HAL
open science

Liquides d'épanchements : analyse par l'hématimètre XN (SYSMEX®), évaluation de la formule automatisée et mise en évidence des cellules pathologiques par cytométrie en flux

Delphine Gérard

To cite this version:

Delphine Gérard. Liquides d'épanchements : analyse par l'hématimètre XN (SYSMEX®), évaluation de la formule automatisée et mise en évidence des cellules pathologiques par cytométrie en flux. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931830

HAL Id: hal-01931830

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931830

Submitted on 23 Nov 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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-thesesexercice-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 DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 20 juin 2017

Par Delphine GERARD
née le 30 mai 1990 à Epinal

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Liquides d'épanchements: analyse par l'hématimètre XN (SYSMEX®), évaluation de la formule automatisée et mise en évidence des cellules pathologiques par cytométrie en flux

---

Membres du Jury

Président :	Mme le Professeur B. FAIVRE,	PU, Faculté de Pharmacie de Nancy
Juges :	M. le Docteur JF. LESESVE,	PH, CHRU de Nancy, Directeur de thèse
	M. le Docteur J. PERRIN,	MCU-PH, CHRU de Nancy, Co-directeur de thèse
	M. le Professeur G. GAUCHOTTE,	PU-PH, CHRU de Nancy
	M. le Professeur B. CHATELAIN,	Professeur, CHU UCL NAMUR

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Béatrice FAIVRE
Directeur des Etudes
Virginie PICHON
Conseil de la Pédagogie
Président, Brigitte LEININGER-MULLER
Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier
Président, Béatrice DEMORE
Commission Prospective Facultaire
Président, Christophe GANTZER
Vice-Président, Jean-Louis MERLIN
Commission de la Recherche
Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine	Béatrice FAIVRE
Responsables de la filière Industrie	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable de la filière Hôpital	Béatrice DEMORE
Responsable Pharma Plus ENSIC	Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus ENSAIA	Raphaël DUVAL
Responsable Pharma Plus ENSGSI	Igor CLAROT
Responsable de la Communication	Marie-Paule SAUDER
Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle	Béatrice FAIVRE
Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage	Béatrice FAIVRE
Responsable ERASMUS	Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Jean-Claude BLOCK
Max HENRY
Alain MARSURA
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET
Janine SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Mariette BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER

Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*
PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	*82*	*Thérapie cellulaire*
Jean-Louis MERLIN	*82*	*Biologie cellulaire*
Alain NICOLAS	*80*	*Chimie analytique et Bromatologie*
Jean-Michel SIMON	*81*	*Economie de la santé, Législation pharmaceutique*
Nathalie THILLY	*81*	*Santé publique et Epidémiologie*
PROFESSEURS DES UNIVERSITES		
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	*86*	*Pharmacologie*
Igor CLAROT	*85*	*Chimie analytique*
Joël DUCOURNEAU	*85*	*Biophysique, Acoustique, Audioprothèse*
Raphaël DUVAL	*87*	*Microbiologie clinique*
Béatrice FAIVRE	*87*	*Biologie cellulaire, Hématologie*
Luc FERRARI	*86*	*Toxicologie*
Pascale FRIANT-MICHEL	*85*	*Mathématiques, Physique*
Christophe GANTZER	*87*	*Microbiologie*
Frédéric JORAND	*87*	*Eau, Santé, Environnement*
Isabelle LARTAUD	*86*	*Pharmacologie*
Dominique LAURAIN-MATTAR	*86*	*Pharmacognosie*
Brigitte LEININGER-MULLER	*87*	*Biochimie*
Pierre LEROY	*85*	*Chimie physique*
Philippe MAINCENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Patrick MENU	*86*	*Physiologie*
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	*86*	*Chimie thérapeutique*
Bertrand RIHN	*87*	*Biochimie, Biologie moléculaire*
MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Béatrice DEMORE	*81*	*Pharmacie clinique*
Alexandre HARLE	*82*	*Biologie cellulaire oncologique*
Julien PERRIN	*82*	*Hématologie biologique*
Marie SOCHA	*81*	*Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique*
MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	*87*	*Parasitologie*
Xavier BELLANGER	*87*	*Parasitologie, Mycologie médicale*
Emmanuelle BENOIT	*86*	*Communication et Santé*
Isabelle BERTRAND	*87*	*Microbiologie*
Michel BOISBRUN	*86*	*Chimie thérapeutique*

François BONNEAUX	*86*	*Chimie thérapeutique*
Ariane BOUDIER	*85*	*Chimie Physique*
Cédric BOURA	*86*	*Physiologie*
Joël COULON	*87*	*Biochimie*
Sébastien DADE	*85*	*Bio-informatique*
Dominique DECOLIN	*85*	*Chimie analytique*
Roudayna DIAB	*85*	*Pharmacie galénique*
Natacha DREUMONT	*87*	*Biochimie générale, Biochimie clinique*
Florence DUMARCAY	*86*	*Chimie thérapeutique*
François DUPUIS	*86*	*Pharmacologie*
Adil FAIZ	*85*	*Biophysique, Acoustique*
Anthony GANDIN	*87*	*Mycologie, Botanique*
Caroline GAUCHER	*86*	*Chimie physique, Pharmacologie*
Stéphane GIBAUD	*86*	*Pharmacie clinique*
Thierry HUMBERT	*86*	*Chimie organique*
Olivier JOUBERT	*86*	*Toxicologie, Sécurité sanitaire*

ENSEIGNANTS (suite)	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*
Alexandrine LAMBERT	*85*	*Informatique, Biostatistiques*
Julie LEONHARD	*86/01*	*Droit en Santé*
Christophe MERLIN	*87*	*Microbiologie environnementale*
Maxime MOURER	*86*	*Chimie organique*
Coumba NDIAYE	*86*	*Epidémiologie et Santé publique*
Marianne PARENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Francine PAULUS	*85*	*Informatique*
Caroline PERRIN-SARRADO	*86*	*Pharmacologie*
Virginie PICHON	*85*	*Biophysique*
Sophie PINEL	*85*	*Informatique en Santé (e-santé)*
Anne SAPIN-MINET	*85*	*Pharmacie galénique*
Marie-Paule SAUDER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Guillaume SAUTREY	*85*	*Chimie analytique*
Rosella SPINA	*86*	*Pharmacognosie*
Sabrina TOUCHET	*86*	*Pharmacochimie*
Mihayl VARBANOV	*87*	*Immuno-Virologie*
Marie-Noëlle VAULTIER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Emilie VELOT	*86*	*Physiologie-Physiopathologie humaines*
Mohamed ZAIOU	*87*	*Biochimie et Biologie moléculaire*

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	*86*	*Sémiologie*

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	*11*	*Anglais*

¤ *En attente de nomination*

**<u>Disciplines du Conseil National des Universités</u> :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

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

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

« 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 ».

Remerciements

A Madame le Professeur Béatrice FAIVRE,
PU, Faculté de Pharmacie de Nancy, Hématologie.

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Veuillez recevoir l'expression de mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Jean-François LESESVE,
PH, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy.

Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée en me dirigeant pour ce travail, ainsi que pour le temps que vous m'avez consacré et pour vos conseils qui m'ont beaucoup aidé.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Julien PERRIN,
MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy.

Je te remercie pour l'aide que tu m'as apportée, ainsi que pour ta grande disponibilité, pour ce travail et pour le reste. Un grand merci également pour tes conseils et tes connaissances qui m'ont épaulé durant tout mon internat.

Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Guillaume GAUCHOTTE,
PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Service d'Anatomopathologie – CHRU de Nancy.

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse et d'apporter vos connaissances à la critique de ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Bernard CHATELAIN,
Professeur, CHU UCL NAMUR

Je vous remercie de m'avoir permis d'utiliser les données de votre laboratoire pour mon étude, et vous me faites l'honneur de juger cette thèse.

Veuillez recevoir l'expression de mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A mes parents

Pour votre amour et votre soutien indéfectible,
Pour m'avoir permis de mener ces études dans les meilleures conditions qui soient,

Cette réussite est aussi la vôtre, je vous dédie ce travail.

A Nicolas,
Pour notre complicité et tous les bons souvenirs
A Chloé,
Pour ces années de facs l'une à côté de l'autre
A tous les deux,
Pour tous ces bons moments, et ceux qui restent à venir

A Colette, Claire et Gérard
Merci pour votre chaleureux accueil dans la famille Thomas

A mes amis,
Carole, Alex, Victo, Chloé, Clément
Alexandra, Gwladys, FX et Nicolas
Merci pour ces belles années, en espérant continuer à vous voir très longtemps

A Adeline, Alice, Camille, Héloïse
Pour ces belles amitiés qui durent malgré les distances et le temps
A Noémie,
Pour toutes ces joyeuses années où nous avons marché côte à côte

Vous êtes toutes parties bien loin mais j'espère vous retrouver encore longtemps

A mes co-internes
Merci pour ces 4 belles années passées à vos côtés, l'internat ne serait pas le même sans les pauses cafés
Evidemment, une pensée particulière pour mes complices d'hématologie, Claire et Charlotte, pour tous ces rires au myélo et ailleurs, et pour mon chauffeur personnel Lucie, pour nous avoir supporté pendant (presque) 6 mois !

A toutes les personnes croisées pendant ces années dans les méandres des labos : secrétaires, techniciens et biologistes
En particulier l'équipe de CMF pour m'avoir accueilli et laissé jouer avec Infinicyt

A toute l'équipe de cytologie du labo d'hémato
Merci pour tout ce que j'ai appris à vos côtés et pour tous les bons moments partagés

A Sylvain Salignac,
Merci pour ta relecture attentive

A Sylvain,
Ton aide m'a été précieuse tout au long de ce travail
J'espère avoir l'occasion de retravailler avec toi …
Merci pour ton entrain, ta bonne humeur et ta gentillesse

A mon Benoît
Merci d'être mon apaisante moitié

A notre petit bonhomme, Louis
Co-auteur de cette thèse

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATIONS **3**

TABLEAUX **4**

FIGURES **5**

INTRODUCTION **7**

1 LES LIQUIDES BIOLOGIQUES HUMAINS **9**

1.1 LIQUIDES BIOLOGIQUES 9
1.2 PHYSIOPATHOLOGIE ET NOTION D'EXSUDAT ET TRANSSUDAT 9
1.3 LIQUIDE D'ASCITE 9
1.3.1 Clinique et Examen *10*
1.3.2 Cytologie et caractéristiques cytologiques des liquides d'ascites *11*
1.4 LIQUIDE PLEURAL 15
1.4.1 Clinique et Examen *15*
1.4.2 Cytologie et caractéristiques cytologiques des liquides pleuraux *16*
1.4.3 Autres analyses *19*
1.5 LIQUIDE SYNOVIAL 19
1.5.1 Définition *19*
1.5.2 Clinique et Examen *20*
1.5.3 Cytologie *20*
1.5.4 Autres examens *22*
1.6 AUTRES LIQUIDES 22

2 APPAREIL AUTOMATISE XN (SYSMEX®) ET MODULE BODYFLUID **24**

2.1 CHAINE XN 24
2.1.1 Description *24*
2.1.2 Principes d'analyses et canaux utilisés *24*
2.2 MODULE BODYFLUID™ 26
2.2.1 Description du module Bodyfluid *26*
2.2.2 Paramètres mesurés et analyses des données *27*
2.2.3 Utilisation du module BF au laboratoire *29*
2.2.4 Intérêts et limites du module Bodyfluid *30*

3 EVALUATION DES PERFORMANCES DU MODULE BODYFLUID **31**

3.1 FIDELITE 32
3.1.1 Répétabilité *32*
3.1.2 Fidélité intermédiaire *35*
3.2 APPROCHE DE LA JUSTESSE 37
3.2.1 WBC-BF *38*
3.2.2 RBC-BF *38*
3.2.3 TC-BF *39*
3.3 EXACTITUDE 39
3.4 INCERTITUDE DE MESURE 39
3.4.1 WBC-BF *40*
3.4.2 RBC-BF *40*
3.4.3 TC-BF *40*
3.5 COMPARAISON DE METHODES 41

3.6 INTERVALLE DE MESURE 43
3.7 INTERFERENCES 45
3.8 CONTAMINATION INTER-ECHANTILLONS 46
3.8.1 WBC-BF 48
3.8.2 RBC-BF 48
3.8.3 TC-BF 48
3.9 ROBUSTESSE 48
3.10 STABILITE 48
3.10.1 WBC-BF 49
3.10.2 RBC-BF 50
3.10.3 TC-BF 51
3.11 INTERVALLE DE REFERENCE 52
3.12 CONCLUSION ET PERSPECTIVES 53

4 FORMULE CYTOLOGIQUE DU MODULE BF ET CELLULES « HAUTES FLUORESCENCES » 54

4.1 LA FORMULE DE RECHERCHE 54
4.1.1 Comparaison entre la formule recherche du module bf et la formule obtenue au microscope 54
4.1.2 Cellules hautes fluorescences 58
4.2 CONCLUSION ET PERSPECTIVES 65

5 ANALYSE DES DONNEES DU MODULE BF PAR LE LOGICIEL INFINICYT 67

5.1 ANALYSE DES DONNEES .FCS D'UNE SERIE DE LIQUIDES NON NEOPLASIQUES 68
5.1.1 Logiciel Infinicyt® 68
5.1.2 Matériels et méthodes 69
5.1.3 Résultats 69
5.2 APPLICATION AUX LIQUIDES NEOPLASIQUES 73
5.2.1 Création des zones « META » 73
5.2.2 Intérêt des zones « META » pour le dépistage de la présence de cellules néoplasiques dans le liquide 78
5.3 APPLICATION A UNE SERIE DE LIQUIDES ANALYSES SUR UN AUTRE MODULE BF 82

CONCLUSION GENERALE 85

BIBLIOGRAPHIE 86

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
AUC	Aire sous la courbe
BF	Bodyfluid™
CCMH	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CIQ	Contrôle Interne de Qualité
CMF	Cytométrie en flux
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
CV	Coefficient de Variation
DM-DIV	Dispositifs Médicaux et Dispositifs Médicaux de Diagnostic In Vitro
EEQ	Evaluation Externe de la Qualité
EO-BF	Eosinophile cell - Bodyfluid™
FSC	Forward Scatter (diffusion frontale de la lumière)
HF-BF	High Fluorescence - Bodyfluid™
IDP	Index de Distribution Plaquettaire
IP	Indice de Pearson
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LDH	Lactate Deshydrogénase
LY-BF	Lymphocyte - Bodyfluid™
MGG	May-Grünwald Giemsa
MO-BF	Monocyte cell - Bodyfluid™
NE-BF	Neutrophil cell - Bodyfluid™
NFS	Numération Formule Sanguine (Hémogramme)
NRBC	Nuclear Red Blood Cell (érythroblastes)
PB	Polynucléaire basophile
PCT	Plaquettocritte
PEo	Polynucléaire Eosinophile
P-LCR	Pourcentage de grandes plaquettes
PLT-F	Plaquettes Fluorescentes
PN	Polynucléaire Neutrophile
RET	Réticulocyte
RBC-BF	Red Blood Cell - Bodyfluid™
ROC	Receiver Operating Characteristic
SFL	Side Fluorescence Light (fluorescence latérale de la lumière)
SSC	Side Scattered Light (diffusion latérale de la lumière)
TC-BF	Total Cell - Bodyfluid™
TCMH	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
VGM	Volume Globulaire Moyen
VPM	Volume Plaquettaire Moyen
WBC-BF	White Blood Cell - Bodyfluid™

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Données bibliographiques de répétabilité du module BF 33
Tableau II: Données WBC-BF d'expérimentation sur site de la répétabilité 34
Tableau III: Données RBC-BF d'expérimentation sur site de la répétabilité 34
Tableau IV: Données TC-BF d'expérimentation sur site de la répétabilité..... 34
Tableau V: Données bibliographiques d'étude de la fidélité intermédiaire du module BF 36
Tableau VI : Données WBC-BF d'expérimentation sur site de fidélité intermédiaire 37
Tableau VII : Données RBC-BF d'expérimentation sur site de fidélité intermédiaire 37
Tableau VIII : Données TC-BF d'expérimentation sur site de fidélité intermédiaire 37
Tableau IX : Données WBC-BF d'expérimentation de la justesse 38
Tableau X : Données RBC-BF d'expérimentation de la justesse 38
Tableau XI : Données TC-BF d'expérimentation de la justesse 39
Tableau XII: Incertitude de mesure du wbc-BF 40
Tableau XIII: Incertitude de mesure du RBC-BF 40
Tableau XIV: Incertitude de mesure du TC-BF 40
Tableau XV : Données bibliographiques de comparaison entre la méthode de référence et le module BF 42
Tableau XVI : Données bibliographiques d'étude de l'intervalle de mesure du module BF .. 44
Tableau XVII : Données bibliographiques d'étude de la contamination du module BF 47
Tableau XVIII: Test de pearson entre les pourcentages obtenus par le moduleBFet la formule obtenue manuellement au microscope optique 55
Tableau XIX: Statistiques descriptives des populations de liquides neoplasiques et non neoplasiques : valeurs medianes des liquides du chru de nancy 61
Tableau XX : Données bibliographiques et de l'étude sur site des pourcentages HF-BF (/100 WBC) 64
Tableau XXI : Données bibliographiques et de l'étude sur site de la valeur absolue HF-BF . 64
Tableau XXII: Diagnostics oncologiques des liquides etudies et nombre d'evenements dans les differentes zones meta (nr : non renseigne) 77
Tableau XXIII: Statistiques descriptives des differentes zones etudiees pour des liquides non neoplasiques et neoplasiques..... 79
Tableau XXIV: Données des courbes ROC établies pour chaque zone « META» 80

