPLICATIONS DE L'ANALYSE D'IMAGE EN CYTOLOGIE : IDENTIFICATION
ET NUMERATION DES SCHIZOCYTES ET DES PLAQUETTES**

Membres du Jury

Président : Mr T. LECOMPTE, Professeur.
Juges : Mr P. BORDIGONI, Professeur.
Mr C. VIGNERON, Professeur.
Mr JF. LESESVE, Docteur en Médecine.

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 058665 8

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I
FACULTE DE PHARMACIE
2001

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

Le 24 Septembre 2001

Par

Sylvain SALIGNAC

DB 15419

Conformément aux dispositions de l'Arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**



**APPLICATIONS DE L'ANALYSE D'IMAGE EN CYTOLOGIE : IDENTIFICATION
ET NUMERATION DES SCHIZOCYTES ET DES PLAQUETTES**

Membres du Jury

Président : Mr T. LECOMPTE, Professeur.
Juges : Mr P. BORDIGONI, Professeur.
Mr C. VIGNERON, Professeur.
Mr JF. LESESVE, Docteur en Médecine.

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE

Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mlle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie



MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M. COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M. DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mle FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GANTZER Christophe	Virologie
M. GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme HASENFRTZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M. JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

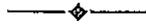
Mme GRISON Geneviève	Pratiques officinales
----------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe	Anglais
-----------------------	---------

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

De exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



*A notre Président du Jury, Monsieur le Professeur Thomas
LECOMPTE*

Professeur d'Hématologie à la Faculté de Médecine de Nancy
Chef de Service d'Hématologie Biologique. CHU Nancy

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce Jury, d'avoir porté un intérêt à mon travail et accepté qu'il soit mené au sein de votre laboratoire et d'avoir suivi mes recherches.

Avec mon profond respect et toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Jean-François LESESVE

Praticien Hospitalier

Service d'Hématologie Biologique. CHU Nancy

Je vous remercie de m'avoir confié cette étude, de m'avoir encadré avec attention et de m'avoir permis de mener à terme ce travail.

Que ce mémoire soit le témoignage de mes plus vifs remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Claude VIGNERON

Ancien Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy

Professeur d'Hématologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Service d'Hématologie Biologique. CHU Nancy

Qu'il me soit permis de vous exprimer ici toute ma reconnaissance pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Avec mes remerciements et toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Pierre BORDIGONI

Praticien hospitalier

Service de Médecine infantile II. CHU Brabois Enfants Nancy

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger cette thèse.
Nous vous remercions vivement pour la bienveillante attention que
vous avez portée à ce travail.

Recevez ici le témoignage de notre sincère reconnaissance.

A mes parents,

Pour leur soutien, leurs idées et tout leur amour

A Etienne,

Pour sa bonne humeur et son courage

A Charlotte,

Pour sa douceur et ses passions

A Mamie et Jean,

Pour leur gentillesse et leurs petits plats

A mon grand-père,

Pour toute son affection

A ma grand-mère,

Pour tous les bons souvenirs

A Audrey,

Pour sa joie de vivre

A toute ma famille,

A Elodie,

Pour son humour, sa gentillesse et son téléphone

A Patou,

Pour sa présence, son amitié et ses fontaines

A Fred,

Pour son soutien, sa patience et sa Ferrari bleue

A Vincent,

Pour toutes ces belles années de fac

A Alex,

Pour son incroyable imagination

A Michel et Valérie,

Pour leur extrême gentillesse

A Virginie,

Pour ses sourires, le schweppes et ses muffins

A Marie-Danielle,

Pour toute son aide

A Christel, Marie, Jérôme et Alex, Marie-Ange et Damien, Tot et Anne C, Polo et Isa,
Agnès et tous les autres.....

A Anne Walter, Emmanuel de Maistre, Véronique Latger-Cannard, Mme Buisine,
Mme Campedel et toutes les personnes du service d'Hématologie Biologique.

A Caro,

Pour tout ce qui fait qu'elle m'est indispensable

SOMMAIRE

	Pages
PREMIERE PARTIE : L'ANALYSE D'IMAGES	5
<u>I - GENERALITES</u>	6
<u>II - LE TRAITEMENT D'IMAGES ET LA MORPHOLOGIE MATHEMATIQUE</u>	7
<u>III - LE TELEDIAGNOSTIC</u>	9
<u>IV - LE LOGICIEL QWIN</u>	10
DEUXIEME PARTIE : APPLICATIONS DU LOGICIEL D'ANALYSE D'IMAGES A LA NUMERATION DES SCHIZOCYTES	11
<u>I - GENERALITES</u>	12
Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Diagnostic des anémies hémolytiques mécaniques : contribution de l'hémogramme. <i>Ann Biol Clin.</i> 2001 ; 59 : <i>sous presse.</i>	13
<u>II - LES PROBLEMES POSES PAR LA NUMERATION DES SCHIZOCYTES</u>	39
<u>II - 1 - Article original</u>	39
Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Schizocytes : quelle définition retenir et quelle méthodologie utiliser pour les identifier et les compter ? Résultats d'une enquête auprès de 24 biologistes. <i>Ann Biol Clin.</i> 2001 ; 59 : 49-52.	40

II - 2 - Enquête "schizocytes" sous l'égide du Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (coordonnée par J.F. Lesesve et T. Lecompte), résultats provisoires de la phase I

	54
II - 2 - 1 - DEFINITION DES TERMES	55
<u>II - 2 - 1 - 1 - Résultats</u>	55
<u>II - 2 - 1 - 2 - Discussion</u>	56
<u>II - 2 - 1 - 3 - Synthèse</u>	58
II - 2 - 2 - TECHNIQUE	58
<u>II - 2 - 2 - 1 - Résultats</u>	58
<u>II - 2 - 2 - 2 - Discussion</u>	60
<u>II - 2 - 2 - 3 - Synthèse</u>	61
II - 2 - 3 - ECHANGES AVEC LE CLINICIEN	61
<u>II - 2 - 3 - 1 - Résultats</u>	61
<u>II - 2 - 3 - 2 - Synthèse</u>	64
II - 2 - 4 - POURSUITE DU TRAVAIL	64
<u>III - DENOMBREMENT DES SCHIZOCYTES ASSISTE PAR ORDINATEUR</u>	66
<u>III - 1 - Article original</u>	66
Salignac S, Campedel C, Bordigoni P, Lecompte T, Lesesve JF. Est-il possible de compter les schizocytes au moyen d'un logiciel d'analyse d'image ? <i>Ann Biol Clin.</i> 2001 ; 59 : 165-8.	67
<u>III - 2 - Détermination de la limite de détection du logiciel</u>	81
<u>III - 3 - Sélection de la zone du frottis</u>	83
<u>IV - CAS CLINIQUES</u>	87
<u>IV - 1 - Exemple d'un SHU</u>	87
<u>IV - 2 - Exemple d'une microangiopathie thrombotique associée à un cancer</u>	94
<u>IV - 3 - Exemple d'une hémolyse sur valve mécanique</u>	104

TROISIEME PARTIE : APPLICATIONS DU LOGICIEL D'ANALYSE D'IMAGES A LA	
NUMERATION DES PLAQUETTES	109
<u>I - LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE NUMERATION PLAQUETTAIRE</u>	110
<u>II - QWIN ET LE COMPTAGE DES PLAQUETTES</u>	113
<u>II - 1- Principe</u>	113
<u>II - 2 - La coloration immuno-histochimique grâce au système DAKO EnVision®</u>	114
<u>III - COMPARAISON DES TECHNIQUES DE NUMERATION</u>	116
<u>III - 1 - Matériel et méthodes</u>	116
<u>III - 2 - Résultats</u>	117
III - 2 - 1 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – H.2 BAYER TECHNICON	117
III - 2 - 2 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – UNOPETTE OBSERVATEUR N°1	119
III - 2 - 3 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – UNOPETTE OBSERVATEUR N°2	120
III - 2 - 4 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – CYTOMETRIE EN FLUX	122
III - 2 - 5 - COMPARAISON UNOPETTE OBSERVATEUR N°1 – UNOPETTE OBSERVATEUR N°2	123
III - 2 - 6 - COMPARAISON UNOPETTE OBSERVATEUR N°1 – H.2 BAYER TECHNICON	125
III - 2 - 7 - COMPARAISON UNOPETTE OBSERVATEUR N°2 – H.2 BAYER TECHNICON	126
III - 2 - 8 - COMPARAISON CYTOMETRIE EN FLUX – H.2 BAYER TECHNICON	128

III - 2 - 9 - COMPARAISON FROTTIS COLORE AU MAY-GRÜNWARD GIEMSA – H.2 BAYER TECHNICON	129
III - 2 - 10 - COMPARAISON CYTOMETRIE EN FLUX – UNOPETTE	131
III - 2 - 11 - SYNTHÈSE DES RESULTATS	132
<u>III - 3 - Discussion</u>	133
<u>IV - CAS CLINIQUE</u>	137
<u>IV - 1 - Exemple d'une macrothrombocytopénie constitutionnelle</u>	137
QUATRIÈME PARTIE : BIBLIOGRAPHIE	146

PREMIERE PARTIE

L'ANALYSE D'IMAGES

I - GENERALITES

L'analyse d'image est la science qui consiste à prendre des mesures géométriques et densitométriques sur des images provenant de sources diverses. Une des applications principales est la microscopie quantitative qui a pour intérêt l'obtention de données rapides, précises et statistiquement exploitables par rapport aux méthodes subjectives traditionnelles.

L'analyse d'image est apparue en 1963 avec le QTM A (Quantitative Microscope à Télévision) destiné à être utilisé dans les laboratoires métallurgiques pour le contrôle de qualité de la pureté de l'acier. Les premières applications dans le domaine biologique ont été de mesurer la taille des espaces aériens dans les poumons et de compter les grains d'argent d'autoradiographie [1]. Depuis lors, les techniques d'analyses d'images ont été appliquées à presque tous les domaines de la science et de la technologie. Elles ont été étendues pour inclure des fonctions de traitement d'image comme les filtrages et l'amélioration d'images. La morphologie ou science des formes permet à l'analyste d'image de définir mathématiquement la forme, la taille et la densité d'un objet.

L'intérêt en hématologie est la possibilité d'une quantification de l'observation microscopique plus rigoureuse et plus reproductible par rapport à celle effectuée par le cytologiste, plus subjective. L'analyse morphométrique rend possible la mesure précise de divers paramètres qui sont habituellement estimés par l'œil. L'utilisation de l'analyse d'image en cytologie a été jusqu'alors développée par L. Benattar et G. Flandrin (Hématologie biologique, Hôpital Necker – Enfants malades). Deux applications ont été proposées : l'analyse de l'hétérogénéité des colorations de frottis sanguins (May-Grünwald Giemsa) issus de 40 laboratoires différents [2], et la caractérisation morphométrique de cellules lymphoïdes d'une leucémie lymphoïde chronique comparées à celles d'une phase leucémique d'un

lymphome du manteau [3]. Ces applications restent pour l'instant les deux seules utilisations de l'analyse d'images développées en cytologie hématologique. Il faut néanmoins citer l'apparition, dans les années 1980, d'appareils de numérations fonctionnant sur le principe de la reconnaissance de formes (Hematrak, ADC 500, DIF-3, Samba). Leur fonctionnement était basé sur l'analyse automatique de frottis sanguins colorés au Wright ou au May-Grünwald Giemsa, grâce à une caméra vidéo et un ordinateur. L'automate classait les cellules (polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, lymphocytes, monocytes), mettait en évidence la présence de cellules anormales (lymphocytes atypiques, myélocytes, blastes, érythroblastes...), réalisait une estimation du nombre de plaquettes et étudiait la morphologie des globules rouges [4]. Leurs résultats étaient acceptables pour les numérations normales, mais insuffisants pour l'analyse des cellules anormales et pour la morphologie des globules rouges [5]. Ils étaient cependant limités par leurs coûts, le petit nombre de cellules comptées (100-200) et leur lenteur, ce qui a conduit à l'abandon de leur commercialisation.

II - LE TRAITEMENT D'IMAGES ET LA MORPHOLOGIE MATHÉMATIQUE

Les techniques de traitement d'images offrent un ensemble d'outils qui peuvent être appliqués pour que les objets soient détectés de façon plus précise et plus reproductible. Il existe de nombreux types de traitement d'images qui permettent notamment de remplir des vides, d'affiner les bords, de segmenter des objets contigus ou d'uniformiser des niveaux de couleurs. La segmentation est une opération qui permet de séparer des éléments qui se touchent, mais elle fonctionne mieux sur des objets circulaires alors que la segmentation d'objets complexes est généralement inefficace et peut aboutir au découpage de l'élément.

Ces traitements appliqués en fonction du type d'image permettent d'en améliorer et d'en faciliter l'analyse.

La morphologie mathématique est une branche des mathématiques dont les outils sont particulièrement adaptés à résoudre les problèmes d'analyses d'images. L'image est traitée par une série d'étapes qui permettent d'obtenir les informations contenues dans celle-ci. Les informations sont triées de façon contrôlée et rendent les images plus faciles à analyser en les débarrassant des détails mal quantifiables et/ou inutiles. Les méthodes morphologiques permettent de résoudre des applications délicates d'analyses d'images difficiles à traiter avec les méthodes d'analyses classiques non morphologiques. La morphologie mathématique est née en 1964 sous l'influence de George Matheron, ingénieur au corps de mines, et de Jean Serra, ingénieur civil des mines de Nancy grâce à leurs travaux sur l'étude quantitative du gisement de fer lorrain. Ils créèrent le Centre de Morphologie Mathématique en avril 1968. La morphologie mathématique ne se limite pas à l'analyse d'image, mais elle en constitue l'application essentielle. Les progrès technologiques, et notamment le développement de l'informatique, ont rendu possible la numérisation des images et leur traitement, puis la mise en pratique des théories de la morphologie mathématique. Elle est actuellement utilisée dans la quasi-totalité des logiciels de traitement d'images. De très nombreuses applications ont été développées dans le domaine de l'imagerie médicale (mammographie : détection de micro calcifications et de surdensité anormale ; diabète : contrôle continu de la glycémie; ophtalmologie : suivi des micro-anévrismes rétiens et évolution de la macula avec l'âge), dans le domaine du "multimédia" (générations d'objets vidéo, télécommunications, photographie et restauration de films anciens), et dans le domaine du contrôle industriel et de document (granulométrie, contrôle radiologique des pièces coulées, détection automatique des zones d'adresses dans les plis postaux, programme PROMETHEUS sur la vision automatique embarquée dans les voitures) [6,7].

III - LE TELEDIAGNOSTIC

Les nouvelles technologies permettent la transmission d'images à distance par l'intermédiaire du réseau téléphonique (système Numéris) ou par Internet. Ces techniques, déjà utilisées en radiologie, se sont développées ces dernières années dans le domaine de l'anatomo-pathologie et de l'hématologie cellulaire [8]. Les possibilités offertes sont diverses, notamment l'aide au diagnostic pour les cas difficiles, la confrontation de données dans le cadre de protocole, l'enseignement à distance, l'archivage et la constitution de banque d'images. Ce système nécessite un microscope optique équipé d'une caméra 3 CCD. Les images sont digitalisées sur un système informatique doté d'un logiciel approprié. Ces images peuvent venir de sources diverses, qu'ils s'agissent de frottis sanguin, médullaire ou de biopsie (moelle osseuse, ganglions,...). Il est alors possible d'ajouter une page de commentaires contenant des renseignements cliniques, biologiques, phénotypiques, cytogénétiques ou de biologie moléculaire, permettant ainsi de constituer un véritable "dossier médical". Le dossier peut alors être transmis par les différents réseaux de télécommunication (Numéris, Internet) dans un objectif de confrontation (cliniciens, cytologistes, anatomo-pathologistes) ou d'aide au diagnostic. Pour une même application, les conditions d'acquisition des images doivent être idéalement standardisées, avec le même éclairage, le même objectif sur la même station de travail. Sous réserve d'une uniformité de l'étape pré-analytique (chaîne d'acquisition, coloration, étalement...), la possibilité de réaliser des analyses d'images sur matériel télétransmis ouvre de nouveaux champs d'application, alliant les deux concepts nouveaux que représentent la morphométrie et le télédiagnostic [9].

IV - LE LOGICIEL QWIN :

QWin, commercialisé par la société Leica, est une application sophistiquée mais rapide. Ce logiciel est capable d'entreprendre et de résoudre les tâches d'analyse d'images les plus complexes. Il fonctionne sous le système d'exploitation Microsoft® Windows™. QWin peut être utilisé pour effectuer des mesures manuelles aux coups par coups (mesures interactives) ou en mode automatique à l'aide de programmes définis par l'utilisateur. L'acquisition de l'image peut se faire directement dans QWin à partir de la caméra ou indirectement à partir d'un autre logiciel d'acquisition d'images.

DEUXIEME PARTIE

APPLICATIONS DU LOGICIEL D'ANALYSE D'IMAGES A LA NUMERATION DES SCHIZOCYTES

I - GENERALITES

Les schizocytes (étymologiquement cellules coupées) sont des fragments circulants d'hématies dont la reconnaissance est importante pour l'orientation clinique et le suivi des malades. Leur présence dans le sang périphérique dans le cadre d'une anémie hémolytique fait évoquer une microangiopathie thrombotique ou une fragmentation mécanique. Leur mise en évidence présente donc un intérêt diagnostique, et leur numération entraîne des conséquences thérapeutiques et pronostiques réelles. Cette numération reste néanmoins difficile par manque de standardisation ce qui est responsable de variations inter- et même intra-observateurs.

Les objectifs de cette partie du mémoire sont donc de situer le contexte et l'intérêt de la numération des schizocytes (premier article), puis de présenter les résultats d'une enquête sur leurs critères de reconnaissance auprès de 24 biologistes travaillant en centre hospitalier (deuxième article, enquête étendue par la suite à 47 biologistes), et enfin d'exposer les résultats d'une approche grâce à un logiciel d'analyse d'images dans le but de standardiser cette analyse difficile et de compter les schizocytes sur des critères fiables et reproductibles (troisième article).

Ma participation à ces travaux a été :

- L'aide à la réalisation et au dépouillement des enquêtes sur la définition et l'identification des schizocytes.
- La mise au point du logiciel d'identification des schizocytes (morphométrie des hématies standard et des schizocytes, écriture du programme).
- L'association au travail plus général sur la valeur sémiologique de la présence de schizocytes.

Diagnostic des anémies hémolytiques mécaniques : contribution de l'hémogramme.

Contribution of the complete blood cell count to the efficiency of fragmentation haemolytic anaemia diagnosis

Jean-François Lesesve, Sylvain Salignac, Thomas Lecompte

Service d'Hématologie Biologique, CHU Nancy, 54 511 Vandoeuvre-lès-Nancy

Téléphone : 03 83 15 37 66, Télécopie : 03 83 15 37 89

Email : jf.lesesve@chu-nancy.fr

Mots clés :

Anémie hémolytique, microangiopathie thrombotique, purpura thrombotique thrombopénique, syndrome hémolytique et urémique, schizocyte

Keys words :

Microangiopathic haemolytic anaemia, thrombotic thrombocytopenic purpura, haemolytic uremic syndrome, schistocyte

Résumé

La présence de schizocytes sur un frottis sanguin est anormale. Elle peut être un des stigmates de maladies graves. La recherche doit donc pouvoir être effectuée en urgence, dans le cadre d'un dialogue clinicien - biologiste précis. La première obligation du biologiste est de fournir au clinicien des éléments validés lui permettant d'orienter son diagnostic : hémoglobine, plaquettes, réticulocytes, test de Coombs érythrocytaire, LDH... La recherche de schizocytes reste un examen difficile. Leur présence de schizocytes sur le frottis doit faire envisager la survenue d'une microangiopathie thrombotique (MAT), car cette entité pathologique nécessite une prise en charge thérapeutique urgente. Par contre, les schizocytes n'en sont pas pathognomoniques. Ils peuvent être présents dans d'autres affections. Le contexte orientera alors le plus souvent. Enfin, il existe des cas minoritaires de MAT où les schizocytes sont d'apparition décalée, voire absente.

Abstract

Schistocytes result from red cell fragmentation. The identification of the schistocytes is critical for decisions on appropriate management of the patients. Detection of schistocytes on a peripheral blood smear is an abnormal finding, which raises the occurrence of a microangiopathy. The availability of effective treatment prompted the urgency to establish this crucial diagnosis. Nevertheless, schistocytes can be observed in a broader spectrum of disorders than thrombotic thrombocytopenic purpura / hemolytic uremic syndrome, or might be delayed even absent.

INTRODUCTION

Le tableau biologique habituel des anémies hémolytiques mécaniques est celui d'une anémie d'origine périphérique avec signes biologiques d'hyper-hémolyse (tableau I). Dans le cas d'une anémie mécanique, il existe une fragmentation des hématies avec schizocytes visibles sur le frottis sanguin. Bien que les schizocytes soient considérés comme un signe cardinal de cette affection, ce sont des cellules qui peuvent poser des problèmes d'identification et de numération (robustesse du critère, variabilité inter-observateurs) [1]. La sensibilité, la spécificité, l'efficacité du critère "schizocyte" n'ont jamais vraiment été évaluées. Le problème de la validation du diagnostic biologique des anémies hémolytiques mécaniques reste donc posé.

Face à une anémie par fragmentation, le diagnostic essentiel à envisager est celui d'une microangiopathie thrombotique (MAT), concept anatomo-pathologique qui regroupe principalement deux entités : le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) et le syndrome hémolytique et urémique (SHU) [2]. La mortalité spontanée de ces affections chez l'adulte est rapportée voisine de 90% et survient généralement dans les premiers jours. Les modalités thérapeutiques actuelles, perfusion plasmatique ou échange plasmatique, ont permis de réduire cette mortalité à environ 10% des malades [3]. Du fait de la gravité de la maladie, la tendance actuelle est de baisser le seuil interventionnel et de proposer un traitement en urgence dès qu'il y a suspicion de MAT [4]. La qualité de la réponse des examens biologiques de première ligne, "urgents", est donc fondamentale. Parmi les examens disponibles 24h/24 et utiles au diagnostic, l'hémogramme occupe la première place. Associé au test de Coombs érythrocytaire, il oriente immédiatement le diagnostic et permet, en urgence, une décision thérapeutique appropriée.

PROBLEMATIQUE

Les différentes causes des anémies par hémolyse mécanique, donc non immunologiques, sont données dans le tableau II. L'examen du frottis sanguin est capital. En effet, soit il existe des schizocytes, et l'on se trouve dans un contexte d'hémolyse mécanique : l'examen clinique, les antécédents permettront le plus souvent d'arriver rapidement au diagnostic de PTT/SHU. Soit les schizocytes sont apparemment absents et se pose le problème d'une hémolyse non immunologique (test de Coombs globulaire direct négatif) et sortant du cadre des MAT. L'examen du frottis sanguin devrait permettre d'affirmer ou d'infirmer la présence de schizocytes, et d'éliminer la présence de trophozoïtes par exemple.

Cette revue tentera de répondre à trois questions :

Comme cela est souvent enseigné, la présence de schizocytes est-elle pathognomonique (100% spécifique) d'une MAT ?

A l'inverse l'absence de schizocyte doit-elle faire rejeter le diagnostic d'une maladie gravissime (100% sensible) et alors (ou bien en cas de doute sur les schizocytes) quels sont les autres critères biologiques disponibles ?

Sur quels indices reconnaître les formes de MAT secondaires puisqu'elles nécessitent un traitement différent ou complémentaire de celui des MAT primitives ?

DIAGNOSTIC

La rareté des entités PTT et SHU explique peut-être la relative méconnaissance de leur diagnostic, en particulier par le biologiste. En effet, les cas de PTT chez l'adulte ont une incidence estimée autour de 1 pour 1 million d'habitants et par an. La revue de la littérature récente, comme les impressions des confrères amenés à prendre en charge ces patients,

suggèrent une augmentation actuelle de cette pathologie [4-5]. Le PTT est défini classiquement par l'association de cinq signes : fièvre, signes neurologiques variés, signes traduisant une insuffisance rénale, anémie hémolytique avec schizocytes, et thrombopénie [6]. En fait l'association de ces cinq signes serait minoritaire (40% des patients), car elle reflète la généralisation de lésions vasculaires généralisées. Ces lésions peuvent être encore minimales au moment de l'évaluation initiale. Par contre 75% des malades présentent des anomalies majeures de l'hémogramme (tableau III). Le premier point est d'éliminer un mécanisme auto-immun par la réalisation d'un test de Coombs érythrocytaire direct, qui sera négatif dans le cas d'une MAT. Le deuxième point est d'éliminer une CIVD par des tests de coagulation (temps de Quick, temps de céphaline avec activateur, fibrinogène). En effet, une CIVD est exceptionnelle au cours des PTT/SHU de l'adulte [7], et, quand elle existe, témoigne souvent de formes frontières (cancers muco-sécrétants...) [8]. L'hémolyse sera appréciée par le dosage des LDH qui sont augmentées. L'analyse des iso-enzymes a montré un profil évocateur de cytolysse des cellules endothéliales (augmentation prépondérante de la fraction 5 d'origine endothéliale par rapport aux fractions 1 et 2 d'origine globulaire) [9].

Thrombopénie

La thrombopénie représente un signe majeur d'orientation au cours des MAT. En effet toutes les anémies hémolytiques ne s'accompagnent pas d'une thrombopénie. La thrombopénie est généralement importante avec un chiffre médian de $25 \times 10^9/L$ [10]. A l'inverse, toute thrombopénie importante n'est pas synonyme d'un PTT/SHU (tableau IV). Un problème biologique majeur est la validation du chiffre rendu par l'appareil. Si la numération des plaquettes est effectuée par impédancemétrie il peut exister une pollution de la zone de comptage des grandes plaquettes par des petits globules rouges et en particulier par les schizocytes [11]. Cet artéfact est en principe minoré si la zone de comptage est encadrée par

des seuils fixes, avec extrapolation plaquettaire (principe Coulter[®]) [12]. La validation du chiffre des plaquettes impose dans ce cas un contrôle de la numération en cellule et/ou sur frottis. La thrombopénie a été rapportée au cours des MAT comme un signe très précoce, précédant les anomalies de la série érythrocytaire et l'élévation des LDH de 2 à 4 jours [13]. Un autre intérêt de la thrombopénie est qu'elle est un critère majeur pour juger de l'efficacité du traitement. Il est recommandé de poursuivre la thérapeutique jusqu'à normalisation du chiffre des plaquettes ($150 \times 10^9/L$) et stabilisation de ce dernier (≥ 2 jours). Il n'existe pas de test à valeur pronostique à partir de l'évaluation initiale pour les PTT. Cette affirmation pourrait cependant être nuancée car il a été montré que la thrombopénie était un indicateur de mortalité (32% des décès parmi les malades ayant moins de $20 \times 10^9/L$ *versus* 18% de décès parmi les malades ayant plus de $20 \times 10^9/L$) [5].

Schizocytes

L'anémie est le plus souvent franche. Cependant, l'hémoglobine peut être normale ou très modérément abaissée dans la phase initiale [10]. Les réticulocytes augmentent franchement, mais d'une manière décalée de quelques jours. La présence des schizocytes est visible dans la grande majorité des cas, mais il faut savoir qu'elle peut manquer, en particulier au début de la maladie [14] et qu'il faudra répéter la recherche. Dans de rares cas, la recherche de schizocytes a été rapportée rester négative tout au long de la maladie [15]. Cette constatation est plutôt effectuée lors de SHU de l'enfant, mais elle a été mentionnée au cours de PTT de l'adulte [16]. Les raisons de l'absence des schizocytes ne sont pas claires. La schizocytose doit être considérée comme pouvant être inconstante au cours des MAT (sensibilité $< 100\%$). Dans ce cas l'anatomie pathologique a une place importante pour confirmer la suspicion clinique de diagnostic (biopsie rénale ou gingivale).

La présence de schizocytes n'est pas pathognomonique des PTT/SHU (spécificité < 100 %). Elle peut être associée à d'autres formes de MAT (tableau II). Elle peut survenir au cours des "macro-angiopathies", essentiellement après chirurgie des gros vaisseaux (schizocytose modérée, transitoire 24/heures) ou dans un contexte de chirurgie cardiaque (suites de la pose d'une valve cardiaque, réparation d'une communication entre les cavités droite et gauche...). Avec les techniques actuelles, il faut noter que l'hémolyse mécanique est néanmoins rare, infraclinique et peu visible biologiquement. Sa survenue témoigne plus d'un dysfonctionnement valvulaire que d'une conséquence attendue (désinsertion de la valve, fuite, régurgitation, infection). Une hémolyse inconstante, jamais grave, est trouvée chez les malades porteurs de valves mitrales et aortiques ; l'hémolyse dépend du type de valve, de leur nombre, de leur position [17]. Seulement 30% des patients porteurs de 2 valves ont des signes biologiques d'hémolyse (augmentation des LDH). Les réticulocytes, l'haptoglobine sont le plus souvent dans les valeurs de référence, l'absence de schizocytes est habituelle [18]. De même, la présence d'une hémolyse mécanique ou d'un PTT est très rare après pose d'un tuteur ("stent") intravasculaire (coronaire, rénal, iliaque) chez les patients non traités par Ticlopidine [19].

En dehors de la pathologie cardio-vasculaire, les schizocytes sont également présents dans des circonstances très particulières. Au cours des états de coagulation intravasculaire disséminée se pose le problème du diagnostic différentiel avec une MAT, d'autant plus que les D-Dimères peuvent être modérément augmentés au cours des MAT [7]. Les schizocytes peuvent également être présents au cours des myélofibroses [20], qu'elles soient secondaires à des cancers métastatiques ou dans le cadre d'hémopathies malignes (splénomégalie myéloïde surtout, érythroleucémies...). Enfin il faut savoir qu'ils peuvent être présents au cours d'anomalies plus bénignes, telle qu'une anémie de Biermer [4] qui peut poser des problèmes

diagnostiques importants (patient se présentant avec un tableau neurologique, une thrombopénie, une anémie avec schizocytes et augmentation de la bilirubine et des LDH). Dans ces circonstances le frottis sanguin peut être évocateur par la grande poïkilocytose qui domine le tableau des anomalies morphologiques des hématies. La présence de schizocytes est possible chez les malades splénectomisés puisque la rate permet la séquestration suivie par la destruction des hématies à membranes rigides non déformables. Enfin, quelques schizocytes sont de constatation habituelle chez les nouveaux nés (souvent prématurés) [21]. La présence artéfactuelle d'hématies altérées lors du prélèvement ou des étalements est négligeable sur un frottis réalisé dans de bonnes conditions (inférieur à 0,2 %).

La numération des schizocytes est parfois utilisée en pourcentage de globules rouges plutôt qu'en valeur absolue. En particulier, dans le contexte de MAT survenant après greffe de moelle, plusieurs scores ont été établis à valeur pronostique. Ces scores incluent en général les paramètres suivants : LDH, plaquettes, pourcentage de schizocytes. Les schizocytoses sont rarement majeures au décours des greffes (le plus souvent comprises en 1 et 10%) [22-24]. Dans ces conditions, il s'agira d'une difficulté statistique de dénombrement d'évènements rares sur un frottis. L'intervalle de confiance à 95%, pour un pourcentage inférieur à 10% est extrêmement large si le compte est fait sur 500 ou 1000 hématies, ce qui est habituel [25]. La valeur de ce pourcentage est donc toute relative et doit tenir compte de l'imprécision statistique. Le décompte doit être effectué attentivement si une interprétation précise est souhaitée par le clinicien. La numération automatisée des schizocytes est proposée par certains automates (Advia 120, Bayer) où les schizocytes sont reconnus comme des éléments de taille inférieure à 30 fL (laser à angle 2-3°, mesure de volume) et de structure différente de celle des plaquettes (laser 5-15°, index de réfraction correspondant à la "densité" cellulaire) [26]. Une contamination par des petits fragments d'hématies est possible et cette méthode reste néanmoins à évaluer : le problème de la séparation petits microcytes, débris d'hématies

(microvésicules), véritables schizocytes reste en théorie posé. Le problème de la reconnaissance de schizocytes sur les frottis a déjà été abordé dans cette revue [1], il n'y a pas de consensus actuel sur les formes à sélectionner. Il faut par contre savoir que les schizocytes peuvent se sphériser après fragmentation, formant des éléments de très petite taille ("sphéro-schizocytes") qui posent le problème de leur reconnaissance en tant que tel [27].

Les microsphérocytes (sphérocytes à volume réellement diminué) étant de constatation banale au cours des anémies hémolytiques immunes [20], la négativité du test de Coombs à une valeur essentielle. En résumé, les pathologies associées à la présence de microsphérocytes dans le sang peuvent évoquer une anémie hémolytique auto-immune, une sphérocytose constitutionnelle (Minkowski-Chauffard), ou une anémie par fragmentation ("sphéro-schizocytes").

FORMES SECONDAIRES ET ASSOCIEES

Environ la moitié des MAT sont associées à un contexte pathologique pré-existant (tableau V) [4]. Le diagnostic en est parfois aisé d'emblée (grossesse, cancer...), ou au cours d'une hospitalisation avec surveillance programmée du malade (greffe de moelle...). Il existe néanmoins des circonstances de survenue plus difficiles à appréhender, en particulier les formes secondaires à une prise médicamenteuse ou rencontrées au cours du SIDA.

Une MAT a été rapportée dans de nombreux cas de prise médicamenteuse (tableau VI). Le diagnostic en est parfois difficile, il impose l'arrêt immédiat du médicament et l'interdiction d'une prescription ultérieure. Actuellement le débat se focalise sur la classe des thiéno-pyridines car il a été rapporté 60 cas de MAT dus à la prise de ticlopidine [28] dont 20 ont été mortels. La prescription de ce médicament a alors été fortement diminuée (d'autant que des neutropénies graves et/ou des aplasies avaient été encore plus largement

mentionnées), et remplacée par celle d'un composé chimique proche, le clopidogrel. Néanmoins 11 cas de MAT ont été décrits chez des malades traités par clopidogrel dont 2 mortels [29].

Les MAT sont souvent associées à l'infection par le virus VIH [30]. L'incidence du PTT est multipliée par 15 à 40 par rapport à la population non atteinte. Dans ce contexte, l'interprétation des cinq signes est difficile. La thrombopénie peut être d'origine immunologique ou post thérapeutique (AZT) ; les signes neurologiques peuvent être dus à une affection opportuniste. En conséquence le diagnostic de PTT devra être retenu que s'il existe d'autres signes (le contexte de SIDA a souvent été associé à l'absence d'hypertension artérielle, la présence de lésions ischémiques (doigts, langue)). Les schizocytes peuvent être trouvés avant la survenue d'une MAT avérée mais il a également été décrit des cas où ils manquaient. En conséquence, le tableau de MAT survenant chez les patients HIV+ est mal défini. Le pronostic en est grave, l'insuffisance rénale est quasi constante avec prise en charge par hémodialyse. Une médiane de survie inférieure à un an a été constatée [31]. Les MAT représenteraient un tiers des causes de l'insuffisance rénale aiguë chez les sujets VIH+.

CONCLUSION

La recherche de schizocytes sur un frottis sanguin est un élément capital du diagnostic d'une anémie hémolytique, dont certaines (MAT) ont des conséquences graves si elles ne sont pas traitées rapidement. Cette recherche doit être effectuée en urgence. Elle engage la conduite thérapeutique. Par contre, la sensibilité du critère "schizocyte" n'est pas absolue, car il existe des tableaux d'anémie hémolytique mécanique sans schizocytes visibles (rare, et le plus souvent d'apparition simplement différée). La spécificité est loin d'être absolue, et c'est là le problème majeur car le patient risque d'être engagé dans une prise en charge lourde pour

lui-même et l'équipe médicale. Enfin, la présence d'une MAT est souvent associée à une pathologie qu'il faudra rechercher. Ces constatations imposent :

- la possibilité de réalisation d'un frottis sanguin y compris pendant la garde, avec validation appropriée de l'hémogramme,
- la possibilité d'un dialogue prescripteur-biologiste,
- la pleine conscience par le biologiste de l'importance du résultat rendu.

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) constituent les deux formes principales du groupe des microangiopathies thrombotiques (MAT). Les signes présents au moment du diagnostic associent à des degrés divers : anémie hémolytique avec schizocytes, thrombopénie, fièvre, insuffisance rénale aiguë, et troubles neurologiques d'origine centrale [20].

LE SYNDROME HEMOLYTIQUE ET UREMIQUE

Le SHU constitue la cause la plus fréquente d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant. Il atteint essentiellement le jeune enfant (90% des cas entre 6 mois et 5 ans) et débute par une diarrhée aqueuse précédant généralement l'anémie et la thrombopénie d'environ 5 à 7 jours. Une insuffisance rénale aiguë de gravité variable peut alors se constituer plusieurs jours après l'apparition de l'anémie. La fièvre n'est pas constante et les enfants présentant un SHU ne manifestent des signes neurologiques que dans 20 à 30% des cas. Malgré la présence très fréquente d'une thrombopénie importante (autour de $50 \times 10^9/L$, mais pouvant atteindre $5 \times 10^9/L$), les signes hémorragiques sont rares. Les 3/4 des enfants atteints de SHU récupèrent complètement. Néanmoins, certains enfants conservent une atteinte rénale qui progresse vers une insuffisance rénale terminale. Au moment de la phase aiguë, la mortalité reste encore d'environ 5% des cas. Les récurrences sont possibles. Il existe de rares formes familiales de SHU.

La symptomatologie du SHU résulte de l'occlusion thrombotique des capillaires des organes. Les agents infectieux jouent un rôle majeur dans le développement d'un SHU. Même si des infections virales ont été considérées responsables d'épidémies de SHU, le SHU est généralement associé à des infections bactériennes, en particulier à *Escherichia coli* entérohémorragique de sérotype O157 : H7. D'autres souches d'*E. coli*, de *salmonelles* ou de

shigelles productrices de vérocytotoxine ("shiga-like toxine"), peuvent être impliquées. Des contaminations à partir de viande insuffisamment cuite, de lait non pasteurisé ou de jus de pomme ont été mentionnées. Seulement 2 à 6 % des enfants présentant une diarrhée hémorragique liée à l'une de ces souches développeront un SHU. Il semble que le SHU soit lié au passage d'un ou plusieurs types de vérocytotoxine au niveau de la circulation, suivie de sa fixation au niveau de la membrane de la cellule endothéliale par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique de structure glycosphingolipidique (Gb3, globotriaosylcéramide). Plusieurs mécanismes ont été évoqués, dont un effet toxique direct sur la cellule. La souche d'*E. coli* semble également être un élément déterminant, puisque l'incidence de SHU est beaucoup plus importante avec les souches produisant la toxine VT-2 seule qu'avec les souches produisant la toxine VT-1 seule ou la combinaison des deux. D'autres facteurs ont été évoqués dans la pathogénèse du SHU, comme des troubles de l'agrégation plaquettaire, la présence de multimères de facteur von Willebrand de poids moléculaire anormalement élevé, ou encore un déficit en prostaglandine I2.

LE PURPURA THROMBOTIQUE THROMBOCYTOPENIQUE

Le PTT décrit par Moschcowitz en 1924 est une maladie grave mais peu fréquente. On peut la voir à tous les âges de la vie, mais elle touche habituellement l'adulte jeune (10-40 ans), avec une prédominance pour les femmes (3/2). Les manifestations hémorragiques sont habituellement un purpura pétéchial avec ecchymoses, mais des épistaxis, des hémorragies rétiniennes et des saignements gastro-intestinaux sont possibles. Les manifestations neurologiques (apathie, céphalées, troubles de la conscience, signes focaux...) constituent le symptôme initial dans la moitié des cas. A ce tableau clinique classique, une insuffisance respiratoire, des douleurs abdominales liées à une pancréatite ou à une occlusion des

vaisseaux viscéraux, une hépatomégalie (25%), une splénomégalie modérée (20%) ou des phénomènes de Raynaud peuvent se surajouter. Comme dans le SHU, la pathogenèse est liée à l'occlusion thrombotique de très nombreux organes, essentiellement au niveau du cerveau, des reins, du cœur, du pancréas, et des surrénales. Le PTT était de mauvais pronostic, et la majorité des patients décédaient rapidement en l'absence de thérapeutique efficace. La survie en l'absence de traitement est de 80% à 3 mois et inférieure à 10% à 1 an. La disponibilité des perfusions plasmatiques et/ou des échanges plasmatiques en urgence a permis de modifier considérablement le pronostic (moins de 10% de mortalité).

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : Eléments du diagnostic biologique d'une hémolyse périphérique avec fragmentation (d'après [32])

Tableau II : Hémolyses extra-corporelles non immunologiques (d'après [14, 20, 21, 32])

Tableau III : Signes diagnostiques des purpuras thrombotiques thrombopéniques / syndromes hémolytiques et urémiques (d'après [4])

Tableau IV : Association anémie avec schizocytes et thrombopénie, orientation selon la numération plaquettaire (seuil proposé $100 \times 10^9/L$) (d'après [21])

Tableau V : Mode de présentation des purpuras thrombotiques thrombopéniques / syndromes hémolytiques et urémiques (d'après [4])

Tableau VI : Médicaments responsables de micro-angiopathies thrombotiques (d'après [33] et compilation de la littérature)

Tableau I : Eléments du diagnostic biologique d'une hémolyse périphérique avec fragmentation (d'après [32])

hémoglobine intra-érythrocytaire \downarrow , réticulocytes \uparrow	= <u>anémie régénérative</u>
bilirubine non conjuguée \uparrow , LDH \uparrow	= <u>hémolyse</u>
haptoglobine \downarrow , hémoglobinurie +, hémosidérinurie +	= <u>intra-vasculaire</u>
test de Coombs érythrocytaire –	= <u>non immunologique</u>
schizocytes +	= <u>fragmentation / mécanique</u>

Tableau II : Hémolyses extra-corporelles non immunologiques (d'après [14, 20, 21, 32])

hémolyses mécaniques (par fragmentation)

"Macro-angiopathies"

prothèses valvulaires ou vasculaires, pathologies vasculaires ou valvulaires non opérées, circulation extra-corporelle, chocs palmoplantaires répétés

Micro-angiopathies

purpura thrombotique thrombopénique, syndrome hémolytique et urémique

formes secondaires (grossesse, néoplasies, médicaments, après greffe cellules souches hématopoïétiques)

hémolyses infectieuses ou parasitaires

Clostridium perfringens ou autres germes, *Bartonella bacilliformis*, *Plasmodium falciparum*, *Babesia*, *Trypanosoma*

hémolyses liées à des troubles métaboliques

hypercuprémie, hypophosphatémie, hépatopathies (syndrome de Zieve, stomatocytose / acanthocytose acquises), insuffisance rénale chronique

hémolyses dues à des agents chimiques ou physiques

toxiques (plomb, cuivre, hydrogène arsénié, aluminium), médicaments, venins d'animaux, champignons

surcharge aqueuse intravasculaire

chocs thermiques

hypersplénisme

Tableau III : Signes diagnostiques des purpuras thrombotiques thrombopéniques / syndromes hémolytiques et urémiques (d'après [4])

Critères majeurs pour le diagnostic de PTT/SHU chez l'adulte

Anémie hémolytique périphérique non immunologique avec fragmentation

Hémoglobine \searrow Hématocrite \searrow

Schizocytes +

Réticulocytes \nearrow

LDH \nearrow

Test de Coombs érythrocytaire direct –

Thrombopénie

Autre cause "évidente" d'anémie et de thrombopénie écartée en particulier Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (TQ, TCA, Fibrinogène)

Critères accessoires

Asthénie marquée

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

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

Atteinte rénale (HTA, protéinurie, hématurie, oligurie...)

Signes digestifs (douleurs abdominales...)

Tableau IV : Association anémie avec schizocytes et thrombopénie, orientation selon la numération plaquettaire (seuil proposé $100 \times 10^9/L$) (d'après [21])

Thrombopénie absente ou modérée

anomalies valvulaires / aortiques, congénitales / acquises (et / ou leurs réparations)

prothèses vasculaires

hypertension maligne

course à pied prolongée

brûlures étendues

Thrombopénie franche

purpura thrombotique thrombopénique

syndrome hémolytique et urémique

PTT / SHU familial

syndrome de Kasabach-Merritt (hémangiomes multiples)

pré-éclampsie et éclampsie

cancers métastasés (notamment à la moelle osseuse)

vascularites, désordres immuns, greffes

Tableau V : Mode de présentation des purpuras thrombotiques thrombopéniques / syndromes hémolytiques et urémiques (d'après [4])

Formes idiopathiques (40%)

Formes secondaires

Grossesse et post-partum

Médicaments

Diarrhée infectieuse (*E. coli* 0157 : H7)

Greffe de moelle

Cancer métastaté

Maladies auto-immunes (Lupus Erythémateux Disséminé, Sclérodermie, Syndrome des Anti-PhosphoLipides)

Hypertension maligne, Pré-éclampsie, Eclampsie, HELLP syndrome

Infection par le virus HIV

Tableau VI : Médicaments responsables de micro-angiopathies thrombotiques (d'après [33] et compilation de la littérature)

thiénopyridines (ticlopidine, clopidogrel)

hypocholestérolémiants (statines : atorvastatine, simvastatine)

pénicilline, piperacilline, rifampicine

ibuprofène, pénicillamine

anticancéreux (mitomicyne C, cisplatine, bléomycine, gemcitabine)

déoxycorymycine

immunosuppresseurs (ciclosporine A, tacrolimus, OKT3)

interféron α et β

quinine

produits de contraste iodés

BIBLIOGRAPHIE

1. Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Schizocytes : quelle définition retenir et quelle méthodologie utiliser pour les identifier et les compter ? Résultats d'une enquête auprès de 24 biologistes. *Ann Biol Clin* 2001 ; 59 : 49-52.
2. Gordjani N, Hénon P, Rondeau E, Hermine O. Forum polémique : purpuras thrombotiques thrombocytopéniques, syndromes hémolytiques et urémiques, micro-angiopathies thrombotiques. *Hématologie* 1998 ; 4 : 75-87.
3. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 393-397.
4. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2000 ; 96 : 1223-9.
5. Rock GA. Management of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2000 ; 109 : 496-507.
6. Rock G, Porta C, Bobbio-Pallavicini E. Thrombotic thrombocytopenic purpura treatment in year 2000. *Haematologica* 2000 ; 85 : 410-9.
7. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 586-592.

8. Gordon LJ, Kwaan HC. Thrombotic microangiopathy manifesting as thrombotic thrombocytopenic purpura hemolytic uremic syndrome in the cancer patient. *Semin Thromb Hemost* 1999 ; 25 : 217-21.
9. Cohen JA, Brecher ME, Bandarenko N. Cellular source of serum lactate dehydrogenase elevation in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apheresis* 1998 ; 13 : 16-9.
10. Rock G, Kelton JG, Shumak KH, Buskard NA, Sutton DM, Benny WB. Laboratory abnormalities in thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Group. *Br J Haematol* 1998 ; 103 : 1031-6.
11. Komiyama Y, Teraoka A, Onishi K, Watanabe K, Takahashi H. Abnormal histograms of platelets and spuriously normalizing platelet counts by Sysmex cell counters in hemolytic uremic syndrome due to Escherichia coli O157:H7 infection. *Thromb Haemost* 1997 ; 77 : 1220-1.
12. Vinatier I, Flandrin G. Avantages et limites de l'hémogramme automatisé : une fiabilité accrue. *Rev Prat* 1993 ; 228 : 69-74.
13. Lau DH, Wun T. Early manifestation of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 1993 ; 95 : 544-5.
14. Scully RE, Mark EJ, McNeely WF, Ebeling SH, Ellender SM. Case records of the Massachusetts general hospital. Case 18-1999. *N Engl J Med* 1999 ; 340 : 1900-8.

15. Fava S, Galizia AC. Thrombotic thrombocytopenic purpura-like syndrome in the absence of schistocytes. *Br J Haematol* 1995 ; 89 : 643-4.

16. Akiyama H, Yoshinaga H, Endou M, Tanikawa S, Sakamaki H, Tanoue K, Onozawa Y. Microangiopathy without hemolysis in a patient following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997 ; 20 : 261-3.

17. Skoularigis J, Essop MR, Skudicky D, Middlemost SJ, Sareli P. Frequency and severity of intravascular hemolysis after left-sided cardiac valve replacement with Medtronic Hall and St. Jude Medical prostheses, and influence of prosthetic type, position, size and number. *Am J Cardiol* 1993 ; 71 : 587-91.

18. Ismeno G, Renzulli A, Carozza A, De Feo M, Iannuzzi M, Sante P, Cotrufo M. Intravascular hemolysis after mitral and aortic valve replacement with different types of mechanical prostheses. *Int J Cardiol* 1999 ; 69 :179-83.

19. Mansoor S, Roman A, Weinstein R. Intravascular stents do not cause microangiopathic hemolysis or thrombotic microangiopathy. *J Clin Apheresis* 1999 ; 14 : 130-4.

20. Sultan C, Gouault-Heilmann M, Imbert M. Aide-mémoire d'hématologie. Médecine-Sciences Flammarion, 1998.

21. Payne LG, Hayward CPM, Kelton JG. Destruction of red cells by the vasculature and reticuloendothelial system. In : Nathan and Oski's hematology of the infancy and childhood. Saunders 5th edition, p523-44.

22. Zeigler ZR, Shaddock RK, Nemunaitis J, Andrews DF, Rosenfeld CS. Bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy : a case series. *Bone Marrow Transplant* 1995 ; 15 : 247-53.
23. Zomas A, Saso R, Powles R, Mackay H, Singhal S, Treleaven J, Mehta J. Red cell fragmentation (schistocytosis) after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998 ; 22 : 777-80.
24. Iacopino P, Pucci G, Arcese W, Bosi A, Falda M, Locatelli F, Marengo P, Miniero R, Morabito F, Rossetti F, Sica S, Uderzo C, Bacigalupo A. Severe thrombotic microangiopathie: an infrequent complication of bone marrow transplantation. Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Bone Marrow Transplant* 1999 ; 24 : 47-51.
25. Salignac S, Campedel C, Bordigoni P, Lecompte T, Lesesve JF. Est-il possible de compter les schizocytes au moyen d'un logiciel d'analyse d'image ? *Ann Biol Clin* 2001 ; 59 : 165-8.
26. Kunicka JE, Fischer G, Murphy J, Zelmanovic D. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. *Am J Clin Pathol* 2000 ; 114 : 283-9.
27. Bessis M. Réinterprétation des frottis sanguins. Masson Springer, 1976.
28. Bennett CL, Davidson CJ, Raisch DW, Weinberg PD, Bennett RH, Feldman MD. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine in the setting of coronary artery stents and stroke prevention. *Arch Intern Med* 1999 ; 159 : 2524-8.

29. Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, McCarthy LJ, Sarode R, Hatfield AJ, Feldman MD, Davidson CJ, Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med* 2000 ; 342 : 1773-7.
30. Thompson CE, Damon LE, Ries CA, Linker CA. Thrombotic microangiopathies in the 1980s : clinical features, response to treatment, and the impact of the human immunodeficiency virus epidemic. *Blood* 1992 ; 80 : 1890-5.
31. Sutor GC, Schmidt RE, Albrecht H. Thrombotic microangiopathies and HIV infection: report of two typical cases, features of HUS and TTP, and review of the literature. *Infection* 1999 ; 27 : 12-5.
32. Bauduer F. Hémolyses extracorporelles non immunologiques. *Encycl Méd Chir* (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Hématologie, 13-006-D-18, 2000, 6p.
33. Rizvi MA, Kojouri K, George JN. Drug-induced thrombocytopenia: an updated systematic review. *Ann Intern Med* 2001 ; 134 : 346.

II - LES PROBLEMES POSES PAR LA NUMERATION DES SCHIZOCYTES

La présence de schizocytes dans le cadre d'une anémie hémolytique évoque une microangiopathie thrombotique ou une fragmentation mécanique et peut être le témoin d'une maladie grave devant être prise en charge rapidement. Leur mise en évidence et leur numération présentent donc un intérêt majeur. En effet, leur recherche peut contribuer de façon essentielle au diagnostic étiologique d'une anémie hémolytique, alors que leur numération est un élément important dans le suivi d'un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) ou d'un greffé médullaire. Néanmoins, il existe de réels problèmes concernant leur reconnaissance et la numération des schizocytes sur les frottis sanguins, ce qui est d'autant plus grave qu'il s'agit généralement d'un diagnostic d'urgence. C'est pourquoi nous avons voulu, dans cette deuxième partie, connaître l'avis d'autres biologistes sur la méthodologie à utiliser et leur définition à employer lors de la recherche de schizocytes. Une enquête a été effectuée auprès de biologistes travaillant en centre hospitalier concernant non seulement la définition et les formes comptées comme schizocytes, mais aussi la méthodologie utilisée et les modalités de la réponse transmise au clinicien.

II - 1 - Article original

"Schizocytes : quelle définition retenir et quelle méthodologie utiliser pour les identifier et les compter ? Résultats d'une enquête auprès de 24 biologistes."

Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. *Ann Biol Clin.* 2001 ; 59 : 49-52.

Schizocytes : quelle définition retenir, et quelle méthodologie utiliser pour identifier et la numérer ces cellules ? Résultats d'une enquête auprès de 24 biologistes.

Schistocytes : urgent need for guidelines to identify and enumerate them

Jean-François Lesesve, Sylvain Salignac, Thomas Lecompte

Service d'Hématologie Biologique, CHU de Nancy, 54 511 Vandoeuvre-lès-Nancy

Téléphone : 03 83 15 37 66, Télécopie : 03 83 15 37 89

E-mail : jf.lesesve@chu-nancy.fr

Mots clés :

Schizocytes

Ont participé à ce travail : I. Amouroux (Clamart), M. Bizet (Annecy), F. Blanc-Jouvan (Annecy), J. Buisine (Nancy), F. Braun (Thionville), MP Callat (Rouen), M. Capbern (Libourne), N. Chioukh (Belfort), J. Corberand (Toulouse), S. Daliphard (Reims), M. Duclos (Dieppe), P. Dussert (Belfort), S. Jacquat (Annecy), A. Lahary (Rouen), T. Lecompte (Nancy), JF Lesesve (Nancy), R. Garand (Nantes), J. Goasgen (Rennes), T. Grancher (Petit Quevilly), P. Mahassen (Luxembourg), M. Maynadié (Dijon), JM Merseille (Thionville), P. Moskovtchenko (Colmar), F. Reins (St-Dié), A. Scotton (Epinal), M. Thouvenin (Neufchateau), X. Troussard (Caen), I. Ziajka (Remiremont)

Résumé

Les schizocytes sont des hématies fragmentées dont la reconnaissance est importante pour l'orientation clinique des malades. Les résultats d'une enquête concernant l'identification des schizocytes sont analysés. Cette enquête a été réalisée auprès de 24 biologistes travaillant en centre hospitalier. Les critères de reconnaissance des schizocytes sont différents suivant les centres et la dispersion des numérations de schizocytes est importante. Dans une moindre mesure, les modalités de la réponse transmise au clinicien sont elles-mêmes variables. Cette enquête préliminaire pose la question d'un travail de plus grande ampleur pour aboutir à un consensus et l'établissement d'un référentiel.

Summary

Schistocytes result from red cell fragmentation. The identification of the schistocytes is critical for decisions on appropriate management of the patients. We report the results of an inquiry about determination methods of schistocytes of 24 well-trained biologists. The analysis of the obtained responses stress on the different approaches used to count these cells, and show an urgent need for guidelines to identify and enumerate them. A systematic approach to the counting method should be rewarded.

INTRODUCTION

Les schizocytes sont des fragments circulants d'hématies, débris de formes variées [1]. Leur surface sur le frottis est donc logiquement inférieure à celle d'une hématie [2]. La numération des schizocytes est difficile du fait : d'un manque de définition précise de ces cellules (absence de standardisation de l'identification, contrairement à d'autres cellules, comme les réticulocytes par exemple pour lesquels existent des recommandations publiées [3]) ; de l'absence de consensus concernant les méthodes de numération (absence de standardisation de la réponse fournie au clinicien) ; des problèmes d'échantillonnage sur un frottis sanguin (absence de standardisation de la zone de lecture). De plus, comme tout dénombrement de cellules présentes plutôt en faible nombre, il existe une variation statistique importante [4]. Or l'identification des schizocytes est importante, tant dans un but diagnostique - et souvent dans un contexte d'urgence - (anémies hémolytiques, microangiopathies thrombotiques [5]), que dans un but pronostique (suivi des greffés médullaires [6,7]).

Dans le but d'harmoniser la standardisation de la reconnaissance des schizocytes et la standardisation de l'échantillonnage, nous développons au laboratoire une application d'un logiciel d'analyse d'image. En ce qui concerne les problèmes de méthodologies et de définitions, nous avons procédé à une enquête préalable auprès de confrères biologistes dont le compte rendu est donné ci-dessous. Cette enquête montre que cet examen, *a priori* simple, manque en fait de reproductibilité.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons procédé à la fin de l'année 1999, à l'envoi d'une trentaine de questionnaires. Vingt-quatre réponses ont été obtenues. L'envoi a été effectué à des biologistes faisant partie d'un réseau de travail informel élargi à quelques laboratoires hospitaliers. Dix réponses provenaient de confrères travaillant en CHU, quatorze réponses de confrères travaillant en CH ou en laboratoire d'exercice libéral. Les premiers ont été qualifiés de "spécialistes", les seconds de "non spécialistes". Cette dénomination veut simplement mettre en exergue qu'il existe probablement plus de demandes de numération des schizocytes en milieu CHU que hors CHU, et que les praticiens exerçant en CHU ont, de manière attendue, plus "d'expérience" que leurs confrères.

Les questionnaires étaient composés de la manière suivante : il était demandé les méthodes du laboratoire (nombre de schizocytes comptés, critères de jugement, formulation de la réponse...) ; une deuxième page mentionnait des termes pouvant définir les schizocytes, et il était demandé de répondre si cette définition paraissait appropriée (tableau I). Les biologistes n'étaient en revanche pas avertis, intentionnellement, que ces termes étaient extraits d'ouvrages de référence en français [2, 8, 9] ou en anglais [10-13] ; enfin quatorze images de frottis sanguins de patients hospitalisés au CHU de Nancy étaient proposées et il était demandé de reconnaître et de numérer - même si cela n'était pas le mode habituel de résultat - le nombre de schizocytes (frottis coloré au May-Grünwald Giemsa, x400 immersion, nombre variable de schizocytes compris entre 0 et 15% environ) (figures 1-4).

RESULTATS ET COMMENTAIRES

Comme déjà mentionné, les réponses ont été séparées en deux catégories : dix réponses "spécialistes" et quatorze réponses "non spécialistes". Deux laboratoires ont fait participer l'ensemble des techniciens (seule la synthèse du biologiste responsable a été comptabilisée). Trois biologistes ont fourni une fiche GBEA spécifique.

Parmi les commentaires recueillis, plusieurs font apparaître que les biologistes insistent sur la nécessité d'avoir connaissance du dossier du malade pour répondre à cette demande (clinique, paramètres biologiques hémato (hémogramme, alarmes, réticulocytes) et biochimiques (LDH, bilirubine...). Certains ont souligné l'importance du suivi des examens répétés par un même cytologiste, indiquant implicitement la variabilité des résultats inter-observateur (et donc parfois intra-laboratoire !).

Concernant la définition des schizocytes, il n'existe pas d'unanimité. Les chiffres (tableau I) correspondent à des pourcentages de réponses positives. Pour les "spécialistes", seules les hématies en casque sont unanimement comptées comme schizocytes, et les hématies crénelées sont unanimement rejetées. Neuf "spécialistes" sur dix pensent que la cellule en triangle répond à la définition. Ces deux définitions (casque, triangle) ont donc un accord fort ; toutes les autres sont discutées. Pour les "non spécialistes", les chiffres sont encore moins tranchés. Certains considèrent les hématies crénelées comme des schizocytes. La réponse ayant l'accord le plus fort est la présence d'hématies mordues. L'interprétation des fragments d'hématies roulés, présents en bout de frottis ("micro-schizocytes", "sphéro-schizocytes" de M. Bessis [2]) semble mal connue à la fois des spécialistes et des non spécialistes. Ils ne doivent probablement être comptés que s'il existe d'authentiques schizocytes dans une autre zone du frottis (diagnostic différentiel avec des microsphérocytes).

Le terme français "d'hématie mordue" est parfois non connu. Il est effectivement peu utilisé. Il correspond à la traduction de "*bite cell*".

L'analyse attentive des cellules sélectionnées (sur les images) et des définitions retenues (tableau I) pour un même participant montre parfois une divergence entre la théorie... et la pratique. Ceci indique bien la difficulté de retenir une définition précise exclusive et les problèmes posés par l'identification des schizocytes.

Au total, les réponses ayant obtenu un accord de plus d'environ $\frac{3}{4}$ des participants sont "casque", "triangle", hématie "mordue" (schizocytes) et hématie "crénelée", "spiculée" (non schizocytes).

En ce qui concerne les méthodes de comptage et de compte rendu des résultats, des biologistes interrogés échantillonnent pour la plupart les cellules au niveau de la zone de lecture de la formule sanguine (zone d'étalement correct des hématies). En revanche, l'expression des résultats varie : certains rendent en pourcentage, sur un nombre variable d'hématies (entre 10 et 25 champs ou entre 1000 et 5000 hématies), et avec des seuils de positivité différents (0, 1, 5%) ; d'autres mentionnent seulement la présence (positive ou négative) ; d'autres enfin évaluent une estimation semi quantitative (0, +, ++, ou 0, +, ++, +++ ou quelques, rares, nombreux). Il existe donc une grande hétérogénéité.

De l'analyse des quatorze images, on peut tirer plusieurs remarques : en dehors de l'image où il n'existe pas de schizocytes, il existe une grande dispersion des résultats rendus. Dès qu'il existe des schizocytes, les écarts-types centrés sur la moyenne (coefficients de variation en pourcentages) sont importants (figure 5). Les "spécialistes" comptent toujours plus de schizocytes que les "non spécialistes". Si la dispersion des résultats est importante, la dispersion entre les résultats des différents cytologistes reste globalement constante (un

cytologiste comptant beaucoup de schizocytes en comptera beaucoup sur toutes les lames et inversement). Ce résultat est encourageant car il permet de supposer qu'une standardisation de la définition des schizocytes et quelques exercices inter-laboratoires permettrait d'harmoniser les résultats [14, 15].

CONCLUSION

Ce travail souligne l'intérêt d'harmoniser la définition "du" schizocyte. Une étude de plus grande ampleur, avec un protocole plus structuré (méthode Delphi par exemple) pourrait être proposée par l'intermédiaire d'un groupe d'expertise professionnelle telle que le Groupe Français d'Hématologie Cellulaire de la Société Française d'Hématologie. Par ailleurs, un programme d'analyse d'image permettant de réduire la subjectivité de l'identification des schizocytes est en cours d'élaboration dans notre laboratoire. Mais, *in fine*, seul un protocole clinique permettra de montrer l'intérêt réel d'une telle démarche.

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : Définition du schizocyte : propositions de termes et pourcentage de réponses positives

Figure 1 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 1 (MGG, x400)

Figure 2 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 5 (MGG, x400)

Figure 3 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 6 (MGG, x400)

Figure 4 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 10 (MGG, x400)

Figure 5 : Réponses des participants (nombre de schizocytes comptés) : résultats individuels, moyenne générale et écart-type. Moyenne des spécialistes et des non spécialistes

Tableau I : Définition du schizocyte : propositions de termes et pourcentage de réponses positives.

Qu'est-ce qu'un schizocyte ?	Réponses des "spécialistes"	Réponses des "non-spécialistes"
Un triangle	90 %	77 %
Une hématie en casque	100 %	77 %
Une hématie crénelée	0 %	31 %
Une hématie spiculée	20 %	38 %
Une hématie "mordue"	70 %	92 %
Une forme en virgule ou en bâtonnet	60 %	8 %
Un microsphérocyte	40 %	8 %
Une hématie de taille diminuée, déformée de manière importante	60 %	62 %



Figure 1 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 1 (MGG, x400).

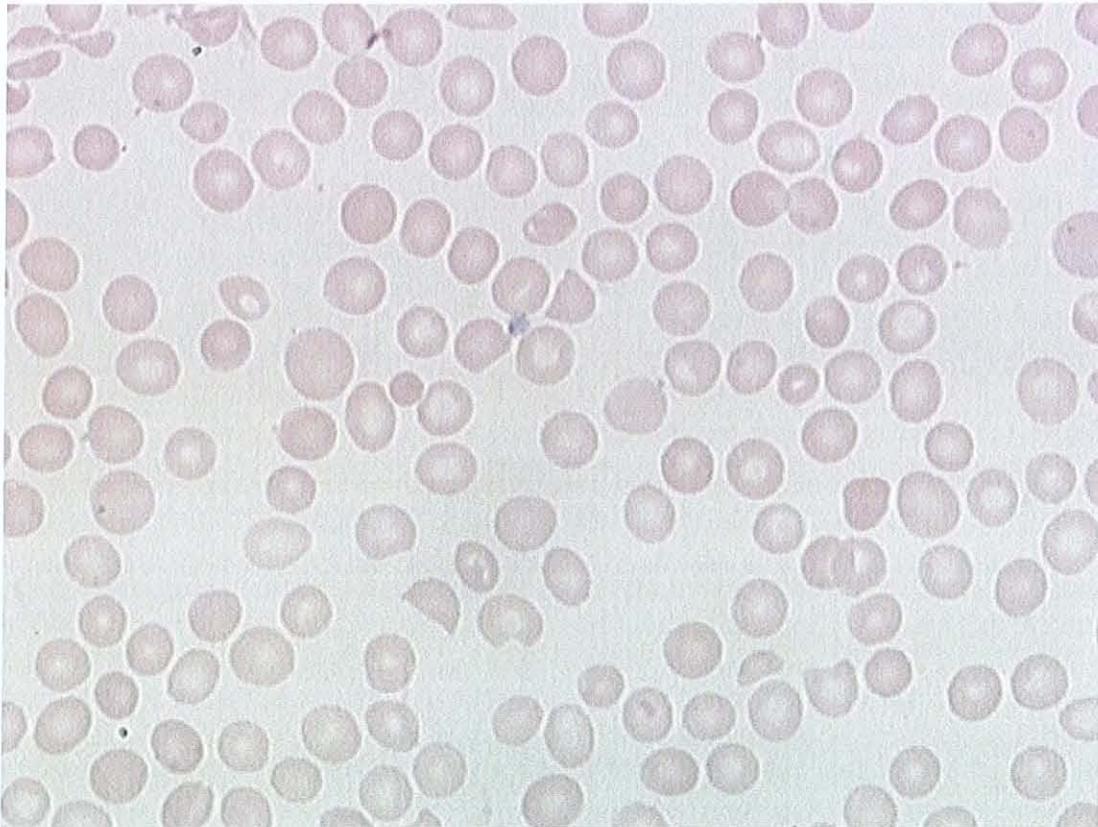


Figure 2 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 5 (MGG, x400).

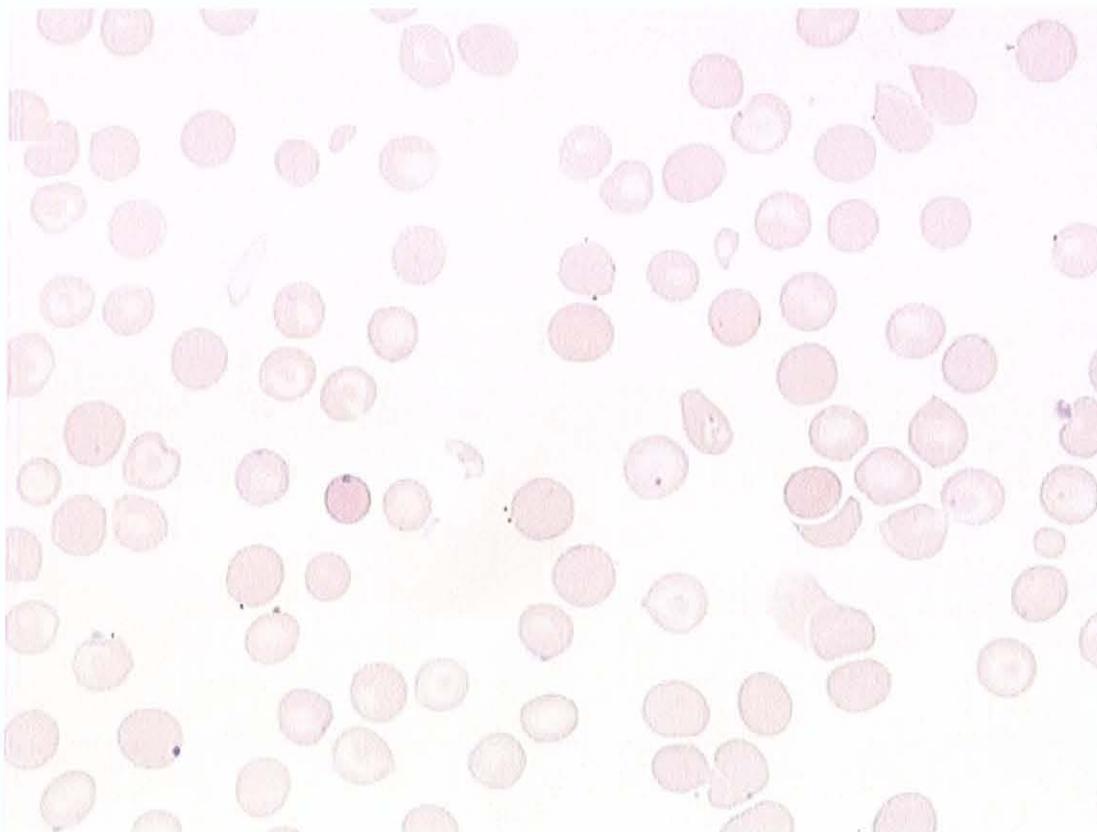


Figure 3 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 6 (MGG, x400).