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Scanner abdominal montrant la présence d'une ascite 10
Figure 2 : Cellules mésothéliales dans un liquide d'ascite (x630)..... 12
Figure 3 : Cellule mésothéliale en transformation « histioïde » dans un liquide d'ascite (x630).. 12
Figure 4 : Cellules néoplasiques dans un liquide d'ascite. ces cellules proviennent d'un carcinome pancreato-billiaire (A) et se présentent parfois sous forme d'amas (b)..... 14
Figure 5 : Radiographie thoracique mettant en évidence un épanchement gauche de moyenne abondance..... 16
Figure 6 : Amas de cellules metastatiques dans un liquide pleural..... 18
Figure 7 : Epanchement articulaire du genou..... 20
Figure 8 : Cellule synoviale 21
Figure 9 : Analyse par Fluorocytométrie : 3 paramètres exploitables 25
Figure 10 : Représentation du canal WNR : Séparation et comptage des leucocytes, polynucléaires basophiles et érythroblastes 26
Figure 11: Représentation du canal WDF : Séparation des populations cellulaires 26
Figure 12 : Technologies d'analyses sur le module Bodyfluid 27
Figure 13 : Scattergram WDF obtenu par le module Bodyfluid et réalisation de la formule cytologique 28
Figure 14 : Représentation graphique classique (SFL en fonction de SSC) sur le logiciel I-PU issue de l'analyse d'un liquide biologique sur le module BF 28
Figure 15 : Exemple de difficultés de différenciations entre les monocytes et les macrophages (liquide d'ascite, x630)..... 30
Figure 16 : Etude de la linéarité sur site du module BF 45
Figure 17 : Données de stabilité du paramètre WBC-BF..... 49
Figure 18 : Données de stabilité du paramètre RBC-BF..... 50
Figure 19 : Données de stabilité du paramètre TC-BF..... 51
Figure 20 : Représentation des pourcentages de PN obtenus au microscope optique (PN-MO) et par la formule recherche du module BF (Ne-BF) 55
Figure 21: Représentation des pourcentages de PEo obtenus au microscope optique (PEo-MO) et par la formule recherche (Eo-BF) 56
Figure 22 : Représentation des pourcentages de Ly obtenus au microscope optique (Ly-MO) et par la formule recherche (Ly-BF) 56
Figure 23 : Représentation des pourcentages de Monocytes/Macrophages obtenu au microscope optique (MO-MO) au pourcentage de MO-BF obtenu par la formule recherche. 57
Figure 24 : Localisation des cellules hautes fluorescences (HF-BF) sur le graphique WDF du module BF 59
Figure 25 : Différents aspects de courbes ROC et potentiel diagnostique d'un test. 60
Figure 26 : Courbe ROC concernant le pourcentage HF-BF / 100 WBC-BF et la présence de cellules néoplasiques dans le liquide..... 62
Figure 27 : Courbe ROC concernant la valeur absolue HF-BF (HF-BF x 10^9 /L) et la présence de cellules néoplasiques dans le liquide..... 63
Figure 28 : Aspect anormal du graphique WDF du module BF. 66

Figure 29 : Représentation WDF d'une formule sanguine. chaque nuage de point correspond à une population cellulaire 67
Figure 30 : Logiciel Infinicyt® 69
Figure 31 : Représentation brute des données .FCS d'un liquide non néoplasique (SFL en fonction de SSC). 70
Figure 32 : Fenêtrage de la population lymphocytaire 70
Figure 33 : Fenêtrage de la population des polynucléaires neutrophiles. 71
Figure 34 : Séparation de la population monocyte/macrophages et mésothéliale. 71
Figure 35 : Séparation des cellules mésothéliales du groupe monocytes macrophages à l'aide d'une seconde représentation. 72
Figure 36 : Zones des débris cellulaires 1 (a) et débris cellulaires 2 (b) 72
Figure 37 : Représentation WDF sur le logiciel Infinicyt® et population cellulaire individualisée à l'aide du masque d'analyse « normal » 73
Figure 38 : Représentation WDF (a) et APS (b) d'un liquide néoplasique. 74
Figure 39 : Zone META1 sur une représentation APS 74
Figure 40 : Zone META31 sur une représentation APS 76
Figure 41 : Zone META12 sur représentation APS 75
Figure 42 : Zone META3 sur représentation APS 75
Figure 43 : Exemple de représentation WDF (a) et APS (b) d'un liquide non néoplasique.... 76
Figure 44 : Courbe ROC correspondant à la zone META3 (a) et META31 (b) 80
Figure 45 : Courbe ROC correspondant à la zone META1 81
Figure 46 : Courbe ROC correspondant à la zone META2 81
Figure 47 : Representation SFL en fonction de SSC d'un liquide biologique analysé sur un autre module BF 83

INTRODUCTION

L'analyse des liquides biologiques humains est un processus essentiel pour le diagnostic et le suivi des pathologies s'accompagnant d'épanchements. C'est le cas par exemple des cancers, où la détection de cellules malignes dans un liquide biologique peut conduire au diagnostic de métastase, d'importance diagnostique et pronostique évidente. Concernant la partie cytologique, les liquides biologiques sont analysés au laboratoire de biologie médicale pour effectuer les numérations cellulaires et un examen morphologique des cellules. Ces demandes, sporadiques dans les laboratoires de petite taille, affluent parfois en grand nombre dans le cas de laboratoires associés à des centres de lutte contre le cancer ou à des grands centres hospitaliers. Cet afflux de prélèvements nécessite une adaptation des techniques utilisées. Pour la cytologie, le gold standard reste le comptage manuel optique par examen microscopique (Clinical Laboratory Standards Institute 2006). Le comptage optique « manuel » à l'aide d'une cellule de comptage (type cellule Nageotte) et l'examen cytologique au microscope requièrent du personnel compétent souvent spécialisé (technicien de laboratoire, biologiste). Ces techniques manuelles présentent des inconvénients majeurs : durée de l'analyse, variabilité inter-opérateur, imprécision du résultat… Il est donc légitime de vouloir mettre en place une analyse cytologique automatisée des liquides biologiques pouvant bénéficier de contrôles. Cependant on ne peut pas utiliser tels quels les modules d'analyses prévus pour le sang, non programmés pour ces tests. En effet l'analyse des liquides biologiques diffère de l'analyse cytologique du sang sur plusieurs points : par la présence de cellules particulières (cellules mésothéliales, cellules synoviales, voire cellules néoplasiques) ; par la cellularité (classiquement moins importante dans un liquide biologique) ; et par la matrice extracellulaire. Il a donc fallu adapter les technologies existantes : modifier les volumes de liquides analysés, vérifier les méthodes de comptage cellulaire pour éliminer un effet de matrice… De nouvelles règles d'expertise ont dû être élaborées pour prendre en compte les spécificités de ces milieux, aboutissant à la construction de modules spécifiques. Plusieurs fournisseurs d'appareils de cytologie ont développé leurs propres méthodes analytiques : Beckman® (LH 750/780 et DxH 800) ; SYSMEX® (séries XE, XN) ; Advia® (2120 et 2120i), Iris (iQ200 et système iriscell) (Bourner et al. 2014). La société SYSMEX® a développé un module complet d'analyse des liquides biologiques : le module Bodyfluid™ (BF), adaptable sur l'ancienne (XE) et la nouvelle génération (XN) de chaînes d'analyseurs d'hématologie.

Ce travail a eu pour but d'évaluer les possibilités d'utilisation du module Bodyfluid SYSMEX® au sein du laboratoire d'hématologie du CHRU de Nancy, analysant un grand nombre de prélèvements de liquides biologiques provenant de services cliniques spécialisés : Pneumologie, Hépato-Gastro-Entérologie, Rhumatologie, Hématologie clinique…

Nous allons dans un premier temps rappeler les différents types de liquides biologiques et leurs spécificités cytologiques. Puis nous détaillerons les méthodes utilisées pour les analyser sur le module BF avec réalisation d'une vérification de méthodes (première partie du travail original). Dans un second temps, nous nous intéresserons aux paramètres de recherche de la formule cytologique fournie par le module BF pour tester la corrélation avec une analyse microscopique. Enfin, nous avons tenté d'interpréter les populations cellulaires cernées par le

logiciel de l'automate à l'aide d'un logiciel de traitement de données dédié à la cytométrie en flux, en particulier afin d'évaluer la détection de la présence de cellules malignes à partir des données graphiques.

1 LES LIQUIDES BIOLOGIQUES HUMAINS

Après prélèvement d'un liquide biologique, le clinicien a à sa disposition plusieurs types d'analyses (biochimique, microbiologique, cytologique…) pour avancer dans sa démarche diagnostique.

1.1 LIQUIDES BIOLOGIQUES

Dans la plupart des cas, il s'agit d'un liquide corporel non circulant, qui, sous l'effet d'une pathologie, augmente en volume et crée un épanchement. On distingue classiquement les liquides pleuraux, péritonéaux, péricardiques, articulaires. Il peut s'agir en outre de liquide présent en quantité significative dont l'analyse peut présenter un intérêt, tel que le liquide céphalo-rachidien (LCR), non concerné par ce travail.

Les épanchements sont parfois révélateurs d'une pathologie sous-jacente ou témoignent d'une évolution d'une pathologie déjà présente chez le patient.

1.2 PHYSIOPATHOLOGIE ET NOTION D'EXSUDAT ET TRANSSUDAT

Quelle que soit l'origine du liquide d'épanchement, la physiopathologie est proche. A l'état normal, il existe une lubrification des séreuses par sécrétion d'une faible quantité de liquide produite par le feuillet pariétal et réabsorbée par le feuillet viscéral. Un déséquilibre entre sécrétion et réabsorption provoque un épanchement. Ces liquides d'épanchements sont classés traditionnellement en deux catégories (Light et al. 1972; Buffet 2012):

-les transsudats

Ils correspondent à une diminution de la résorption du liquide. Les causes sont mécaniques et diffèrent selon l'origine du liquide. Classiquement, on ne retrouve pas d'excès de protides et la cellularité est faible.

-les exsudats

Ils apparaissent suite à une augmentation de la production du liquide. Ils sont le plus souvent secondaires à une prolifération tumorale ou à une inflammation ayant pour origine une infection, des troubles vasculaires aigus, ou certaines connectivites. Le taux de protides est élevé, il peut y avoir présence de fibrinogène et on y retrouve de nombreuses cellules.

De plus chaque liquide possède des caractéristiques différentes en fonction de son origine.

1.3 LIQUIDE D'ASCITE

L'ascite est un épanchement liquidien de la cavité péritonéale. On exclut généralement de cette définition les épanchements purulents (péritonites), les épanchements sanglants (hémopéritoines), et les épanchements bilieux (cholépéritoines).

La caractéristique exsudative ou transsudative de l'ascite dépend de la cause de l'épanchement : le transsudat est constitué suite à une hypertension portale, retrouvée dans les cas de cirrhose, d'affection cardiaque, ou de métastases hépatiques avec compression

vasculaire provoquant un blocage mécanique. A l'inverse, la pression portale est normale dans le cas d'un exsudat. La cause est alors extérieure : carcinose péritonéale, infection, affection pancréatique, perforation intestinale…(Buffet 2012)

FIGURE 1: SCANNER ABDOMINAL MONTRANT LA PRESENCE D'UNE ASCITE (D'APRES CAUMARTIN Y ET DUJARDIN T)

1.3.1 CLINIQUE ET EXAMEN

Cliniquement, on observe une augmentation souvent indolore du périmètre abdominal avec prise de poids. A l'examen clinique, on note une matité des flancs et un ballonnement abdominal, ainsi que les signes « du flot » (transmission transabdominale liquidienne d'une pression controlatérale) et « du glaçon » (choc en retour suite à la remontée du foie au sein du liquide d'ascite) (Zeitoun et Lacaine 2003). L'échographie est l'examen le plus sensible pour poser le diagnostic d'ascite.

Le prélèvement de liquide se fait au lit du malade, au niveau de la fosse iliaque, au niveau du tiers externe de la ligne entre l'ombilic et l'épine iliaque antéro-supérieure. On peut l'effectuer sous contrôle échographique. Le liquide s'écoule naturellement, on le recueille traditionnellement sur 3 flacons dont 1 avec anticoagulant (EDTA ou citrate). Un flacon d'hémoculture peut être ensemencé directement au lit du patient pour culture bactérienne. Les contre-indications de cette ponction sont exceptionnelles : fibrinolyse primaire ou coagulation intravasculaire disséminée avec hémorragie évidente. Les troubles de la coagulation habituellement présents chez le patient cirrhotique ne sont pas une contre-indication. (Raphaël, M 2014)

Le premier examen est macroscopique : la couleur du liquide d'ascite oriente sur l'origine transsudative ou exsudative du liquide. Les transsudats correspondent à des liquides clairs, opalescents, chyleux, citrins. Les exsudats sont troubles ou rougeâtres, purulents, hémorragiques ou chyleux. (Grancher T et Jeanne G 2006)

1.3.2 CYTOLOGIE ET CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES DES LIQUIDES D'ASCITES

1.3.2.1 CELLULES

CELLULES MESOTHELIALES

Ce sont les cellules qui tapissent en une couche monocellulaire l'intérieur de la cavité péritonéale. Elles sont identiques à celles retrouvées dans les liquides pleuraux (elles proviennent alors des séreuses pleurales). Les cellules desquament du feuillet viscéral et sont les seules présentes à l'état normal dans le liquide avec quelques macrophages. Elles mesurent 5 à 7µm de diamètre au sein de l'épithélium et augmentent de volume une fois dans l'ascite pour mesurer souvent 15 à 25 µm de diamètre. Elles sont de formes arrondies et à bords nets. Le noyau est unique, rond, volumineux et on peut parfois apercevoir un petit nucléole. Le cytoplasme est finement granulaire et basophile.

L'aspect des cellules mésothéliales se modifie suivant la cause de l'épanchement et le délai entre le prélèvement et l'analyse. Plusieurs types de cellules mésothéliales peuvent être alors observés :

- Cellules mésothéliales en transformation « d'allure histiocytaire » ou « histioïde » (vacuolisation du cytoplasme avec parfois des images de phagocytose) (Figure 3)
- Cellules vacuolisées avec noyau repoussé en périphérie « en bague à chaton » (la fusion des vacuoles cytoplasmiques entraine l'accolement du noyau à la périphérie)
- Cellules mésothéliales « irritées » par « stimulation » supposée (anisocytose, anisochromie, déformation du noyau ; cytoplasme vacuolisé, mal délimité)(Grancher T et Jeanne G 2006)
- Cellules multinucléées

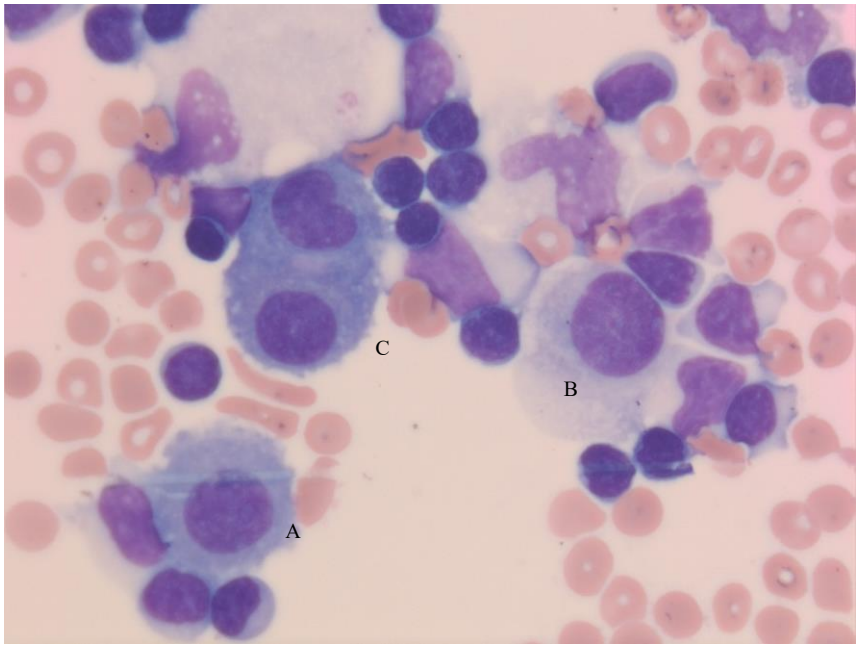


FIGURE 2: CELLULES MESOTHELIALES DANS UN LIQUIDE D'ASCITE (x630) (A ET B : CELLULES MESOTHELIALES NON ALTEREES ; C : DEUX CELLULES MESOTHELIALES ACCOLEES)

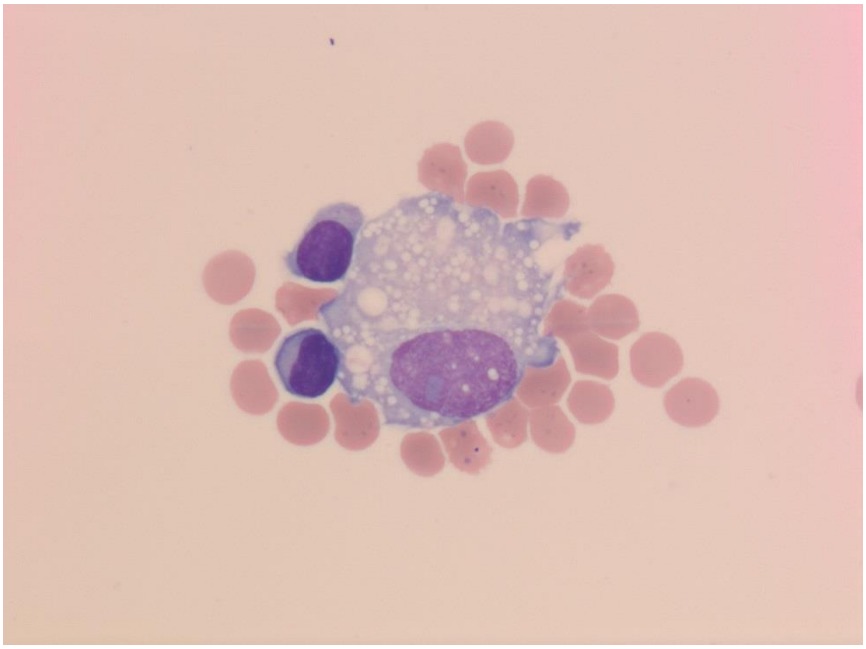


FIGURE 3 : CELLULE MESOTHELIALE EN TRANSFORMATION « HISTIOÏDE » DANS UN LIQUIDE D'ASCITE (X630). UN NUCLEOLE EST VISIBLE DANS LE NOYAU.

AUTRES CELLULES

Les autres cellules pouvant être observées dans l'ascite sont toutes d'origine extérieures à la cavité. Elles passent dans le liquide à la suite d'un processus bénin ou malin : polynucléaires neutrophiles (PN), éosinophiles (PEo) et basophiles (PBa), lymphocytes, monocytes,

plasmocytes, mastocytes, cellules lymphoïdes atypiques… Ces cellules ont un aspect semblable sur le frottis de liquides à celui retrouvé sur un frottis sanguin.

1.3.2.2 CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES DES LIQUIDES D'ASCITE

Une des possibilités de caractérisation des liquides est le classement par population cellulaire prédominante : (Grancher T et Jeanne G 2006; Buffet 2012; Lesesve 2016)

ASCITE A POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

La présence de PN dans un liquide d'ascite est fortement évocatrice d'une infection du liquide. Chez un cirrhotique, une numération de PN supérieure à 0,25 x 10^9 cellules / L (250 cellules / mm3) impose la mise sous traitement antibiotique probabiliste (souvent une céphalosporine de 3ème génération) avant même l'identification du germe. On peut retrouver en outre cette cytologie après une irradiation, témoignant d'une inflammation.

ASCITE A POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES

C'est une affection exceptionnelle, de prépondérance féminine. Les signes cliniques sont des douleurs abdominales associées à des troubles digestifs et une hyperéosinophilie sanguine est fréquemment associée. L'enquête étiologique est souvent négative. On notera en outre que les ponctions d'ascites itératives sont souvent responsables d'une augmentation des polynucléaires éosinophiles au fur et à mesure des ponctions.

ASCITE A LYMPHOCYTES D'ASPECT BANAL

Un liquide d'ascite avec plus de 70% de lymphocytes doit faire rechercher avant tout une tuberculose péritonéale. La tuberculose est responsable de 2 à 6 % des ascites. Elle doit être explorée par culture de liquide d'ascite dans un milieu riche pour les mycobactéries (flacons d'hémocultures pour mycobactéries notamment).

ASCITE A CELLULES LYMPHOÏDES ATYPIQUES

Le lymphome de Burkitt ainsi que d'autres lymphomes non Hodgkiniens, notamment le lymphome B diffus à grandes cellules, peuvent diffuser dans la cavité péritonéale. Dans ce cas, les cellules lymphomateuses du liquide auront des caractéristiques proches des cellules lymphomateuses sanguines. On observera fréquemment de nombreuses mitoses dans le liquide.

ASCITE A CELLULES MESOTHELIALES

Dans le cas d'une ascite d'origine transsudative, les cellules mésothéliales se détachent de la paroi péritonéale et flottent dans le liquide d'ascite. La chronicité des épanchements s'accompagne d'une vacuolisation des cellules mésothéliales qui prennent un aspect histioïde.

ASCITE A CELLULES MALIGNES METASTATIQUES

La présence de cellules malignes résulte de l'atteinte directe de la séreuse par voie lymphatique, par voie sanguine ou par simple propagation. La carcinose péritonéale est la deuxième grande cause d'ascite. Le cancer le plus fréquemment en cause dans les ascites péritonéales est l'adénocarcinome ovarien. La cytologie permet le diagnostic de la métastase dans environ 2/3 des cas seulement. La sensibilité de l'examen peut être augmentée en répétant trois jours de suite l'analyse.

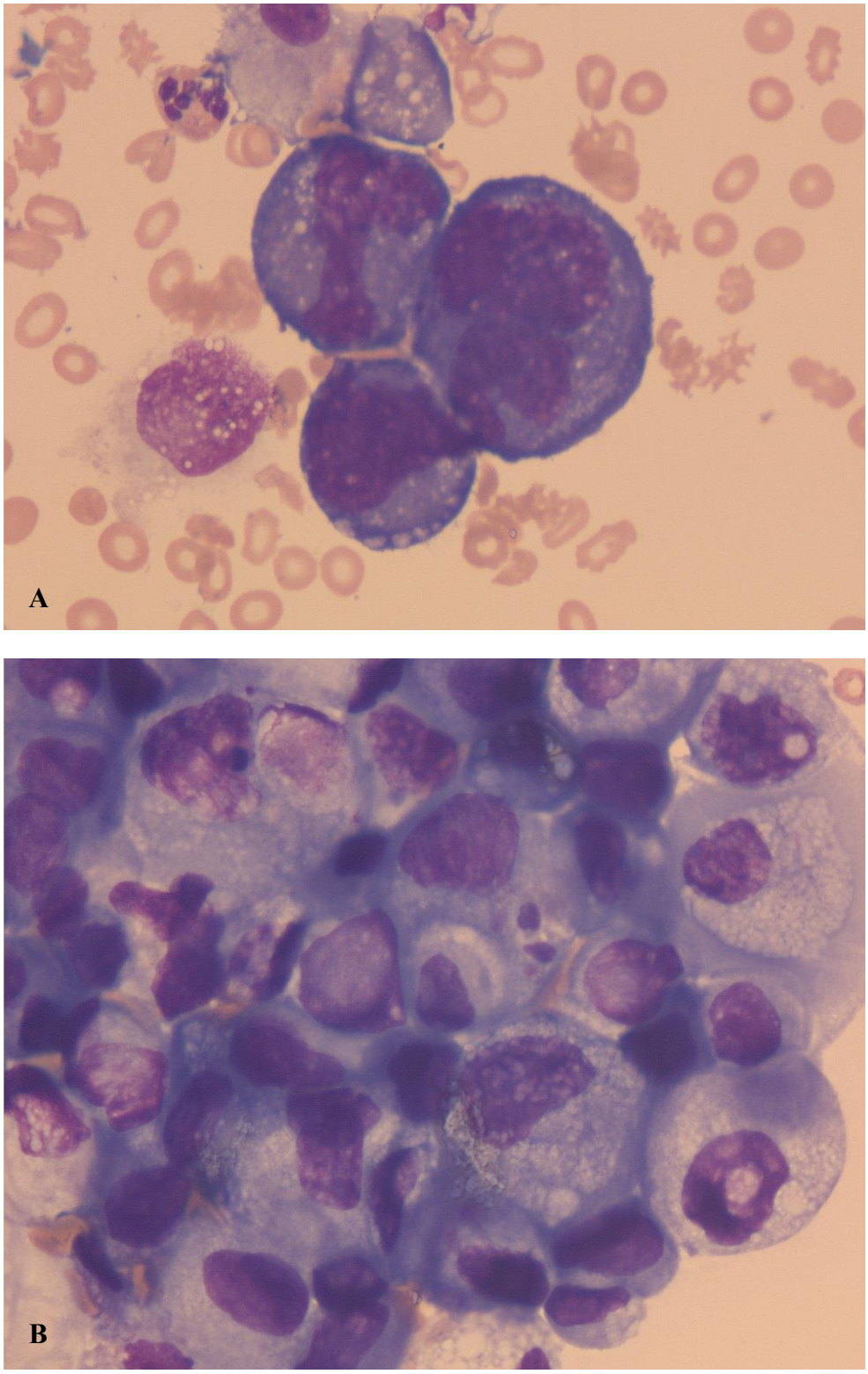


FIGURE 4: CELLULES NEOPLASIQUES DANS UN LIQUIDE D'ASCITE. CES CELLULES PROVIENNENT D'UN CARCINOME PANCREATO-BILLIAIRE (A) ET SE PRESENTENT PARFOIS SOUS FORME D'AMAS (B).

1.3.2.3 AUTRES ANALYSES

L'analyse biochimique du liquide d'ascite est demandée systématiquement : dosage des protides et de l'albumine. Le dosage des protides permet de classer le liquide en exsudat ou transsudat. Le calcul du gradient Albumine sérum / Albumine ascite oriente vers l'étiologie.

Ce gradient est supérieur à 11 dans les cirrhoses ou lors d'une hypertension portale. Inférieur à 11, il indique plutôt une carcinose péritonéale, une tuberculose péritonéale, une atteinte pancréatique ou un syndrome néphrotique (Carrier et al. 2014).

Pour la bactériologie, un examen direct est effectué systématiquement ainsi qu'une mise en culture sur milieu conventionnel ou flacon d'hémoculture.

Certaines analyses peuvent être demandées de manière moins usuelle : le dosage des triglycérides (supérieurs à 2,25 x 10^{-3} mol/L dans le cas d'une ascite chyleuse) ; le dosage de l'amylase (lors de suspicion d'ascite pancréatique, le rapport amylase ascite / amylase sérique est > 6). Actuellement le dosage de la lipase remplace le dosage de l'amylase. D'autres analyses sont possibles, non réalisées en routine, comme par exemple le marqueur tumoral ACE pour le diagnostic de carcinose péritonéale.

En cas de suspicion de pathologie néoplasique ou de cellules tumorales, le liquide d'ascite doit bénéficier d'une analyse anatomopathologique.

1.4 LIQUIDE PLEURAL

La plèvre est la membrane séreuse qui recouvre les poumons, la cage thoracique, le diaphragme et le médiastin. Les deux feuillets sont contigus et l'espace virtuel formé ainsi entre les deux est la cavité pleurale. Normalement, les deux feuillets ne sont séparés que par une quantité infime de fluide quasi virtuelle qui facilite les mouvements de glissement des deux membranes l'une contre l'autre. Le liquide pleural est produit par le feuillet pariétal puis est résorbé par le feuillet viscéral. Un déséquilibre entre la production ou la résorption du liquide peut entraîner l'accumulation de fluide dans la cavité pleurale. Les causes les plus fréquentes d'épanchements pleuraux sont : l'insuffisance cardiaque congestive, les pneumopathies infectieuses, les néoplasies ou l'embolie pulmonaire (Kjeldsberg 2015).

1.4.1 CLINIQUE ET EXAMEN

Les symptômes d'un épanchement pleural sont le plus souvent : dyspnée, toux et douleur thoracique vive et non irradiante. L'examen clinique retrouve une diminution des vibrations vocales, une matité à la percussion et une diminution ou abolition du murmure vésiculaire. Lorsque l'épanchement pleural est unilatéral, il est le plus souvent dû à une pathologie pleurale ou pulmonaire, à la différence d'un épanchement bilatéral qui sera plutôt le témoin d'une atteinte systémique.

Les examens systématiques à réaliser pour explorer un épanchement pleural comprennent une radiographie de thorax, et la réalisation d'une ponction pleurale pour analyse du liquide obtenu. Les contre-indications de cette ponction sont similaires à celles décrites pour la ponction d'ascite.

FIGURE 5: RADIOGRAPHIE THORACIQUE METTANT EN EVIDENCE UN EPANCHEMENT GAUCHE DE MOYENNE ABONDANCE. PRESENCE D'UNE OPACITE BASITHORACIQUE EFFAÇANT LA COUPOLE DIAPHRAGMATIQUE. (D'APRES EMC RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE (DEBRAY M-P ET AL. 2013))

Macroscopiquement, le liquide pleural peut déjà informer sur l'origine de l'épanchement. Un liquide trouble évoque une infection, un aspect blanc laiteux un chylothorax, un liquide uniformément sanglant un hémothorax. Un épanchement sérohématique oriente vers une cause néoplasique. En revanche, un liquide jaune citrin et clair ne préjuge pas de l'origine (Pastré et al. 2015).

1.4.2 CYTOLOGIE ET CARACTERISTIQUES CYTOLOGIQUES DES LIQUIDES PLEURAUX

La numération cellulaire globale est secondaire dans l'analyse des liquides pleuraux par rapport à la formule (Pastré et al. 2015; Lesesve 2016).

Les cellules retrouvées dans un liquide pleural sont identiques aux cellules retrouvées dans les liquides d'ascites. Les cellules mésothéliales possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques.

PLEURESIES A POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

Plus de 50 % de PN signe un phénomène aigu. Souvent, le pourcentage augmente jusqu'à 90%. Il s'agit de processus inflammatoires ou infectieux.

PLEURESIES A POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES

Les PEo sont supérieurs à 10% ; cette valeur peut atteindre 90%. On les rencontre dans les maladies cancéreuses, allergiques, au décours d'une embolie pulmonaire, au décours d'un pneumothorax ou d'un traumatisme thoracique. Comme pour les liquides d'ascites, les ponctions itératives semblent être une cause d'augmentation des PEo mais cela reste controversé. L'origine de ces pleurésies à PEo reste souvent indéterminée.

PLEURESIES LYMPHOCYTAIRES

La formule est composée de plus de 50% de lymphocytes. Ces pleurésies évoquent fortement une tuberculose ou un lymphome. L'examen complémentaire de choix, dans le premier cas, est la biopsie pleurale. Un immunophénotypage est recommandé dans le second. On retrouve aussi des pleurésies lymphocytaires dans les pleurésies virales, ou dans les pleurésies secondaires aux pneumopathies à mycoplasme et chlamydiae. On doit aussi évoquer la possibilité d'un envahissement pleural d'hémopathie lymphoïde. Enfin, une lymphocytose pleurale peut être le témoin d'un épanchement chronique.

EPANCHEMENTS A PREDOMINANCE DE CELLULES MESOTHELIALES

C'est principalement le cas des transsudats ou des mésothéliomes. Dans le cas du mésothéliome, on notera que les cellules mésothéliales malignes sont majoritairement dystrophiques et souvent en amas. L'aspect des cellules est parfois déroutant et peut faire hésiter le diagnostic.