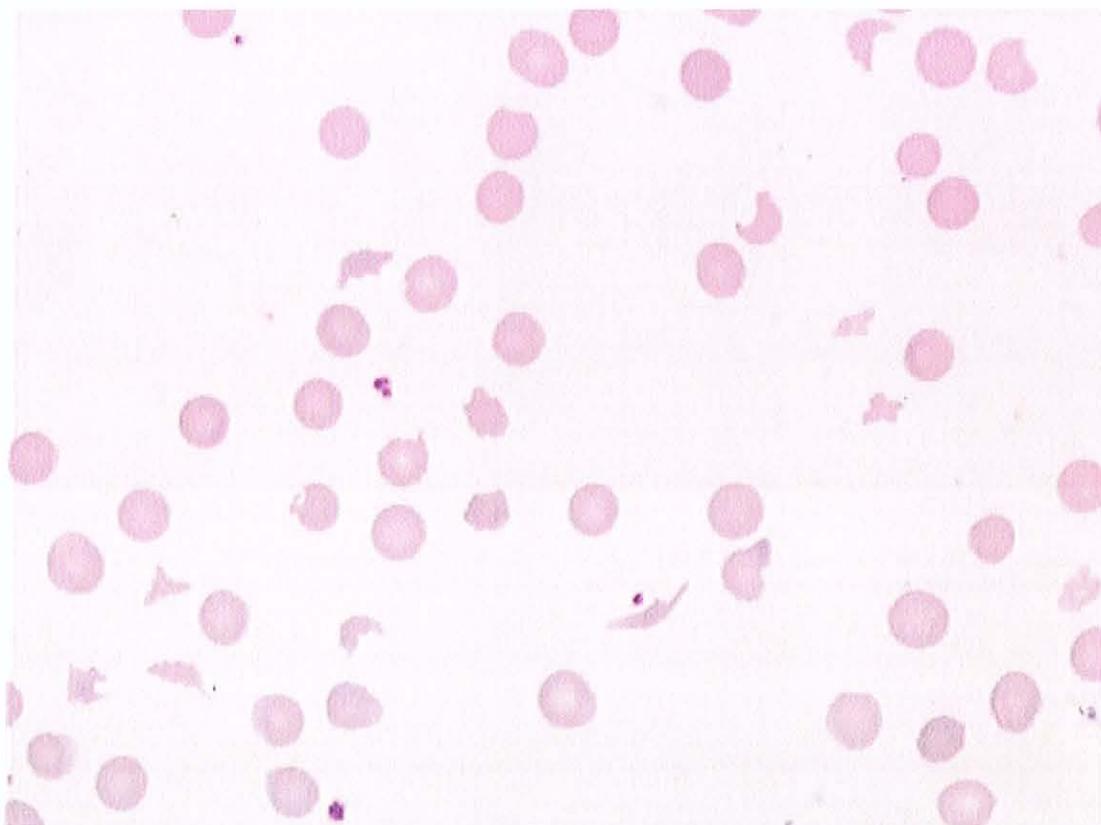


Figure 4 : Champ microscopique digitalisé soumis aux participants : image 10 (MGG, x400).

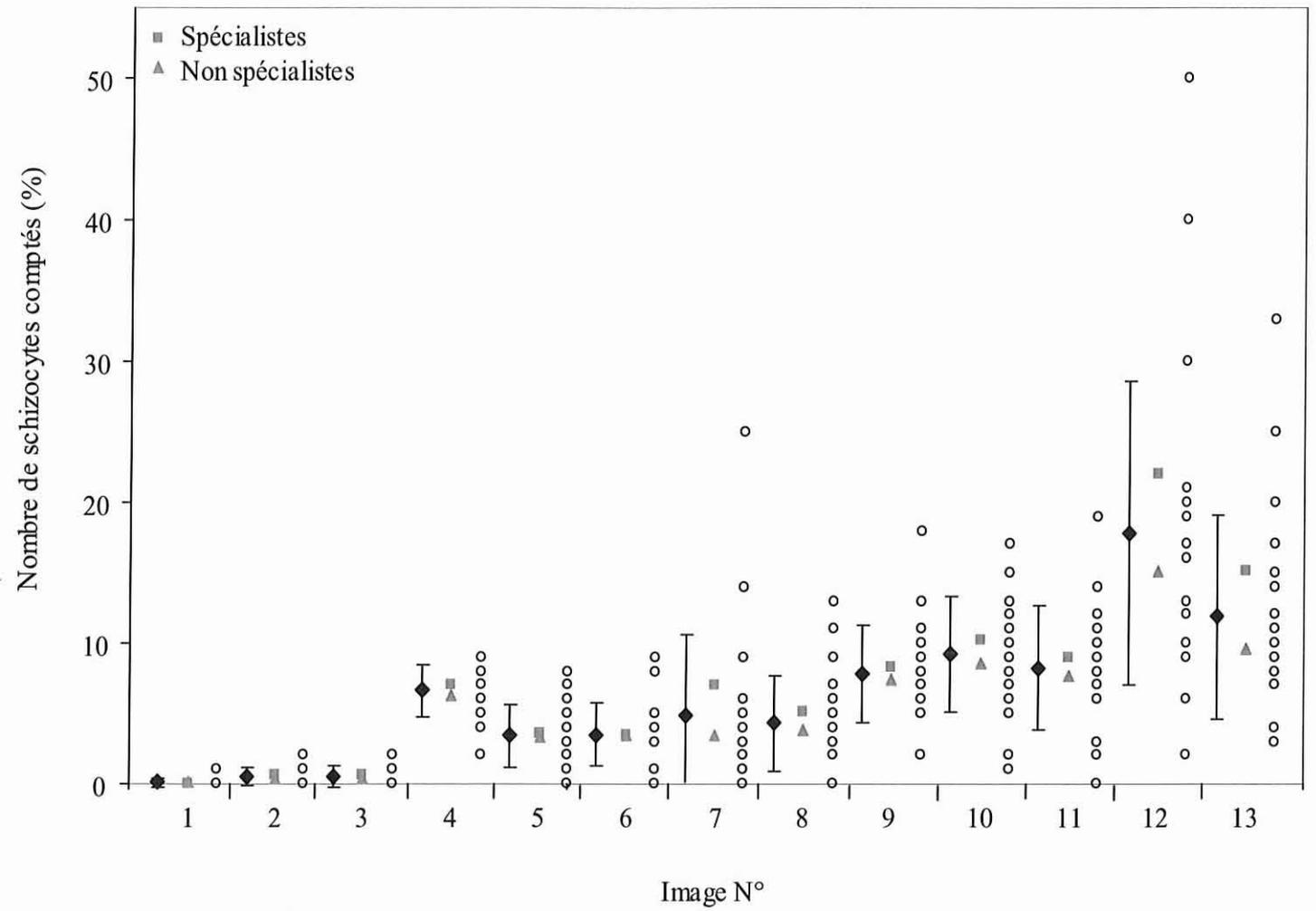


Figure 5 : Réponses des participants (nombre de schizocytes comptés) : résultats individuels, moyenne générale et écart-type. Moyenne des spécialistes et des non spécialistes

BIBLIOGRAPHIE

1. Sultan C, Gouault-Heilmann M, Imbert M. *Aide-mémoire d'hématologie*. Médecine-Sciences Flammarion, 1998.
2. Bessis M. *Réinterprétation des frottis sanguins*. Masson Springer, 1976.
3. The Expert Panel on Cytometry of the International Council for Standardization in Haematology. ICSH Guidelines for Reticulocytes Counting by Microscopy of Supravivally Stained Preparations. Geneva : World Health Organization, 1992.
4. Rümcke CL. Variability of results in differential cell counts on blood smears. *Triangle* 1960 ; 4 : 154-7.
5. Bull BS, Rudenberg ML, Dacie AV, Brain MC. Red blood cell fragmentation in microangiopathic haemolytic anaemia : in vitro studies. *Lancet* 1967 ; 2 : 1123.
6. Pettitt AR, Clark RE. Thrombotic microangiopathy following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1994 ; 14 : 495-504.
7. Zeigler ZR, Shaddock RK, Nemunaitis J, Andrews DF, Rosenfeld CS. Bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy : a case series. *Bone Marrow Transplant*. 1995 ; 15 : 247-53.

8. Wajcman H, Lantz B, Girot R. *Les maladies du globule rouge*. Médecine-Sciences, 1992, Flammarion, page 90.
9. Sultan C, et al. *Techniques en hématologie*, Médecine-Sciences Flammarion, 1978.
10. Bain BJ. *Blood Cells. A practical Guide*, Blackwell Science Ltd, Oxford, 1995.
11. Dacie JV, Lewis SM. *Practical haematology*. Churchill Livingstone, 1995.
12. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, et al. Morphology of the erythron, in *Hematology*, International Edition, 1986.
13. Wintrobe MM, et al. The red cell fragmentation syndrome, in *Clinical Hematology*, Lea & Febiger, 1974.
14. Young TW, Keeney GL, Bull BS. Red cell fragmentation in human disease (a light and scanning electron microscope study). *Blood Cells* 1984 ; 10 : 493-501.
15. Dacie JV. Red cell fragmentation in human disease (a light and scanning electron microscope study). *Blood Cells* 1984 ;10 : 503-4.

A la suite de ce travail initial, les résultats ont été présentés au congrès de la Société Française d'Hématologie (4 Mars 2001) sous forme d'un poster et d'une communication orale. Il a alors été décidé de poursuivre cette enquête par l'envoi d'un questionnaire reprenant les définitions proposées initialement et des questions relatives à la réalisation de l'analyse dans les différents laboratoires interrogés.

II - 2 - Enquête "schizocytes" sous l'égide du Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (coordonnée par J.F. Lesesve et T. Lecompte), résultats provisoires de la phase 1

Ont participé à ce travail (47 biologistes) :

I. Amouroux (CHU, Clamart), M. Bizet (CH, Annecy), F. Blanc-Jouvan (CH, Annecy), F. Braun (CH, Thionville), C. Brouzes (CAC, Villejuif), J. Buisine (CHU, Nancy), M.P. Callat (CHU, Rouen), M. Capbern (CH, Libourne), B. Chatelain (UCL, Yvoir), N. Chioukh (CH, Belfort), J. Corberand (CHU, Toulouse), Y. Cornet (UCL, Yvoir), S. Daliphard (CHU, Reims), M. Dautel (CH, Cholet), M. Duclos (CH, Dieppe), P. Dussert (CH, Belfort), A. Falkenrodt (CHU, Strasbourg), C. Fourcade (CH, Argenteuil), R. Garand (CHU, Nantes), F. Garnache (EFS, Besancon), J. Goasguen (CHU, Rennes), T. Grancher (CH, Petit Quevilly), M.J. Grange (CHU, Paris Bichat), S. Jacquat (CH, Annecy), M. Lagrange (CHU, Paris Saint Antoine), A. Lahary (CHU, Rouen), T. Lecompte (CHU, Nancy), P. Lepelley (CHU, Lille), J.F. Lesesve (CHU, Nancy), B. Leloup-Poilant (CH, St Briec), D. Lusina (CH, Aulnay sous Bois), P. Mahassen (CH, Luxembourg), M. Mallet (CHU, Caen), M. Maynadié (CHU, Dijon), J.M. Merseille (CH, Thionville), D. Morel (CHU, Lyon Sud), P. Moskovtchenko (CH, Colmar), Y. Plumelle (?), G. Portefaix (CAC, Clermont-Ferrand), F. Reins (CH, St-Dié), A.

Scotton (CH, Epinal), G. Sebahoun (CHU, Marseille Nord), F. Subiger (CH, Chaumont), M. Thouvenin (CH, Neufchateau), X. Troussard (CHU, Caen), M. Zandecki (CHU, Angers), I. Ziajka (CH, Remiremont).

II - 2 - 1 - DEFINITION DES TERMES

II - 2 - 1 - 1 Résultats

Les réponses sont groupées dans le tableau I (pourcentages de réponses positives). Les biologistes ont été séparés en deux groupes, "spécialisés" (praticiens amenés à pratiquer régulièrement cette recherche du fait du recrutement de l'établissement, le plus souvent, CHU ou laboratoire spécialisé, n = 23), et "non spécialisés" (n = 24).

Pour les "spécialisés", seules les hématies en casque et en triangle ont un accord fort (90% et 85% respectivement), les hématies crénelées et les hématies spiculées sont presque unanimement écartées (10%), les autres définitions (hématie "mordue", forme en virgule ou en bâtonnet, microsphérocyte, hématie de taille diminuée et déformée de manière importante) sont toutes discutées (entre 38% et 55% d'accord).

Pour les "non spécialisés", les réponses sont encore moins nettes. Les hématies en casque et en triangle ont un accord plus faible (75% et 70% respectivement), les hématies crénelées et les hématies spiculées sont plus souvent considérées comme des schizocytes (20% et 25% respectivement). Les hématies mordues présentent un accord plus fort que chez les "spécialistes" (75%).

Au total, les réponses ayant obtenu un accord de plus d'environ $\frac{3}{4}$ des participants sont : pour les schizocytes "casque", "triangle" ; contre les schizocytes hématie "crénelée", "spiculée". Les propositions hématie "mordue", hématie de taille diminuée et déformée de

manière importante, et forme en virgule ou en bâtonnet restent discutées. Nous rappelons que tous les termes proposés étaient extraits d'ouvrages publiés (par définition !).

II - 2 - 1 - 2 - Discussion

L'absence de définition stricte et consensuelle est ressentie : la définition des schizocytes est très large (Lahary), trop vaste (Capbern) ; elle est non codifiée (Maynadié, Thouvenin). Leur identification et leur dénombrement posent problème (Lagrange, Maynadié); ces deux critères sont très observateur-dépendant, ils manquent de rigueur (Lagrange). L'absence de différence nette entre les réponses des "spécialisés" et des "non spécialisés" renforce ce point de vue.

Certaines dénominations sont inconnues ou mal comprises, en particulier "hématie mordue", traduction de l'anglais "bite cell" (Bizet, Daliphard).

Deux critères importants d'identification apparaissent :

1. la notion d'angles quelle que soit la forme (Amouroux, Lagrange, Plumelle), voire d'au moins deux angles (Garnache) ;
2. la notion de fragment (Leloup-Poilant, Moskovtchenko), avec perte de taille (Corberand). En accord, suivent une série de termes imagés : hématie à bords acérés (Garnache), en croissant de lune (Brouzes), en tête de chat (Daliphard), en chapeau de gendarme (Amouroux, Bizet), hématie cornue (Amouroux), hématie amputée (Braun), irrégulièrement encochée (Capbern).

Ces dénominations imagées montrent la difficulté à trouver des termes opérationnels de définition à la fois précis et adéquats. Pour l'identification des schizocytes, il y a obligation de voir des cellules en casque, et alors on compte tout ce qui peut correspondre aux schizocytes selon les diverses morphologies évoquées (Zandecki).

Les hématies déformées, spiculées, les microsphérocytes sont souvent associés à la présence de schizocytes mais non considérés comme tels (Sébahoun). Elles ne sont pas prises en compte si isolées (Mallet). Elles ne sont pas signalées dans le contexte d'une grande aniso-poïkilocytose, et il faut mettre à part les anomalies d'une carence martiale par exemple (Lusina), d'une grande hypochromie (Bizet). L'interprétation est très différente entre des anomalies morphologiques importantes rattachées à une micro-angiopathie ou à une hémopathie maligne (ex : myélofibrose) ou bénigne (ex : Biermer) (Lesesve). L'interprétation des fragments d'hématies roulées, surtout présents vers la zone pré-terminale du frottis ("micro-schizocytes", "sphéro-schizocytes" de M. Bessis) semble mal connue à la fois des spécialistes et des non spécialistes (Corberand, Lesesve). Ils ne doivent probablement être comptés que s'il existe d'authentiques schizocytes dans une autre zone du frottis (diagnostic différentiel avec des microsphérocytes), que si et seulement s'il existe des schizocytes incontestables (Bizet). Les microsphérocytes sont comptés que s'il existe des schizocytes associés ; dans les jours suivants un SHU surtout chez l'enfant, des micromicrosphérocytes par "sphérocytation" des schizocytes dans la circulation ou dans le tube apparaissent (Zandecki). Par contre, les fragments de forme bizarre doivent être comptés même s'ils ne sont pas morphologiquement exactement conformes à la définition donnée (Daliphard).

On peut donc aborder les difficultés de deux manières :

1. Proposer un commentaire général, débris d'hématies de formes variées (Bizet), fragment d'hématies de différentes tailles (Dussert), avec perte de substance (Corberand). Certains souhaitent un terme plus précis : casque semble faire l'unanimité (tableau I) et est en adéquation avec l'origine grecque du terme casque (Goasguen).
2. A l'opposé, vu les difficultés à définir le schizocyte, aborder la question en affirmant ce qu'il n'est pas (dacryocyte, drépanocyte, sphérocyte) (Corberand). Cette distinction pose elle aussi des problèmes, en particulier de traduction anglo-saxonne : distinguer

schizocytes des cellules "contractées et irrégulières" en fait aussi trouvées dans des hémolyses et des fragmentations mécaniques (Lahary).

II - 2 - 1 - 3 - Synthèse

L'enquête concernant la définition des schizocytes indique qu'il n'existe pas d'unanimité. Nous proposons :

- ✓ **d'abandonner les critères de choix de forme trop précis, trop personnels,**
- ✓ **de définir un terme clairement relié à la pathogenèse (fragmentation des hématies sur des filaments de fibrine). Propositions Bizet, Dussert, Corberand à valider,**
- ✓ **de mentionner systématiquement si les schizocytes sont une anomalie isolée ou faisant partie d'anomalies complexes dans le cadre d'une aniso-poïkilocytose.**

II - 2 - 2 - TECHNIQUE

II - 2 - 2 - 1 - Résultats

Une fiche "GBEA" n'est mentionnée que dans trois cas (Callat, Corberand, Lesesve).

Comme attendu, le prélèvement ne pose pas de problèmes particuliers : sang veineux prélevé sur EDTA (tube utilisé pour la numération) et coloré suivant la technique de May-Grünwald Giemsa, dans les délais habituels de réalisation de l'hémogramme.

Par contre, les nouvelles possibilités technologiques d'étalement font que les frottis sont étalés de façon manuelle traditionnelle ou automatique (Falkenrodt, Lagrange, Leloup-Poilant), la plupart des biologistes dans ce cas utilisant du matériel Sysmex-Roche (Garnache, Grange, Lepelley, Mallet, Morel, Plumelle), parfois Beckman-Coulter (Chatelain, Cornet).

Sans surprise, les biologistes échantillonnent les cellules au niveau de la zone de lecture de la formule sanguine (zone d'étalement correct des hématies), en évitant les bords extrêmes et les franges (Brouzes, Mallet).

En revanche, l'expression des résultats varie suivant les centres.

- Certains rendent en pourcentage (Bizet, Brouzes, Fourcade, Grange, Lagrange, Leloup-Poilant, Mallet, Maynadié, Subiger, Zandecki), mais sur un nombre variable d'hématies (entre 300 (Subiger), 1000 (Brouzes, Capbern, Chatelain, Cornet, Dautel, Falkenrodt, Garand, Sébahoun), 2000 (Corberand, Maynadié, Plumelle), 3000 (Garnache) et 5000 (Braun, Merseille)), elles mêmes comptabilisées sur un nombre de champs différent (entre 10 (Bizet, Corberand, Fourcade, Plumelle, Portefaix, Zandecki) et 25 champs (Braun, Merseille)) du fait de l'utilisation d'objectifs aux grossissements différents (moyen ou fort). Certains vérifient les résultats avec comptage sur deux fois 500 hématies par deux personnes différentes (Amouroux), voire par trois personnes (Corberand). Certains rendent le résultat en "nombre absolu" (Malet), font des classes de résultats : négatif ou recherche positive = présence de schizocytes : 1-2%, 2-3%, 3-5%, 6-10%, 11-20%, plus de 20% des hématies (Zandecki). A cette notion de résultat quantitatif est souvent attachée la notion de seuil de positivité. Ils sont hétérogènes : ~0% (Lesesve), 1% (Amouroux, Corberand), 2% (Maynadié), 5% (Garand)) ; voire variables selon les pathologies : 1 à 2% habituellement, mais 3% si contexte de SHU/PTT et 1% si greffe ou traitement par ciclosporine (Lepelley).
- D'autres mentionnent seulement la présence (positive ou négative).
- D'autres évaluent une estimation semi quantitative : 0, +, ++, +++ ; quelques, rares, nombreux (Daliphard, Grancher, Ziajka). Une proposition d'échelle de correspondance est parfois mentionnée mais, là encore, différente suivant les centres : rare = <1/champ

objectif x50, quelques : 1-5/champ, nombreux >5 (Morel) ; très rares = <1/champ objectif x50, quelques = 1-2, nombreux = 3-10, très nombreux = >10) (Callat).

- D'autres enfin, les plus nombreux, font les deux types de réponse, qualitatives ou quantitatives (Amouroux, Buisine, Falkenrodt, Garnache, Grange, Lesesve, Morel, Portefaix, Sébahoun). La réponse est qualitative si les schizocytes sont rares, quantitative si présents (Lusina).

II - 2 - 2 - 2 - Discussion

Prélèvement et colorations soulèvent peu de commentaires. Pas de prélèvement sur cathéter (Malet). MGG non obligatoire (Lagrange). Bonne fixation au méthanol nécessaire (Zandecki) pour éviter les anomalies artéfactuelles des hématies.

Les méthodes d'étalement automatisé, amenées à se développer, posent la question de leur évaluation (Mallet, Plumelle). Il serait instructif d'avoir le point de vue des utilisateurs de l'étaleur SP100 Sysmex-Roche puisqu'ils sont nombreux.

La suspicion de la présence de schizocytes, devant conduire à leur recherche sur frottis, est indiquée par l'analyse de la courbe de répartition en volume des hématies sur l'automate (Corberand, Lusina). Des anomalies de l'IDR sont suggestives (Goasguen).

Le problème primordial - en cas de quantification - du comptage par champs aux nombres d'hématies supposés homogènes est posé. Le nombre imprécis et variable d'hématies majore les erreurs de pourcentage (Moskovtchenko, Plumelle). Le dénombrement d'évènements rares oblige à connaître l'intervalle de confiance du résultat annoncé (Braun, Lesesve, Marseille). L'intervalle de confiance d'un chiffre de 1% est 0-3 si 500 hématies sont comptées, 0-2 si 1000 hématies sont comptées, 0,4-1,6 si 5000 hématies sont comptées, 0,8-1,2 si 10000 hématies sont comptées.

Enfin, la notion de seuil reste à définir (Moskovtchenko). Normalement, il n'y a pas de schizocyte "vrai" dans le sang, et les artéfacts dus au prélèvement et à l'étalement sont rares (<0,5%) si la phase pré-analytique est correcte (Lesesve).

II - 2 - 2 - 3 - Synthèse

En ce qui concerne les méthodes de comptage et de compte rendu des résultats, les réponses sont très hétérogènes. Nous proposons :

- ✓ **prélèvement de sang veineux (EDTA) analysé avec l'hémogramme (chiffres, graphes),**
- ✓ **frottis coloré au MGG,**
- ✓ **lecture à l'objectif moyen ou fort, mais dans la zone de lecture de la différentielle leucocytaire, et sur un nombre de champs permettant la visualisation de 5000 hématies,**
- ✓ **les modalités de réponses, quantitative ou qualitative, sont laissées à l'appréciation du biologiste mais si une réponse qualitative est choisie, les modalités doivent être définies et standardisée (0/+/>++ ou absence/rares/nombreux) et reposer sur une semi-quantification définie (propositions Callat, Morel),**
- ✓ **de définir un seuil de positivité (valeur de référence et seuil décisionnel).**

II - 2 - 3 - ECHANGES AVEC LE CLINICIEN

II - 2 - 3 - 1 - Résultats

Certains centres n'ont pas la possibilité d'un dialogue véritable avec les cliniciens (Lepelley, Portefaix). Cette situation est rare.

Les communications sont fréquentes :

- Appel d'emblée si absence de renseignements cliniques (Dautel). L'appel serait souhaitable dès réception de la demande (Portefaix).
- Appel pour orientation et comptage ensuite si nécessaire (car délicat et consommateur de temps) (Corberand).
- Appel si recherche positive (Lagrange), pour information sur le contexte dès constatation de la présence (Brouzes, Sébahoun), ou si chiffre >1% et non connu (Leloup-Poilant, Lesesve, Mallet).
- Appel avec conseils sur la démarche étiologique (Chatelain, Cornet, Dautel, Grange, Plumelle, Sébahoun). Sensibilisation du clinicien à l'importance du diagnostic de SHU/PTT (Lahary, Lesesve, Subiger).
- Appel en fonction du service demandeur (hématologie) (Chatelain, Cornet).

Dans la mesure où le biologiste est souvent considéré comme un "prestataire de service", les prescriptions se faisant plus par excès, et les formes "découvertes" au labo étant exceptionnelles, le dialogue est de fait modeste (Zandeki).

Dans certains cas, la réponse est orientée en fonction du contexte clinique ou du service demandeur (cardiologie, service de greffe...). Il existe donc une grande hétérogénéité dans la formulation de la réponse rendue au clinicien.

La nécessité du suivi du malade est indiquée (Mallet), soit fonction du service prescripteur (réanimation, Plumelle), soit du patient (importance du suivi par un même cytologiste pour un SHU/PTT, Daliphard, Lesesve).

La réponse est quantitative si les schizocytes représentent l'anomalie nettement dominante des hématies et seulement qualitative s'ils s'inscrivent dans une aniso-poikilocytose globale (Buisine, Goasguen, Plumelle), s'il s'agit d'une microangiopathie ou du service de

cardiologie (Brouzes), dans un contexte de greffe (Chatelain, Cornet). Les seuils de positivité varient suivant le contexte (Grange, Lepelley).

Dans le contexte des greffes, l'estimation pose toujours problème (Portefaix) car les cliniciens y attachent un intérêt pour le pronostic d'une GVH. Il faut opposer les cas de l'enfant avec beaucoup de schizocytes en général (SHU, 5-20%) et de l'adulte, des greffés avec souvent peu de schizocytes (1- 3%) (Zandecki).

Il faut toujours éliminer une CIVD (Chatelain, Cornet). L'interprétation est différente avec les bébés, en particulier les prématurés en néonatalogie (Amouroux).

Un nombre faible de schizocytes (< 1-2%) chez l'enfant n'est pas retenu si une anisopoïkilocytose franche existe par ailleurs (VGM bas), sans contexte d'anémie hémolytique associée.

Chez le nouveau né, l'interprétation d'un petit nombre de schizocytes (inférieur à 1-2%) est difficile (Zandecki).

Les investigations complémentaires varient beaucoup. Parmi les propositions :

- plaquettes
- réticulocytes
- bilan de coagulation à la recherche d'une CIVD (Garnache, Lagrange)
- bilan d'hémolyse (haptoglobine, bilirubine libre et conjuguée, LDH) ; test de Coombs (Fourcade, Garnache, Lagrange, Lesesve, Morel, Sébahoun, Subiger)
- biochimie (foie, rein, créatinine et clairance)
- ferritine, fer
- anticorps anti-leucocytaires et anti-plaquettaires
- ektacytométrie (pour éliminer une pyro-poïkilocytose chez nouveau né, Lusina)

Seul un biologiste insiste sur la notion d'urgence : à faire en garde (Lusina).

II - 2 - 3 - 2 - Synthèse

Chaque centre a ses habitudes. Nous proposons :

si le résultat est positif, surtout si le malade n'est pas connu, une communication téléphonique au moment du rendu (appel systématique illusoire, plusieurs appels chronophages) avec demande de renseignements cliniques et sensibilisation du clinicien à la gravité potentielle d'un diagnostic de micro-angiopathie devant bénéficier d'une prise en charge thérapeutique adaptée. Les autres conseils (étiologies, bilan biologique) sont laissés à l'initiative du biologiste.

Nous souhaitons savoir l'intérêt à conseiller une biopsie (rien, gencives) en cas de suspicion de MAT.

II - 2 - 4 - POURSUITE DU TRAVAIL

Ces premiers résultats seront envoyés au bureau du GFHC pour information et avis fin Août). Une réponse commentée du bureau sera souhaitée.

L'envoi d'images digitalisées est prévu en Septembre - avec ce compte rendu - pour que les participants de ce 1^{er} tour identifient sur images les éléments qu'ils estiment être des schizocytes.

Ce 2^{ème} tour de résultats sera exploité pour définir les formes consensuelles (indiquées par les participants). Elles seront interprétées également par rapport à leur réponse du 1^{er} tour.

A partir de l'ensemble des résultats et des remarques du bureau du GFHC, un texte de consensus - si cela est possible - sera proposé à l'approbation du bureau du GFHC. Le but

ultime serait la rédaction d'un "guideline", avec publication dans une revue française ("Hématologie" ?) et proposition à une revue anglo-saxonne.

Tableau I : Définition du schizocyte : propositions de termes et pourcentage de réponses positives.

	Spécialistes	Non Spécialistes	Spécialistes + Non Spécialistes
Un triangle	85	70	78
Une hématie en casque	90	75	83
Une hématie crénelée	10	20	15
Une hématie spiculée	10	25	18
Une hématie "mordue"	55	75	65
Une forme en virgule ou en bâtonnet	45	10	28
Un microsphérocyte	33	15	24
Une hématie de taille diminuée, déformée de manière importante	38	55	46

III - DENOMBREMENT DES SCHIZOCYTES ASSISTE PAR ORDINATEUR

L'enquête présentée dans l'article précédent, réalisée, tout d'abord sur 24 biologistes puis étendue par la suite à 47, met en évidence une grande variabilité, tant sur la méthodologie à utiliser que sur les formes comptées comme schizocytes. Cette variabilité inter-individuelle souligne le besoin d'harmonisation non seulement pour assurer des résultats reproductibles au sein d'un même laboratoire et pour permettre ainsi le suivi des malades, mais aussi pour pouvoir comparer des résultats issus de laboratoires différents. C'est pourquoi nous avons voulu développer une application sur un logiciel d'analyse d'images dans le but de sélectionner les schizocytes sur certains critères objectifs et reproductibles. L'objectif final est d'améliorer la précision et l'exactitude de l'analyse, et donc l'utilisation clinique du résultat.

III - 1 - Article original

"Est-il possible de compter les schizocytes au moyen d'un logiciel d'analyse d'image ?"

Salignac S, Campedel C, Bordigoni P, Lecompte T, Lesesve JF. *Ann Biol Clin.* 2001 ; 59 : 165-8.

Est-il possible de numérer les schizocytes au moyen d'un logiciel d'analyse d'image ?

Is detection of shistocytes by computerized image analysis accurate ?

S. Salignac ¹, C. Campedel ², P. Bordigoni ³, T. Lecompte ¹, J.-F. Lesesve ¹

¹ Service d'hématologie biologique, CHU Brabois, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy

² Société LEICA, 86 avenue du 18 Juin 1940, 92563 Rueil Malmaison Cedex

³ Service de pédiatrie et unité de transplantation médullaire, Hôpital d'enfant, 54511

Vandoeuvre-lès-Nancy

Correspondance :

Dr JF Lesesve, Hématologie biologique, CHU Brabois, 54 511 Vandoeuvre-lès-Nancy

Téléphone : 03 83 15 37 66, Télécopie : 03 83 15 37 89

E-mail : jf.lesesve@chu-nancy.fr

Mots clés :

Schizocytes, analyse d'image

Résumé

Les schizocytes sont des hématies fragmentées. Leur reconnaissance et leur quantification sont utiles pour le diagnostic et le suivi de certaines pathologies. Cette numération reste difficile par manque de standardisation ce qui est responsable de variations inter- et intra-observateurs. Dans le but d'une meilleure reproductibilité, nous avons programmé et testé un logiciel d'analyse d'image (QWin®, Leica), pour détecter et numérer les schizocytes à partir de critères objectifs. Nos résultats montrent que notre programme, bien qu'encore imparfait, pourrait apporter une plus grande cohérence aux résultats rendus par rapport à l'observation microscopique.

Summary

Schistocytes result from red cell fragmentation. The identification of the schistocytes is critical for decisions on appropriate management of the patients. Currently, a systematic approach to the counting method remains rewarded. We programmed a computer image analysis device (QWin®, Leica) in order to detect fragmented red cells. A good correlation between the computer and a well-trained biologist was found after minor modifications of the computer's results. Image analysis should reduced the biologist-to-biologist variation and improve the identification and enumeration of the schistocytes.

INTRODUCTION

Les schizocytes sont des fragments d'hématies [1]. Leur présence dans le sang périphérique évoque une microangiopathie thrombotique ou une fragmentation mécanique [2]. Leur mise en évidence présente donc un intérêt diagnostique. Leur numération a des conséquences thérapeutiques et pronostiques réelles [3]. Malgré l'apparente simplicité de cette numération, l'absence de tout consensus complique considérablement la tâche du biologiste. L'absence de recommandations, tant sur la définition que sur la technique de comptage, est responsable de la grande hétérogénéité des résultats fournis au clinicien. Ces résultats sont donc en fait très "observateur-dépendant" et varient en fonction de la technique, des formes comptées, de la zone du frottis observée et du nombre d'hématies sur lesquels s'effectue l'analyse [4].

Nous avons programmé et testé l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image (QWin®, Leica) pour le comptage des schizocytes, dans le but de sélectionner des fragments d'hématies sur des critères objectifs et reproductibles. Nous souhaitons éliminer les facteurs de variation inter-observateurs et apporter une certaine standardisation. Notre expérience indique que l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image, programmé spécifiquement pour la reconnaissance des schizocytes, peut aider la reproductibilité et la précision des résultats fournis aux malades.

MATERIELS ET METHODES

La station de travail (Leica – ICG) permet, grâce à l'association d'un microscope, d'une caméra 3-CCD et d'un ordinateur, l'acquisition et le stockage d'images microscopiques. Nous avons écrit un programme d'utilisation du logiciel d'analyse morphométrique QWin®

permettant la mesure (taille et forme) de tous les éléments présents sur l'image digitalisée. Les schizocytes sont détectés sur des critères de surface (nombre total de pixels détectés dans l'objet), de circularité (facteur de forme qui donne une valeur minimum d'unités à un cercle, calculé en fonction du rapport du périmètre carré sur la surface), d'élongation (rapport de la longueur divisé par la largeur) et de diamètre équivalent (diamètre de cercle équivalent, c'est à dire le diamètre d'un cercle qui a la même surface que l'objet). Les fêrets (largeur de l'objet suivant un angle donné par rapport à l'orientation de l'image digitalisée, ie 0°, 45°, 90°, etc.) n'ont pas été utilisés. En résumé, les schizocytes sont considérés par le logiciel comme des hématies de petite taille, allongées et non circulaires. Après traitement de l'image, ils apparaissent de couleur différente à l'écran (figure 1). Il a néanmoins été décidé de laisser à l'opérateur, en fin d'analyse, la possibilité de modifier manuellement le nombre de schizocytes trouvés. Le logiciel analyse successivement les différents champs microscopiques digitalisés et rend un pourcentage de schizocytes ainsi que le nombre d'hématies comptées. Les critères de sélection du schizocyte (surface, circularité, élongation et diamètre équivalent) ont été déterminés de manière empirique par la mesure d'un grand nombre d'hématies normales et de schizocytes incontestables. Pour chaque frottis, 10 champs microscopiques ont été numérisés (objectif x40 à immersion, grossissement total x400) dans la zone d'étalement uniforme des hématies.

Trente et un échantillons consécutifs ont été analysés. Nous avons comparé les résultats rendus par le logiciel à ceux rendus par méthode microscopique. Les échantillons sanguins ont été recueillis dans des tubes Becton-Dickinson Vacutainer (anticoagulant : EDTA). Les frottis ont été étalés manuellement puis colorés suivant la technique de May-Grünwald Giemsa. La lecture microscopique des frottis a été réalisée par un cytologiste expérimenté. Le comptage a été effectué à l'objectif x40 à immersion (grossissement total x400) dans la zone d'étalement uniforme des hématies, sur 1000 cellules. Les résultats ont été

interprétés après division arbitraire en deux groupes (schizocytoses basses ou élevées), selon un seuil fixé à 3%. L'interprétation statistique a été réalisée grâce à des tests de comparaison de moyenne en échantillons appariés et par le diagramme des différences (représentation graphique de Bland et Altman).

RESULTATS

L'analyse de 10 champs microscopiques digitalisés permet de compter en moyenne 1162 ± 228 hématies, ce qui est équivalent au comptage microscopique sur 1000 hématies pour l'erreur statistique. La comparaison des moyennes des pourcentages de schizocytes rendus par le logiciel et le cytologiste met en évidence une différence significative due aux échantillons à schizocytoses importantes (groupe $> 3\%$) lorsque aucune correction n'est apportée au logiciel (tableau I). Néanmoins, aucune différence significative n'a été retrouvée lorsque le logiciel a été utilisé avec une correction manuelle en fin de programme. Pour un pourcentage inférieur à 3%, aucune différence significative n'a été retrouvée, que le logiciel soit utilisé avec ou sans correction manuelle. La comparaison graphique des deux méthodes grâce au diagramme des différences (différence en fonction de la moyenne) met en évidence un accroissement des écarts lorsque la schizocytose est supérieure à 1%. Il est fréquent de retrouver des différences de 2-3% lorsque les schizocytoses sont supérieures à 5% (figure 2). Le temps d'analyse moyen en microscopie optique est d'environ 5 minutes, et de 8 minutes avec le logiciel.

DISCUSSION

L'utilisation de stations d'analyse d'image s'est considérablement développée en France depuis environ 5 ans. Ces installations sont essentiellement situées dans des laboratoires d'hématologie et d'anatomie pathologique, dans des buts de constitution de banques d'images et de télémedecine [5, 6]. La digitalisation des images microscopiques rend en outre possible leur retraitement par des logiciels d'analyse. Cette application reste néanmoins peu exploitée : morphométrie des cellules lymphoïdes [7], analyse des couleurs des frottis colorés par May-Grünwald Giemsa et standardisation de la coloration des hématies [8]. Nous avons exploité les possibilités du logiciel QWin® pour la mesure des objets (surface, circularité, élongation et diamètre équivalent, ferets...) et la reconnaissance de fragments de disques (schizocytes versus hématies). Des critères stricts ont permis d'éviter la reconnaissance de disques peu déformés (hématies anisocytaires et poikilocytose modérée). Ces critères stricts ont l'inconvénient de laisser passer quelques faux négatifs (schizocytes de grande taille essentiellement). La prise en compte de critères supplémentaires (ferets), une modélisation mathématique plus poussée des schizocytes avec des critères physiques de définition plus stricts devraient permettre d'améliorer les performances de notre logiciel. De même, un travail de réécriture du programme devrait permettre un accroissement de la vitesse de lecture des champs digitalisés et une diminution du temps de lecture informatique. L'analyse serait alors possible en temps proche de celui effectué au microscope.

La nécessité d'une quantification des schizocytes est d'importance variable en clinique. Si la simple présence d'hématies fragmentées suffit à confirmer l'hypothèse d'un syndrome hémolytique et urémique chez un enfant présentant des troubles digestifs, neurologiques et une thrombopénie, la quantification précise est par contre utile pour surveiller l'efficacité d'une plasmaphérèse [9] ou pour estimer le pronostic d'une réaction du

greffon contre l'hôte après greffe de moelle osseuse [10-12]. La standardisation de la mesure des schizocytes est donc souhaitable, ainsi que la précision de la mesure. Ces deux impératifs seront facilités par un comptage informatisé qui élimine au maximum les variations inter- et intra-laboratoire dues à l'observateur (cytologiste-dépendance et variabilité intrinsèque d'un même observateur).

La différence significative entre le programme établi sur QWin® et le cytologiste pour les schizocytoses supérieures à 3%, et quand aucune correction manuelle n'est apportée, pose la question de l'autonomie totale de fonctionnement de notre logiciel (avec les critères utilisés) et de la confiance que l'on peut accorder au résultat donné. En l'état actuel, la correction manuelle - même souvent minimale - réduit l'intérêt sur le gain d'objectivité apporté par le logiciel. Le diagramme des différences met en évidence une cohérence relativement modeste des résultats quand le frottis contient plus de 1 à 2 % de schizocytes. Il s'agit en fait majoritairement d'une imprécision statistique liée au nombre d'hématies comptées. En effet, lorsque le compte est réalisé par le cytologiste sur 1000 hématies, pour une schizocytose de 5%, l'intervalle de confiance à 95% varie entre 3% et 7% [13,14] (tableau II). Pour améliorer la précision du décompte, en particulier lorsque le nombre de schizocytes est important, il est indispensable d'augmenter le nombre d'hématies comptées. Il est néanmoins impensable en pratique de compter sur 5000 ou 10000 hématies au microscope pour une raison de durée d'analyse et de fatigue visuelle. L'utilisation d'un logiciel d'analyse d'images performant pourrait dans cette hypothèse améliorer simultanément la précision et l'exactitude de l'analyse (en augmentant le nombre d'éléments comptés et en standardisant les formes reconnues comme schizocytes).

Au total, le logiciel que nous avons programmé ne répond qu'imparfaitement à l'objectif fixé. La durée d'analyse reste légèrement supérieure à l'observation microscopique. Une correction manuelle minimale reste nécessaire en fin d'analyse pour obtenir des résultats

similaires entre le programme rédigé sur QWin® et un cytologiste expérimenté. Néanmoins, l'utilisation d'un logiciel informatique pourrait permettre d'assurer une plus grande cohérence des résultats rendus au clinicien par rapport à l'observation microscopique pure en améliorant la précision et l'exactitude du comptage des schizocytes.

TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Logiciel d'analyse d'image : écrans d'analyse et de résultats

Tableau I : Comparaison cytologiste versus logiciel sans (-) et avec (+) correction manuelle

Tableau II : Intervalle de confiance à 95% d'un dénombrement de schizocytes

Figure 2 : Représentation graphique de Bland et Altman comparant les performances du logiciel et du cytologiste dans la numération des schizocytes.

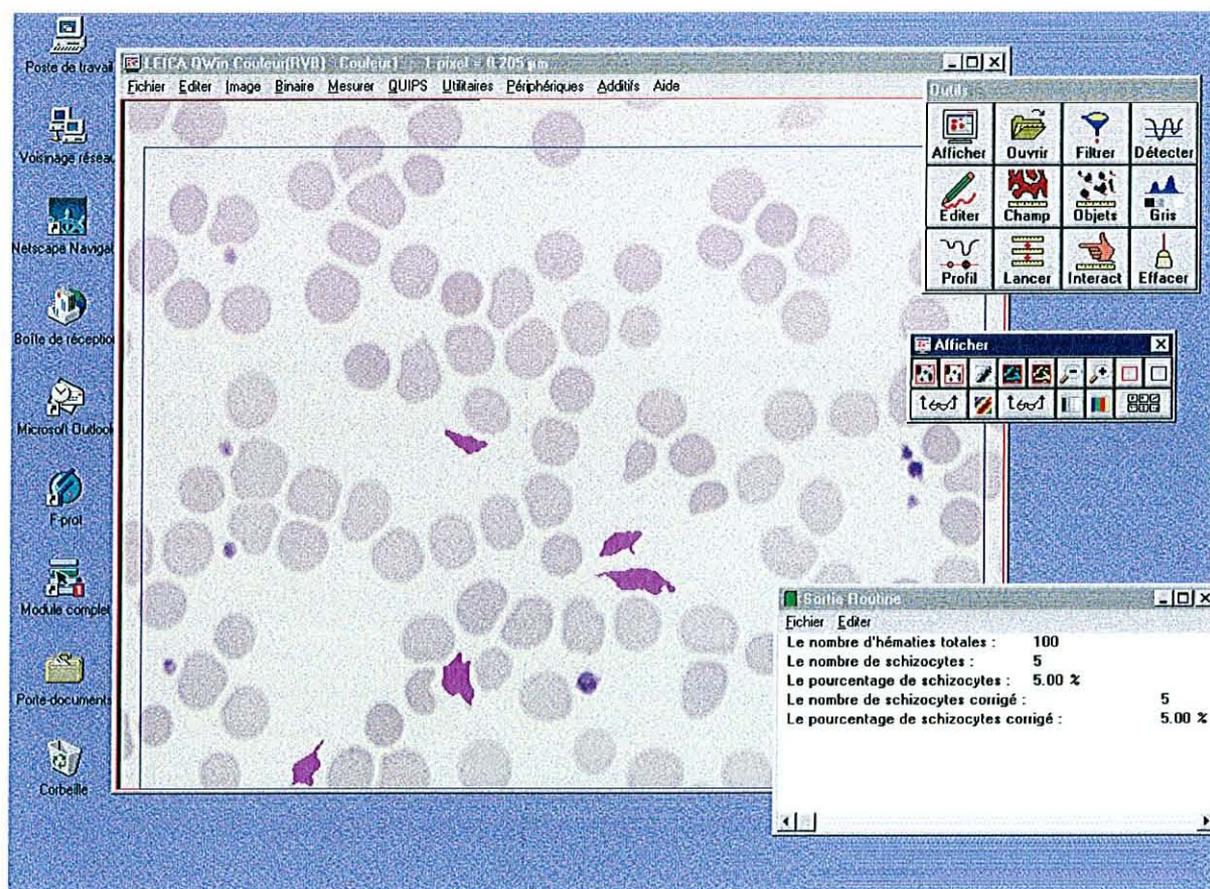


Figure 1 : Logiciel d'analyse d'image : écrans d'analyse et de résultats.

Tableau I : Comparaison cytologiste versus logiciel sans (-) et avec (+) correction manuelle.

	Cytologiste	Logiciel (-/+ correction)	Différence (-/+ correction)	
Ensemble des valeurs	2,2	1,9	0,3 ± 0,9	P < 0,035
		2,3	0,1 ± 1,2	NS
Schizocytes < 3% (n = 20)	0,7	0,6	0,1 ± 0,6	NS
		0,5	0,2 ± 0,5	NS
Schizocytes > 3% (n = 11)	5,0	4,3	0,7 ± 1,2	P < 0,05
		5,5	0,5 ± 1,9	NS

Tableau II : Intervalle de confiance à 95% d'un dénombrement de schizocytes.

% de schizocytes comptés	Nombre d'hématies comptées	Intervalle de confiance à 95%
1	1000	0-2
	10000	0,8-1,2
2	1000	1-4
	10000	1,7-2,3
3	1000	2-5
	10000	2,7-3,3
4	1000	2-6
	10000	3,6-4,4
5	1000	3-7
	10000	4,6-5,4

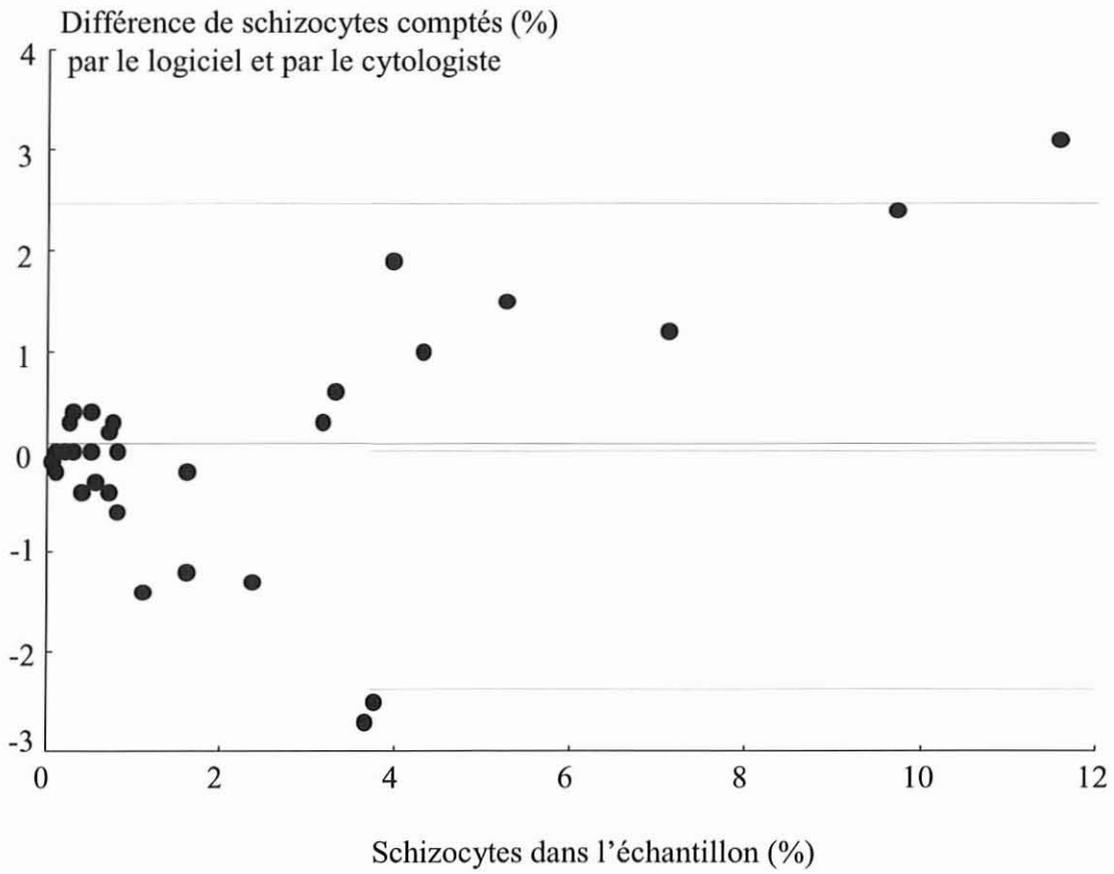


Figure 2 : Représentation graphique de Bland et Altman comparant les performances du logiciel et du cytologiste dans la numération des schizocytes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bessis M. *Réinterprétation des frottis sanguins*. Paris, Masson Springer, 1976 : 92-95.
2. Bain BJ. *Blood Cells. A practical Guide*. Oxford, Blackwell Science Ltd, 1995 : 61.
3. Zeigler ZR, Shadduck RK, Nemunaitis J, Andrews DF, Rosenfeld CS. Bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy : a case series. *Bone Marrow Transplant* 1995 ; 15 : 247-53.
4. Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Schizocytes : quelle définition retenir, et quelle méthodologie utiliser pour identifier et la numérer ces cellules ? Résultats d'une enquête auprès de 24 biologistes. *Ann Biol Clin*, 2001, 59 : 49-52.
5. Flandrin G. Stratégie d'utilisation du télédiagnostic et de la banque d'images. Une application spécifique de la télépathologie pour l'hématologie. *Ann Pathol* 1996 ; 16 :155-8.
6. Flandrin G, Lesesve JF. Telediagnostic and image data bank consultation. A two year application for hematology. *World congress on telemedecine*, Toulouse, 1995 ; abstract.
7. Benattar L, Troussard X, Flandrin G. Analyse morphométrique d'une LLC-B et d'une phase leucémique de lymphome du manteau. *Réunion du Groupe Français d'Hématologie Cellulaire*, 1998 ; abstract.

8. Bennatar L, Flandrin G. Analyse morphométrique, coloration panoptique de May-Grünwald Giemsa et contrôle de qualité. *Hématologie* 1998 ; 4 : 233-8.
9. George JN, Gilcher RO, Smith JW, Chandler L, Duvall D, Ellis C. Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome : diagnosis and management. *J Clin Apheresis* 1998 ; 13 : 120-5.
10. Dua A, Zeigler ZR, Shaddock RK, Nath R, Andrews DF, Agha M. Apheresis in grade 4 bone marrow transplant associated thrombotic microangiopathie : a case series. *J Clin Apheresis* 1996 ; 11 : 176-84.
11. Zonas A, Saso R, Powles R, Mackay H, Singhal S, Treleaven J, Mehta J. Red cell fragmentation (schistocytosis) after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998 ; 8 : 777-80.
12. Akiyama H, Yoshinaga H, Endou M, Tanikawa S, Sakamaki H, Tanoue K, Onozawa Y. Microangiopathy without hemolysis in a patient following allogenic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997 ; 3 : 261-3.
13. The Expert Panel on Cytometry of the International Council for Standardization in Haematology. ICSH Guidelines for Reticulocytes Counting by Microscopy of Supravitaly Stained Preparations. Geneva : *World Health Organization*, 1992.
14. Rümcke CL. Variability of results in differential cell counts on blood smears. *Triangle* 1960 ; 4 : 154-7.

III - 2 - Détermination de la limite de détection du logiciel

La présence d'artéfacts (prélèvement, étalement...) peut suggérer des schizocytes sur des frottis réalisés à partir d'échantillons de sujets sains. Nous avons voulu déterminer le seuil de détection, de manière à pouvoir faire la différence entre une "fausse" positivité artéfactuelle et une réelle schizocytose. Vingt-trois spécimens sanguins provenant de malades hospitalisés dans divers services du CHU ont été analysés (hémogramme, recueil dans des tubes Becton-Dickinson Vacutainer®, anticoagulant : EDTA). Ces échantillons ont été sélectionnés sur l'absence d'anomalies sur la lignée rouge et sur l'absence d'alarmes sur l'automate de numération (H.2 Bayer Technicon). Les frottis ont été étalés manuellement puis colorés par la technique de May-Grünwald Giemsa suivant les procédés habituels du laboratoire. Pour chaque frottis, 10 champs microscopiques ont été numérisés (objectif x40 à immersion, grossissement total x400) dans la zone d'étalement uniforme des hématies. Après analyse informatique avec correction, environ 1500 hématies ont été comptées (moyenne \pm écart-type : 1511 ± 126), le pourcentage moyen de schizocytes était de 0,04% avec un écart type de 0,05% (tableau I). La définition de la limite de détection correspond à la moyenne plus trois écarts type, le seuil a donc été fixé à 0,2%. L'analyse des frottis à l'aide du logiciel non corrigé par l'utilisateur a trouvé une moyenne à 0,56%, un écart type à 0,68% et une limite de détection à 2,61%. Ce seuil, beaucoup plus élevé, suggère fortement la présence de faux positifs. Ces faux positifs sont souvent liés à une mauvaise qualité des images digitalisées. Il peut s'agir d'hématies trop claires qui sont mal détectées, et qui entraîne la formation d'un nombre important de "faux" schizocytes au moment de la segmentation. Ces faux positifs peuvent également être liés à un mauvais choix des champs contenant des globules rouges contigus et qui aboutissent à la formation d'amas au moment du traitement de l'image, la segmentation crée alors un nombre important de "faux" schizocytes.

Cette détermination de la limite de détection ne résout cependant pas tous les problèmes. En effet, il permet de faire la différence entre un frottis normal et la présence de schizocytes. Néanmoins, leur présence peut être artéfactuelle ou associée à d'autres pathologies (coagulation intravasculaire disséminée, myélofibroses, malades splénectomisés), sans correspondre à une microangiopathie thrombotique.

Tableau I : Valeurs des limites de détection avec ou sans correction

	Hématies comptées	Logiciel sans correction (%)	Logiciel avec correction (%)
Moyenne	1511	0,56	0,04
Ecart type	126	0,68	0,05
Limite de détection		2,61	0,20

III - 3 - Sélection de la zone du frottis

Les schizocytes sont des éléments fragiles, ils s'arrondissent et se transforment en microsphérocytes (ou sphéro-schizocytes) que l'on trouve en queue de frottis et particulièrement dans les franges. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé avec le logiciel, 2 frottis présentant une schizocytose très élevée. Les résultats sont surprenants (tableau I, figure 1), des 12,8 et 12,9 % de schizocytes comptés dans la zone où s'effectue la "formule leucocytaire" (figure 2), il n'en reste plus que 3 et 9,6 % dans la zone précédant immédiatement les franges (figure 3), et 1,3 et 2,6 % dans les franges (figure 4). Ces résultats montrent bien qu'il est indispensable de compter systématiquement les schizocytes dans la zone où s'effectue la "formule sanguine", en évitant absolument la queue du frottis où les schizocytes perdent leurs caractères morphologiques. Le choix des champs est donc capital de façon à permettre une analyse fiable, sans sous estimer les résultats de façon importante.

Tableau I : Pourcentage de schizocytes en fonction de la zone du frottis

	Formule leucocytaire	Proximité des franges	Franges
Frottis n° 1	12,8 %	3 %	1,3 %
Frottis n° 2	12,9 %	9,6 %	2,6 %

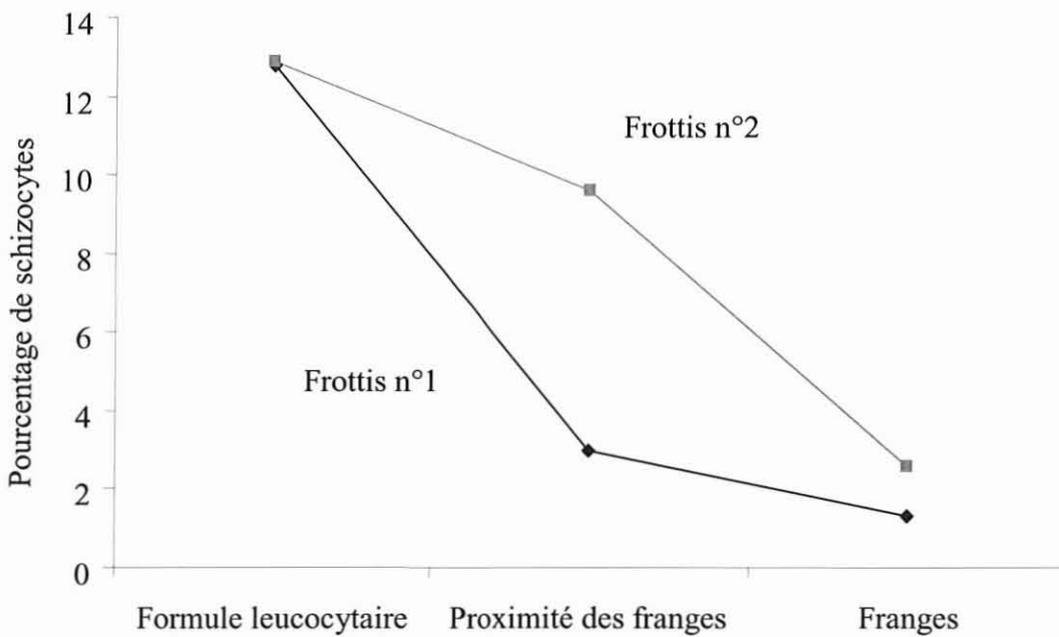


Figure 1 : Représentation graphique du pourcentage de schizocytes en fonction de la zone du frottis.

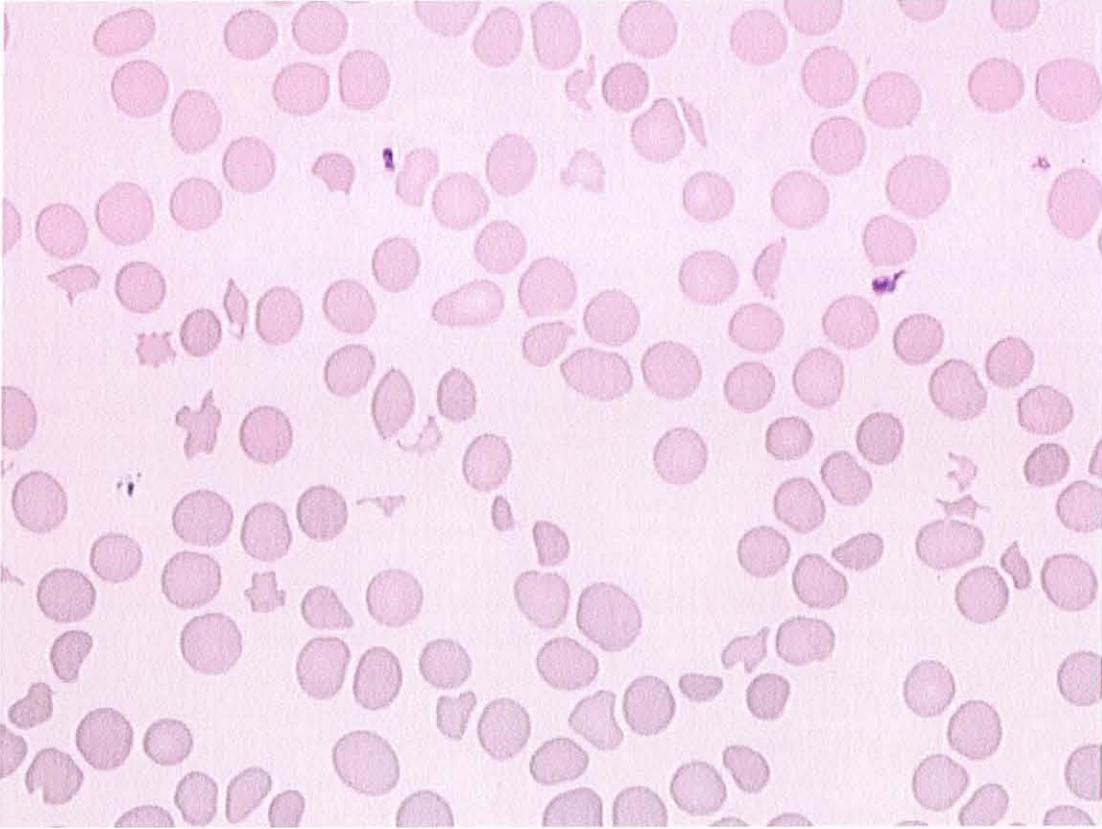


Figure 2 : Image dans la zone où s'effectue la "formule leucocytaire" (MGG, x400)

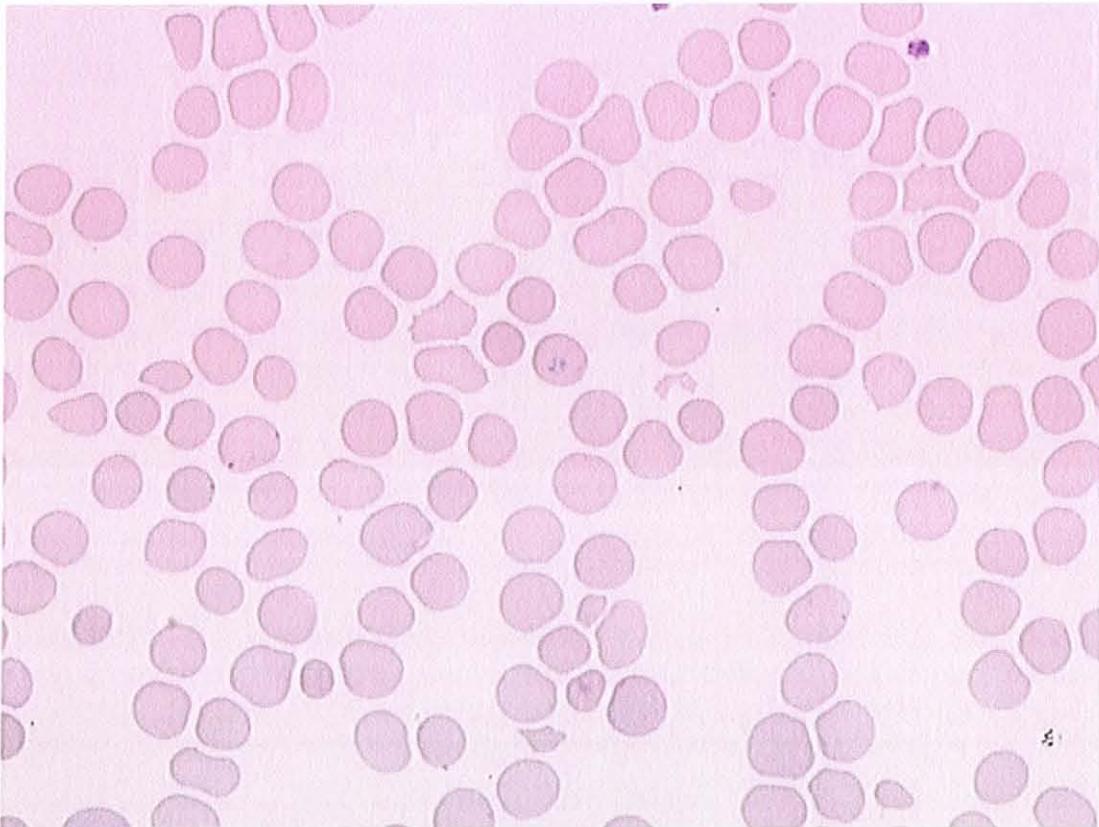


Figure 3 : Image à proximité des franges (MGG, x400)



Figure 4 : Image dans les franges (MGG, x400)

IV - CAS CLINIQUES

IV - 1 - Exemple d'un SHU

FICHE PLAQUET'AIR (diffusion par la société Beckman-Coulter)

Découverte d'un syndrome hémolytique et urémique de l'enfant par une thrombopénie associée à une anémie

S. Salignac, P. Bordigoni*, J.-L. André**, T. Lecompte, J.-F. Lesesve

Services d'Hématologie Biologique, Médecine Infantile*, Néphrologie pédiatrique**, CHU Nancy

OBSERVATION CLINIQUE

L'enfant Clément A., âgé de 12 mois, est hospitalisé en Juillet 2001 dans le service de médecine infantile pour apparition d'une diarrhée glairo-sanglante apparue depuis quelques jours. Le poids est mesuré à 12,3 kg, correspondant à une perte de 250 grammes par rapport au dernier poids connu quelques jours auparavant. L'abdomen est souple et indolore ; le siège est irrité ; l'examen neurologique et cardio-pulmonaire est normal. L'examen ORL montre une otite congestive droite associée à des adénopathies cervicales droites. L'hémogramme réalisé met en évidence une hémoglobine à 11,5 g/dL (volume globulaire moyen : 79,7 fL), des plaquettes à $412 \times 10^9/L$ et des leucocytes à $13,7 \times 10^9/L$ (figure 1). L'examen clinique et l'ionogramme ne mettent pas en évidence de déshydratation, la C réactive protéine est inférieure à 5 mg/L. Cependant, l'évolution est marquée par la persistance d'une diarrhée glairo-sanglante importante, associée à des vomissements entraînant une aggravation de la perte de poids et de l'altération générale, nécessitant la mise en place d'une réhydratation par

voie intraveineuse. Les coprocultures réalisées mettent en évidence un germe *Escherichia coli* de sérotype O157 : H7 sensible à tous les antibiotiques étudiés et ne montre pas de bactérie du genre *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *E. coli* entéropathogène, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*. Les recherches dans les selles de rotavirus de parasite et de champignons resteront négatives. Les analyses biologiques effectuées 5 jours plus tard (J6) mettent alors en évidence un syndrome hémolytique et urémique (SHU) associant une insuffisance rénale débutante (créatinine 71 $\mu\text{mol/L}$, urée 10,49 mmol/L), une thrombopénie à $26 \times 10^9/\text{L}$ et une anémie normochrome normocytaire à 8,5 g/dL avec présence de schizocytes (1,4%) (figure 2). L'hyperhémolyse est confirmée par le caractère régénératif de l'anémie (réticulocytes : $135 \times 10^9/\text{L}$ à J8 et $229 \times 10^9/\text{L}$ à J11. La lecture attentive du résultat graphique fourni par l'appareil de numération met en évidence une anisocytose très importante, avec un épaulement vers la gauche de la courbe de répartition du volume des globules rouges lié probablement à la présence de schizocytes. La courbe de distribution en volume des plaquettes est lissée mais ne revient pas à la ligne de base vers 20 fL (figure 3). L'observation microscopique du frottis coloré suivant la technique de May-Grünwald Giemsa met en évidence une anisocytose érythrocytaire, une thrombopénie (rares plaquettes de morphologie normale) et la présence de schizocytes (chiffres compris entre 4 et 7% de J8 à J17). La réalisation d'une bandelette urinaire puis d'un examen cytologique des urines mettent en évidence une hématurie (12 000 hématies/mL). La diurèse est conservée. Devant l'augmentation modérée de la créatinine, un régime hypoprotidique, hyponatrémique et hypokaliémique est mis en place par précaution. Aucune fièvre ni signe neurologique sont observés. L'enfant est alors transféré en réanimation à J7 pour pose de voie centrale et maintien de l'équilibre hydroélectrolytique. Devant l'anémie à 6,8 g/dL et la thrombopénie à $21 \times 10^9/\text{L}$, une transfusion d'un concentré de globules rouges déleucocytés et d'un concentré de plaquettes d'aphérèse est réalisée. Durant le séjour en réanimation, la diurèse est toujours

restée satisfaisante, la créatinine et l'urée n'ont pas dépassé 9 mg/L et 1,02 g/L respectivement. La coproculture de contrôle effectuée à J10 ne met plus en évidence d' *E. coli* de sérotype O157 : H7. L'enfant est transféré en secteur à J12 après une seconde transfusion d'un concentré de globules rouges déleucocytés (hémoglobine toujours basse après la première transfusion, 6,8 g/dL). Il quitte le service sans séquelle 20 jours après son hospitalisation.

DISCUSSION

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) représente la forme principale du groupe des microangiopathies thrombotiques (MAT) chez l'enfant [10]. Les signes présents au moment du diagnostic associent à des degrés divers : anémie hémolytique avec schizocytes, thrombopénie, fièvre, insuffisance rénale aiguë, et, rarement, troubles neurologiques d'origine centrale. C'est la cause la plus fréquente d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant. Comme ici, il atteint essentiellement le jeune enfant et débute par une diarrhée précédant généralement l'anémie et la thrombopénie d'environ 5 à 7 jours. Une insuffisance rénale aiguë de gravité variable peut alors se constituer plusieurs jours après l'apparition de l'anémie. Comme dans notre observation, la fièvre n'est pas constante et les enfants présentant un SHU ne manifestent des signes neurologiques que dans moins de 20% des cas. Les 3/4 des enfants atteints de SHU récupèrent complètement. Néanmoins, certains enfants conservent une atteinte rénale qui progresse vers une insuffisance rénale terminale. Au moment de la phase aiguë, la mortalité reste encore d'environ 5% des cas. Chez l'enfant on peut distinguer 4 grands modes de présentation du SHU. Le SHU du jeune enfant (90% des cas de 6 mois à 5 ans), avec début typique (diarrhée aqueuse, parfois avec méléna précédant l'anémie et la thrombopénie), de pronostic favorable. Le SHU de l'enfant plus âgé, plus rare et atypique, sans prédominance saisonnière, sans prodromes digestifs. Une insuffisance rénale aiguë de gravité variable peut survenir plusieurs jours après l'apparition de l'anémie. Les

réurrences sont possibles. Le SHU secondaire (greffe, médicaments, néphropathie antérieure, acidurie méthylmalonique) dont les critères de gravité sont l'HTA et les atteintes neurologiques. Enfin, il existe de rares formes familiales de SHU.