EPANCHEMENTS A POPULATIONS POLYMORPHES

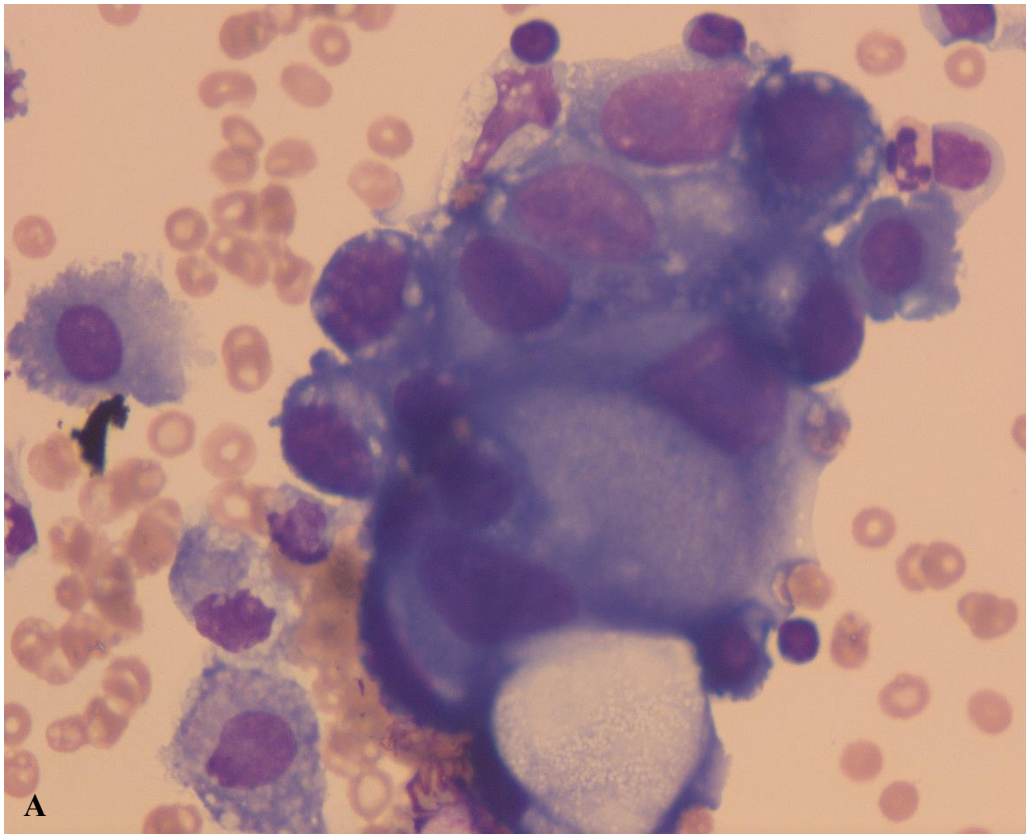
On nomme ainsi les épanchements avec formule cytologique bigarrée : plusieurs types de cellules coexistent sans prédominance notable (lymphocytes, PN, cellules mésothéliales). Deux orientations sont possibles :

- épanchement bénin

L'épanchement est dans ce cas le reflet aspécifique d'un processus inflammatoire.

- épanchement malin

On note à l'examen microscopique la présence de cellules suspectes : typiquement, elles ont un noyau irrégulier, déformé avec un ou plusieurs nucléoles, et une hétérogénéité chromatinienne. Elles sont parfois cohésives monomorphes. (Figure 6) On observe des mitoses. Il est important de savoir dépister ces cellules malignes afin d'orienter le clinicien sur une pathologie tumorale sous-jacente.



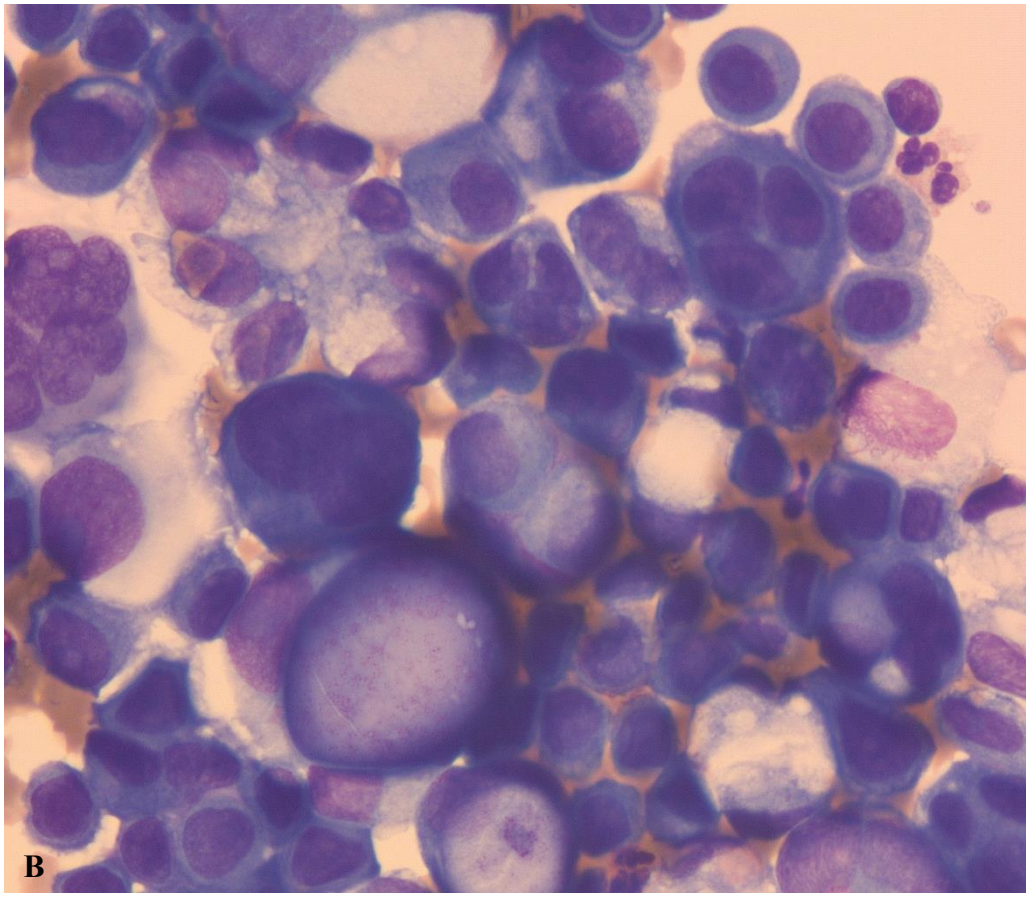


FIGURE 6: AMAS DE CELLULES METASTATIQUES DANS UN LIQUIDE PLEURAL. LES ORIGINES DES CELLULES NEOPLASIQUES RETROUVEES DANS LES LIQUIDES PLEURAUX SONT VARIABLES: PAR EXEMPLE UN ADENOCARCINOME MAMMAIRE (A) OU UN CANCER DE L'ENDOMETRE (B)

1.4.3 AUTRES ANALYSES

Peu d'examens biochimiques sont utilisés en routine. Les protides sont le reflet de l'augmentation de la perméabilité pleurale, alors que les LDH témoignent plutôt de son inflammation. Ces deux marqueurs, à l'aide des critères de Light de 1972 (Light et al. 1972), permettent de faire la distinction entre exsudat et transsudat. On pourra aussi calculer, tout comme dans les ascites, les gradients protéiques ou d'albumine, pour déterminer l'origine de l'épanchement.

En bactériologie, là encore, un examen direct peut être réalisé et l'ensemencement de milieux adaptés ou de flacons d'hémocultures anaérobies et aérobies permet de préciser le diagnostic infectieux. En cas de suspicion d'infection tuberculeuse, les mises en cultures appropriées doivent être réalisées.

En 2ème intention, on pourra réaliser un hématocrite, pour étayer un hémothorax, un dosage de pH ou de glucose pour le caractère infectieux, ou encore un dosage du cholestérol ou des triglycérides dans le cas d'un chylothorax (Pastré et al. 2015).

Comme pour les liquides d'ascite, en cas de suspicion d'atteinte maligne, une partie du prélèvement doit être envoyé pour analyse anatomo-pathologique.

1.5 LIQUIDE SYNOVIAL

1.5.1 DEFINITION

Le liquide synovial (appelé aussi liquide articulaire) remplit l'espace des cavités des articulations afin de les lubrifier. Il est fabriqué par les cellules synoviales à partir d'un filtrat de plasma (Tercic et Bozic 2001). L'analyse du liquide synovial est un examen clé de la démarche diagnostique. Trois analyses sont particulièrement effectuées : la cytologie, la bactériologie et la recherche des cristaux. La biochimie ne présente pas d'intérêt (Bardin 2008).

FIGURE 7 : EPANCHEMENT ARTICULAIRE DU GENOU. 1 : EPANCHEMENT PRESENT DANS LE CUL DE SAC QUADRICIPITAL; 2 : FEMUR ; 3 : PATELLA (D'APRES INFO-RADIOLOGIE.CH)

1.5.2 CLINIQUE ET EXAMEN

La ponction est réalisée par un opérateur entraîné, à l'aide d'une aiguille fine. Le recueil se fait sur des tubes contenant un anticoagulant, les plus appropriés étant l'héparinate de sodium ou le citrate de sodium. Les autres anticoagulants peuvent créer des artefacts pouvant être confondus avec des cristaux. L'idéal est un examen extemporané du liquide, au mieux dans un délai maximum de 6h. (Grancher T et Jeanne G 2006; Bardin 2008; Lesesve 2016)

Le premier examen établit l'aspect macroscopique : un liquide synovial normal est transparent, clair, très visqueux et incoagulable. Plus le liquide est inflammatoire, moins il est visqueux, la viscosité étant dépendante de la concentration et du degré de polymérisation de l'acide hyaluronique sécrété par les cellules synoviales. Les leucocytes présents dans l'articulation sécrètent des enzymes qui dépolymérisent l'acide hyaluronique (Tercic et Bozic 2001).

L'aspect macroscopique se modifie en fonction de la pathologie : jaune paille ou jaune citrin dans le cas des arthropathies dégénératives, trouble et purulent dans les arthrites septiques. Les hémarthroses donnent des liquides synoviaux sanglants, non coagulables. On pourra chercher en outre des petites particules blanches, « en grains de riz », dans la polyarthrite rhumatoïde qui correspondent à des « agrégats » de fibrine et de débris synoviaux (Lesesve 2016).

1.5.3 CYTOLOGIE

Le liquide synovial normal contient moins de 0,2 x 10^9 cellules / L (200 cellules par mm^3). Il s'agit essentiellement de PN, de lymphocytes et de cellules du revêtement synovial (Tercic et Bozic 2001; Grancher T et Jeanne G 2006; Bardin 2008; Lesesve 2016).

CELLULES SYNOVIALES

Elles constituent le revêtement de la membrane synoviale. Elles sont libérées en réaction à une stimulation (la ponction peut suffire à entraîner la présence de cellules synoviales dans le liquide). Ce sont des cellules avec un noyau rond ou ovale, souvent excentré (d'aspect « plasmocytoïde »), avec un rapport nucléo-cytoplasmique proche de 60%. Le cytoplasme est basophile, avec un aspect « sale ».

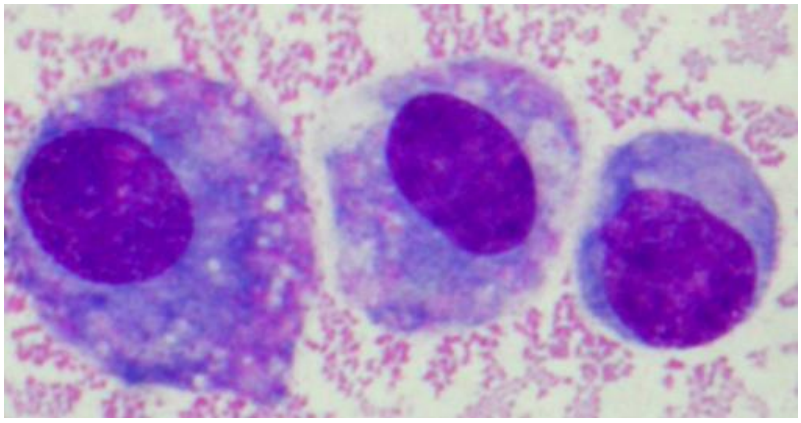


FIGURE 8 : CELLULE SYNOVIALE (D'APRES GRANCHER T ET JEANNE G)

LIQUIDES D'EPANCHEMENTS SYNOVIAUX MECANIQUES

Ils sont de couleur jaune pâle et assez visqueux, ont une cellularité inférieure à 2 x 10^9 cellules / L (2000 cellules par mm^3). Ces épanchements ont une prédominance d'éléments mononucléés ; ils se rencontrent dans l'arthrose, les ostéonécroses aseptiques, les ostéochondrites disséquantes, les algodystrophies, l'ostéo-chondromatose synoviale.

SYNOVITES INFLAMMATOIRES

Le liquide est d'une couleur plus marquée, jaune paille. Il est parfois purulent dans les arthrites septiques. La viscosité est basse. Le nombre de cellules est supérieur à 2 x 10^9 cellules / L (2000 cellules par mm^3). Au niveau de la formule cellulaire, on retrouve plusieurs possibilités :

- Prédominance de polynucléaires neutrophiles

Un pourcentage de PN dépassant les 95% est fortement évocateur d'une arthrite bactérienne ou microcristalline. On notera que les PN avec inclusions (anciens « ragocytes » de la polyarthrite rhumatoïde ou « cellules LE » du lupus) ne sont pas spécifiques.

- Prédominance de lymphocytes

Une formule présentant plus de 70 % de lymphocytes témoigne le plus souvent d'une polyarthrite rhumatoïde, d'une arthrite virale, d'un lupus érythémateux disséminé voir d'une arthrite tuberculeuse.

- Prédominance de monocytes

Une prédominance de monocytes est plutôt évocatrice d'une arthrite virale mais sans spécificité. De nombreux rhumatismes inflammatoires peuvent conduire à des épanchements

monocytaires : polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé, sarcoïdose, rhumatisme psoriasique… La monocytose synoviale n'est donc pas spécifique.

- Prédominance de polynucléaires éosinophiles

Il est rare d'observer un épanchement riche en PEo (c'est-à-dire supérieur à 10%), excepté lors d'arthrite parasitaire, d'arthrite chez des sujets allergiques, dans la maladie de Lyme, ou après une arthrographie avec utilisation de produit de contraste. La cause reste souvent indéterminée.

LIQUIDES SYNOVIAUX HEMORRAGIQUES

Les liquides hémorragiques sont à différencier des liquides avec contamination sanguine par ponction traumatique ou perforation de vaisseaux apportant un peu de sang dans la seringue. Les vrais liquides hémorragiques peuvent être de causes multiples : épanchements post traumatiques, trouble de l'hémostase (hémophilie notamment, en principe à ne pas ponctionner), arthrite septique, hémangiomes synoviaux, synovites villonodulaires, arthrose avec ulcération de l'os sous chondral. L'aspect de ces liquides est évidemment sanglant.

LIQUIDES SYNOVIAUX AVEC PRESENCE DE CELLULES ATYPIQUES

La recherche de cellules néoplasiques est toujours indiquée. La présence de blastes s'observe parfois, surtout lors des leucémies aiguës de l'enfant avec atteinte articulaire. Exceptionnellement, des cellules néoplasiques provenant de tumeurs solides peuvent être observées. Une biopsie est indiquée dans ces cas. (Marengo et al. 2011)

1.5.4 AUTRES EXAMENS

Aucun test n'est indispensable dans la stratégie diagnostique usuelle.

Le liquide synovial peut être ensemencé sur milieux classiques ou en hémoculture. On adaptera les milieux si besoin pour la recherche de mycobactéries. On peut en outre effectuer une recherche de pathogènes à pousse difficile par des techniques de biologie moléculaire ; on pensera notamment à *Chlamydia*, au Gonocoque…

La recherche de cristaux est très importante pour le diagnostic d'arthropathie microcristalline. Elle s'effectue au microscope à lumière polarisée ou en spectrométrie. On recherche notamment les cristaux d'urate monosodique dans la goutte, les cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté dans la chondrocalcinose ; les cristaux d'apatite et autres phosphates de calcium sont retrouvés dans les mise à nu de l'os sous chondral notamment. D'autres cristaux peuvent être retrouvés moins fréquemment (cristaux d'oxalate de calcium, de cholestérol, microcristaux de dérivés cortisoniques…).

1.6 AUTRES LIQUIDES

D'autres liquides biologiques peuvent être étudiés : Les LCR, les liquides péricardiques … Ces liquides n'étant pas analysés dans la suite de ce travail, ils ne seront pas abordés ici.

L'analyse des liquides biologiques couvre différentes facettes de la biologie médicale. Pour la cytologie, plusieurs techniques co-existent : la technique standard, encore appliquée dans de

nombreux laboratoires de petite taille, consiste à effectuer le comptage cellulaire manuellement, à l'aide de cellules de comptage de type Nageotte ou Malassez. Puis la formule est réalisée sur un frottis coloré suivant la technique de May-Grünwald Giemsa (MGG), avec cyto-centrifugation préalable. Dans les laboratoires de plus grande taille, analysant un nombre plus élevé de liquides, il peut être intéressant de mettre en place un système analytique automatisé permettant le comptage et/ou la réalisation de la formule cellulaire sans revue humaine. Des constructeurs ont développé des modules d'analyses spécifiques, par exemple SYSMEX® (chaîne XN associé au module Bodyfluid™ (BF)).

2 APPAREIL AUTOMATISE XN (SYSMEX®) ET MODULE BODYFLUID

2.1 CHAINE XN

2.1.1 DESCRIPTION

La gamme d'automates d'hématimétrie XN est développée par la société SYSMEX® (SYSMEX® Corporation, Kobe, Japon). Ces appareils sont composés de différents modules analytiques qui peuvent être complétés par un étaleur colorateur (SP-10) et par un module de lecture automatisée des lames de frottis sanguins (DM ou DI). Le service d'hématologie biologique du CHRU de Nancy utilise une chaîne XN 9000 : cette chaîne est composée de 3 modules (2 modules experts et 1 module classique), comprenant chacun tous les canaux d'analyses classiques permettant de réaliser les hémogrammes (NFS) ainsi que, pour les modules experts, le canal RET (réticulocyte) et le canal PLT-F (mesure en fluorescence des plaquettes). Le module classique est lui-même complété par un module BF. Un étaleur colorateur de frottis sanguins termine la chaîne.

Plusieurs principes d'analyses sont utilisés en hématimétrie (photométrie, impédance, fluorocytométrie en flux), utilisés également par le module BF.

2.1.2 PRINCIPES D'ANALYSES ET CANAUX UTILISES

2.1.2.1 PHOTOMETRIE : HEMOGLOBINE

La méthode utilisée pour le dosage de l'hémoglobine est une méthode photométrique après lyse des hématies et transformation de l'hémoglobine en un complexe dont l'absorbance est mesurée à 555nm et est directement proportionnelle à la quantité d'hémoglobine dans la chambre de mesure.

2.1.2.2 IMPEDANCE : GLOBULE ROUGE ET PLAQUETTE

Après focalisation hydrodynamique par manchonnage, les globules rouges et les plaquettes passent un à un entre deux électrodes. Le courant électrique appliqué entre les deux électrodes varie à chaque passage de cellule et crée une impulsion électrique proportionnelle à la taille de la cellule. Les plaquettes et les globules rouges sont séparés par leur taille, entre 2 et 40 fL pour les plaquettes et entre 40 et 250 fL pour les globules rouges.

2.1.2.3 FLUOROCYTOMETRIE EN FLUX : GLOBULES BLANCS, RETICULOCYTES, PLAQUETTES, GLOBULES ROUGES

Un fluorochrome est ajouté à l'échantillon, qui se fixe sur l'ADN ou l'ARN des cellules. Un faisceau de diode laser traverse une chambre de mesure : il entre en contact avec la cellule présente et est diffracté en plusieurs directions. Trois récepteurs sont situés après la chambre de mesure et permettent de récolter différents signaux lumineux (Figure 9) :

- la diffraction en petit angle donne une information sur la taille (Forward-scattered light FSC) ; plus la cellule est grande, plus la diffraction sera importante ;
- la diffraction grand angle donne une information sur la structure de l'intérieur de la cellule : plus la cellule est granuleuse ou le noyau complexe, plus la diffraction sera importante (Side-scattered light SSC) ;
- enfin un récepteur récolte la fluorescence des cellules (Side-fluorescence light SFL) : plus la cellule sera jeune ou activée, plus l'ADN sera accessible au marquage et plus la fluorescence sera importante ; cette fluorescence étant liée à la quantité de fluorochrome fixée par chaque cellule.

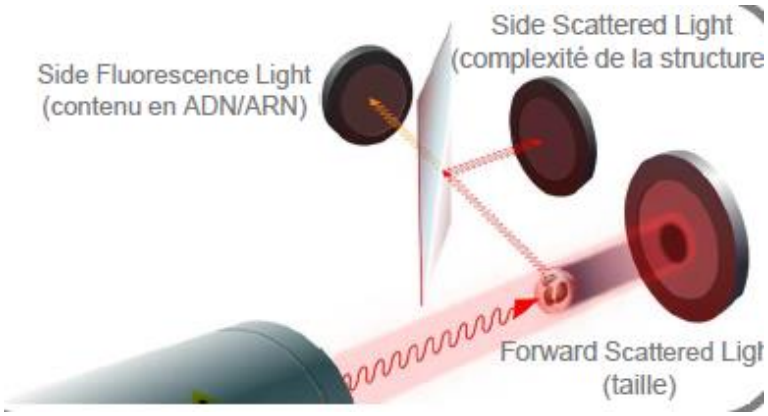


FIGURE 9 : ANALYSE PAR FLUOROCYTOMETRIE : 3 PARAMETRES EXPLOITABLES (D'APRES SYSMEX®)

Plusieurs canaux utilisent cette technologie : le canal RET, pour le comptage des réticulocytes ainsi qu'un deuxième comptage des globules rouges et des plaquettes ; dans le canal PLT-F, un fluorochrome spécifique de protéines membranaires plaquettaires permet de réaliser un comptage par fluorescence des plaquettes.

Pour les globules blancs, deux canaux sont utilisés :

Canal WNR : Une lyse forte est appliquée à l'échantillon, entraînant la lyse des plaquettes et des globules rouges, ainsi que l'élimination du cytoplasme des globules blancs (sauf celui des polynucléaires basophiles, résistant à la lyse). Le fluorochrome ajouté (Fluorocell-WNR) marque les noyaux des globules blancs et des érythroblastes (NRBC). Ce canal permet un comptage et une séparation entre ces deux populations, ainsi qu'une première numération des polynucléaires basophiles. Les données sont représentées sous forme d'un « scattergram » figurant la taille des cellules en fonction de la fluorescence (Figure 10).

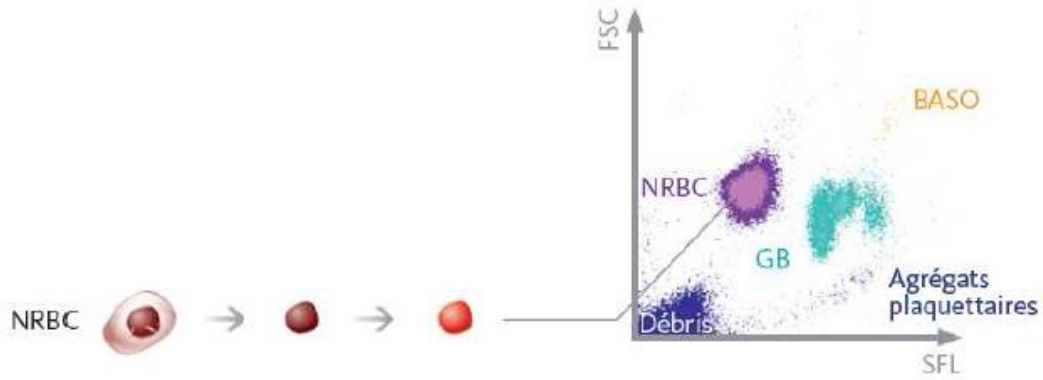


FIGURE 10: REPRESENTATION DU CANAL WNR : SEPARATION ET COMPTAGE DES LEUCOCYTES, POLYNUCLEAIRES BASOPHILES ET ERYTHROBLASTES (D'APRES SYSMEX®)

Canal WDF : Une lyse douce est appliquée à l'échantillon, ce qui entraîne la lyse des globules rouges et perméabilise les globules blancs ; le fluorochrome (Fluorocell-WDF) peut ainsi marquer les acides nucléiques des cellules. Le scattergram obtenu en représentant la fluorescence des cellules en fonction de la structure des cellules permet d'obtenir des nuages de points séparés (Figure 11). Ce canal permet aussi d'effectuer un deuxième comptage des globules blancs.

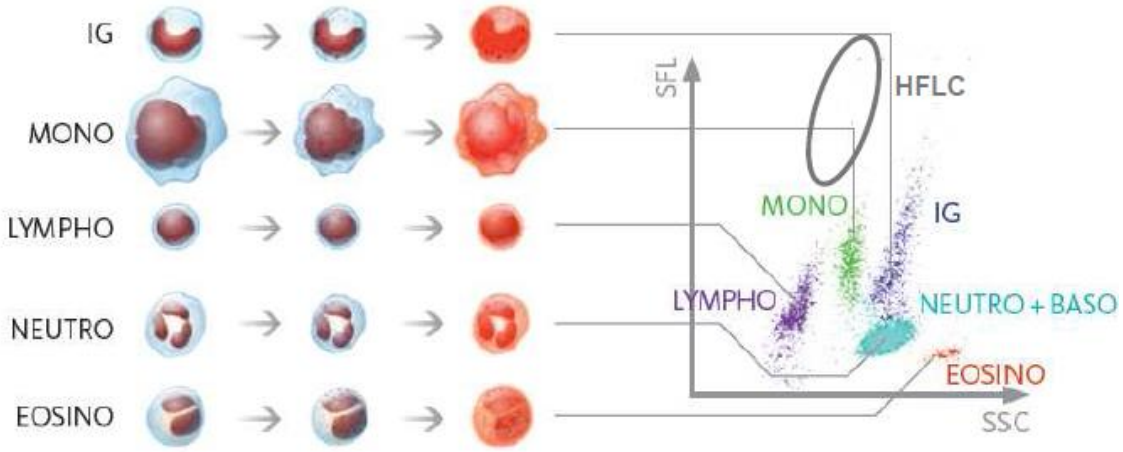


FIGURE 11: REPRESENTATION DU CANAL WDF. SEPARATION DES POPULATIONS CELLULAIRES (LYMPHOCYTE, MONOCYTE, IG (GRANULEUX IMMATURES), POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE ET POLYNUCLEAIRE BASOPHILE, POLYNUCLEAIRE EOSINOPHILE) ET ETABLISSEMENT DE LA FORMULE LEUCOCYTAIRE (D'APRES SYSMEX®)

2.2 MODULE BODYFLUID™

Le module BF permet l'analyse automatisée des liquides d'ascite, pleuraux et synoviaux et la numération des globules rouges et des cellules nucléées, ainsi qu'une approche de la formule.

2.2.1 DESCRIPTION DU MODULE BODYFLUID

Le module BF est un module analytique développé initialement pour l'automate XE-5000 (génération précédente d'automates d'hématologie de SYSMEX®). Ce module a été conçu pour le passage sans prétraitement de liquides d'épanchements et de liquides céphalo-rachidiens. Il a ensuite été amélioré pour la gamme d'automates XN : le nombre total de

cellules analysées est 4 fois supérieur avec le XN, le volume de prise a été réduit à 88µL (contre 130 µL avec le XE), et le passage en tube fermé et avec microtubes a été développé.

2.2.2 PARAMETRES MESURES ET ANALYSES DES DONNEES

L'échantillon est analysé sur deux canaux : canal GR-i (comptage des hématies réalisé par impédance dans le canal GR/PLT) ; et canal WDF (comptage des globules blancs par fluorocytométrie en flux). C'est l'utilisation du canal WDF qui sera principalement étudié dans le cadre de ce travail.

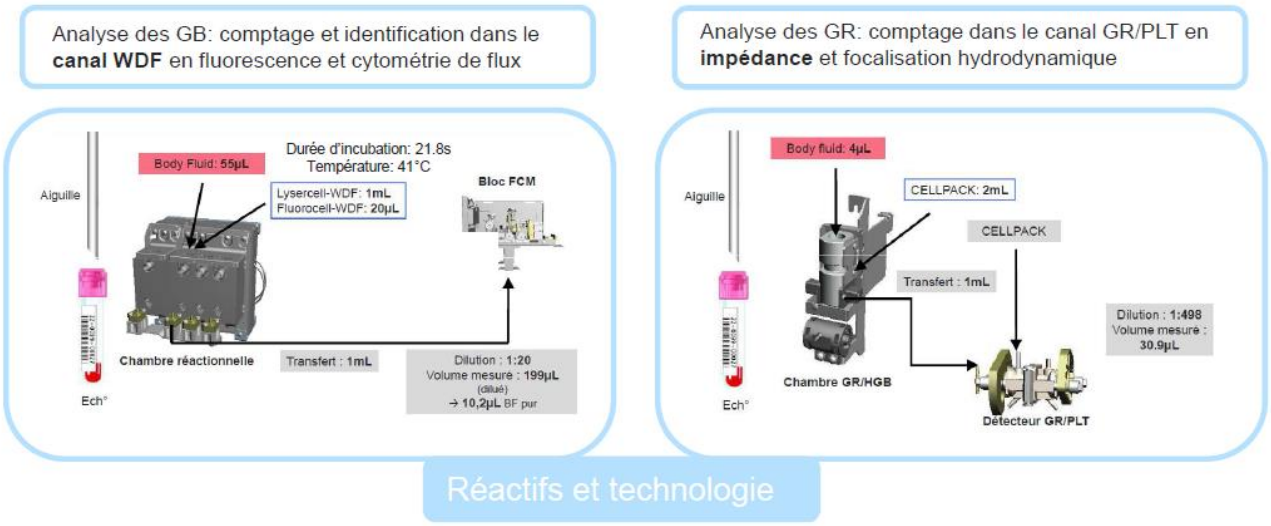


FIGURE 12: TECHNOLOGIES D'ANALYSES SUR LE MODULE BODYFLUID (D'APRES SYSMEX®)

L'analyse par le canal GR-i permet d'obtenir la concentration en hématies (RBC-BF) dans le prélèvement.

L'analyse par le canal WDF permet d'obtenir plusieurs paramètres :

- La concentration totale en cellules nucléées dans l'échantillon (TC-BF),
- La concentration en globules blancs dans le liquide (WBC-BF) (Figure 13),
- Le module sépare en deux populations les cellules de la zone WBC-BF à l'aide du scattergram WDF (Figure 13). Il établit ainsi le pourcentage de cellules polynucléées (PMN) et le pourcentage de cellules mononucléées (MN). Selon le fournisseur, les PMN contiennent les polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles et les MN comprennent les lymphocytes et les monocytes. Ce scattergram est visible sur le logiciel I-PU de l'hématimètre (Figure 14).

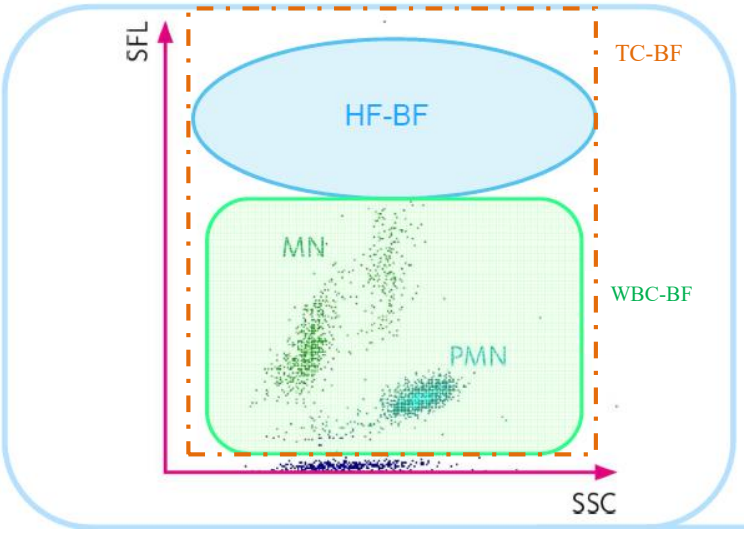


FIGURE 13: SCATTERGRAM WDF OBTENU PAR LE MODULE BODYFLUID ET REALISATION DE LA FORMULE CYTOLOGIQUE (D'APRES SYSMEX®)

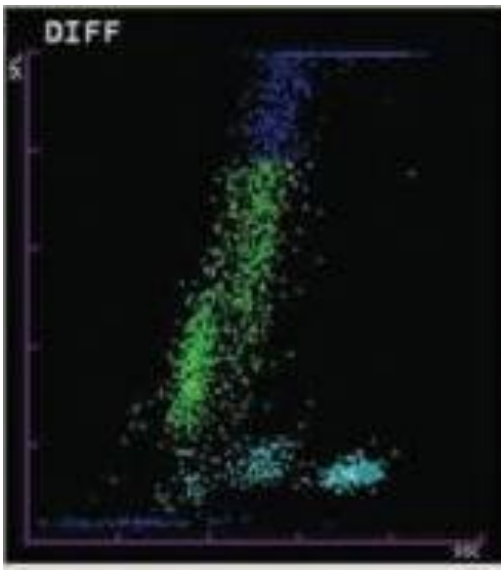


FIGURE 14 : REPRESENTATION GRAPHIQUE CLASSIQUE WDF (SFL EN FONCTION DE SSC) SUR LE LOGICIEL I-PU ISSUE DE L'ANALYSE D'UN LIQUIDE BIOLOGIQUE SUR LE MODULE BF

Des paramètres de recherche sont en outre obtenus grâce au canal WDF (non validés par le constructeur et donc non utilisables tels quels en routine) :

- Zone HF-BF : Elle correspond à une zone du graphique WDF située au-dessus de la zone WBC-BF, où sont situées les cellules avec une fluorescence forte : selon le constructeur, les cellules mésothéliales et les macrophages apparaissent dans cette zone. La numération des cellules apparaissant dans cette zone est rendue par l'automate soit en valeurs absolues, soit en pourcentage pour 100 WBC.

- Formule dite « de recherche », calculée par l'automate, donnant un pourcentage de polynucléaires éosinophiles (EO-BF), neutrophiles (NE-BF), de monocytes (MO-BF) et de lymphocytes (LY-BF).

Le seuil délimitant les cellules hautes fluorescences (qui est fixe et arbitraire) ainsi que les outils d'analyse permettant d'obtenir la formule de recherche ne sont pas connus. Ces paramètres seront étudiés plus en détails dans la suite de ce travail.