La symptomatologie du SHU résulte de l'occlusion thrombotique des capillaires des organes. Les agents infectieux jouent un rôle majeur dans le développement d'un SHU. Même si des infections virales ont été considérées responsables d'épidémies de SHU, le SHU est généralement associé à des infections bactériennes, en particulier à *E. coli* entérohémorragique de sérotype O157 : H7. D'autres souches d'*E. coli*, de *salmonelles* ou de *shigelles* productrices de vérocytotoxine ("shiga-like toxine"), peuvent être impliquées. Des contaminations à partir de viande insuffisamment cuite, de lait non pasteurisé ou de jus de pomme ont été mentionnées. Seulement 2 à 6 % des enfants présentant une diarrhée hémorragique liée à l'une de ces souches développeront un SHU. Il semble que le SHU soit lié au passage d'un ou plusieurs types de vérocytotoxine au niveau de la circulation, suivie de sa fixation au niveau de la membrane de la cellule endothéliale par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique de structure glycosphingolipidique (Gb3, globotriaosylcéramide). Plusieurs mécanismes ont été évoqués, dont un effet toxique direct sur la cellule. La souche d'*E. coli* semble également être un élément déterminant, puisque l'incidence de SHU est beaucoup plus importante avec les souches produisant la toxine VT-2 seule qu'avec les souches produisant la toxine VT-1 seule ou la combinaison des deux. D'autres facteurs ont été évoqués dans la pathogenèse du SHU, comme la présence de multimères de facteur von Willebrand de poids moléculaire anormalement élevé, ou encore un déficit en prostaglandine I2.

La thrombopénie est parfois un signe révélateur et constitue de toute façon un signe majeur d'orientation au cours des SHU. Elle est généralement importante (autour de

50 x 10⁹/L, mais pouvant atteindre 5 x 10⁹/L, avec un chiffre médian de 25 x 10⁹/L [11]). Néanmoins, les signes hémorragiques sont rares. Un problème biologique majeur est la validation du chiffre rendu par l'appareil. Si la numération des plaquettes est effectuée par impédancemétrie il peut exister une pollution de la zone de comptage des grandes plaquettes par des petits globules rouges et en particulier par les schizocytes. Cet artéfact est en principe minoré si la zone de comptage est encadrée par des seuils fixes, avec extrapolation plaquettaire. La validation du chiffre des plaquettes impose dans ce cas un contrôle de la numération en cellule et/ou sur frottis [12]. La thrombopénie a été rapportée au cours des MAT comme un signe très précoce, précédant les anomalies de la série érythrocytaire et l'élévation des LDH de 2 à 4 jours. Pour les MAT, la thrombopénie est un critère majeur pour juger de l'efficacité du traitement, et il est recommandé de poursuivre la thérapeutique jusqu'à normalisation du chiffre des plaquettes (150 x 10⁹/L) et stabilisation de ce dernier (≥ 2 jours).

FIGURES

Figure 1 : Evolution de l'hémoglobine (g/dL) et des plaquettes (10⁹/L)

Figure 2 : Résultats graphiques de l'appareil (H.2 Bayer Technicon)

Figure 3 : Schizocytes (frottis sanguin, MGG, x400)

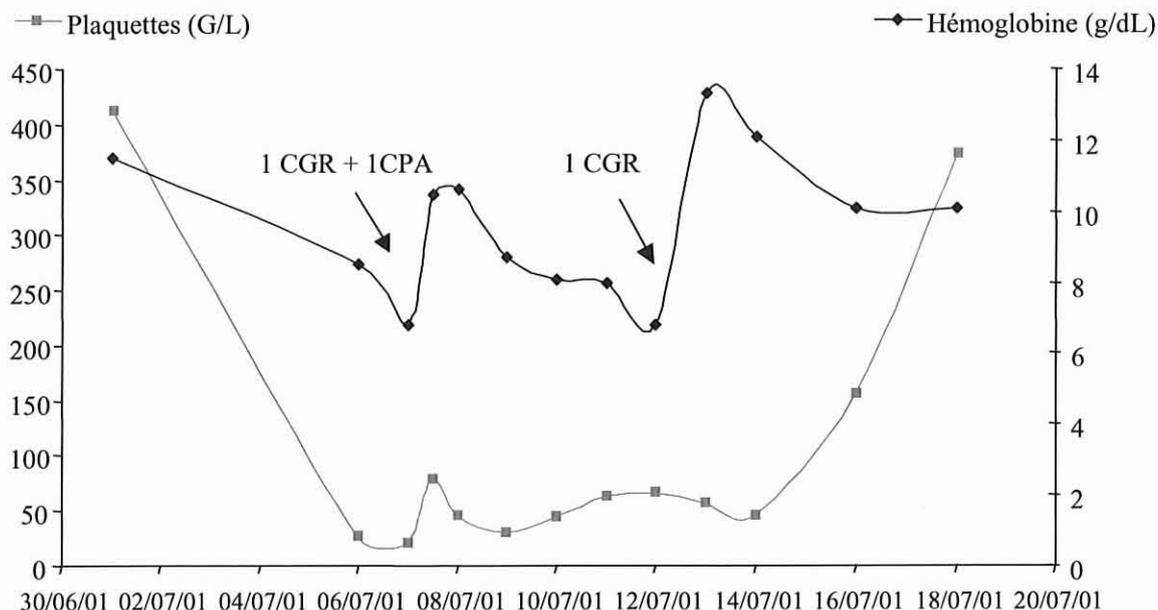


Figure 1 : Evolution de l'hémoglobine (g/dL) et des plaquettes (10⁹/L)

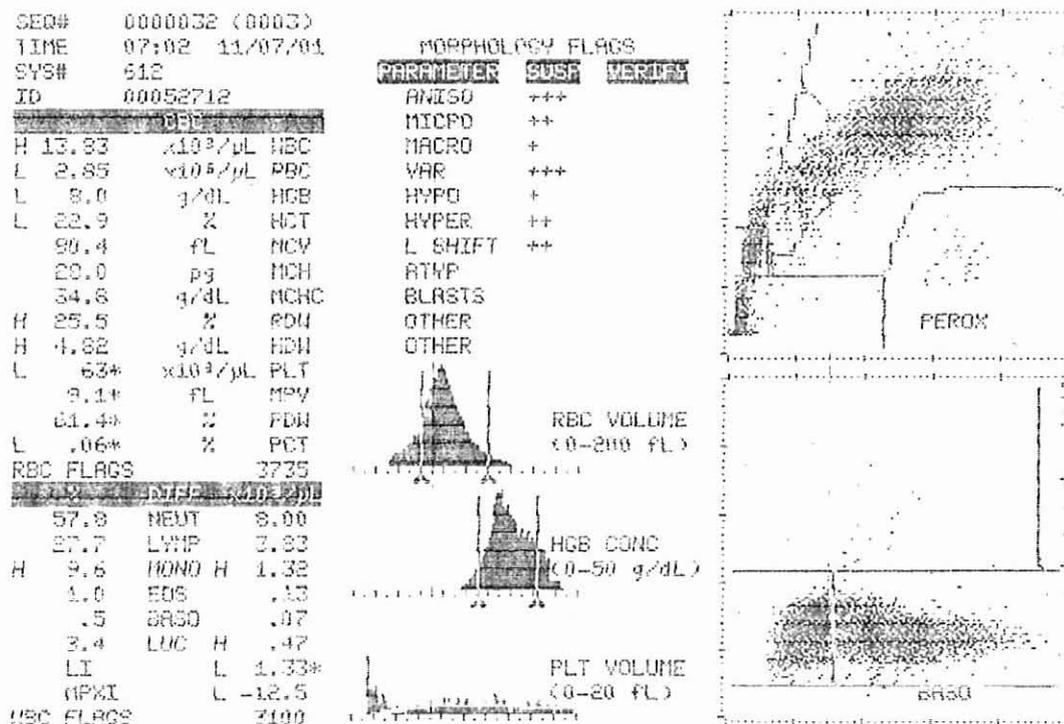


Figure 2 : Résultats graphiques de l'appareil (H.2 Bayer Technicon)

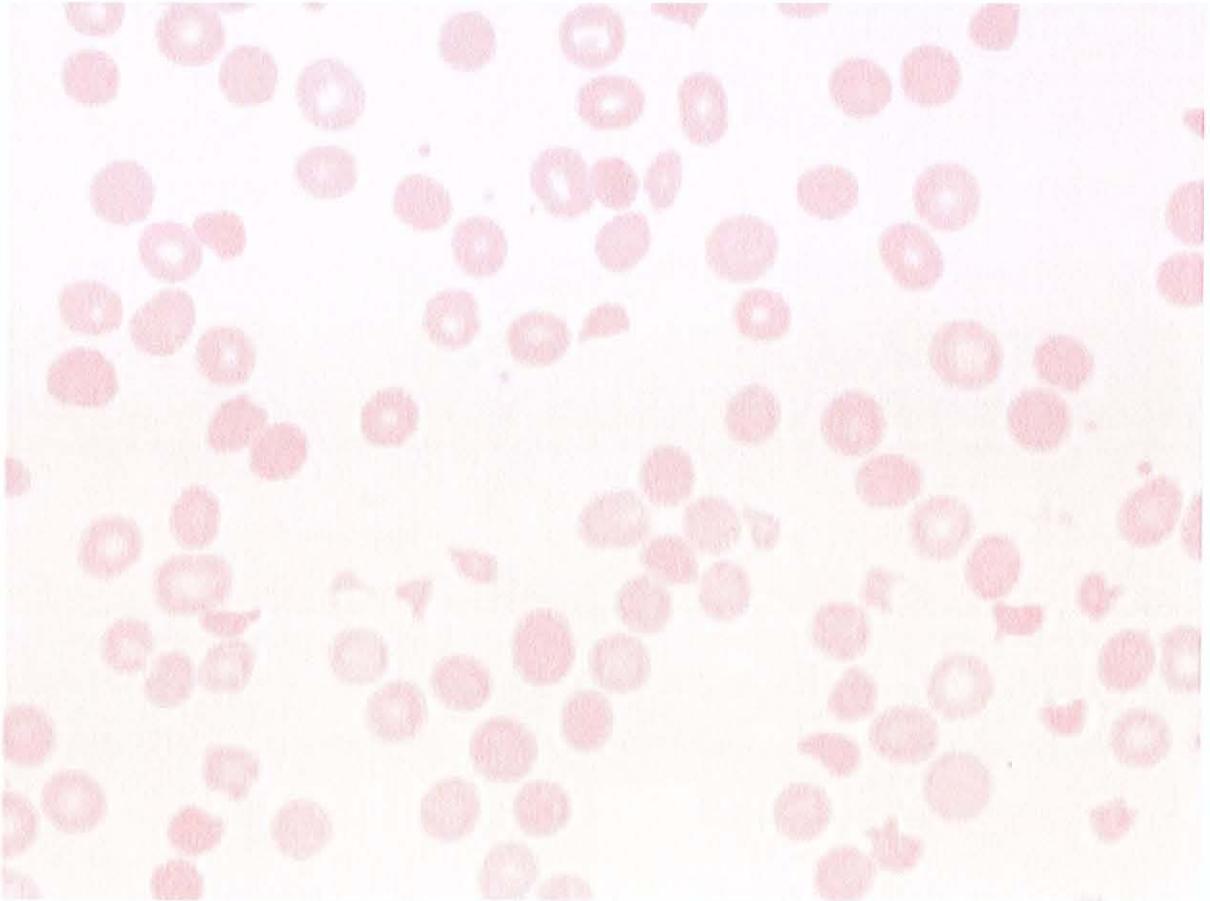


Figure 3 : Schizocytes (frottis sanguin, MGG, x400)

Une observation de tumeur solide en phase terminale : interprétation des anomalies biologiques (tests hématologiques).

(article soumis à la revue Annales de Biologie Clinique)

Abnormalities of the laboratory tests (hematologic findings) accompanying a metastasized solid tumor : a case report

S. Salignac, A. Walter, T. Lecompte, J-F. Lesesve

Service d'Hématologie Biologique, CHU Nancy, 54 511 Vandoeuvre-lès-Nancy

Téléphone : 03 83 15 37 66, Télécopie : 03 83 15 37 89

Email : jf.lesesve@chu-nancy.fr

Correspondance : J-F. Lesesve, Service d'Hématologie Biologique, CHU Nancy Brabois, 54 511 Vandoeuvre-lès-Nancy

Mots clés :

Cancer, coagulation intra-vasculaire disséminée, microangiopathie thrombotique, diagnostic biologique

Keys words :

Cancer, disseminated intravascular coagulation, microangiopathic haemolytic anaemia, biological diagnosis

OBSERVATION CLINIQUE

Madame B., âgée de 58 ans, est hospitalisée le 13 novembre 2000 pour l'évolution d'un adénocarcinome colloïde mucineux de la vessie découvert au plus tôt en décembre 1999 et opéré en février 2000. Le scanner réalisé après neuf mois (09 / 2000) montrait une métastase hépatique associée à des adénopathies iliaques droites et gauches. L'hémogramme (tableau I) mettait alors en évidence une anémie (hémoglobine : 10,2 g/dL), normochrome normocytaire, associée à une thrombopénie ($102 \times 10^9/L$). Le 14 / 11 / 2000, l'hémogramme indique une anémie (7,9 g/dL) normochrome normocytaire régénérative (réticulocytes : $289 \times 10^9/L$) se majorant rapidement, associée à une thrombopénie ($88 \times 10^9/L$). Le bilan d'hémostase réalisé le 17 / 11 / 2000 montre une thrombopénie ($70 \times 10^9/L$), un taux de prothrombine (TP) à 62%, un fibrinogène (Fg) à 0,8 g/L, les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (PDF) à 40 $\mu\text{g/mL}$ ($N \leq 10$) et la présence de monomères de fibrine (+++, par technique d'agglutination de particules de latex recouvertes de monomères de fibrine "de Largo" [13]). Un syndrome de coagulation intra-vasculaire disséminé (CIVD) est suspecté. L'exploration des facteurs de la coagulation associe une diminution du facteur II (40%) à des facteurs V et VII+X normaux. Le temps de lyse des euglobulines est légèrement raccourci (1h15 avec $N > 1h30$) ce qui est habituel dans les CIVD. L'antithrombine, le plasminogène et l'alpha 2 anti-plasmine sont normaux. Dans le but de documenter l'anémie, initialement normocytaire mais devenue macrocytaire du fait de la régénération, les explorations complémentaires sont en faveur d'une hémolyse (haptoglobine effondrée, augmentation des LDH plasmatiques et de la bilirubine non conjuguée). La recherche d'une origine immunologique est négative (agglutinine irrégulière éliminée par la négativité des tests de Coombs direct et indirect). Les dosages des vitamines B9 et B12 sont normaux. La patiente est alors transfusée par deux concentrés de globules rouges déleucocytés. L'évolution

est marquée par la persistance des monomères de fibrine, liés à la présence d'une CIVD chronique dans le cadre de l'extension du cancer métastasé, et par l'aggravation progressive de l'anémie et de la thrombopénie (figure 1). Le pourcentage de schizocytes (figure 2), très modéré au départ (0,4% le 17 / 11) se majore avec l'aggravation de l'anémie et la persistance de la CIVD (1,4% le 21 / 11 et 2,2% le 12 / 12). L'examen du frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa met en évidence une érythromyélocytose (6% de myélocytes, 7% de métamyélocytes, 6 érythroblastes pour 100 globules blancs) associée à une anisocytose, une polychromatophilie et la présence d'hématies à ponctuations basophiles. La scintigraphie osseuse montre la présence de plusieurs métastases osseuses et le scanner cérébral, effectué du fait de l'apparition d'un strabisme convergent à l'œil droit, met en évidence une masse rétro-orbitaire droite. L'évolution est rapidement défavorable.

DISCUSSION

L'observation rapportée présente des éléments de l'évolution d'une malade atteinte d'un cancer (vessie) métastasé (foie, ganglions abdominaux profonds, orbite, os) du diagnostic au décès (12 mois). La survenue de complications - attendues - rend plus complexe l'interprétation d'examen biologiques simples. Or, les retombées cliniques de l'interprétation biologique sont importantes, dans la mesure où le traitement est sensiblement différent. Parmi les examens de première ligne, le bilan hématologique "standard" (hémogramme + hémostase) est régulièrement demandé. Nous nous efforcerons de discuter la part de la CIVD et celle de la microangiopathie thrombotique (MAT), toutes deux pouvant compliquer un cancer [14], mais relevant d'une attitude thérapeutique différente.

La CIVD est un syndrome acquis caractérisé par l'activation intra-vasculaire massive de la coagulation et apparaissant dans de nombreuses pathologies (septicémie, obstétrique, traumatisme majeur, brûlure étendue, cancers...) [15]. Aucune analyse biologique ne permet à elle seule d'affirmer ou d'exclure le diagnostic de CIVD [16,17]. Le diagnostic est évoqué devant l'association de plusieurs signes biologiques chez un sujet susceptible de développer une CIVD : allongement du temps de Quick (TQ) et du temps de céphaline avec activateur (TCA), diminution du Fg et des plaquettes, avec ou sans fibrinogénopénie ou thrombopénie [15], présence de PDF ou de D-dimères, et de monomères de fibrine. Ces éléments étaient présents dans l'observation présentée (Plaquettes, TP, Fg, PDF, monomères...). Parmi ces analyses de première ligne, les monomères de fibrine semblent être les plus spécifiques d'une CIVD : ils témoignent de la génération massive de thrombine et de son action sur le Fg [18]. La diminution des plaquettes et du Fg ainsi que l'allongement des temps de coagulation et la présence de PDF ou D-dimères sont des signes sensibles mais non spécifiques [19]. Qui plus est, en présence d'un syndrome inflammatoire, le Fg (protéine de la phase aiguë de l'inflammation) et parfois le TCA (sensible au facteur VIII, protéine de l'inflammation) peuvent rester dans les valeurs physiologiques [15-17]. A côté des monomères de fibrine, il existe d'autres tests spécialisés reflétant la génération de thrombine : fragment d'activation de la prothrombine F_{1+2} et complexes thrombine-antithrombine. Mais leur utilité et possibilité d'utilisation pratique sont modérées car ils sont rarement pratiqués en routine et leur performance diagnostique ne semble pas être supérieure à celle des monomères de fibrine, leur spécificité et sensibilité se situant entre 80 et 90% [15]. Les autres anomalies associées à une CIVD sont : une diminution des inhibiteurs physiologiques de la coagulation (antithrombine, Protéine C, Protéine S), un éventuel raccourcissement du temps de lyse des euglobulines, la diminution du plasminogène et de l'alpha 2 anti-plasmine [20]. Toutefois ces analyses, non spécifiques, apportent peu d'aide au diagnostic. Comme dans notre observation,

la diminution du plasminogène et de l'alpha 2 antiplasmine, est souvent absente dans les CIVD chroniques modérées, le plus souvent compensées (ce qui semble ne pas être le cas ici, faisant approfondir la recherche de la connaissance du mécanisme).

La présence d'une CIVD chronique est particulièrement fréquente dans les cancers métastasés [14]. Les signes de consommation sont alors souvent au premier plan. Environ 10 à 15% des patients avec tumeurs métastasées montrent des signes biologiques de CIVD dont le mécanisme n'est pas encore clairement compris [15]. L'expression de facteur tissulaire à la surface des cellules tumorales a été impliquée, en particulier avec les cancers à cellules sécrétrices, comme c'est le cas chez notre patiente. La thrombopénie fait partie du tableau et se majore avec la CIVD. Un compte initial de moins de $100 \times 10^9/L$ est évocateur - mais non spécifique -, d'autant plus qu'il s'accompagne ensuite d'une accentuation de la diminution du nombre des plaquettes.

Dans le cas présenté, la présence d'une thrombopénie et d'une anémie hémolytique avec schizocytes visibles sur le frottis sanguin pose le problème de l'association ou du diagnostic différentiel entre MAT et CIVD. La question est de savoir si les schizocytes et la thrombopénie sont expliqués par une CIVD, une MAT ou l'association des deux pathologies. Au cours des MAT, la présence de schizocytes est un signe diagnostique majeur, souvent réputé comme obligatoire (ce qui n'est pas toujours le cas !) [12]. Au cours des CIVD, des schizocytes peuvent parfois être visibles. La CIVD est alors généralement grave, s'accompagnant de dépôts de fibrine dans les capillaires ou les artérioles. Ces constatations ont été vérifiées par biopsie (rein [15]). Une CIVD importante peut en effet s'accompagner d'une anémie hémolytique modérée avec présence de schizocytes [15-17, 20, 21-23], mais, comme ici, l'association avec une anémie importante se majorant est un argument en faveur

d'une MAT surajoutée [24]. En ce qui concerne le contexte clinique, CIVD et MAT peuvent toutes deux compliquer un cancer métastasé [25]. Les signes cliniques : fièvre, insuffisance rénale et signes neurologiques associés aux MAT ne sont pas suffisamment spécifiques pour porter le diagnostic. Les schizocytes sont le signe cardinal des MAT mais peuvent également se voir dans d'authentiques CIVD. Les signes biologiques les plus spécifiques d'une CIVD sont les monomères de fibrine, les fragments F_{1+2} de la prothrombine et les complexes thrombine-antithrombine. Ces deux derniers tests ne sont pas de réalisation courante. Quant aux MAT, le signe le plus spécifique est la présence de multimères de facteur von Willebrand de haut poids moléculaire, ou mieux la mise en évidence du déficit de la protéase clivant les multimères de facteur von Willebrand (analyse réalisée dans des laboratoires spécialisés). Cependant, cette anomalie n'est pas toujours trouvée dans les MAT associées aux cancers métastasés [26]. L'importance de l'anémie hémolytique (haptoglobine effondrée, augmentation des Lactico DesHydrogénases plasmatiques et de la bilirubine non conjuguée), contrastant avec la concentration modérée en schizocytes, a conduit à envisager d'autres causes possibles d'hémolyses : immunologique (allo ou auto-anticorps), infectieuse, parasitaire ou médicamenteuse [12]. L'enquête s'est révélée négative.

Chez cette malade, le tableau hématologique est d'interprétation difficile. La persistance d'une CIVD - explicable par le contexte et prouvée biologiquement - qui semble s'intensifier lentement avec l'évolution (diminution du TQ et du Fg associée à une augmentation des PDF) contraste avec l'aggravation rapide de l'anémie et de la thrombopénie. Elle suggère une contribution importante d'un phénomène microangiopathique. Cependant, le pourcentage relativement faible de schizocytes retrouvé au niveau du frottis sanguin est surprenant, alors que l'anémie se majore rapidement en quelques semaines malgré une régénération importante (réticulocytes $> 200 \times 10^9/L$). En principe, et pédagogiquement, on sépare les tableaux

biologiques de CIVD et de MAT (tableau II). Cette observation met en exergue la possibilité, quasi-unique, de coexistence des deux situations, dans les cancers, d'autant plus qu'ils sont métastasés et en phase terminale.

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : Evolution des paramètres biologiques (observation présentée, phase terminale)

Tableau II : Signes biologiques au cours des syndromes de coagulation intra-vasculaire disséminé (CIVD) et des micro-angiopathies thrombotiques (MAT)

Figure 1 : Evolution de l'hémoglobine et des plaquettes (observation présentée, phase terminale)

Figure 2 : Schizocytes, frottis sanguin (MGG, x630)

Tableau I : Evolution des paramètres biologiques (observation présentée, phase terminale)

	26/10/00	14/11/00	17/11/00	20/11/00	21/11/00	23/11/00	25/11/00	06/12/00	08/12/00	12/12/00
Hémoglobine (g/dL)	10,2	7,9	7,1	10,8	10	9,7	8,4	5,8	5,2	7,1
Réticulocytes ($10^9/L$)		289							240	275
Plaquettes ($10^9/L$)	102	88	70	57	52	65	71	33	33	25
Temps de Quick (pourcentage d'activité)		67	62		91	72			40	
Fibrinogène (g/L)			0,8		2,6	1,8			0,9	
Monomère de Fibrine			++		++	++			+++	
Schizocytes (%)			0,4		1,4	1,2				2,2

Tableau II : Signes biologiques au cours des syndromes de coagulation intra-vasculaire disséminé (CIVD) et des micro-angiopathies thrombotiques (MAT)

	CIVD	MAT
Anémie hémolytique régénérative	+/-	++
Schizocytose	+/-	++
Thrombopénie	+ (souvent $50-100 \times 10^9/L$)	++
Allongement du temps de Quick et diminution des facteurs	+	-
Diminution de fibrinogène	++	-
Monomère de fibrine	++	-
PDF	++	+/- (?)

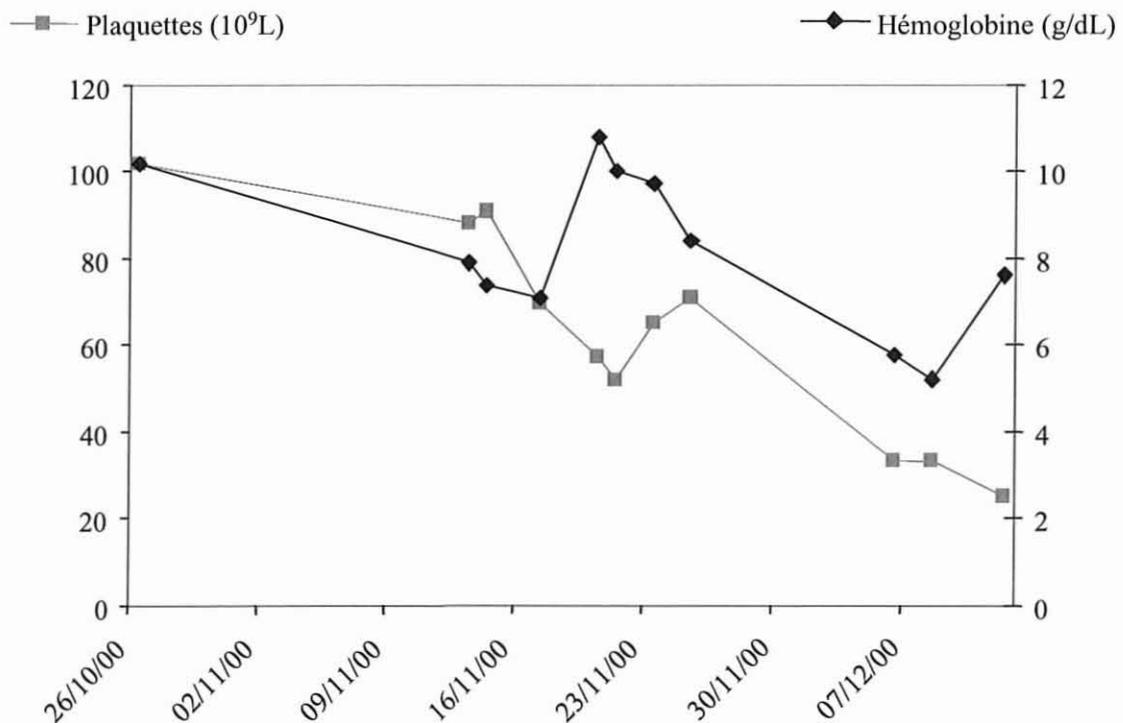


Figure 1 : Evolution de l'hémoglobine et des plaquettes (observation présentée, phase terminale)

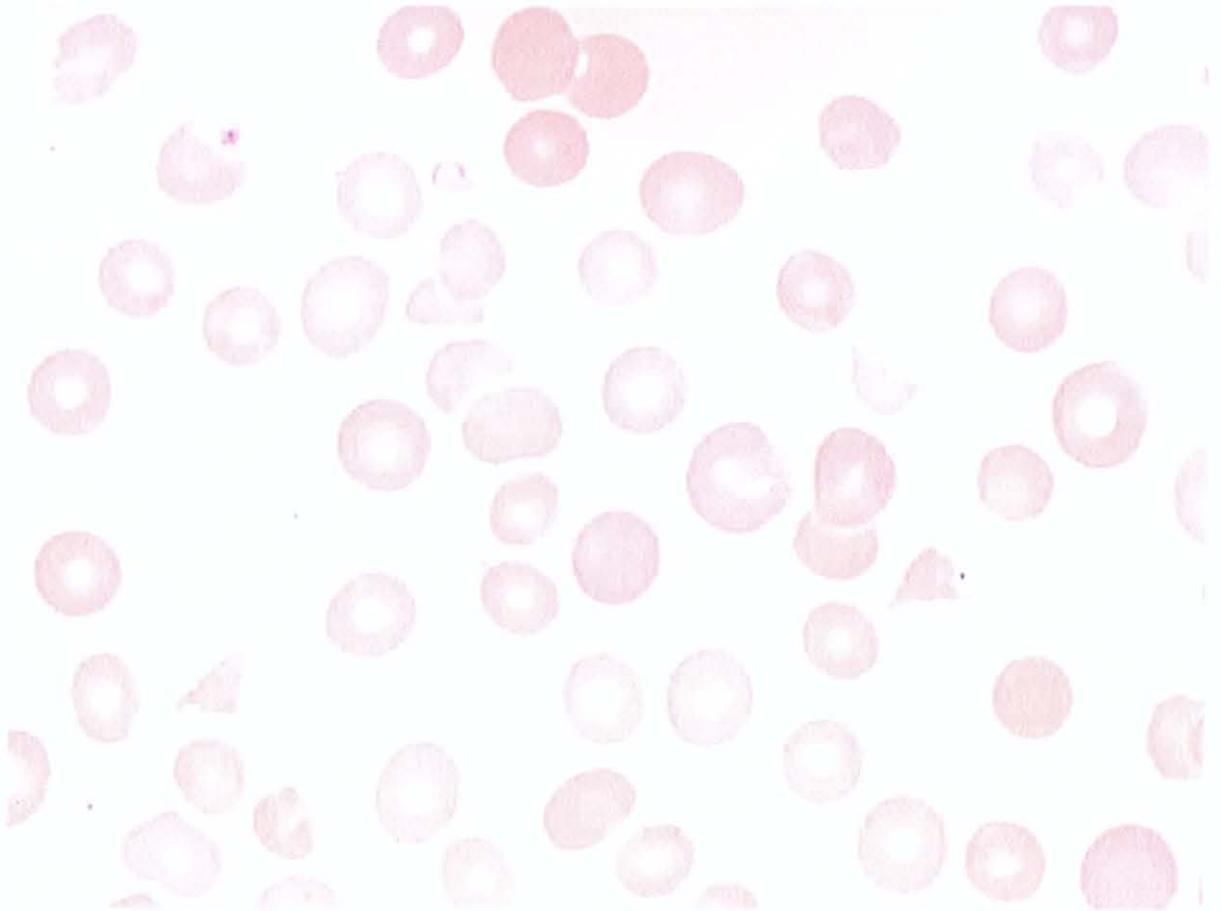


Figure 2 : Schizocytes, frottis sanguin (MGG, x630)

IV - 3 - Exemple d'une hémolyse sur valve mécanique

OBSERVATION CLINIQUE

Monsieur B., âgée de 70 ans, est hospitalisé dans le service d'hépto-gastro-entérologie pour apparition d'un méléna avec déglobulisation (hémoglobine à 6 g/dL). Le patient est transfusé (3 culots de globules rouges déleucocytés) ce qui permet un rehaussement de l'hémoglobine à 9,6 g/dL. Les antécédents de Monsieur B. sont une cirrhose post-hépatite C et la présence d'épisodes de méléna depuis décembre 1999, sans étiologie identifiée, mais avec suspicion d'une angiodysplasie duodénale. Le patient est également porteur de deux prothèses valvulaires, posées en 1978 : une bio-prothèse en position aortique et une prothèse mécanique en position mitrale. La gastroscopie réalisée met en évidence des signes d'hypertension portale modérée ne pouvant expliquer l'épisode hémorragique (présence de varices oesophagiennes ne saignant pas et absence de sang dans la cavité gastrique). La réalisation d'hémocultures, à l'occasion d'un pic thermique, met en évidence une bactériémie à *Klebsiella pneumoniae* sécrétrice de bêta-lactamase à spectre étendu (2 hémocultures sur 3 positives) en absence de syndrome inflammatoire (CRP à 15 mg/L) et de polynucléose neutrophile. Le patient est transféré dans le service de maladies infectieuses (23/05/01). Il reste fébrile (38°C) et l'antibiothérapie par Augmentin® (Amoxicilline + Acide clavulanique) et Oflocet® (Ofloxacine) est modifiée pour un traitement par Tienam® (Imipénème) et Amiklin® (Amikacine) devant le spectre de résistance de la *Kliebsielle*. Une échographie cardiaque est alors réalisée et ne montre pas de dysfonction des prothèses valvulaires, ni de greffe bactérienne à ce niveau. La lecture attentive du résultat graphique fourni par l'appareil de numération met en

évidence une anisocytose importante (Index de distribution des hématies : 22,5 sur Coulter STKS et 24,8 sur H.2 Bayer Technicon), avec un épaulement vers la gauche de la courbe de répartition du volume des globules rouges lié possiblement à la présence de schizocytes. La courbe de distribution en volume des plaquettes est lissée mais ne revient pas à la ligne de base vers 20 fL (figures 1,2). L'examen du frottis coloré au May-Grünwald Giemsa confirme la présence de schizocytes (9% le 18/06, tableau I) qui signent l'origine mécanique de l'hémolyse. L'antibiothérapie est arrêtée après 15 jours de traitement devant la négativité des hémocultures. L'évolution est alors marquée par la réapparition rapide d'une fièvre à 39°C, accompagnée d'une anurie et d'une insuffisance rénale (créatinine à 274 µmol/L). L'état de Monsieur B. se dégrade alors rapidement et le patient décède dans un tableau de défaillance multi-viscérale.

DISCUSSION

Même s'il existe un certain degré d'hémolyse intravasculaire au cours de jours suivant une chirurgie cardiaque, elle ne constitue plus une réelle complication chez les patients porteurs de prothèses valvulaires mécaniques. Cependant, il existe souvent des stigmates biologiques d'hémolyse (haptoglobine basse, LDH élevée, et éventuelle présence de schizocytes). Une hémolyse intravasculaire modérée est observée chez 30% des patients portant deux valves mécaniques [27]. Quand elle existe, l'anémie est souvent plus prononcée chez les patients ayant une valve ne fonctionnant pas normalement. Ces hémolyses liées à une dysfonction du matériel (fuite, infection...) peuvent entraîner une ré-intervention. L'hémolyse chronique est fonction du type de la prothèse (à bille type Starr > à double ailettes type S¹ Jude > à disques type Bjork),

du site de la prothèse (aortique > mitral), du nombre de prothèse (2 > 1), et des paramètres cardiaque (rythme, pression, fibrillation auriculaire) [27,28]. La fragmentation mécanique des hématies a lieu sur les surfaces étrangères, dans des zones de fort gradient de pression et d'éventuelles turbulences. Ces hémolyses à minima sont responsables de pertes urinaires de fer et peuvent nécessiter une supplémentation martiale. Les hémolyses en relation avec les bio-prothèses sont beaucoup plus rares et sont généralement observées en position mitrale. Chez ce malade, la lecture du résultat graphique fourni par l'appareil de numération et l'observation du frottis met en évidence une anémie hémolytique mécanique importante (hémoglobine 6,1 g/dL, schizocytes 9%). Il s'agit probablement de la décompensation d'une hémolyse chronique, liée au contexte infectieux (septicémie) et au contexte hémodynamique précaire. Il faut également envisager l'association avec d'éventuelles pertes sanguines d'origine digestive (épisodes de méléna depuis décembre 1999 avec suspicion d'une angiodysplasie duodénale) mais qui semblent peu probables du fait de l'absence de microcytose. Il existe une différence importante entre la numération plaquettaire réalisée sur les différents automates, $175 \times 10^9/L$ sur H.2 Bayer Technicon et $281 \times 10^9/L$ sur Coulter STKS. Cette différence, trop importante pour correspondre à une simple variation statistique correspond probablement à une interférence liée aux schizocytes. Les automates y sont manifestement différemment sensibles, possiblement du fait de différences au niveau de leurs algorithmes de comptage des plaquettes à partir d'une extrapolation [29]. La courbe de distribution en volume des plaquettes sur Coulter STKS ne revient pas à la ligne de base mais est néanmoins lissée par l'automate, ce lissage abusif est probablement responsable d'une surestimation importante de l'aire sous la courbe (1/3 environ) et donc de la numération plaquettaire.