2.2.3 UTILISATION DU MODULE BF AU LABORATOIRE

Dans le service d'hématologie biologique du CHRU de Nancy, le module BF est utilisé 24h/24h (en routine et en période de permanence des soins). Les liquides sont prélevés dans les services cliniques sur tube EDTA (excepté pour les liquides articulaires, où seuls les tubes citratés sont acceptés). Tous les échantillons de liquides pleuraux, d'ascites, et articulaires reçus au laboratoire sont analysés sur le module puis une revue du frottis est réalisée, avec (ou sans) cyto-centrifugation (450 rpm pendant 5 min), pour établir la formule cytologique et rechercher la présence de cellules anormales. Cela représente environ 5 liquides biologiques analysés par jour.

Suite à l'analyse du liquide biologique, les paramètres rendus sont :

- Numération des hématies : à partir de la valeur RBC-BF
- Numération des globules blancs : le paramètre WBC-BF et le paramètre TC-BF sont rendus
- Formule cytologique : obtenue après lecture au microscope optique

A la lecture au microscope optique, sont différenciés : les polynucléaires neutrophiles (la valeur des PN est donnée à la fois en pourcentage et en valeur absolue (calculée à partir du pourcentage et de la valeur TC-BF)), les polynucléaires éosinophiles, les lymphocytes, l'ensemble monocytes et macrophages, les cellules mésothéliales. Les cellules atypiques sont signalées dans un commentaire biologique mais ne font pas parties de la formule (elles se présentent souvent sous forme d'amas et il est difficile de les dénombrer). Les monocytes et les macrophages ne sont pas séparés dans le comptage car ces deux populations cellulaires sont difficiles à différencier l'une de l'autre sur des lames de liquides cytocentrifugés (Figure 15). Cette approximation n'est pas préjudiciable sur le plan clinique. La confusion est de plus possible entre les cellules mésothéliales vacuolisées et les monocytes et macrophages.

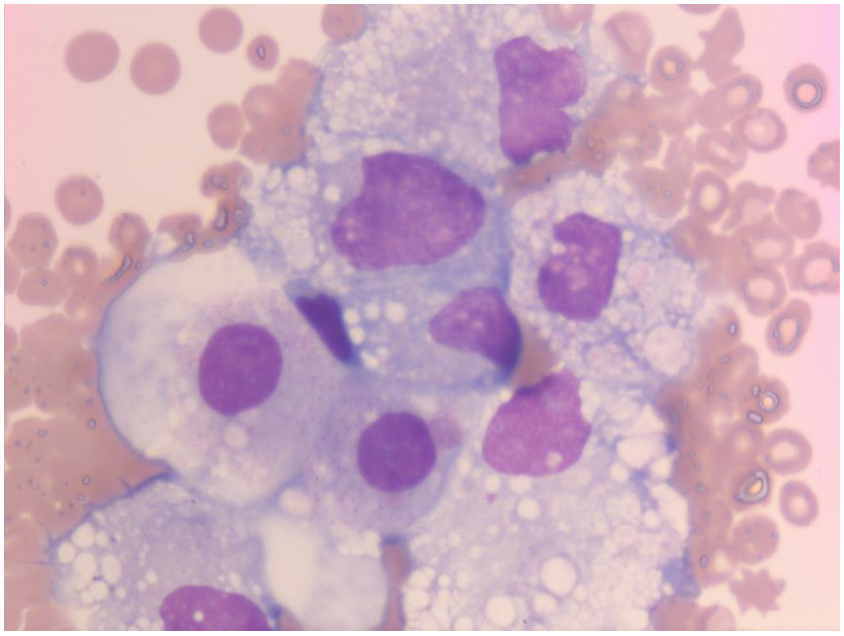


FIGURE 15 : EXEMPLE DE DIFFICULTES DE DIFFERENCIATIONS ENTRE LES MONOCYTES ET LES MACROPHAGES (LIQUIDE D'ASCITE, X630)

Pour évaluer le bon fonctionnement du module BF, deux niveaux de contrôles qualités internes, XN BF-Check, proposés par SYSMEX®, sont passés 1 fois par jour. Les contrôles sont analysés ensuite selon les règles de Westgard et tout contrôle ne satisfaisant pas à ces règles induit une action corrective et une étude d'impact si besoin. Ces contrôles sont externalisés et comparés au groupe de pair.

2.2.4 INTERETS ET LIMITES DU MODULE BODYFLUID

La réalisation de la numération des liquides biologiques par une méthode automatisée permet de s'affranchir de plusieurs inconvénients du comptage manuel :

- volume d'échantillon nécessaire pour l'analyse plus faible,
- nombre de cellules analysées plus élevé,
- diminution du temps d'analyse,
- affranchissement des variabilités inter-opérateurs du comptage manuel.

De plus, le module BF possède de bonnes performances analytiques, et la vérification de la méthode est plus aisée pour une méthode automatisée que pour une méthode manuelle.

Cependant, il faut retenir plusieurs inconvénients à l'utilisation de ce module :

- formule cytologique non validée par le constructeur : formule obligatoirement réalisée au microscope par un technicien
- absence d'alarmes détectant la présence de cellules anormales.

De plus, quelques développements sont à réaliser pour exploiter toutes les fonctionnalités du module : c'est le but de ce travail. En premier lieu, il est nécessaire d'en évaluer les performances. La formule cytologique et la détection de cellules anormales seront étudiées ensuite.

3 EVALUATION DES PERFORMANCES DU MODULE BODYFLUID

Un laboratoire en démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189 v2012 se doit d'utiliser des méthodes validées ou vérifiées. Les équipements et les réactifs sont utilisés dans les conditions préconisées par le fournisseur : il faut donc réaliser une vérification quantitative des méthodes de portée A, c'est-à-dire la vérification des performances du couple automate/réactif annoncées par le fabricant. Cette vérification de méthode comprend une première partie de bibliographie, une détermination des critères de performance et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes. Enfin, sera réalisée une vérification expérimentale sur site en s'appuyant sur le guide technique d'accréditation édité par le COFRAC.

L'analyse de risque demandée pour toute vérification ou validation de méthode découlera, pour le module BF, de l'analyse de risque de la numération et de la formule cellulaire.

Une analyse bibliographique approfondie est nécessaire pour relever de manière exhaustive les données techniques existantes. L'analyse automatisée des liquides biologiques sur module spécifique n'est pas très répandue, et encore peu de laboratoires dans le monde possèdent le module BF de SYSMEX®. En outre, bon nombre de publications scientifiques portant sur le module BF ont été établies à partir d'un hématimètre XE. Les différences entre ces deux versions du module BF sont connues (détaillées précédemment) et, bien que ces différences soient mineures, les données issues de modules BF reliés à un XE seront à considérer avec précautions. Pour certains critères de performances, seuls les critères fournisseurs sont disponibles. Enfin, les paramètres étudiés par Ricos (Ricos and al) seront rapidement évoqués, car ils sont applicables au sang mais non expérimentés pour les liquides biologiques. Il n'existe pas de recommandations de sociétés savantes pour les liquides biologiques. La bibliographie existante au sujet du module BF lié à un XN est donc restreinte. Le choix des critères de performances ne s'appuie donc que sur ces publications et les données fournisseurs.

La vérification de performance du module BF sur site comprend, selon le SH GTA 04 : l'évaluation de la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), l'approche de la justesse et de l'exactitude, l'évaluation de l'incertitude et des facteurs de variations et la comparaison à une autre méthode utilisée au laboratoire. Les intervalles de mesures, données d'interférences, données de contamination, robustesse, stabilité des réactifs et intervalle de référence seront repris dans la bibliographie.

En routine, seuls sont utilisés le nombre total de globules blancs (WBC-BF) et le nombre total de globules rouges (RBC-BF). La mesure TC-BF est en outre utilisée pour le rendu des PN en valeur absolue à partir de la formule. Cette vérification de méthodes ne s'intéressera donc qu'à ces trois paramètres.

3.1 FIDELITE

3.1.1 REPETABILITE

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. On peut utiliser des échantillons biologiques ou des échantillons contrôles internes de qualité.

Dans la littérature, il n'existe pas de données d'études de répétabilité réalisées avec un module BF associé à un automate XN, hormis les données fabricants. Il est à noter cependant que 3 équipes ont étudiés la répétabilité du paramètre WBC-BF sur l'automate XE. Dans les deux cas fournissant des données exploitables, les coefficients de variations (CV) trouvés sont supérieurs aux coefficients de variations donnés par le fabricant. Ces données sont reprises dans le tableau I.

TABLEAU I: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES DE REPETABILITE DU MODULE BF

Répétabilité							
Source	XN/ XE	Contrôle / Echantillons	Nombre de niveaux	Nombre de passage	CV RBC-BF (%)	CV WBC-BF (%)	CV TC-BF (%)
SYSMEX®	XN	Contrôle (sang)	3 niveaux	minimum 10x	40,0% ou Max - Min ≤0,007 x 10^6/µl (0,003 à 0,050 x 10^6/µl)	30,0% ou moins (0,005 à 0,015 x 10^9 WBC/L) 15,0% ou moins (0,016 à 0,030 x 10^9 WBC/L) 10,0% ou moins (0,031 à 0,050 x 10^9 WBC/L)	30,0% ou moins (0,005 à 0,015 x 10^9 WBC/L) 15,0% ou moins (0,016 à 0,030 x 10^9 WBC/L) 10,0% ou moins (0,031 à 0,050 x 10^9 WBC/L)
Paris et al. 2010	XE	Echantillons patients (liquides d'ascites)	3 patients	10 x chacun	Pas de données exploitables (CV allant de 36% à 4% sans informations supplémentaires)		
Zimmermann et al. 2011	XE	Echantillons patients (LCR)	10 patients	10 x chacun	NR	1,9 - 50,6%	NR
Li et al. 2014	XE	Echantillons patients (sang dilué dans du LCR acellulaire)	3 patients	20 x chacun	NR	32% (0,005 x 10^9 WBC/L) 19% (0,025 x 10^9 WBC/L) 15,8% (0,050 x 10^9 WBC/L)	NR

En outre, il existe des données de répétabilité pour la numération leucocytaire sanguine totale et la numération des hématies dans les données Ricos. Les CV maximum déduits de RICOS sont dans ce cas respectivement de 4,3% et de 1,35% (Ricos and al).

Nous retenons le seuil de CV de répétabilité du fournisseur, à savoir :

- CV RBC-BF (%) : 40,0% ou Max - Min ≤0,007 x 10^6/µl (0,003 à 0,050 x 10^6/µl)
- CV WBC-BF (%) : 10,0 % quelle que soit la concentration du liquide
- CV TC-BF (%) : identiques au CV WBC-BF

Pour notre étude sur site, les contrôles de qualités Eurobio ont été utilisés (différents des contrôles utilisés en routine). Il en existe trois niveaux, permettant de couvrir une large étendue de la gamme de numération leucocytaire et érythrocytaire. Chaque niveau a été passé 30 fois consécutives le même jour par le même opérateur.

Nos données d'expérimentations sur site sont présentées ci-après :

3.1.1.1 WBC-BF

TABLEAU II: DONNEES WBC-BF D'EXPERIMENTATION SUR SITE DE LA REPETABILITE

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (x 10^9 WBC-BF/L)	Ecart-type	CV (%)
CIQ Bas	30	0,072	0,002	3,070
CIQ Moyen	30	0,277	0,008	2,81
CIQ Haut	30	0,916	0,018	1,99

Nos données de répétabilité sont donc conformes aux spécifications attendues.

3.1.1.2 RBC-BF

TABLEAU III: DONNEES RBC-BF D'EXPERIMENTATION SUR SITE DE LA REPETABILITE

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (x 10^{12} RBC-BF/L)	Ecart-type	CV (%)
CIQ Bas	30	0,023	0,001	2,718
CIQ Moyen	30	0,071	0,002	2,125
CIQ Haut	30	0,472	0,004	0,931

Nos données de répétabilité sont donc conformes aux spécifications attendues.

3.1.1.3 TC-BF

TABLEAU IV: DONNEES TC-BF D'EXPERIMENTATION SUR SITE DE LA REPETABILITE

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (x 10^9 TC-BF/L)	Ecart-type	CV (%)
CIQ Bas	30	0,074	0,002	2,934
CIQ Moyen	30	0,283	0,008	2,795
CIQ Haut	30	0,936	0,019	2,064

Nos données de répétabilité sont donc conformes aux spécifications attendues.

3.1.2 FIDELITE INTERMEDIAIRE

La fidélité intermédiaire correspond à la reproductibilité intra-laboratoire. Elle consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs.

Dans la littérature, plusieurs équipes se sont intéressées à l'étude de la fidélité intermédiaire, probablement car cette étude est facilitée par le passage quotidien de contrôle qualité. Deux publications ont retenu notre attention : Fleming et al. 2012 et Cho et al. 2015 ont réalisé une étude de reproductibilité sur un module BF rattaché à un XN, en utilisant le contrôle BF-Check de SYSMEX® (qui sera utilisé pour notre propre étude). Les données obtenues sont plus précises que les CV donnés par le fournisseur et inférieures à ses spécifications (Tableau V). Cependant elles ont effectués moins de 30 passages, 30 passages étant recommandés par le COFRAC pour analyse de la fidélité intermédiaire. Les CV fournisseur sont donc retenus comme CV limite admissible.

- Pour le WBC-BF : <30%
- Pour le RBC-BF : <40%
- Pour le TC-BF : <30%

TABLEAU V: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES D'ETUDE DE LA FIDELITE INTERMEDIAIRE DU MODULE BF

Fidélité intermédiaire							
Source	XN/XE	Contrôles / Echantillons	Nombre de niveaux	Nombre de passage	CV RBC-BF (%)	CV WBC-BF (%)	CV TC-BF (%)
SYSMEX®	XN	Contrôle (sang)	3	2x/jour pendant 25 jours minimum	<40	<30	<30
Fleming et al. 2012	XN	BF XN-Check	2	20x sur 18jours	/	< 7,5	/
Cho et al. 2015	XN	BF XN-Check	2	1x par jour pendant 18 jours	< 6,1	< 6,1	/
Paris et al. 2010	XE	Contrôle "sang" "E-check"	1, haut	/	Pas de données disponibles		
Boer et al. 2009	XE	Contrôle?	?	2x/jour pendant 20 jours	2,80	8,20	/
Li et al. 2014	XE	Contrôle	2	/	/	15,30	/

Pour tester la reproductibilité, les deux niveaux de contrôles qualités SYSMEX® (BF-Check) seront utilisés. Ils sont les contrôles qualités passés quotidiennement sur le module BF. Trente valeurs consécutives sont retenues pour nos calculs.

3.1.2.1 WBC-BF

TABLEAU VI : DONNEES WBC-BF D'EXPERIMENTATION SUR SITE DE FIDELITE INTERMEDIAIRE

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (x 10^9 WBC-BF/L)	Ecart-type	CV (%)
CIQ SYSMEX® niveau bas	30	0,078	0,004	4,859
CIQ SYSMEX® niveau haut	30	0,306	0,014	4,465

Le CV est inférieur à la limite retenue : nous sommes conformes aux attentes. Il est à noter qu'il est également, pour les deux niveaux, inférieur aux CV retrouvés dans la littérature.

3.1.2.2 RBC-BF

TABLEAU VII : DONNEES RBC-BF D'EXPERIMENTATION SUR SITE DE FIDELITE INTERMEDIAIRE

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (x 10^{12} RBC-BF/L)	Ecart-type	CV (%)
CIQ SYSMEX® niveau bas	30	0,025	0,001	2,963
CIQ SYSMEX® niveau haut	30	0,077	0,003	3,749

Le CV est inférieur à la limite retenue : nous sommes conformes aux attentes. Il est à noter qu'il est également, pour les deux niveaux, inférieur aux CV publié par Cho.

3.1.2.3 TC-BF

TABLEAU VIII : DONNEES TC-BF D'EXPERIMENTATION SUR SITE DE FIDELITE INTERMEDIAIRE

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne (x 10^9 TC-BF/L)	Ecart-type	CV (%)
CIQ SYSMEX® niveau bas	30	0,077	0,004	4,909
CIQ SYSMEX® niveau haut	30	0,304	0,014	4,469

Le CV est inférieur à la limite retenue : nous sommes conformes aux attentes.

3.2 APPROCHE DE LA JUSTESSE

« La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence ». Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la « valeur vraie ». Cette justesse peut être estimée grâce à l'externalisation des CIQ. On évalue le biais entre la moyenne de nos échantillons et la valeur cible du groupe de pairs.

Aucune bibliographie n'est disponible à ce sujet pour le module BF.

Les CIQ passés quotidiennement sur le module BF de la chaîne XN du laboratoire sont externalisés automatiquement. Le biais de notre résultat de reproductibilité par rapport au

groupe de pair sur la même période est donc calculable. Nous avons choisi de tolérer un biais de 5% maximum, comme cela a été fait pour la numération sanguine.

3.2.1 WBC-BF

TABLEAU IX : DONNEES WBC-BF D'EXPERIMENTATION DE LA JUSTESSE

Echantillons	**Nombres de valeurs**	**Valeurs** (x 10^9 WBC-BF/L)	**Cible** **(groupe de pairs)** (x 10^9 WBC-BF/L)	**Biais** (%) **/ groupe de pairs**
4/02 au 11/03	99	0,077	0,08	-3,75
4/02 au 11/03	99	0,304	0,31	3,23

Les biais constatés pour les deux niveaux sont négligeables (<5%). Le laboratoire est conforme.