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I: Evolution des paramètres biologiques (observation présentée, phase terminale)

Figure 1 : Résultats graphiques de l'appareil (Coulter STKS)

Figure 2 : Résultats graphiques de l'appareil (H.2 Bayer Technicon)

Tableau I: Evolution des paramètres biologiques (observation présentée, phase terminale)

	23/05	24/05	25/05	28/05	30/05	02/06	06/06	08/06	11/06	12/06	15/06	18/06	19/06
Hémoglobine (g/dL)	8,9	9,3	9,4	9,1	8,7	7,7	7,6	7	6,1	6,2	8,7	8,3	7,8
Volume globulaire moyen	96,3	97,1	95,6	94,3	92,9	96,2	89,3	91	94,7	96	93,1	93,5	95,2
Index de distribution des hématies	20,4	19,4	20,5	21	21,2	20,6	22,4	23,3	24,8	25,9	24,5	24,8	24,8
Schizocytes (%)											6,5	9	
Plaquettes ($10^9/L$)	59	96	88	139	156	182	192	179	168	174	181	200	175
Leucocytes ($10^9/L$)	6,61	5,62	4,37	5,07	6,61	6,78	7,86	6,27	6,06	5,53	5,6	15,7	13,5

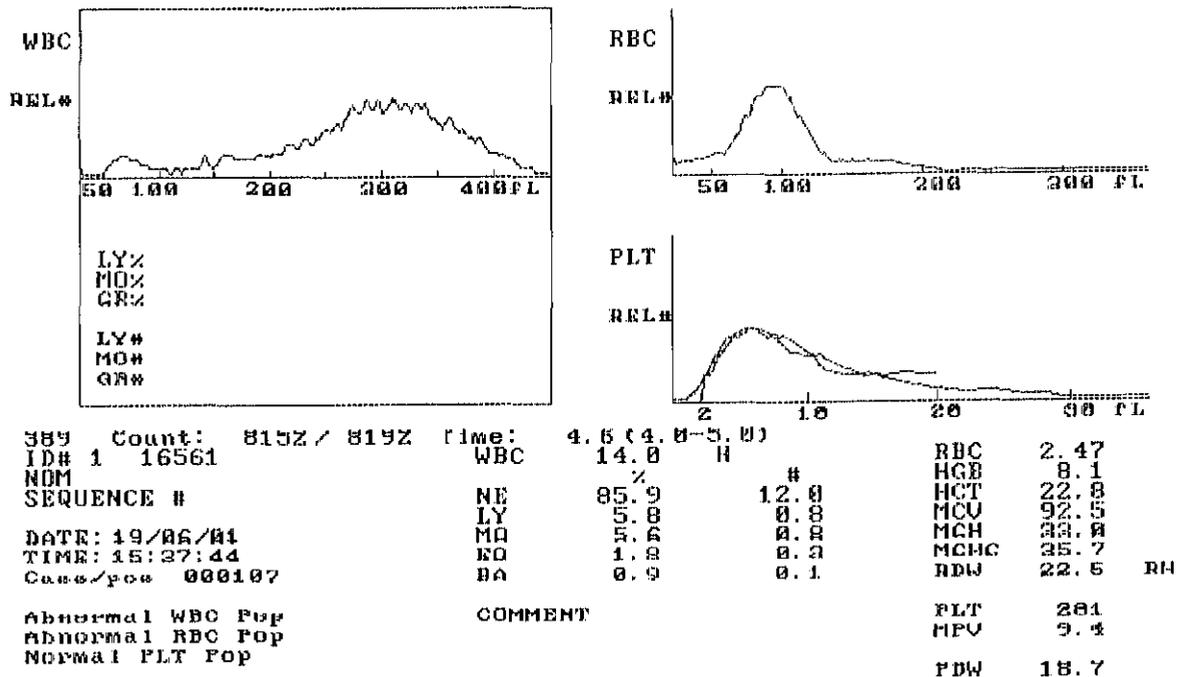


Figure 1 : Résultats graphiques de l'appareil (Coulter STKS)

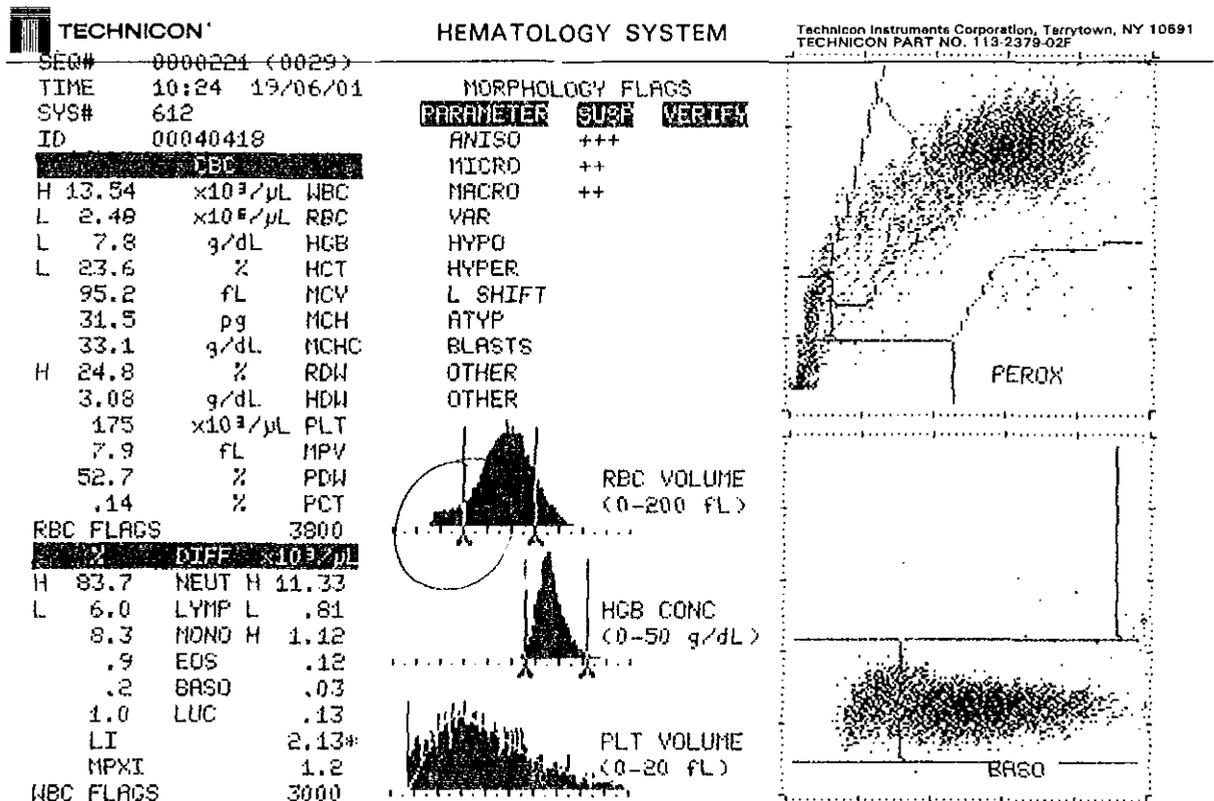


Figure 2 : Résultats graphiques de l'appareil (H.2 Bayer Technicon)

TROISIEME PARTIE

APPLICATION DU LOGICIEL D'ANALYSE D'IMAGES

A LA NUMERATION DES PLAQUETTES

I - LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE NUMERATION PLAQUETTAIRE

Dans les laboratoires d'analyses médicales, les numérations plaquettaires sont effectuées sur des appareils de numération qui permettent d'avoir un résultat rapide et suffisamment exact et reproductible. Mais les principes utilisant l'impédancemétrie (Coulter®) ou les comptages optiques peuvent être perturbés par la présence de fragments de globules rouges, de débris cellulaires, de plaquettes géantes, ou de particules lipidiques.... Leurs résultats sont alors à vérifier par d'autres techniques. En plus de leur sensibilité aux interférences, les appareils de numération manquent de précision et d'exactitude pour les numérations plaquettaires inférieures à $20 \times 10^9/L$, avec, souvent, une tendance à la surestimation [30].

Néanmoins, la technique de référence reste la numération optique en cellule de comptage par microscopie en contraste de phase. La numération peut être effectuée à partir d'un prélèvement veineux réalisé sur tube EDTA ou sur tube citrate, mais il est également possible d'utiliser un prélèvement capillaire. Il existe un système (Unopette®) permettant un prélèvement sanguin grâce à un capillaire de volume connu suivi d'une dilution dans une solution de lyse des globules rouges. Le principe paraît simple, mais la pratique montre qu'il est facile de confondre des plaquettes avec des débris. Cette technique n'est donc pas très reproductible et le coefficient de variation est de l'ordre de 10 à 25% [31]. De ce fait, elle est peu applicable en cas de thrombopénie marquée du fait de son imprécision. En pratique, l'utilisation de cette technique se limite donc au cas où l'appareil de numération est incapable de rendre un résultat exact du fait d'une interférence.

L'imprécision de ces techniques de numération plaquettaire pose un problème lors de l'utilisation clinique de ces résultats. En effet, les malades atteints de thrombopénies profondes présentent un risque majeur d'hémorragie, les hémorragies cérébrales comportent un risque important de décès et de séquelles. Ces malades bénéficient donc généralement d'une transfusion prophylactique de plaquettes, le seuil décisionnel habituellement utilisé est alors de $20 \times 10^9/L$. Il est possible que ce seuil soit abaissé à $10 \times 10^9/L$ ou même à $5 \times 10^9/L$, sans augmentation du risque hémorragique [32,33,34]. En pratique, l'utilisation de ce nouveau seuil est en fait difficilement applicable en raison du manque de précision et d'exactitude des appareils de numération pour les numérations inférieures à $20 \times 10^9/L$. Il est donc nécessaire d'établir une méthode de référence permettant d'effectuer une numération plaquettaire fiable dans toute la gamme des numérations plaquettaires rencontrées chez les malades. Cette méthode ne devra pas être sensible aux interférences (présence de fragments de globules rouges, de débris cellulaires ou de particules lipidiques), devra être précise en cas de thrombopénie profonde et savoir reconnaître les anomalies de la morphologie plaquettaire (essentiellement la présence de plaquettes géantes).

Assez récemment, deux techniques par cytométrie en flux se sont développées [35]. La première détermine le rapport globules rouges/plaquettes après les avoir séparés grâce à leur taille et au marquage spécifique réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre un antigène plaquettaire [31]. La numération est alors calculée à partir de la numération du nombre de globules rouges effectuée sur un appareil de numération classique. La seconde technique utilise des billes calibrées (système TruCOUNT®,

Becton Dickinson) introduites en quantité connue, la numération plaquettaire est alors déduite du rapport billes calibrées/plaquettes [30].

Le marquage par un anticorps dirigé contre un antigène plaquettaire spécifique permet de d'affranchir des interférences liées à la présence de débris cellulaires et élimine le problème de comptage rencontré avec les plaquettes géantes sur les appareils de numération classiques. Le principe de la cytométrie en flux permet une précision suffisante, sous réserve de compter un nombre suffisant d'évènements, le temps de l'analyse est alors fonction de la numération plaquettaire du malade. Les résultats publiés avec ces techniques montrent une précision suffisante, même en cas de thrombopénie profonde, le coefficient de variation se situe entre 5 et 10% [30,31]. La limite inférieure de quantification avec la technique utilisant les billes calibrées est de $1,1 \times 10^9/L$, et est linéaire dans cette zone de faible numération. Ces techniques par cytométrie en flux sont néanmoins relativement lourdes par rapport à une numération sur un appareil de numération et ne peuvent être utilisées en routine que lorsque le résultat rendu par l'appareil doit être vérifié.

Il est possible de réaliser une numération plaquettaire au microscope à partir d'un frottis coloré au May-Grünwald Giemsa. Le principe est de compter de façon précise le nombre de plaquettes pour un nombre de globules rouges donné puis d'appliquer ce rapport à la numération des globules rouges rendu par l'appareil de numération. Cette technique pose néanmoins le problème de la répartition homogène des plaquettes sur le frottis et du nombre de globules rouges à compter pour que le résultat soit suffisamment précis et statistiquement fiable.

II - QWIN ET LE COMPTAGE DES PLAQUETTES

II - 1- Principe

Le caractère fastidieux de la technique de numération plaquettaire sur frottis nous a incité à développer une technique automatisée en utilisant un logiciel d'analyse d'images qui permet une analyse fiable et rapide sur plusieurs milliers d'hématies, ce qui est très difficilement réalisable par l'œil. Le principe de fonctionnement est simple : le logiciel différencie les globules rouges et les plaquettes grâce à leur couleur. Les globules rouges sont alors considérés comme des éléments de couleur uniforme, de taille compatible et relativement circulaire, alors que les plaquettes sont reconnues sur leur couleur différente des globules rouges, puis triées en trois catégories en fonction de leur surface (plaquette de taille normale, macroplaquette, et plaquette géante). La coloration des plaquettes au May-Grünwald Giemsa étant hétérogène du fait de leur granulation (seuls les grains alpha sont colorés), le logiciel les reconnaît difficilement et peut commettre des erreurs d'identification. Nous avons donc utilisé une coloration immuno-histochimique sur lame grâce au kit EnVision (Dako), avec un marquage spécifique de glycoprotéines plaquettaires qui permet d'obtenir une coloration rouge homogène que le logiciel différencie aisément des globules rouges contre colorés à l'hématoxyline de Mayer. Lors de l'analyse, le logiciel détecte les plaquettes et les affiche en rouge à l'écran (figure 1).

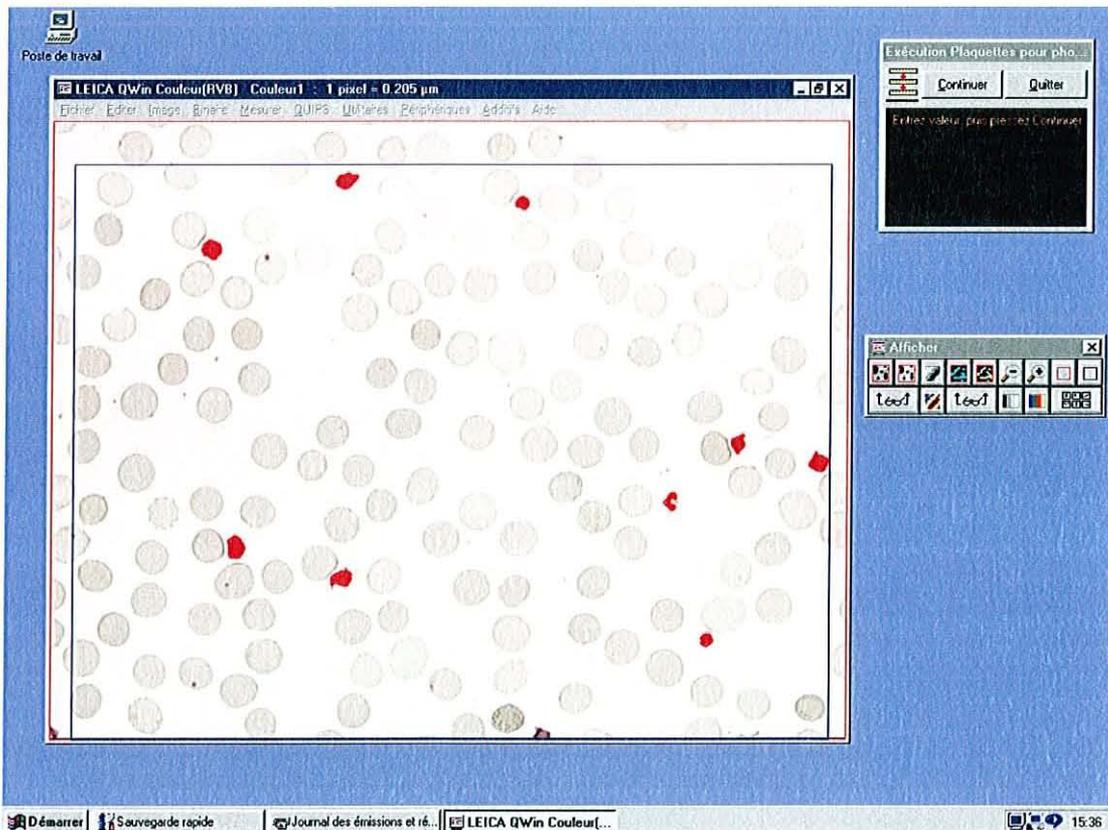


Figure 1 : Logiciel d'analyse d'images, écran d'analyse.

II - 2 - La coloration immuno-histochimique grâce au système DAKO EnVision®

Les techniques immuno-enzymatiques permettent la visualisation d'antigène cellulaire sur lame. Le principe est fondé sur l'immuno-révélation des antigènes cellulaires à l'aide de la production d'un substrat coloré au niveau des cellules d'intérêts. Les premières techniques immuno-enzymatiques ont utilisé des méthodes directes avec un anticorps primaire directement couplé à une enzyme. Ces techniques étant peu sensibles, des méthodes indirectes utilisant un anticorps secondaire couplé à l'enzyme ont été développées, permettant ainsi une amplification du signal. Ces méthodes en deux étapes utilisent un anticorps primaire dirigé contre l'antigène

d'intérêt puis un anticorps secondaire qui se lie sur l'anticorps primaire. Les techniques de révélation de ce complexe anticorps primaire/anticorps secondaire ont évolué avec l'apparition des techniques PAP (peroxydase-antiperoxydase) et APAAP (phosphatase alcaline – anti-phosphatase alcaline) où le conjugué sert de pont entre l'anticorps primaire et le complexe de révélation, puis des techniques utilisant les complexes Avidin-Biotin et Streptavidin-Biotin de forte affinité se liant sur l'anticorps secondaire biotinylé. L'Avidin ou la Streptavidin servent alors de support pour la phosphatase alcaline. L'intérêt de l'utilisation de ces complexes de forte affinité est l'amplification du signal et donc l'amélioration de la sensibilité de la technique. Le système DAKO EnVision® est basé sur l'utilisation d'un polymère marqué à la phosphatase alcaline conjugué à l'anticorps secondaire. Les intérêts de cette technique sont la rapidité et la simplicité d'utilisation par rapport aux techniques précédentes, la suppression de l'anticorps de liaison entre le conjugué et le complexe de révélation et l'absence de marquage non spécifique lié à une activité Avidin-Biotin endogène ou à l'activité peroxydase endogène présente notamment dans les polynucléaires et gênant les applications en hématologie. Le marquage non spécifique lié à l'activité phosphatase alcaline endogène présente dans de nombreux tissus est neutralisé par le levamisole. Les phosphatases utilisées sont d'origine placentaire et ne sont pas inhibées par le levamisole. La phosphatase alcaline est utilisée comme enzyme sur un substrat non coloré, le Fast Red. La phosphatase alcaline hydrolyse le groupement phosphate entraînant la libération du chromogène déphosphaté qui entraîne la formation d'un produit insoluble coloré en rouge qui précipite sur les membranes cellulaires. La coloration s'effectue en plusieurs étapes. Après la fixation dans un mélange méthanol-acétone, le frottis est incubé avec l'anticorps primaire dans une chambre humide, puis rincé dans un tampon PBS-Tween. Il est alors incubé avec

le conjugué composé d'anticorps anti-souris et anti-lapin, ce conjugué permet l'utilisation d'anticorps primaire de lapin ou d'origine murine. Le frottis est alors mis en contact avec la solution de chromogène puis rincé à l'eau distillée et contre coloré à l'hématoxyline. On utilise de l'hématoxyline de Mayer qui n'est pas alcoolisée et qui permet de colorer les globules rouges sans dissoudre le substrat coloré. Le précipité de substrat coloré est en effet soluble dans les produits organiques, les frottis ne doivent donc pas être observés directement à l'huile mais doivent être additionnés d'une lamelle grâce à une solution de montage non organique (Glycergel®).

III - COMPARAISON DES TECHNIQUES DE NUMERATION

III - 1 - Matériel et méthodes

Nous avons comparé un appareil de numération (H.2 Bayer Technicon) et la numération en contraste de phase réalisée par deux observateurs à deux nouvelles techniques mises au point dans le laboratoire, la cytométrie en flux avec un système de billes calibrées, et deux techniques de comptage sur frottis, l'une colorée au May-Grünwald Giemsa et comptée au microscope, et l'autre colorée par la technique immuno-histochimique et traitée par analyse d'images. Vingt-six échantillons sanguins provenant de malades hospitalisés dans divers services du CHU de NANCY ont été analysés (hémogramme, recueil dans des tubes Becton-Dickinson Vacutainer®, anticoagulant : EDTA). Ces spécimens ont été sélectionnés sur l'absence d'anomalies sur la lignée plaquettaire et sur l'absence d'alarmes sur l'appareil de numération (H.2 Bayer Technicon). Les frottis ont été étalés manuellement puis colorés par la technique de May-Grünwald Giemsa suivant les

procédés habituels. La coloration immuno-histochimique grâce au système DAKO EnVision® a utilisé un anti-CD 41 (anti-chaîne alpha^{Ib} de l'intégrine GP IIb-IIIa) comme anticorps primaire. Des essais ont été réalisés avec un anti-CD 42 (GP Ib-IX) et un anti-CD 61 (anti-GP IIIa), avec des résultats légèrement inférieurs concernant la qualité de la coloration.

III - 2 - Résultats

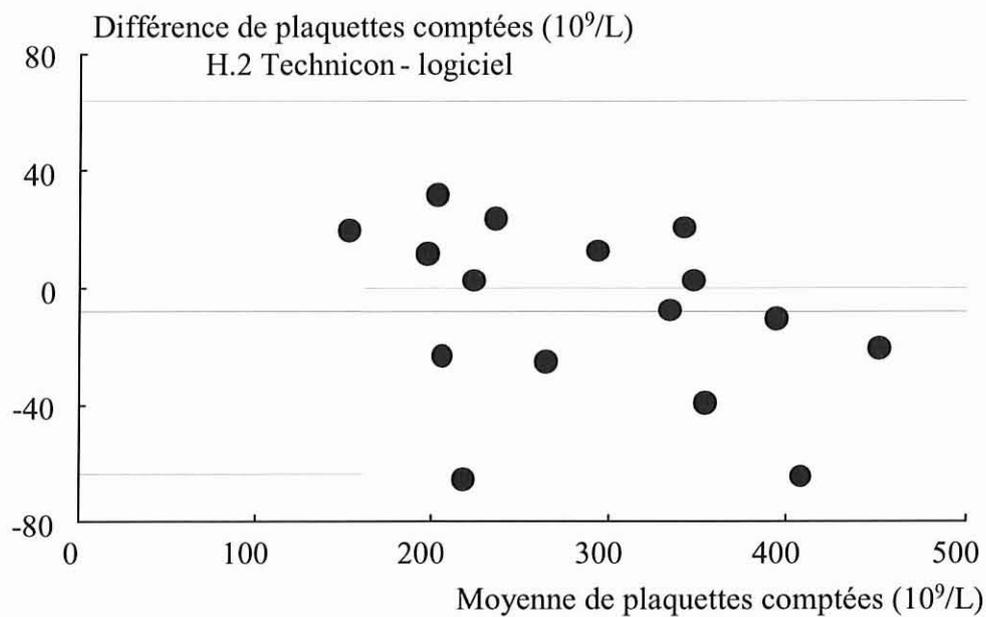
Pour l'analyse sur frottis grâce au logiciel d'analyse d'images, 20 champs microscopiques ont été numérisés par frottis (objectif x40 à immersion, grossissement total x400) dans la zone d'étalement uniforme des hématies. Après analyse informatique, environ 2500 hématies ont été comptées en moyenne pour chaque frottis analysé (moyenne \pm écart-type : 2487 ± 322).

Les résultats sont présentés séparément mais l'ensemble sera regroupé dans un tableau pour faciliter la lecture comparative (cf III - 2 - 11).

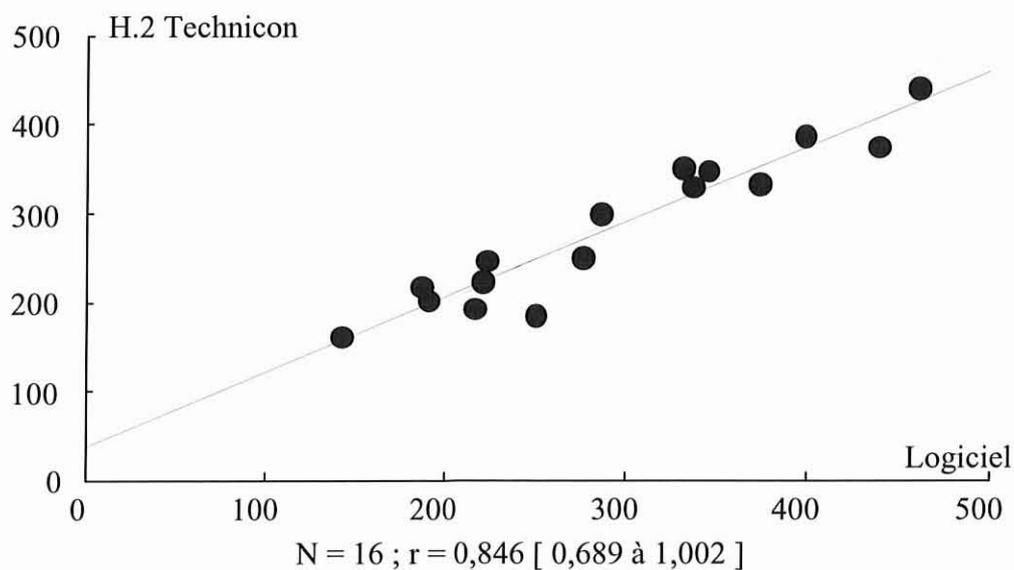
III - 2 - 1 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – H.2 BAYER TECHNICON

La comparaison des résultats des numérations réalisées par le logiciel d'analyse d'images et par notre appareil de numération (H.2 Bayer Technicon) montre une correspondance relativement bonne des résultats (coefficient de corrélation : 0,85). En moyenne, le logiciel trouve $7,8 \times 10^9/L$ plaquettes de plus que notre appareil de numération, mais l'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence que l'appareil de numération a tendance à se situer au-dessus du logiciel

d'analyse pour les numérations les plus basses alors que la tendance s'inverse pour les numérations plus élevées.

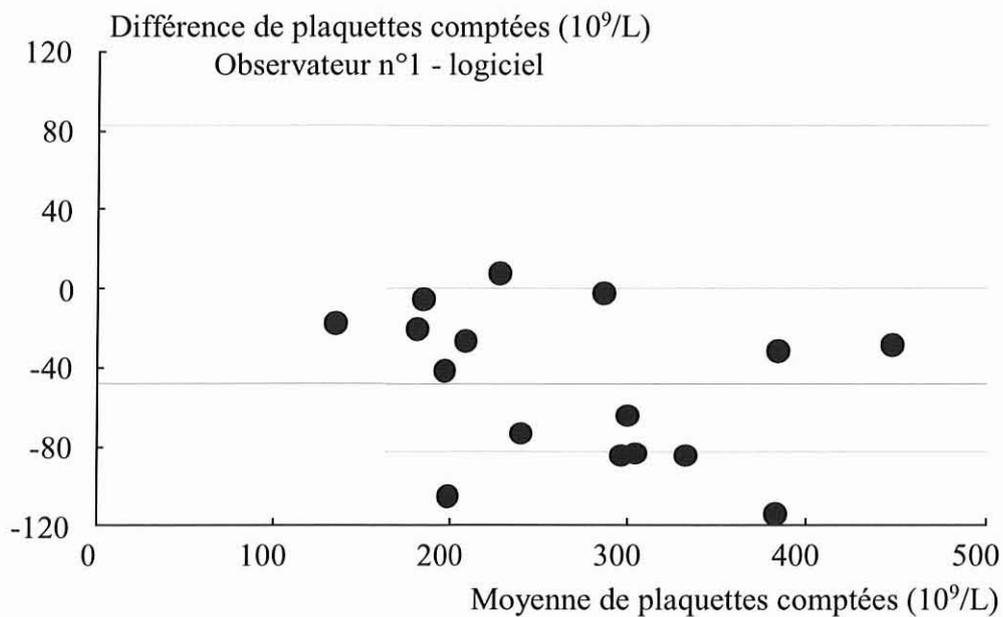


N = 16 ; Moyenne des différences : -7,81 [-23,7 à 8,08]

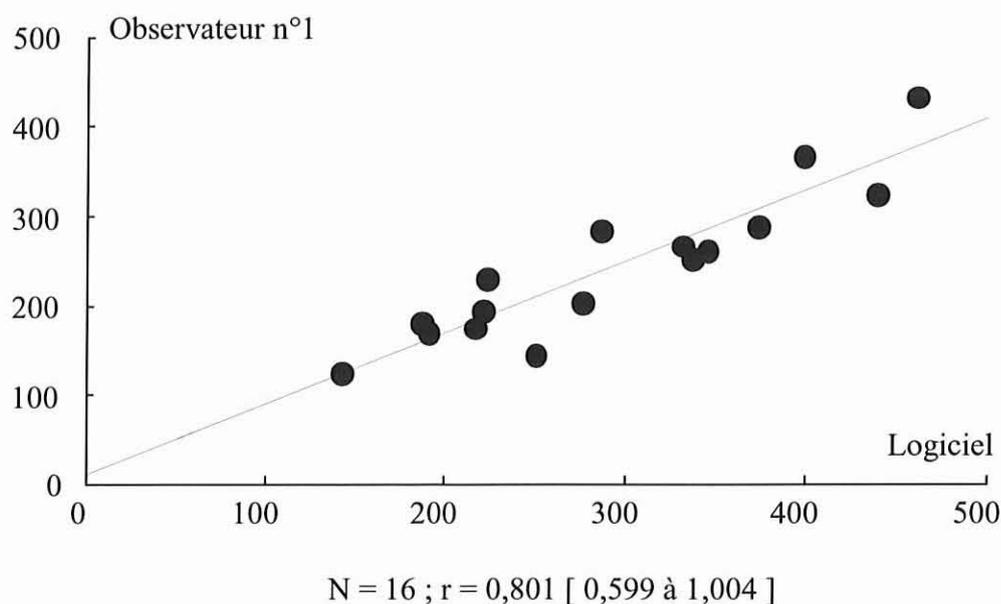


III - 2 - 2 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – UNOPETTE OBSERVATEUR N°1

La comparaison des résultats des numérations réalisées par le logiciel d'analyse d'images et par la technique Unopette réalisée par l'observateur n°1 montre une relativement bonne correspondance des résultats (coefficient de corrélation : 0,80). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une erreur systématique ; le logiciel trouve une numération systématiquement supérieure à la technique Unopette réalisée par l'observateur n°1 ($48,1 \times 10^9/L$ en moyenne).

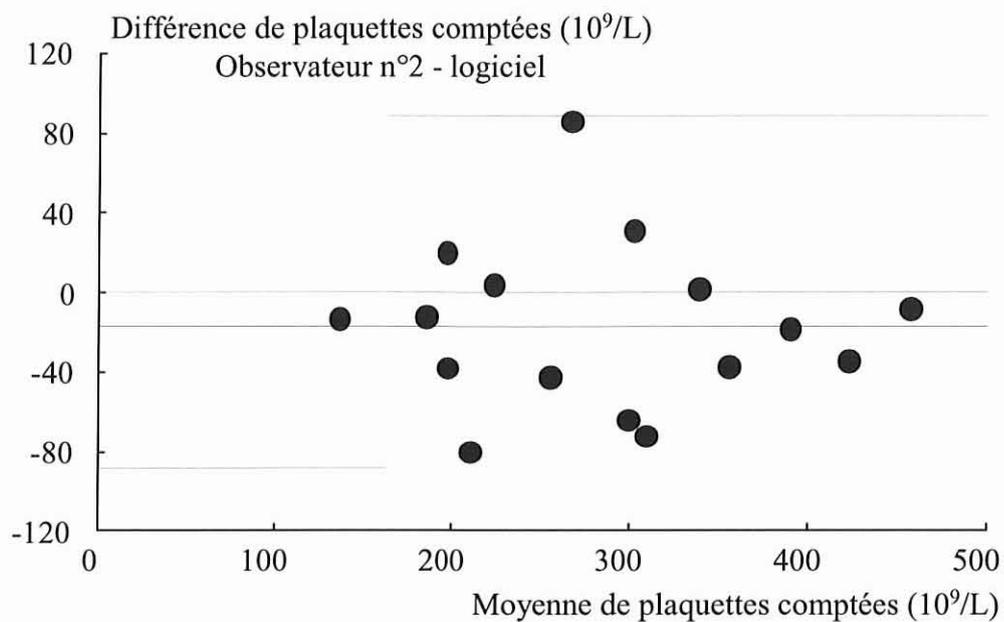


N = 16 ; Moyenne des différences : -48,1 [-68,6 à -27,5]

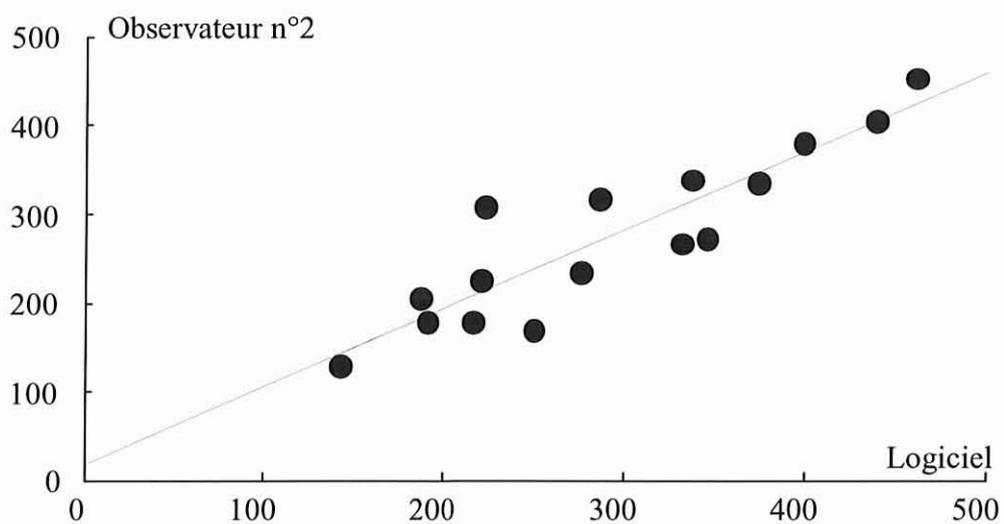


III - 2 - 3 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – UNOPETTE OBSERVATEUR N°2

La comparaison des résultats des numérations réalisées par le logiciel d'analyse d'images et par la technique Unopette réalisée par l'observateur n°2 montre une relativement bonne correspondance des résultats (coefficient de corrélation : 0,88). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une répartition aléatoire autour de la moyenne ; le logiciel trouve une numération supérieure de $17,2 \times 10^9/L$ plaquettes, en moyenne, à la technique Unopette réalisée par l'observateur n°2.



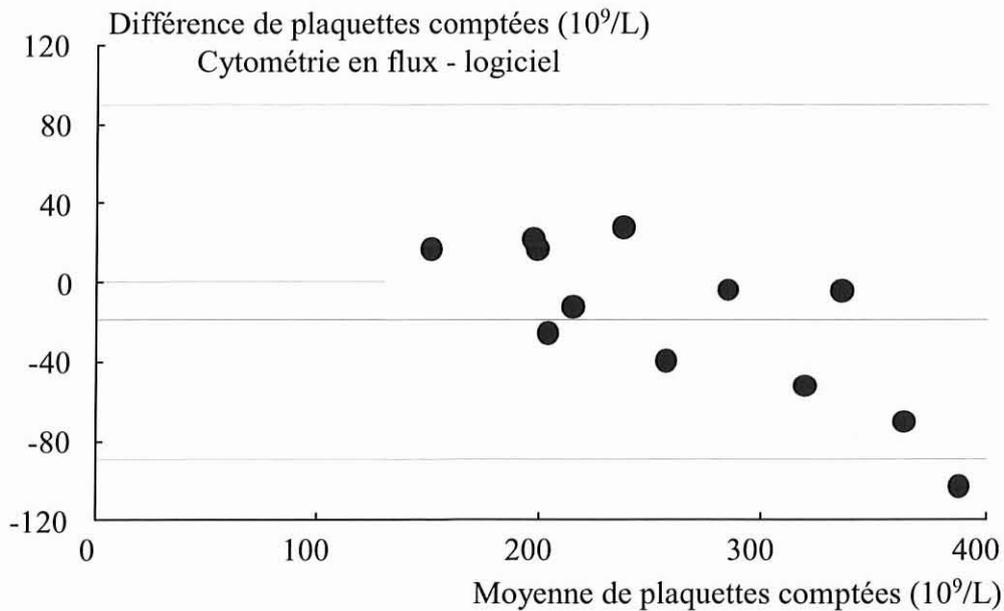
N = 16 : Moyenne des différences : -17,2 [-39,4 à 5,06]



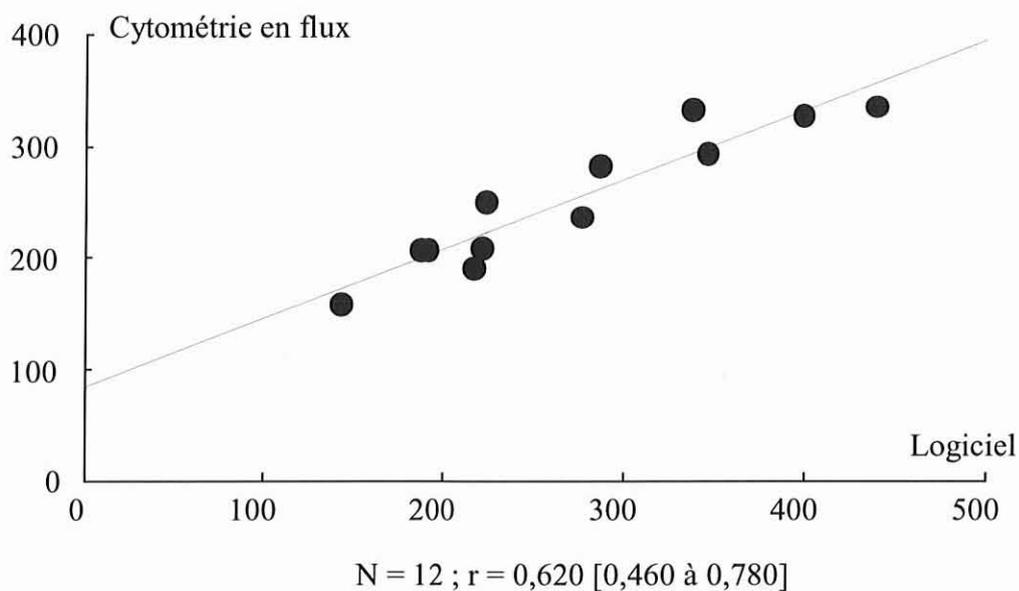
N = 16 ; r = 0,883 [0,641 à 1,126]

III - 2 - 4 - COMPARAISON LOGICIEL QWIN – CYTOMETRIE EN FLUX

La comparaison des résultats des numérations réalisées par le logiciel d'analyse d'images et avec la technique par cytométrie en flux montre une mauvaise correspondance des résultats (coefficient de corrélation : 0,62). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une répartition aléatoire autour de la moyenne associée à une dérive pour les numérations élevées, la technique par cytométrie en flux sous-estime alors les résultats. Le logiciel trouve une numération supérieure de $18,7 \times 10^9/L$ plaquettes, en moyenne, à la technique par cytométrie en flux.



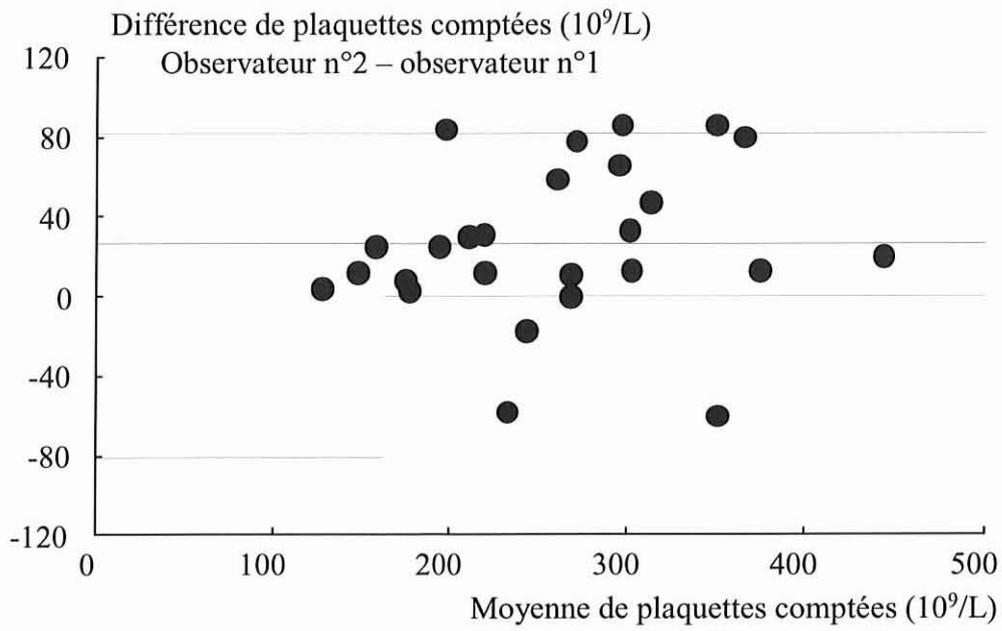
N = 12 ; Moyenne des différences : -18,7 [-44,5 à 7,12]



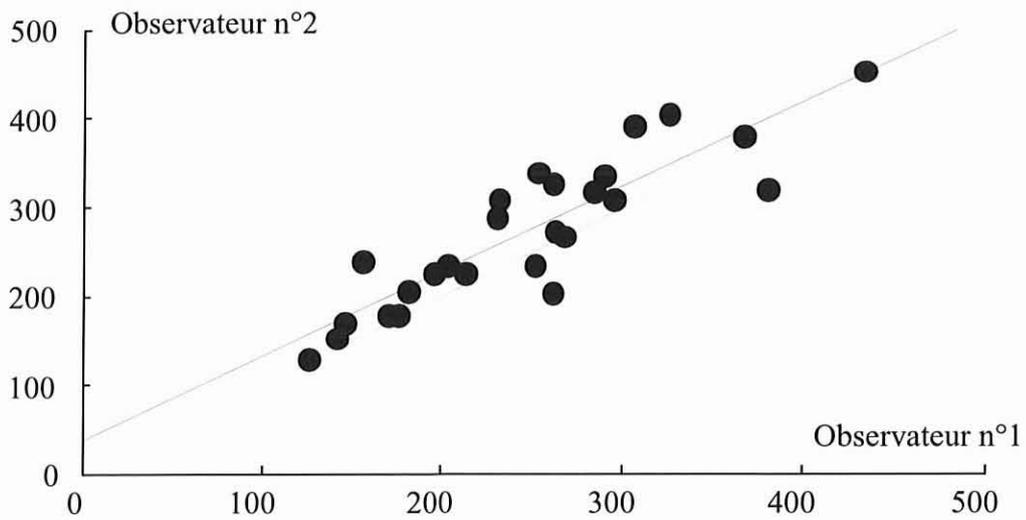
III - 2 - 5 - COMPARAISON UNOPETTE OBSERVATEUR N°1 – UNOPETTE

OBSERVATEUR N°2

La comparaison des résultats des numérations réalisées par technique Unopette réalisée par les deux observateurs montre une bonne correspondance des résultats (coefficient de corrélation : 0,96). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une différence systématique, l'observateur n°2 trouve presque systématiquement un résultat plus élevé que l'observateur n°1 ($26,6 \times 10^9/L$ plaquettes de plus, en moyenne).



N = 26 ; Moyenne des différences : 26,6 [10,7 à 42,5]

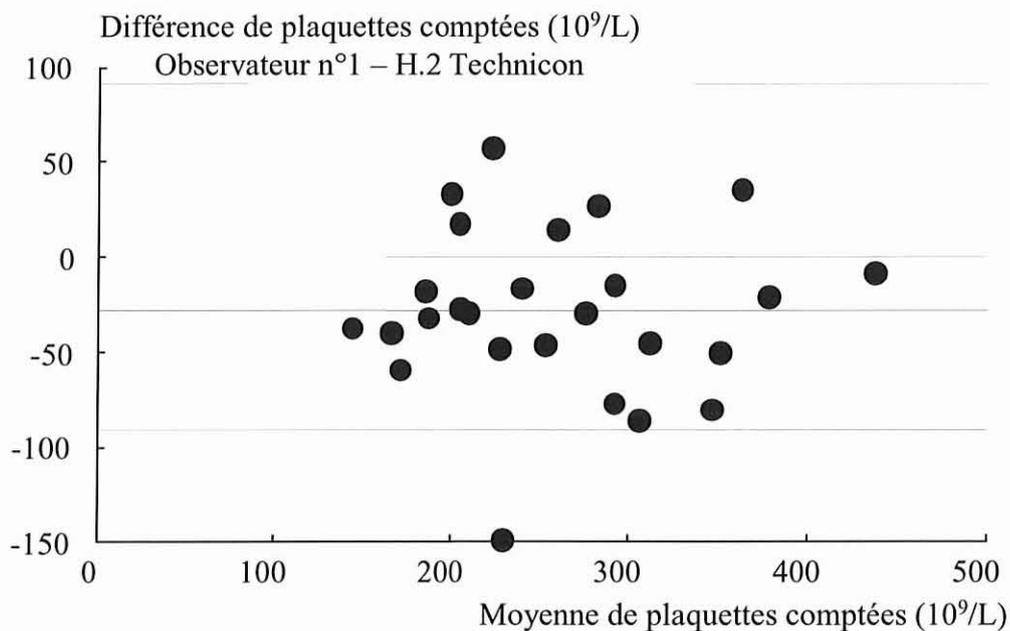


N = 26 ; r : 0,958 [0,744 à 1,171]

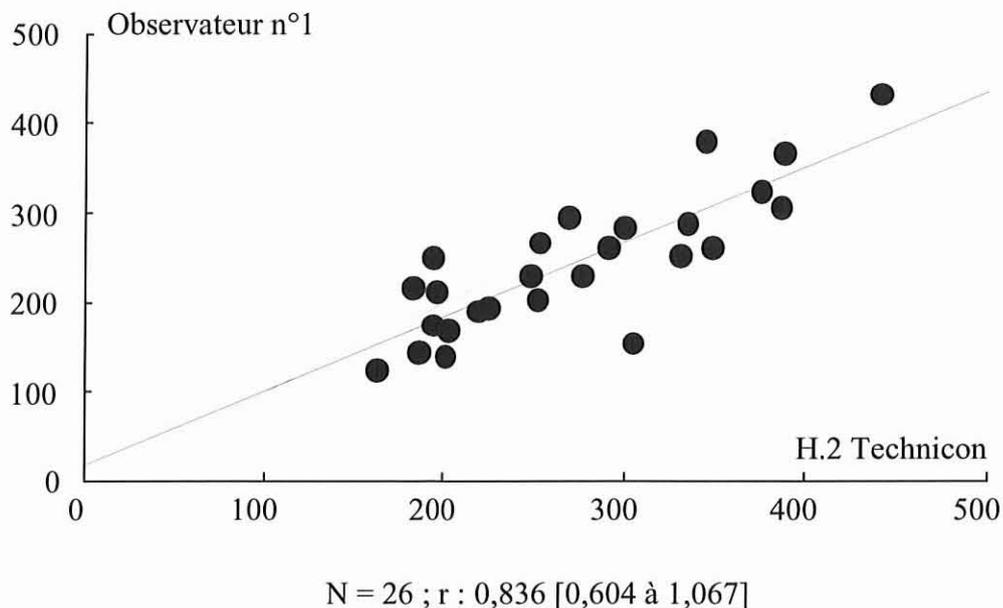
III - 2 - 6 - COMPARAISON UNOPETTE OBSERVATEUR N°1 – H.2 BAYER

TECHNICON

La comparaison des résultats des numérations réalisées avec la technique Unopette par l'observateur n°1 et par l'appareil de numération (H.2 Bayer Technicon) montre une relativement bonne correspondance des résultats (coefficient de corrélation : 0,84). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une répartition aléatoire autour de la moyenne, l'appareil de numération trouve une numération supérieure de 27,8 x 10⁹/L plaquettes, en moyenne, à la technique Unopette réalisée par l'observateur n°1.



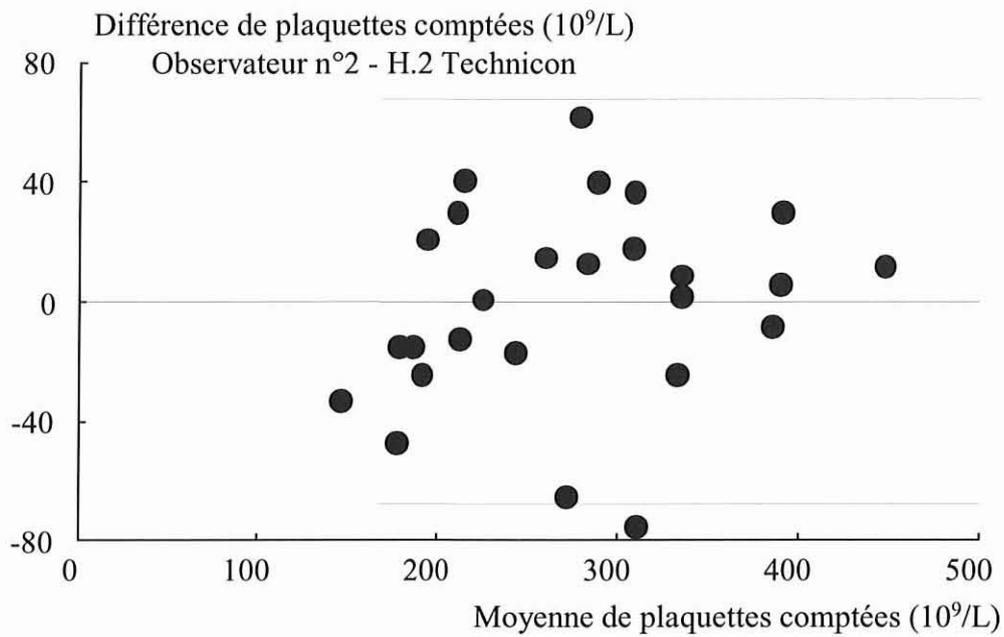
N = 26 ; Moyenne des différences : -27,8 [-45,7 à -9,96]



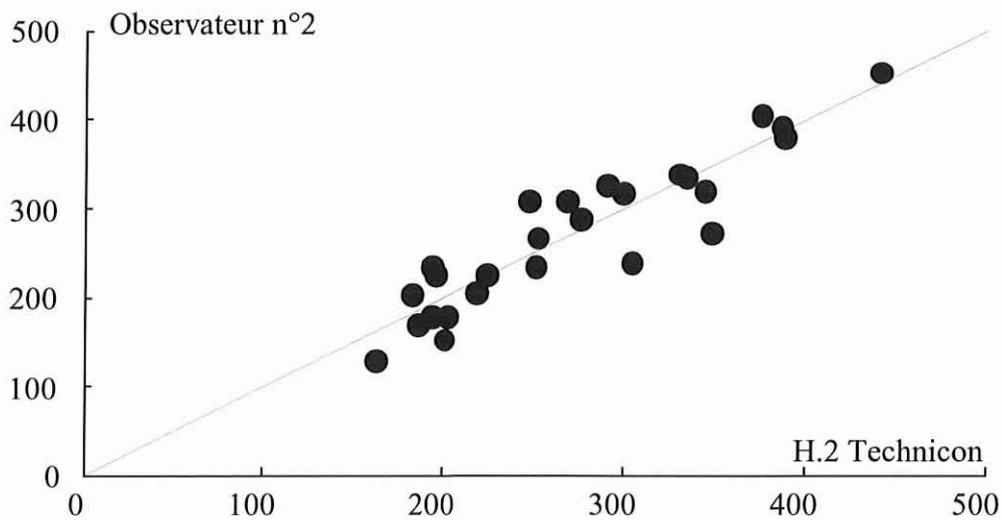
III - 2 - 7 - COMPARAISON UNOPETTE OBSERVATEUR N°2 – H.2 BAYER

TECHNICON

La comparaison des résultats des numérations réalisées avec la technique Unopette par l'observateur n°2 et par l'appareil de numération (H.2 Bayer Technicon) montre une très bonne correspondance des résultats (coefficient de corrélation : 1). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une répartition aléatoire autour de la moyenne, des différences de $80 \times 10^9/L$ sont possibles pour certaine numération, même si les écarts se situent généralement dans un intervalle de $40 \times 10^9/L$ et que la moyenne ne montre pas de différence.



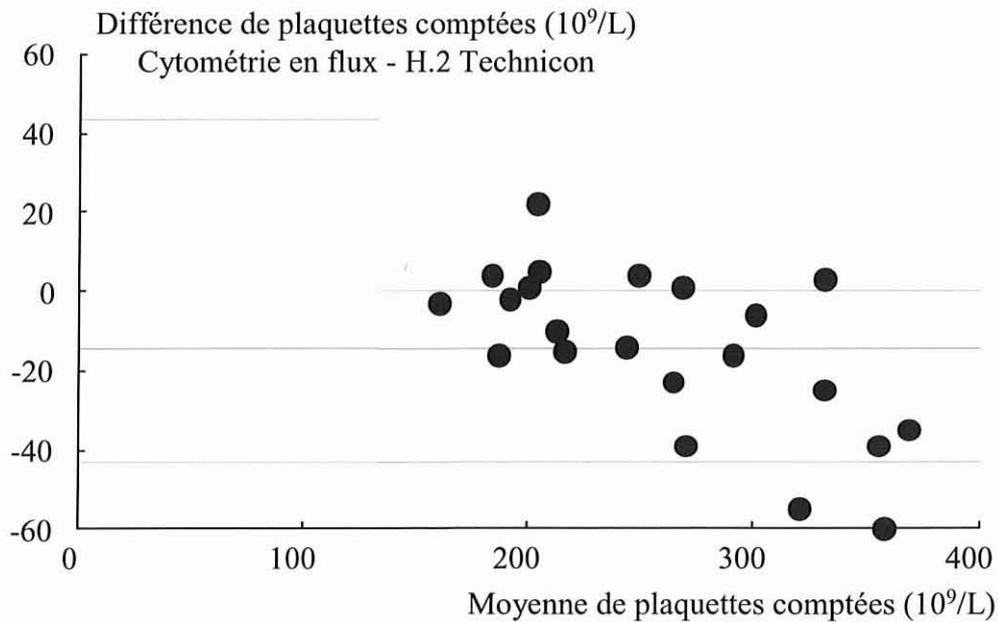
N = 26 ; Moyenne des différences : 0,077 [-13,2 à 13,3]



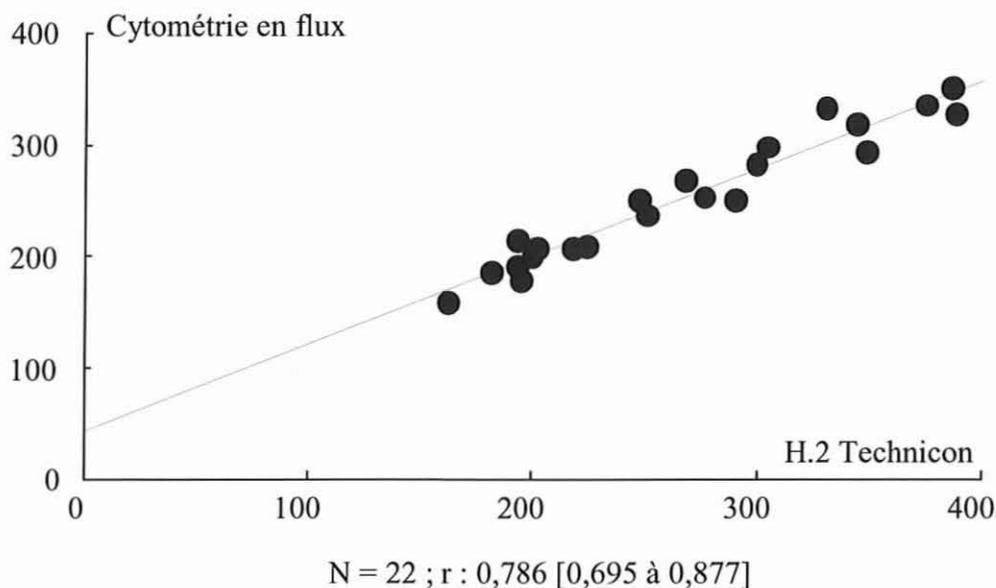
N = 26 ; $r = 0,999$ [0,820 à 1,179]

TECHNICON

La comparaison des résultats des numérations réalisées avec la technique par cytométrie en flux et par l'appareil de numération (H.2 Bayer Technicon) montre une relativement bonne correspondance des résultats (coefficient de corrélation : 0,79). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une erreur systématique augmentant avec les numérations élevées, l'appareil de numération trouve une numération supérieure de $14,5 \times 10^9/L$ plaquettes, en moyenne, à la technique par cytométrie en flux.



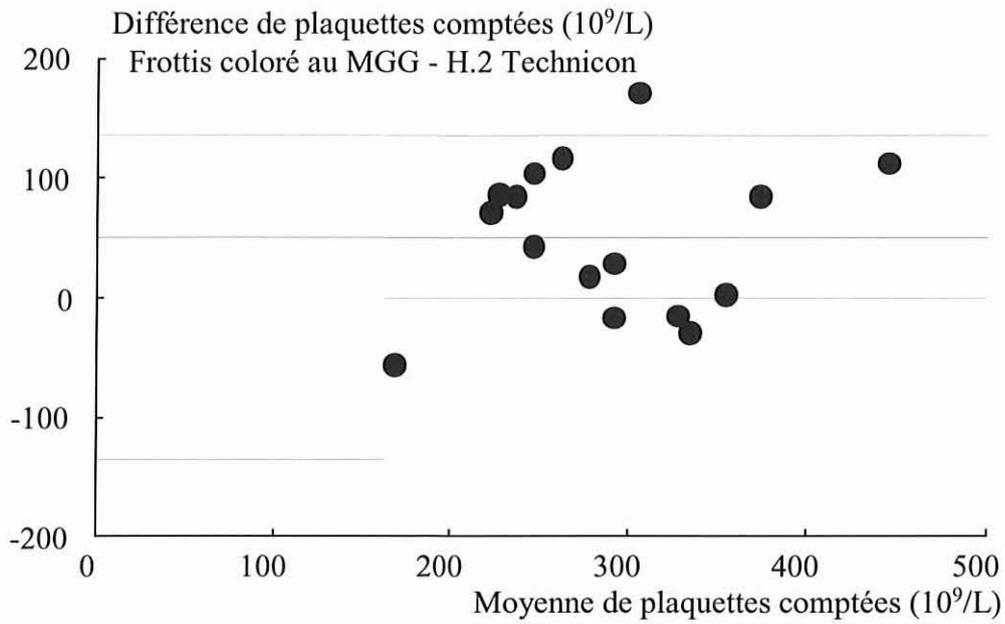
N = 22 ; Moyenne des différences : -14,5 [-23,7 à -5,23]



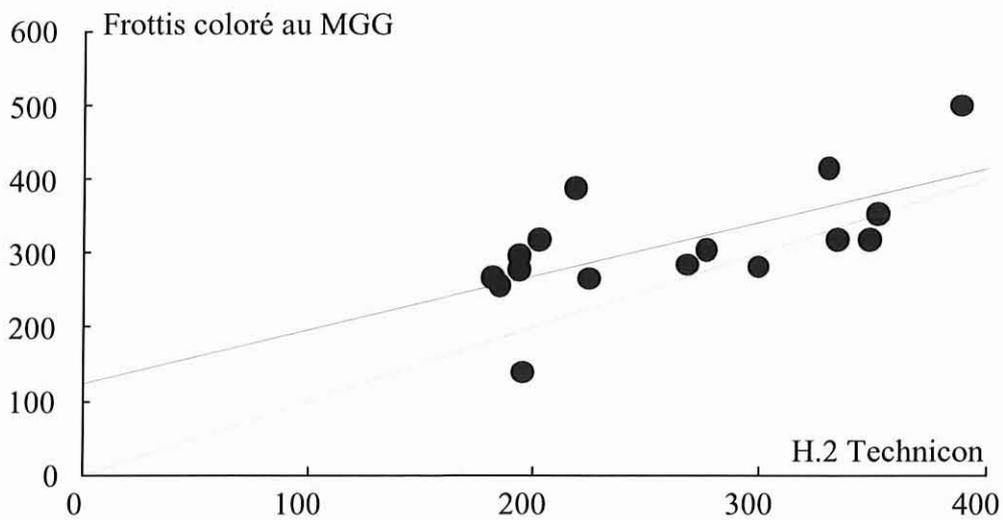
III - 2 - 9 - COMPARAISON FROTTIS COLORE AU MAY-GRÜNWARD

GIEMSA – H.2 BAYER TECHNICON

La comparaison des résultats des numérations réalisées par un observateur sur frottis colorés au May-Grünwald Giemsa et par l'appareil de numération (H.2 Bayer Technicon) montre une correspondance relativement médiocre des résultats (coefficient de corrélation : 0,72). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman met en évidence une erreur systématique, l'observateur trouve une numération systématiquement supérieure à la numération réalisée sur l'appareil de numération ($51,1 \times 10^9/L$ en moyenne).



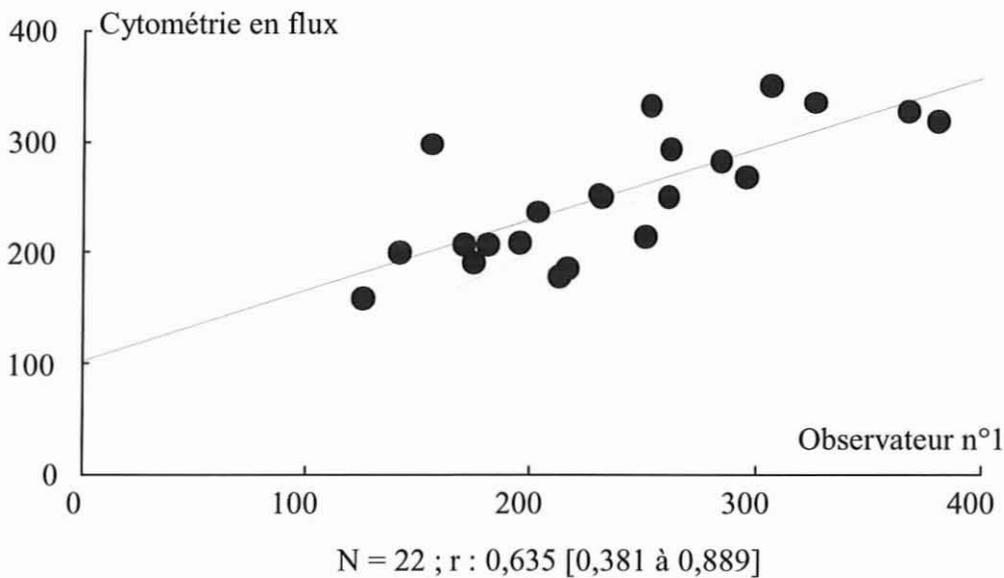
N = 16 ; Moyenne des différences : 51,1 [17,3 à 84,8]

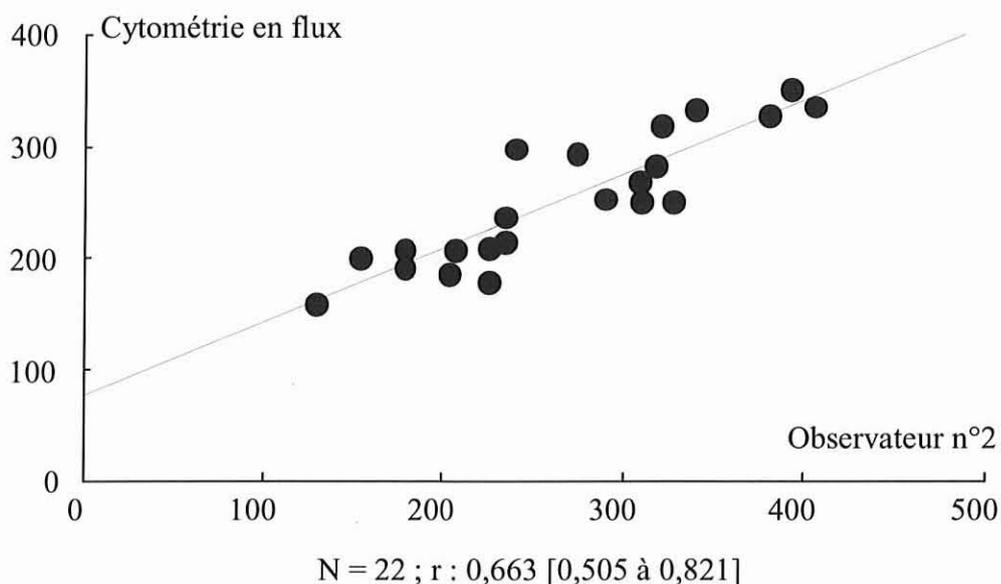


N = 16 ; r : 0,722 [0,237 à 1,206]

III - 2 - 10 - COMPARAISON CYTOMETRIE EN FLUX – UNOPETTE

La comparaison des résultats des numérations réalisées avec la technique par cytométrie en flux et par la technique Unopette montre une correspondance médiocre des résultats (coefficient de corrélation : 0,64 pour l'observateur n°1 et 0,66 pour l'observateur n°2). L'observation de la représentation graphique de Bland et Altman (non représenté) met en évidence une dispersion importante des résultats, la cytométrie en flux a tendance à se situer au-dessus de la technique Unopette pour les numérations les plus basses alors que la tendance s'inverse pour les numérations plus élevées.





III - 2 - 11 - SYNTHÈSE DES RESULTATS

	H.2 Technicon	Logiciel QWin	Unopette observateur n°1	Unopette observateur n°2	Cytométrie en flux
H.2 Technicon		r = 0,85 M.D. = 7,8	r = 0,84 M.D. = -27,8	r = 1 M.D. = 0,1	r = 0,79 M.D. = -14,5
Logiciel QWin	r = 0,85 M.D. = -7,8		r = 0,80 M.D. = -48,1	r = 0,88 M.D. = -17,2	r = 0,62 M.D. = -18,7
Unopette observateur n°1	r = 0,84 M.D. = 27,8	r = 0,80 M.D. = 48,1		r = 0,96 M.D. = 26,6	r = 0,64 M.D. = 15,4
Unopette observateur n°2	r = 1 M.D. = -0,1	r = 0,88 M.D. = 17,2	r = 0,96 M.D. = -26,6		r = 0,66 M.D. = -13,9
Cytométrie en flux	r = 0,79 M.D. = 14,5	r = 0,62 M.D. = 18,7	r = 0,64 M.D. = -15,4	r = 0,66 M.D. = 13,9	

Tableau récapitulatif des résultats : Résultats des comparaisons des techniques (r : coefficient de corrélation, M.D. : moyenne des différences, la différence s'effectue dans le sens de la flèche).

III - 3 - Discussion

L'analyse des résultats des numérations effectuées avec la technique Unopette, le logiciel d'analyse d'images et la cytométrie en flux montrent une relativement bonne corrélation à la numération réalisée avec l'appareil de numération. La numération sur automate sert ici de référence (aucun problème de numération plaquettaire n'a été constaté). Ces résultats suggèrent que toutes ces techniques fournissent des résultats cohérents avec la numération fournie par l'appareil de numération, mais avec un certain degré d'imprécision et d'exactitude qui est fonction de la technique et de ces caractéristiques.

La comparaison des résultats obtenus par la technique Unopette montre une bonne corrélation entre les deux observateurs, malgré la présence d'un biais systématique. Cette différence souligne bien la difficulté d'effectuer une numération plaquettaire grâce à cette technique, il est en effet facile de confondre plaquettes et débris cellulaires ou de prendre une plaquette de forme atypique ou peu réfringente pour un débris. Les résultats montrent également une bonne corrélation avec la numération réalisée par l'appareil de numération, et ce quel que soit l'observateur, malgré un biais avec l'observateur n°1 et la présence d'une différence pouvant atteindre 40 à 80 x 10⁹/L plaquettes. La technique Unopette permet donc de réaliser des numérations peu précises mais relativement exactes pour peu que l'opérateur soit un peu entraîné.

La comparaison des résultats obtenus par cytométrie en flux montre une assez bonne corrélation avec l'appareil. La technique par cytométrie en flux a cependant

tendance à sous-estimer la numération (de 40 à 60 x 10⁹/L) et ceci surtout pour les numérations les plus élevées. Par contre, les corrélations obtenues avec les résultats obtenus par technique Unopette sont assez mauvaises quel que soit l'observateur. Cependant, ces mauvais résultats s'expliquent par un problème technique sur le cytomètre et sont donc difficiles à interpréter. Il serait donc nécessaire de réaliser de nouveaux essais de corrélation qui montreraient très probablement de meilleurs résultats. Cette technique par cytométrie en flux est en effet théoriquement exacte et précise.

Les numérations sur frottis colorés au May-Grünwald Giemsa par le cytologiste sont relativement mal corrélées avec la numération effectuée sur l'appareil de numération ; il existe une erreur systématique, le cytologiste sur estime presque systématiquement la numération plaquettaire. Les résultats sont également mal corrélés aux autres techniques. Ces résultats soulignent bien la difficulté d'effectuer un comptage précis au microscope et la difficulté pour l'œil humain de compter autant de cellules.