3.2.2 RBC-BF

TABLEAU X : DONNEES RBC-BF D'EXPERIMENTATION DE LA JUSTESSE

Echantillons	**Nombre de valeurs**	**Valeurs** (x 10^{12} RBC-BF/L)	**Cible** **(groupe de pairs)** (x 10^{12} RBC-BF/L)	**Biais** (%) **/ groupe de pairs**
4/02 au 11/03	99	0,03	0,03	0,00
4/02 au 11/03	99	0,08	0,08	0,00

Le biais étant nul, le laboratoire est conforme.

3.2.3 TC-BF

TABLEAU XI : DONNEES TC-BF D'EXPERIMENTATION DE LA JUSTESSE

Echantillons	Nombre de valeurs	Valeurs (x 10^9 TC-BF/L)	Cible (groupe de pairs) (x 10^9 TC-BF/L)	Biais (%) / groupe de pairs
4/02 au 11/03	99	0,077	0,08	-3,75
4/02 au 11/03	99	0,30	0,31	3,23

Les biais constatés pour les deux niveaux sont négligeables (<5%). Le laboratoire est conforme.

3.3 EXACTITUDE

L'exactitude correspond à l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. L'exactitude peut être étudiée à l'aide des évaluations externes de la qualité (EEQ), qui permettent de comparer la valeur d'un dosage d'un échantillon inconnu (à la différence des CIQ où le dosage est connu) à une valeur cible. Cependant le laboratoire ne dispose pas à l'heure actuelle d'un EEQ pour l'analyse des liquides biologiques. Une évaluation précise de l'exactitude de notre méthode d'analyse ne peut donc pas être faite. Nos CIQ étant systématiquement externalisé, un grand écart d'exactitude serait détecté par une déviation par rapport au groupe de pairs. Aucune remarque n'a été reçue à ce jour.

3.4 INCERTITUDE DE MESURE

Selon la norme ISO 15189, le laboratoire doit définir les exigences de performances pour l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure : l'incertitude de mesure doit être recalculée régulièrement et confrontée aux exigences de performances du laboratoire. Pour l'établissement de cette incertitude, nous nous appuierons sur le GTA 14, « guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale ». Différentes méthodes de calcul de l'incertitude de mesure sont explicitées dans le guide SH GTA 14, La méthode utilisant les CIQ externalisés peut être appliquée ici. Les CIQ externalisés sont des CIQ réalisés par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles, confrontés entre eux, pour estimer la justesse. Bien que les CIQ externalisés ne soient pas considérés comme des EEQ au sens de la norme, ils peuvent être utilisés comme alternative pour l'évaluation de la justesse lorsqu'il n'y a pas d'EEQ disponibles. L'incertitude est la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ et du CIQ externalisés.

3.4.1 WBC-BF

TABLEAU XII: INCERTITUDE DE MESURE DU WBC-BF

Incertitude de mesure (CIQ externalisés)

Valeur CIQ	0,08
Ecart type CIQ	0,00
Moyenne Biais	-0,0031
Ecart type biais	0,0031

Valeur CIQ	0,31
Ecart type CIQ	0,01
Moyenne Biais	-0,0148
Ecart type biais	0,0067

Niveau 1	
Incertitude type	0,01
Incertitude élargie	0,01
Incertitude relative (%)	13,3
Expression	0,08 +/- 0,01 x 10^9 cellules/L
Expression	0,08 x 10^9 cellules/L +/- 13,3 %

Niveau 2	
Incertitude type	0,02
Incertitude élargie	0,03
Incertitude relative (%)	11,4
Expression	0,31 +/- 0,03 x 10^9 cellules/L
Expression	0,31 x 10^9 cellules/L +/- 11,4 %

L'incertitude de mesure WBC-BF est acceptable pour les deux niveaux.

3.4.2 RBC-BF

TABLEAU XIII: INCERTITUDE DE MESURE DU RBC-BF

Incertitude de mesure (CIQ externalisés)

Valeur CIQ	0,03
Ecart type CIQ	0,00
Moyenne Biais	0,0006
Ecart type biais	0,0007

Valeur CIQ	0,08
Ecart type CIQ	0,00
Moyenne Biais	0,0009
Ecart type biais	0,0023

Niveau 1	
Incertitude type	0,00
Incertitude élargie	0,00
Incertitude relative (%)	8,7
Expression	0,03 +/- 0,00 x 10^12 RBC-BF/L
Expression	0,03 x 10^12 RBC-BF/L +/- 8,7 %

Niveau 2	
Incertitude type	0,00
Incertitude élargie	0,01
Incertitude relative (%)	9,7
Expression	0,08 +/- 0,01 x 10^12 RBC-BF/L
Expression	0,08 x 10^12 RBC-BF/L +/- 9,7 %

L'incertitude de mesure RBC-BF est acceptable pour les deux niveaux.

3.4.3 TC-BF

TABLEAU XIV: INCERTITUDE DE MESURE DU TC-BF

Incertitude de mesure (CIQ externalisés)

Valeur CIQ	0,08
Ecart type CIQ	0,00
Moyenne Biais	-0,0032
Ecart type biais	0,0031

Valeur CIQ	0,31
Ecart type CIQ	0,01
Moyenne Biais	-0,0148
Ecart type biais	0,0066

Niveau 1	
Incertitude type	0,01
Incertitude élargie	0,01
Incertitude relative (%)	13,5
Expression	0,08 +/- 0,01 x 10^9 cellules/L
Expression	0,08 x 10^9 cellules/L +/- 13,5 %

Niveau 2	
Incertitude type	0,02
Incertitude élargie	0,03
Incertitude relative (%)	11,4
Expression	0,31 +/- 0,03 x 10^9 cellules/L
Expression	0,31 x 10^9 cellules/L +/- 11,4 %

L'incertitude de mesure TC-BF est acceptable pour les deux niveaux.

3.5 COMPARAISON DE METHODES

Le module BF n'étant pas utilisé en miroir, aucune comparaison de méthode inter-automate n'a été effectuée.

Dans la littérature, il existe plusieurs données de comparaison entre le module BF et la méthode de référence pour le comptage cellulaire, à savoir la numération en cellules de comptage, type Nageotte ou Malassez. Ces données bibliographiques sont reprises dans le tableau XII.

Pour le paramètre TC-BF, seules les données SYSMEX® sont disponibles. Pour le paramètre RBC-BF, l'étude réalisée par Cho et al, 2015 sur le XN montre une bonne corrélation entre le comptage réalisé en cellules de Malassez et la numération automatisée. La corrélation est cependant meilleure lorsque les LCR sont exclus. Enfin, pour le paramètre WBC-BF, d'autres études présentent des résultats discordants entre elles : il y a ainsi une sous-estimation du compte leucocytaire automatisé pour Boer et al, 2009, contradictoire avec l'étude de Zimmermann et al, 2011 qui montre une déviation en faveur d'un compte plus élevé avec le module BF (Tableau XV). Cependant ces données sont issues d'études réalisées sur le XE et trop peu d'informations sur le mode opératoire sont disponibles pour pouvoir expliquer ces différences. La variabilité inter-opérateur du comptage manuel peut être incriminée.

TABLEAU XV : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES DE COMPARAISON ENTRE LA METHODE DE REFERENCE ET LE MODULE BF

Comparaison à la méthode de référence							
Source	XN/XE	Contrôle / Echantillon	Plage d'étude	Nombre de passage	WBC-BF	RBC-BF	TC-BF
SYSMEX® (Sysmex Corporation 2015)	XN	Echantillons?	/	min 50x	$r^2>0,9$	$r^2>0,9$	$r^2>0,9$
Cho et al. 2015	XN	LCR	/	/	$r^2=0,88$	$r^2=0,99$	/
		non LCR			$r^2=0,96$	$r^2=0,94$	/
Zimmermann et al. 2011	XE	116 LCR	0 - 200 cellules/µL	/	Bland Al®an : + 3,3 cellules pour XE	/	/
Li et al. 2014	XE	198 LCR	/	/	r= 0,83 (p<0,001)	/	/
Boer et al. 2009	XE	273 LCR	/	/	Dérive observée : Cellularité supérieure au microscope optique mais données non exploitables	/	/

3.6 INTERVALLE DE MESURE

L'intervalle de mesure s'étend de la limite de quantification à la limite de linéarité. Selon le SH GTA 04, l'intervalle de mesure peut n'être vérifié que de manière bibliographique sur une méthode quantitative de portée A. Plusieurs études ont permis d'établir la limite de linéarité et/ou de quantification.

Dans la documentation fournisseur, il est indiqué que la limite basse de l'intervalle de mesure est à 0,003 x 10^9 WBC-BF/L (3 WBC-BF/mm^3), 0,003 x 10^9 TC-BF/L (3 TC-BF/mm^3) et 0,002 x 10^{12} RBC-BF/L (2000 RBC-BF/mm^3).

Les TC-BF n'ont pas été étudiés dans la littérature. Les RBC-BF ont été étudiés et une plage plus étroite de mesure (et donc de linéarité) est donnée par Boer et al. 2009. Cependant cette plage n'est pas applicable en l'état car elle a été mesurée sur le XE et l'échantillon source est un mélange de concentré sanguin dilué dans du LCR acellulaire. Les WBC-BF ont en outre été étudié par Cho et al. 2015 : la limite de quantification donnée est à 0,0058 *10^9/L (Tableau XVI).

Aucune étude n'a été réalisée sur la limite haute de mesure du module BF.

TABLEAU XVI : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES D'ETUDE DE L'INTERVALLE DE MESURE DU MODULE BF

Intervalle de mesure (IM)								
Source	XN/XE	Contrôle/Echantillons	Plage d'étude WBC-BF	IM WBC-BF	Plage d'étude RBC-BF	IM RBC-BF	Plage étude TC-BF	IM TC-BF
SYSMEX ® (Sysmex Corporation 2015)	XN	Contrôle	0,003 à 10,000 x10^9 WBC-BF/L	/	0,002 à 5,000 x 10^{12}RBC/L	/	idem WBC-BF	/
Cho et al. 2015	XN	Contrôle	/	limite basse 0,0058*10^9WBC/L	NR		NR	
Boer et al. 2009	XE	Echantillon sanguin, après sédimentation, dilution dans du LCR acellulaire	0,001-10*10^9/L	/	1 – 1000 * 10^{12} RBC-BF/L	/	NR	

D'après notre expérience, le module BF peut réaliser des comptes leucocytaires WBC-BF sans dilution bien au-delà de 10 x10^9 WBC-BF/L. Lors de l'arrivée au laboratoire d'un échantillon hypercellulaire de liquide pleural, la limite de linéarité du module BF a été étudiée (Figure 16).

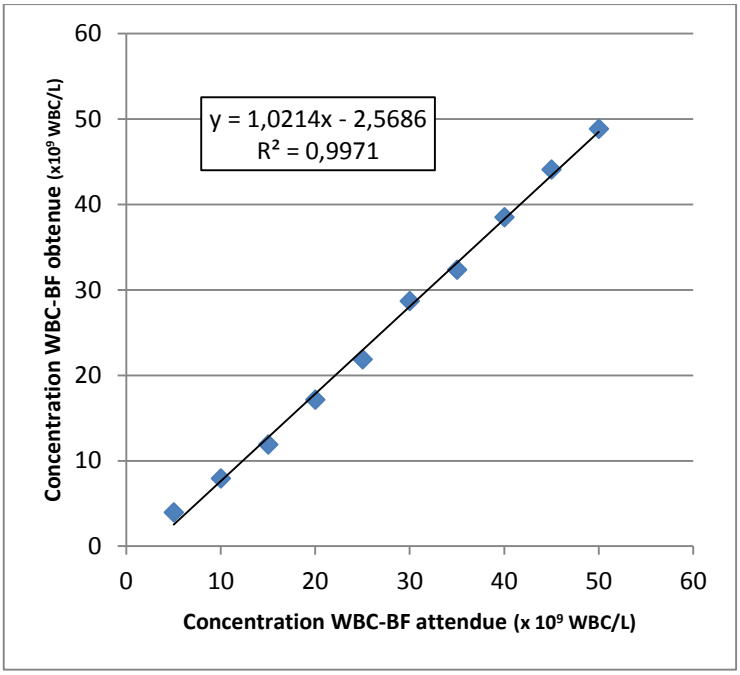


FIGURE 16: ETUDE DE LA LINEARITE SUR SITE DU MODULE BF

La limite de linéarité trouvée (48 x 10^9 WBC-BF / L) est bien supérieure à celle annoncée par le fabricant. Cependant, il n'est pas judicieux de retenir cette limite pour l'application en routine car il aurait fallu mener d'autres études sur d'autres échantillons de liquides pour affiner cette nouvelle borne, ce qui n'a pas été réalisable car les échantillons hypercellulaires de liquides biologiques sont rares.

3.7 INTERFERENCES

Les interférences correspondent à une altération du signal de mesure pouvant entraîner des résultats erronés. Les interférences n'ont pas été étudiées dans la bibliographie. Les données fournisseurs sont les seules existantes, et décrites pour le sang, à savoir :

Pour le paramètre WBC-BF (et par extension le paramètre TC-BF) : Une numération leucocytaire faussement basse peut être causée par la présence d'agrégat leucocytaire. A l'inverse, une numération faussement élevée peut avoir pour source des agrégats plaquettaires, la présence de cryoprotéines ou de cryoglobulines, de fibrines ou encore la présence de plaquettes géantes.

Pour le paramètre RBC-BF : En cas de numération érythrocytaire faussement basse on peut suspecter une agrégation érythrocytaire (pouvant être causée par des agglutinines froides), la présence de microerythrocytes ou la possibilité de fragmentation des globules rouges. En cas de numération érythrocytaire faussement élevée, la cause peut-être : une leucocytose ou la présence de plaquettes géantes.

Une bonne connaissance de l'appareil et de son mode de fonctionnement, une surveillance des alarmes et une confrontation aux antériorités du patient permet une détection de ces interférences. De plus, une revue systématique du frottis étant réalisée au laboratoire pour l'établissement de la formule cellulaire, elle permet de s'affranchir en pratique des risques résiduels.

3.8 CONTAMINATION INTER-ECHANTILLONS

L'analyse à la suite de liquides acellulaires et de liquides très riches en cellules est possible. Un système de lavage nettoie les canaux après passage d'un liquide fortement chargé en cellules. L'automate vérifie ensuite le bruit de fond en effectuant une analyse sans aspirer les échantillons : tout élément dont le résultat n'est pas dans la plage acceptable déclenche un nouveau lavage. Etant donné la cellularité élevée de certains liquides pathologiques, il est pertinent de réaliser une étude de la contamination inter-échantillon du module BF.

Dans la littérature, une seule publication fait état d'une étude de la contamination inter-échantillon, réalisée sur XE (Boer et al. 2009). Les données fournies ne sont pas exploitables pour notre vérification de méthode (Tableau XVII).

SYSMEX® assure dans ses spécifications une faible contamination inter-échantillons (Sysmex Corporation 2015). Le seuil fournisseur a donc été choisi pour comparaison de nos résultats d'expérimentation sur site.

TABLEAU XVII : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES D'ETUDE DE LA CONTAMINATION DU MODULE BF

Contamination					
Source	XN/XE	Méthode	WBC-BF	RBC-BF	TC-BF
SYSMEX®	XN	?	0,3% ou $0,001*10^{9}$/L	0,3% ou $0,003*10^{12}$/L	0,3% ou $0,001*10^{9}$/L
Boer et al. 2009	XE	1 échantillon (>10,000 x 10^{9}WBC-BF / L) passé 5 fois avant LCR acellulaire	Sur 5 passages, 1 LCR acellulaire détecté à 1cellule	NR	NR

Au laboratoire, après rinçage de l'appareil, un échantillon patient à cellularité élevée est analysé trois fois consécutivement (H1, H2, H3 de moyenne H) suivi d'un échantillon à valeur basse également passé trois fois (B1, B2, B3). On répète trois fois cet enchainement. On obtient un indice de contamination en pourcentage grâce à l'utilisation de la formule suivante : Contamination en % = (mB1-mB3) * 100 / (mH-mB3).

3.8.1 WBC-BF

C=0,2 % ; p=0,165

La contamination étant inférieure au seuil fournisseur, le laboratoire est conforme.

3.8.2 RBC-BF

C= 0 % ; p=0,5

La contamination étant nulle, le laboratoire est conforme.

3.8.3 TC-BF

C=0,3 % ; p=0,12

La contamination étant inférieure au seuil fournisseur, le laboratoire est conforme.

3.9 ROBUSTESSE

« La robustesse d'une procédure d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode. » La robustesse n'est pas nécessairement testée lors d'une validation de méthode de portée A.

3.10 STABILITE

Le module BF de la chaine XN utilise des réactifs correspondant à des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro ; le laboratoire doit par conséquent suivre les préconisations relatives à la stabilité des réactifs définies par le fournisseur. Les recommandations du fournisseur seront donc reprises. Les réactifs sont stables 60 à 90 jours à température ambiante. Les détails de ces spécifications des réactifs peuvent être retrouvés dans le mode d'emploi de la chaîne XN-9000 (Paragraphe 5,18,1).