Les résultats des numérations plaquettaires obtenues avec le logiciel d'analyse d'images et les comparaisons avec les autres techniques permettent d'aboutir à plusieurs conclusions. Les résultats fournis par le logiciel QWin sont relativement bien corrélés aux résultats de l'appareil de numération, même si des écarts de 40 x 10⁹/L sont fréquents. La comparaison avec la technique Unopette met en évidence une relativement bonne concordance des résultats, malgré la présence d'une différence systématique avec l'observateur n°1. La comparaison avec la technique par

cytométrie en flux est peu interprétable du fait d'un effectif trop faible mais montre une mauvaise corrélation.

Cette nouvelle technique de numération plaquettaire par analyse d'image permet de fournir des résultats qui semblent relativement exacts, mais comporte un certain degré d'imprécision. Il est théoriquement possible d'améliorer la précision en augmentant le nombre de globules rouges comptés et donc le nombre de champs analysés. Cette technique est néanmoins relativement longue, non pas du fait de l'analyse informatique qui est automatique et prend une dizaine de minutes pour le traitement d'une vingtaine de champs mais du fait de la coloration immuno-histochimique grâce au kit EnVision® qui dure environ 1h30. Cette nouvelle technique est donc difficile à appliquer en routine, mais elle peut présenter un intérêt pour l'analyse morphologique en fournissant une analyse sur la proportion de macroplaquettes et de plaquettes géantes dans les cas de thrombopénie avec présence de plaquettes de grande taille. L'analyse de frottis colorés au May-Grünwald Giemsa fonctionne mal du fait d'un trop faible contraste des couleurs et d'une coloration exclusive des grains alpha qui rend la périphérie des plaquettes trop claire pour être reconnues par le logiciel d'analyse. L'exactitude de la numération plaquettaire réalisée grâce au logiciel d'analyse d'images sur des frottis colorés par technique immuno-histochimique, sous réserve de la répartition homogène des plaquettes sur le frottis, est liée à la présence de faux positifs ou de faux négatifs. La précision de la méthode est quant à elle fonction de l'erreur statistique et est donc directement liée au nombre d'hématies comptées et donc au nombre de champs analysés. La qualité du frottis et des images numérisées est donc indispensable au bon déroulement de l'analyse et permet d'éviter que des faux positifs ou des faux négatifs ne viennent fausser le résultat. Les causes de faux positifs sont multiples et peuvent

correspondent à des taches résultant d'un dépôt non spécifique du chromogène, qui sont alors comptées comme des plaquettes. Il peut également s'agir d'une erreur d'analyse, le logiciel peut former deux plaquettes de petite taille à partir de la segmentation d'une plaquette dont le centre est un peu trop clair. Mais la numération plaquettaire peut également être surestimée par la sous-estimation du nombre de globules rouges lors de l'analyse, ce phénomène est généralement lié à la présence d'hématies mal colorées, trop claires qui ne seront pas détectées ou à la présence d'amas ou de globules rouges juxtaposés qui ne sont éliminés lors du traitement de l'image. Les faux négatifs sont généralement liés à une coloration insuffisante de certaines plaquettes qui ne seront pas comptées lors de l'analyse, mais il peut également s'agir d'une erreur d'analyse où deux plaquettes accolées sont prises pour une plaquette géante, entraînant non seulement une sous estimation de la numération plaquettaire, mais aussi une erreur dans leur interprétation morphologique.

IV - CAS CLINIQUE

IV - 1 - Exemple d'une macrothrombocytopénie constitutionnelle

OBSERVATION CLINIQUE

Madame L, âgée de 31 ans, consulte en mai 2001 dans le service d'hématologie biologique pour exploration complémentaire d'une macrothrombocytopénie familiale (thrombopénie à plaquettes de grande taille, de transmission autosomique dominante). Les examens réalisés au cours d'une consultation précédente (février 2000) avaient montré une thrombopénie à $100 \times 10^9/L$. L'appareil de numération avait été incapable de compter les plaquettes (courbe de plaquettes irrégulière, sans possibilité de lissage) et la numération avait été réalisée grâce à la technique Unopette. L'examen du frottis avait alors mis en évidence une anisocytose plaquettaire avec présence de macroplaquettes et de quelques plaquettes géantes. Les granulations alpha étaient présentes, et il n'avait pas été observé d'amas plaquettaires ni de phénomène de satellitisme. L'examen attentif de 100 polynucléaires n'avait pas mis en évidence de corps de Döhle. Le reste de l'hémogramme était normal. Le temps de Quick et le temps de céphaline avec activateur étaient normaux. Le diagnostic de macrothrombocytopénie familiale a alors été retenu sur les critères suivant : absence d'histoire hémorragique, caractère autosomique dominant de la transmission [38]. Le père de la patiente présente en effet une thrombopénie du même type, et de nombreux membres de la famille sont également atteints (4 des 6 oncles et tantes, figure 1).

L'hémogramme réalisé à l'occasion de cette nouvelle consultation confirme la thrombopénie, sans anomalie associée. La numération est réalisée grâce à la technique

Unopette et donne un résultat de $55 \times 10^9/L$ sur EDTA. L'appareil de numération (H.2 Bayer Technicon) sous estime franchement la numération plaquettaire ($33 \times 10^9/L$ sur EDTA) mais le résultat imprimé de l'appareil de numération ne permet pas de suspecter la présence de plaquettes de grandes tailles (figure 2). Par ailleurs, l'appareil de numération Coulter STKS est complètement incapable de compter les plaquettes de cette patiente ($3 \times 10^9/L$ sur EDTA), mais il met bien en évidence l'anomalie (courbe de plaquettes irrégulière, sans possibilité de lissage, épaulement à gauche du graphique LMG, figure 3). L'examen du frottis coloré au May-Grünwald Giemsa confirme l'anisocytose plaquettaire avec présence de macroplaquettes et de quelques plaquettes géantes (figures 4,5,6). Les granulations alpha sont présentes, et il n'y pas amas plaquettaires ni de phénomène de satellitisme. Néanmoins, certains polynucléaires neutrophiles présentent des formations de couleur bleu pâle d'aspect et de distribution hétérogènes, pouvant évoquer des corps de Döhle, sans être "caractéristiques". L'analyse morphométrique réalisée grâce au logiciel d'analyse d'images, réalisée sur 2350 hématies, trouve une numération plaquettaire à $58 \times 10^9/L$ sur EDTA, comportant 62% de macroplaquettes et 15% de plaquettes géantes.

Les tests fonctionnels plaquettaires réalisés sur sang total et sur plasma riche en plaquettes ne montrent pas d'anomalie. L'agglutination à la ristocétine, l'agrégation au collagène, à l'ADP et à l'acide arachidonique sont normales. L'étude des fonctions procoagulantes plaquettaires montre une prothrombine sérique résiduelle légèrement augmentée à deux reprises (13 et 14%, $N < 10\%$) (dosage de la prothrombine résiduelle après coagulation du sang total dans un tube en verre pendant 4 heures à $37^\circ C$), évoquant une possible anomalie de l'exposition des phospholipides procoagulant. L'étude du complexe GP Ib/IX/V réalisée par cytométrie en flux ne met pas en évidence d'anomalie (figure 4). L'intensité de fluorescence supérieure au témoin

visualisé sur les cytogrammes traduit en fait le nombre supérieur de complexe GP Ib/IX/V du fait de la taille supérieure de la plaquette.

DISCUSSION

Les thrombopénies à plaquettes de grande taille posent souvent un problème de reconnaissance et le diagnostic est souvent posé secondairement après la découverte des anomalies de la morphologie plaquettaire. L'examen du frottis est donc indispensable pour éviter d'éventuelles explorations complémentaires inutiles (myélogramme par exemple) et une escalade thérapeutique inefficace (corticothérapie) [38]. L'examen attentif du résultat imprimé de l'appareil de numération met en évidence la courbe de distribution plaquettaire qui est caractéristique, avec un aspect irrégulier et l'absence de lissage. Les macroplaquettes et les plaquettes géantes sont également visualisées par l'épaule à gauche de la courbe de distribution des leucocytes. L'appareil de numération n'est pas capable de compter ces plaquettes, les plaquettes de grande taille n'étant pas prises en compte dans les canaux de comptage de 2 à 20 femtolitres. Les résultats fournis pour l'appareil, tant la numération que le volume plaquettaire moyen sont complètement ininterprétables. Ces thrombopénies sont de transmission autosomique dominante et la découverte peut être fortuite à l'occasion d'un hémogramme ou à la suite d'une enquête familiale. Les conséquences hémorragiques sont très limitées du fait du caractère modéré de la thrombopénie et par une certaine compensation du fait de la grande taille des plaquettes ("le thrombocyte" est donc relativement peu diminué). Chez cette patiente, la présence de tâches pouvant évoquer des corps de Döhle lors de cette investigation complémentaire, fait évoquer une anomalie de May-Hegglin. Mais

ces inclusions sont peu caractéristiques et le faible pourcentage de plaquettes géantes (15%) sont plus en faveur d'une macrothrombocytopenie familiale.

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : Numération plaquettaire, 23/05/01

Figure 1 : Arbre généalogique de la famille de Madame L.

Figure 2 : Histogramme rendu par l'appareil de numération H.2 Bayer Technicon

Figure 3 : Histogramme rendu par l'appareil de numération Coulter STKS

Figure 4 : Etude du complexe GP Ib/IX/V réalisée par cytométrie en flux

Figure 5 : Frottis sanguin (MGG, x400)

Figure 6 : Frottis sanguin (MGG, x630)

Figure 7 : Frottis sanguin (coloration immuno-histochimique, x400)

Tableau I : Numération plaquettaire, 23/05/01

	H.2 Bayer Technicon	Coulter STKS	Technique UNOPETTE	Cytométrie en flux	Analyse morphométrique QWin
Tube EDTA	33	3	55	67	58
Tube Citrate	30	11	47	63	
Tube CTAD	30	11	56	61	

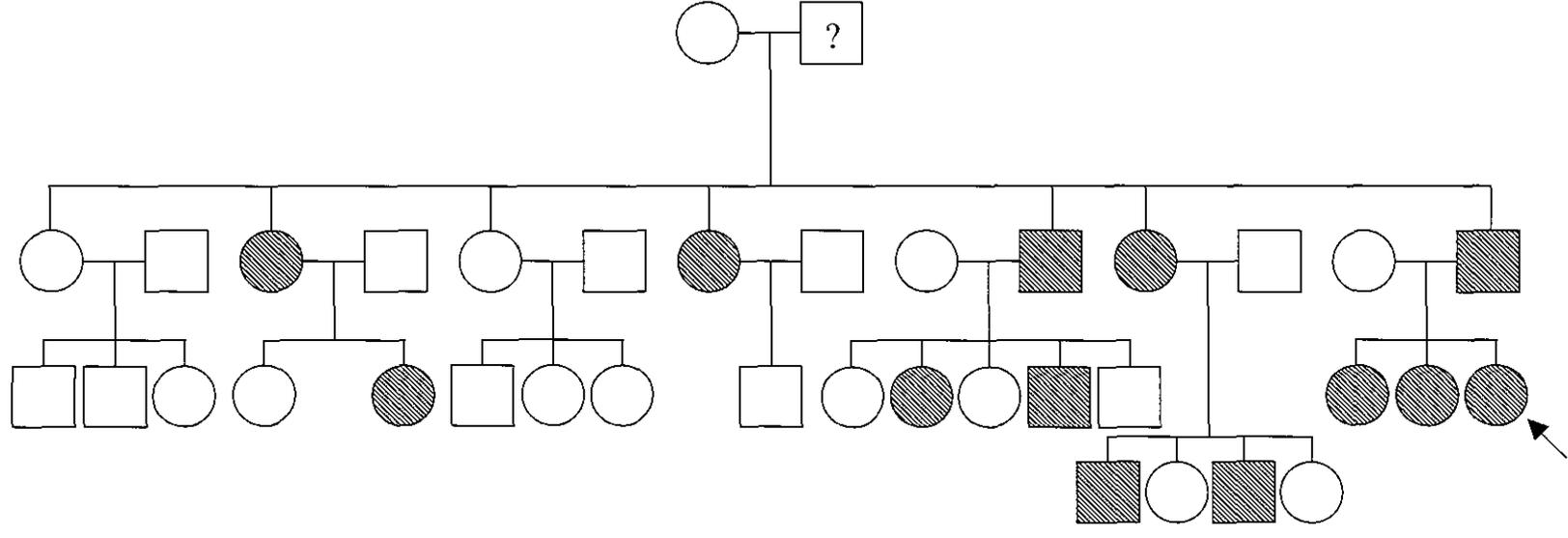


Figure 1 : Arbre généalogique de la famille de Madame L. (indiquée par la flèche), les sujets hachurés sont thrombopénique.

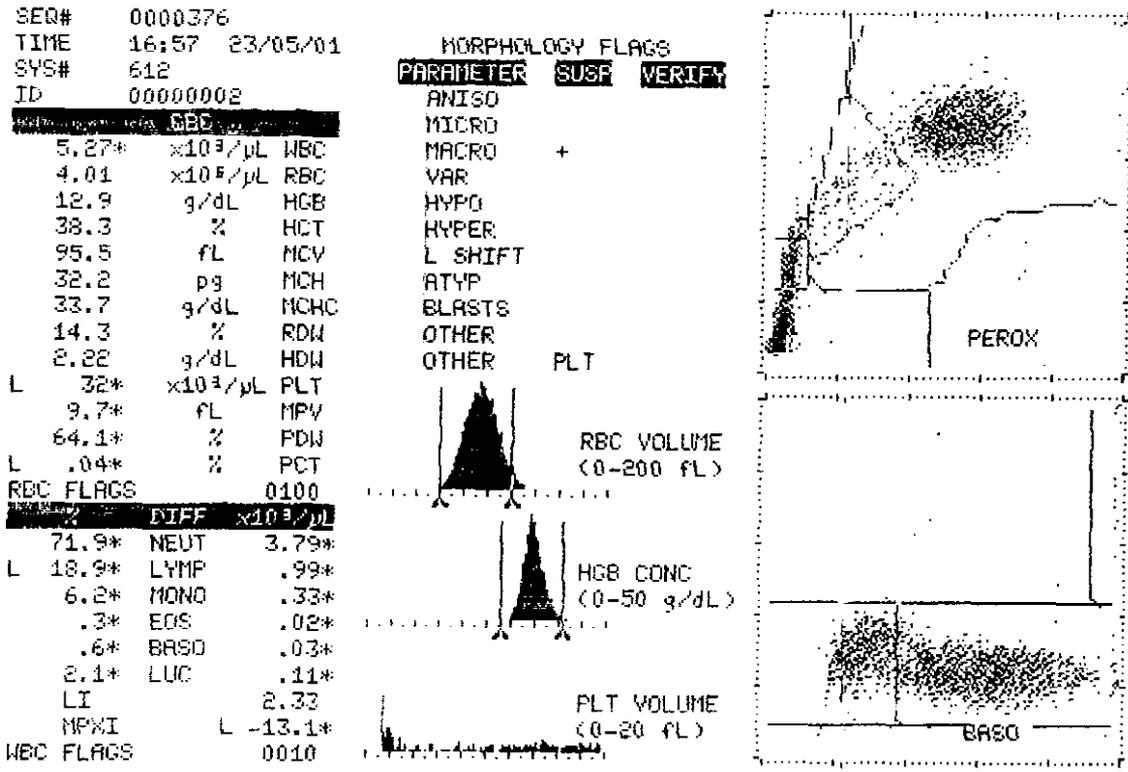


Figure 2 : Histogramme rendu par l'appareil de numération H.2 Bayer Technicon

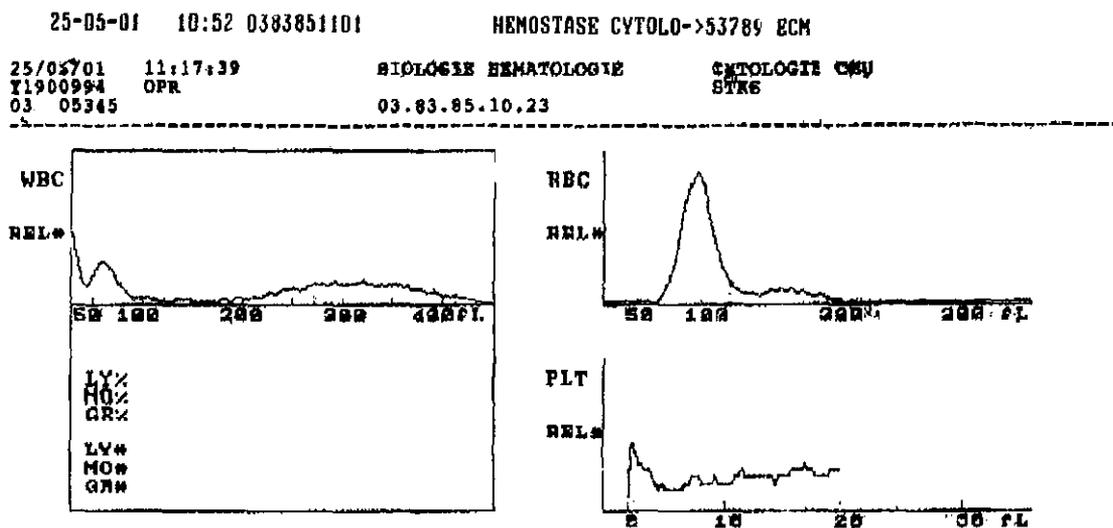


Figure 3 : Histogramme rendu par l'appareil de numération Coulter STKS

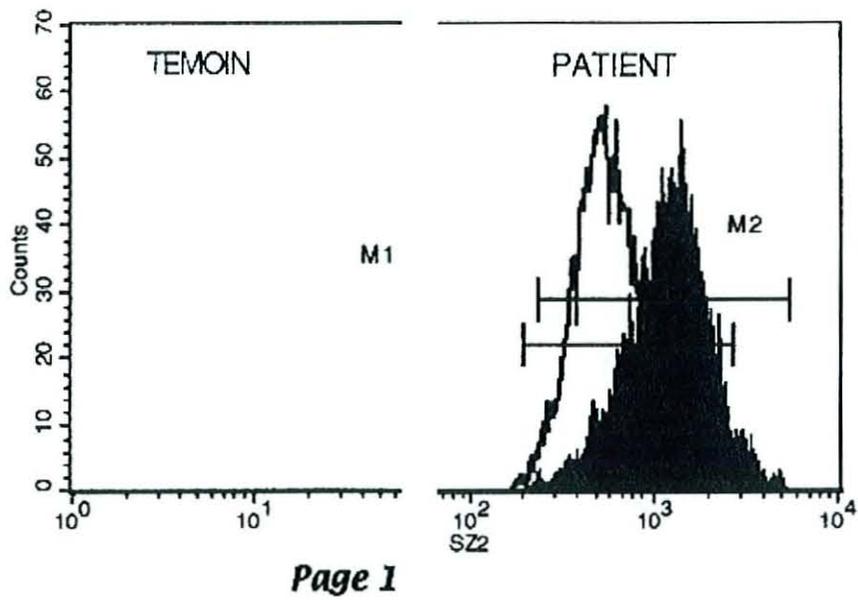


Figure 4 : Etude du complexe GP Ib/IX/V réalisée par cytométrie en flux

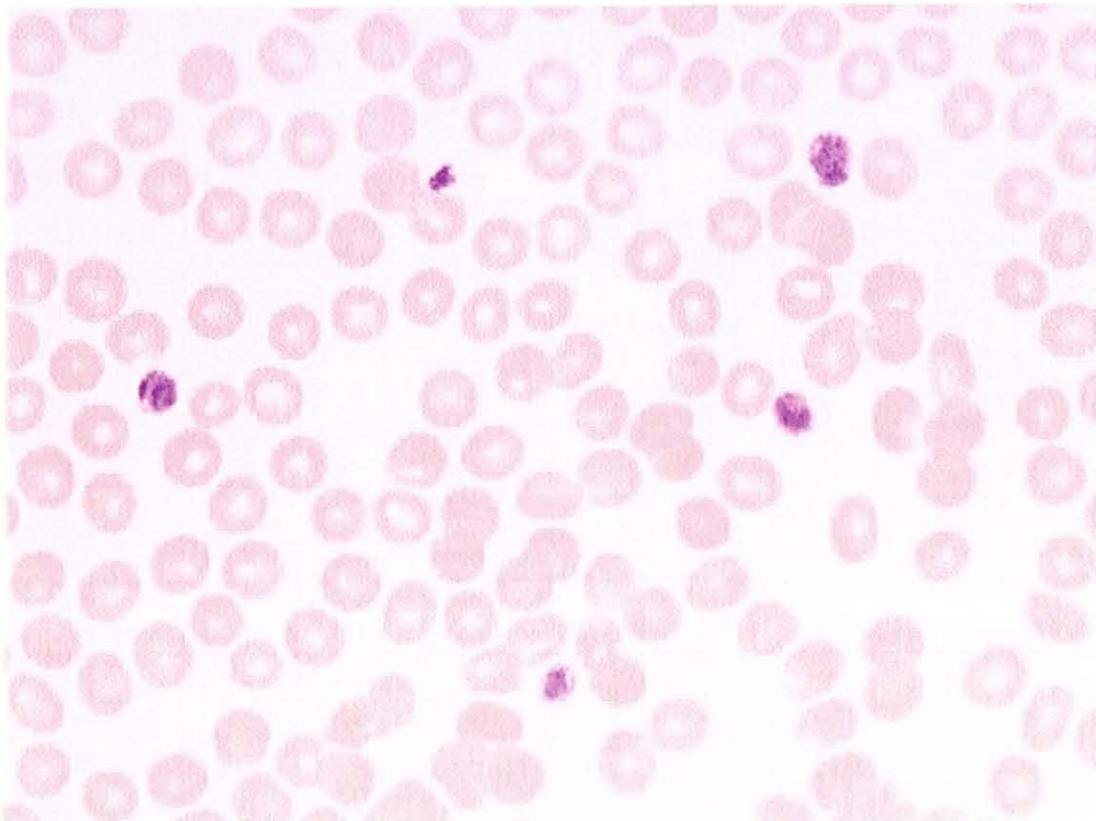


Figure 5 : Frottis sanguin (MGG, x400)

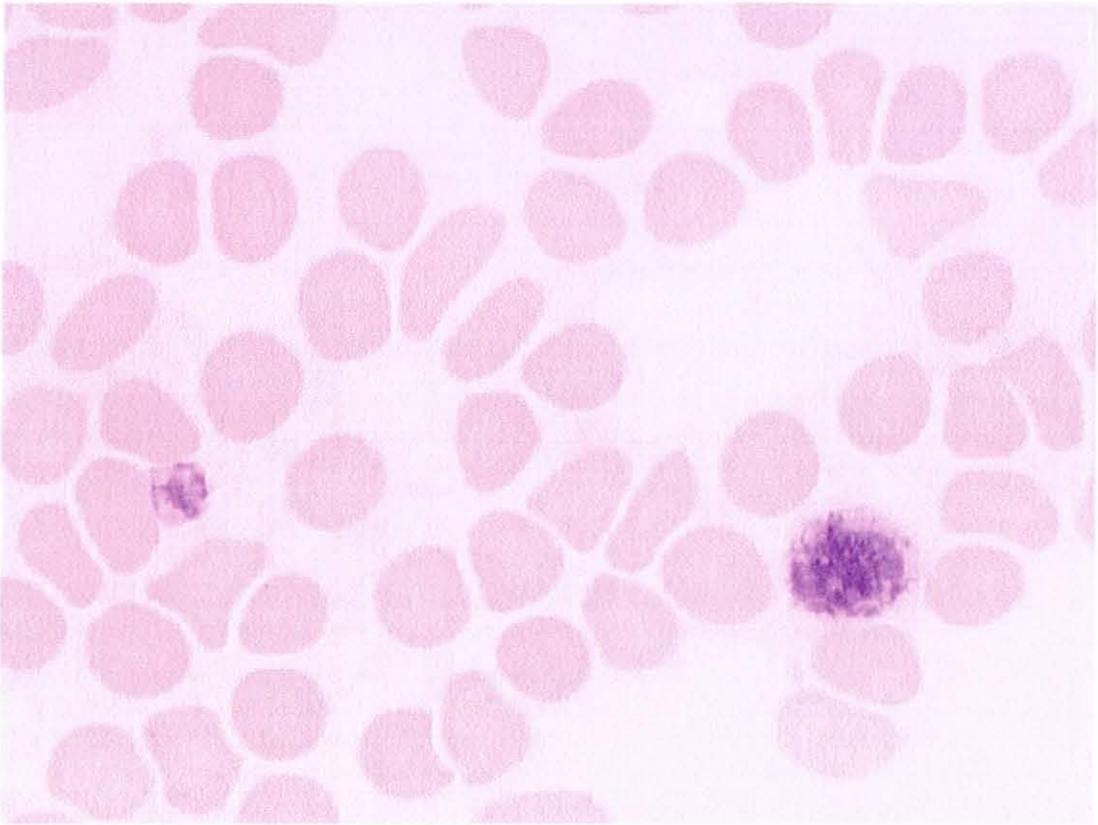


Figure 6 : Frottis sanguin (MGG, x630)

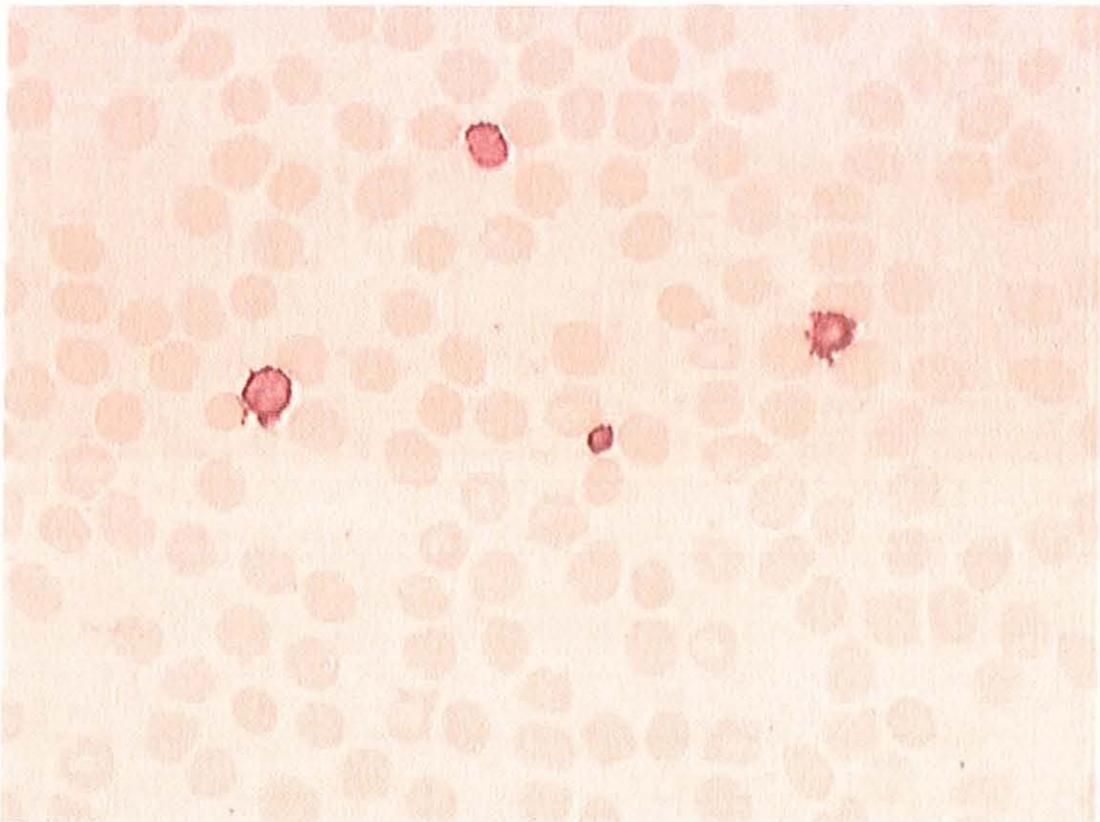


Figure 7 : Frottis sanguin (coloration immuno-histochimique, x400)

QUATRIEME PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Leica, QWin Guide de l'utilisateur. Logiciel de traitement et d'analyse d'images.
192 p. Leica

2. Bennatar L, Flandrin G. Analyse morphométrique, coloration panoptique de May-Grünwald Giemsa et contrôle de qualité. *Hématologie* 1998 ; 4 : 233-8.

3. Benattar L, Troussard X, Flandrin G. Analyse morphométrique d'une LLC-B et d'une phase leucémique de lymphome du manteau. *Réunion du Groupe Français d'Hématologie Cellulaire*, 1998 ; abstract.

4. Fossat C, Sainty D, Conciatori M, Horschowski N, Guitard AM, Sampol J. La formule leucocytaire automatisée. *Revue française de laboratoires* 1988 ; 175 : 69-76.

5. Sultan C, Imbert M, Henny J, Tarallo P, Siest G, Girard JM, Floc'h A, Blin G, Marty J. Réflexions sur l'hémogramme. Apport de nouvelles technologies. *Feuillets de Biologie* 1985 ; 143 : 23-28.

6. Serra J. Cours de Morphologie Mathématique, 1^{ère} partie. Opérateurs Morphologiques. Novembre 1999, 150 p.

7. Serra J. Cours de morphologie mathématique, 2^{ème} partie : Leçons illustrées sur les ensembles aléatoires. Mars 2000.

8. Flandrin G. Stratégie d'utilisation du télédiagnostic et de la banque d'images. Une application spécifique de la télépathologie pour l'hématologie. *Ann Pathol* 1996 ; 16 : 155-8.
9. Flandrin G, Lesesve JF. Telediagnostic and image data bank consultation. A two year application for hematology. *World congress on telemedicine*, Toulouse, 1995 ; abstract.
10. Payne LG, Hayward CPM, Kelton JG. Destruction of red cells by the vasculature and reticuloendothelial system. In : Nathan and Oski's hematology of the infancy and childhood. Saunders 5th edition, p523-44.
11. Rock G, Kelton JG, Shumak KH *et al.* Laboratory abnormalities in thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Group. *Br J Haematol* 1998 ; 103 : 1031-6.
12. Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Diagnostic des anémies hémolytiques mécaniques : contribution de l'hémogramme. *Ann Biol Clin* 2001 ; 59 : *sous presse*
13. Largo R, Heller V, Straub W. Detection of soluble intermediates of fibrinogen-fibrin conversion using erythrocytes coated with fibrin monomers. *Blood* 1976 ; 47 : 991-1002.
14. Bernard J, Lévi JP, Varet B, Clauvel JP, Rain JD, Sultan Y. Abrégé d'Hématologie. Paris : Masson, 9^e édition, 1998.

15. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999; 341 : 586-92.
16. Feinstein DI. Diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation: the role of heparin therapy. *Blood* 1982 ; 60 : 284-7.
17. Spero JA, Lewis JH, Hasiba U. Disseminated intravascular coagulation. Finding in 346 patients. *Thromb Haemost* 1980 ; 43 : 28-33.
18. Wada H, Wakita Y, Nakase T, Shimura M, Hiyoyama K, Nagaya S, Deguchi H, Mori Y, Kaneko T, Deguchi K, Fujii J, Shiku H. Increased plasma-soluble fibrin monomer levels in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 1996 ; 51 : 255-60.
19. Yu M, Nardella A, Pechet L. Screening tests of disseminated intravascular coagulation: guidelines for rapid and specific laboratory diagnosis. *Crit Care Med* 2000 ; 28 : 1777-80.
20. Baglin T. Disseminated intravascular coagulation: diagnosis and treatment. *BMJ* 1996 ; 312 : 683-7.
21. Brain MC, Dacie JV, Hourihane OB. Microangiopathic haemolytic anaemia: the possible role of vascular lesions in pathogenesis. *Br J Haematol* 1962 ; 8 : 358-74.

22. Rosner F, Rubenberg ML. Erythrocyte fragmentation in consumption coagulopathy. *N Engl J Med* 1969 ; 280 : 219-20.
23. Schmaier AH. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999 ; 341 : 1937.
24. Gordon LI, Kwaan HC. Thrombotic microangiopathy manifesting as thrombotic thrombocytopenic purpura hemolytic uremic syndrome in the cancer patient. *Semin Thromb Hemost* 1999 ; 25 : 217-21.
25. Gordjani N, Hénon P, Rondeau E, Hermine O. Forum polémique : purpuras thrombotiques thrombocytopéniques, syndromes hémolytiques et urémiques, microangiopathies thrombotiques. *Hématologie* 1998 ; 4 : 75-87.
26. Fontana S, Gerritsen HE, Kremer Hovinga J, Furlan M, Lämmle B. Microangiopathic haemolytic anaemia in metastasizing malignant tumours is not associated with a severe deficiency of the von Willebrand factor-cleaving protease. *Br J Haematol* 2001 ; 113 : 100-102.
27. Ismeno G, Renzulli A, Carozza A, De Feo M, Iannuzzi M, Sante P, Cotrufo M. Intravascular hemolysis after mitral and aortic valve replacement with different types of mechanical prostheses. *Int J Cardiol* 1999 ; 69 : 179-83.

28. Skoularigis J, Essop MR, Skudicky D, Middlemost SJ, Sareli P. Frequency and severity of intravascular hemolysis after left-sided cardiac valve replacement with Medtronic Hall and St. Jude Medical prostheses, and influence of prosthetic type, position, size and number. *Am. J. Cardiol.* 1993 ; 71 : 587-591.
29. Sassier P, Breillot J. Evaluation of the mathematical algorithm for the analysis of the platelet volume distributions provided by coulter hematological analysers. *Path. Biol.* 1991 ; 39 (3) : 215-221.
30. Kunz D, Hoffkes HG, Kunz W.S, Gressner AM. Standardized flow cytometric method for the accurate determination of platelet counts in patients with severe thrombocytopenia. *Cytometry* 2000 ; 42 : 284-289.
31. Harrison P, Ault KA, Chapman S, Charie L, Davis B, Fujimoto K, Houwen B, Kunicka J, Lacombe F, Machin S, Raynor R, Van Hove L, W Van Assendelft O. An interlabotary study of a candidate reference method for platelet counting. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001 ; 115 : 448-459.
32. Ancliff PJ, Machin SJ. Trigger factors for prophylactic platelet transfusion. *Blood Rev.* 1998 ; 12 (4) : 234-238.
33. Rebutta P, Finazzi G, Marangoni F, Avvisati G, Gugliotta L, Barbui T, Mandelli F, Sirchia G. The threshold for the prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukaemia. *N. Engl. J. Med.* 1997 ; 337 (26) : 1870-1875.

34. Heckman KD, Weiner GJ, Davis CS, Strauss RG, Jones MP, Burns T. Randomized study of prophylactic platelet transfusion threshold during induction therapy for adult acute leukaemia: 10,000/ μ L versus 20,000/ μ L. *J. Clin. Oncol.* 1997 ; 15 : 1143-1149.

35. Harrison P, Horton A, Grant D, Briggs C, Machin S. Immunoplatelet counting : a proposed new reference procedure. *Br J Haematol.* 2000 ; 108 : 228-235.

36. Giacomini A, Legovini P, Gessoni G, Antico F, Valverde S, Salvadego MM, Manoni F. Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA TM 120 reference subjects and patients. *Clin. Lab. Haem.* 2001 ; 23 : 181-186.

37. Kunicka JE, Fischer G, Murphy J, Zelmanovic D. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000 ; 144 : 283-289.

38. Najean Y, Lecompte T. Genetic thrombocytopenia with autosomal dominant transmission : a review of 54 cases. *Br J Haematol.* 1990 ; 74 : 203-208.