Bien que cette étude ne soit pas expressément demandée dans une vérification de méthode, nous avons étudié l'évolution des résultats de dosages en fonction du temps pour 5 liquides (4 ascite, 1 pleural). Ces liquides ont été analysés à leur arrivée au laboratoire puis toutes les heures jusqu'à 8h. Les résultats ont ensuite été compilés dans un tableur. Nous avons comparé chacun des résultats avec l'écart-type trouvé pour la fidélité intermédiaire de l'analyse.

3.10.1 WBC-BF

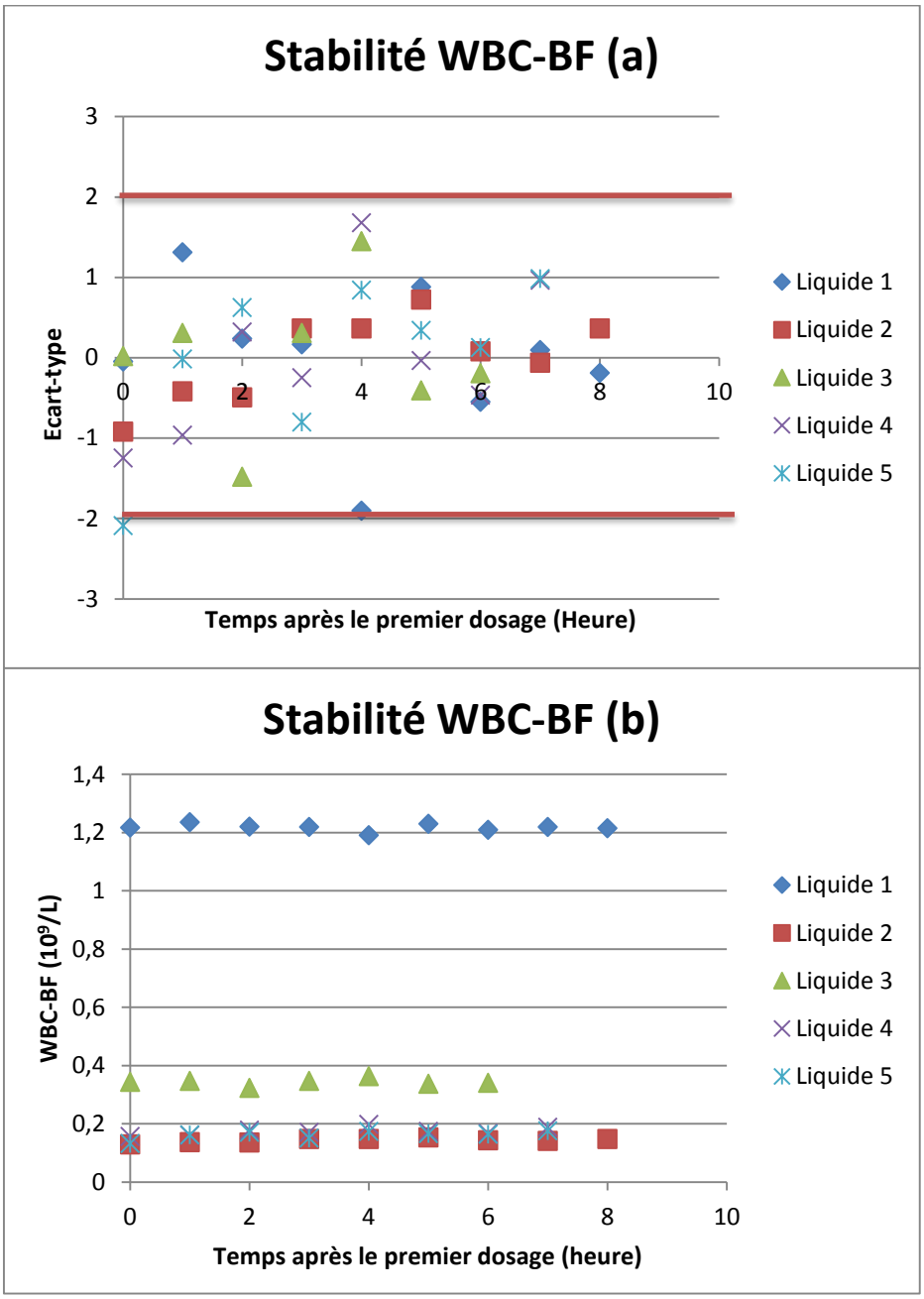
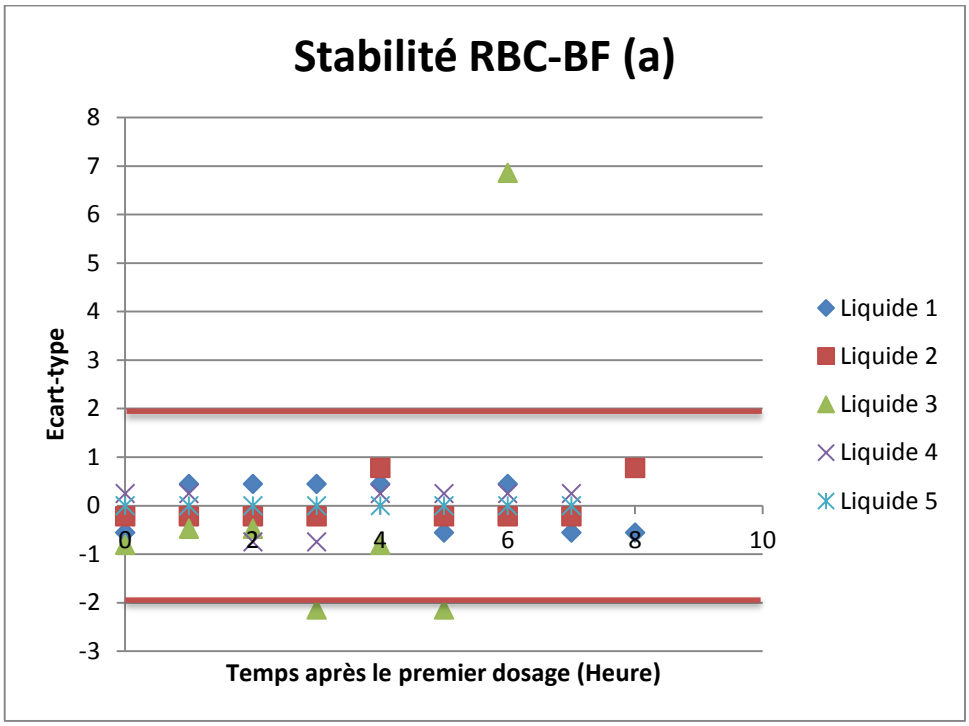


FIGURE 17: DONNEES DE STABILITE DU PARAMETRE WBC-BF. LES RESULTATS POUR CHACUN DES 5 LIQUIDES SONT EXPRIMES EN FONCTION DE L'ECART-TYPE DE LA FIDELITE INTERMEDIAIRE (A). LA REPARTITION DES VALEURS ABSOLUES DES NUMERATIONS EST REPRESENTEE SUR LE GRAPHIQUE B.

La majorité des points sont situés -2 et +2 écart-types : on considère donc que ce paramètre est stable jusqu'à 8h après le premier dosage. Un point est situé entre -2 et 3 écart-types : il est toléré car il s'agit du point du premier dosage et il situé à -2,09 écart-type.

3.10.2 RBC-BF



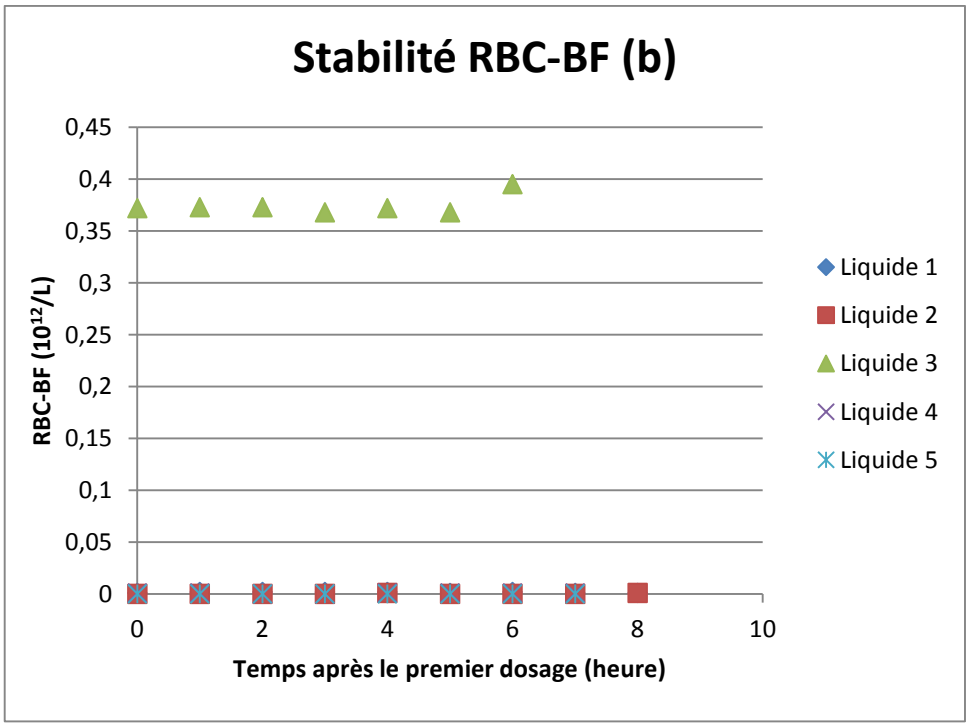
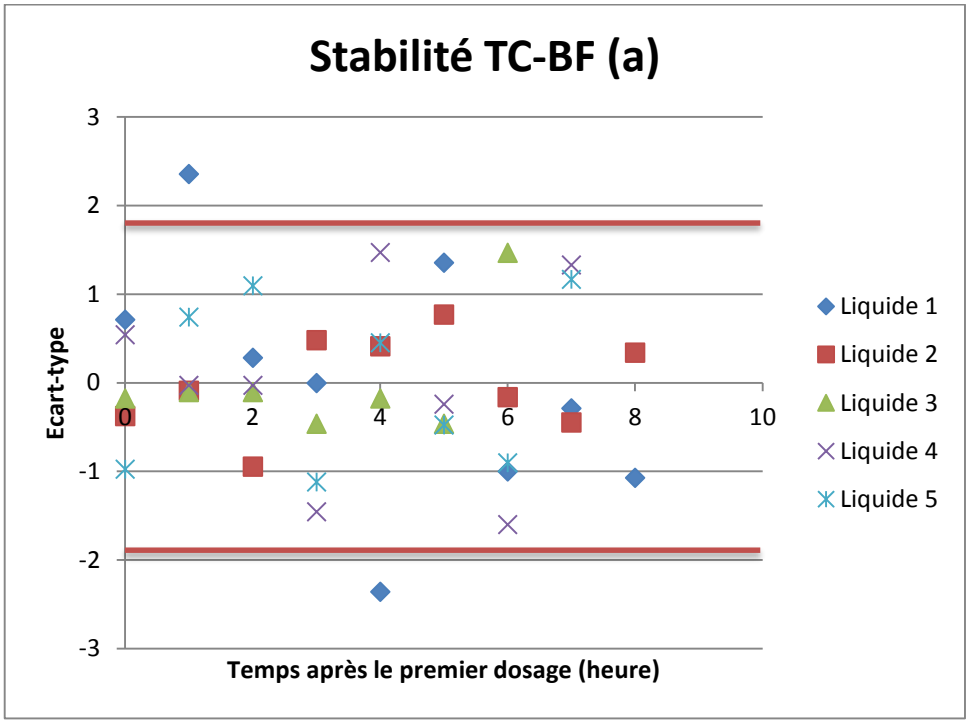


FIGURE 18: DONNEES DE STABILITE DU PARAMETRE RBC-BF. LES RESULTATS POUR CHACUN DES 5 LIQUIDES SONT EXPRIMES EN FONCTION DE L'ECART-TYPE DE LA FIDELITE INTERMEDIAIRE (A). LA REPARTITION DES VALEURS ABSOLUES DES NUMERATIONS (B) MONTRE QU'UN SEUL DES LIQUIDES ETUDIES CONTIENT BEAUCOUP DE RBC-BF.

Tous les points des liquides 1, 2, 4 et 5 sont situés entre -2 et 2 écart-types. Concernant le liquide 3, il est à noter que le dosage des RBC-BF a une moyenne de $0{,}333*10^{12}$/L. Cependant le niveau haut sur lequel a été calculé l'écart-type de la fidélité intermédiaire a une

moyenne située à 0,077*10^{12}/L. L'écart-type appliqué ici n'est donc pas adapté et cela explique le point situé à 7 écart-type au-dessus de la moyenne du liquide.

3.10.3 TC-BF



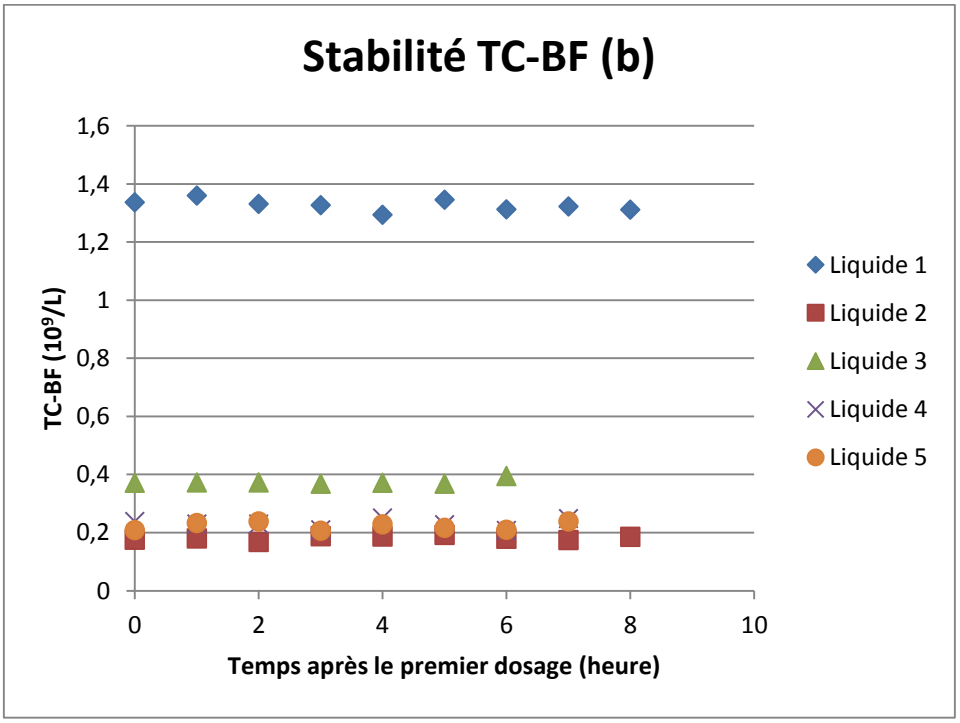


FIGURE 19: DONNEES DE STABILITE DU PARAMETRE TC-BF. LES RESULTATS POUR CHACUN DES 5 LIQUIDES SONT EXPRIMES EN FONCTION DE L'ECART-TYPE DE LA FIDELITE INTERMEDIAIRE (A). LA REPARTITION DES VALEURS ABSOLUES DES NUMERATIONS EST REPRESENTEE SUR LE GRAPHIQUE B.

Pour les liquides 2, 3, 4 et 5, les points sont tous situés entre -2 et 2 écart-types. Concernant le liquide 1, deux points sont situés au-delà de -2 et 2 écart-types. Comme pour le paramètre

RBC-BF, cela s'explique par un écart-type non adapté : le liquide 1 a une moyenne de $1,327*10^9$/L alors que l'écart-type appliqué est calculé sur le niveau haut du contrôle, avec une moyenne à $0,306*10^9$/L. Cependant, les points étant tout de même situés en dessous de 3 écart-types, on considère que le paramètre TC-BF est stable jusqu'à 8h après le premier dosage.

Il est à noter que tous les liquides biologiques sont analysés dans l'heure de leur arrivée au laboratoire. Cependant le délai entre le prélèvement et l'analyse peut varier de quelques minutes à plusieurs heures. Cette étude, bien que portant sur un faible panel de liquides, indique que les paramètres WBC-BF, RBC-BF et TC-BF restent stables plusieurs heures après l'arrivée au laboratoire, et donc plusieurs heures après le prélèvement.

3.11 INTERVALLE DE REFERENCE

« L'intervalle de référence et les seuils de décision médicale seront définis et documentés par le laboratoire ».

Dans notre cas, les intervalles de référence décrits dans la littérature seront appliqués. Ils sont abordés dans le chapitre 1.

3.12 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Il est primordial pour le laboratoire de vérifier que la mise en application d'une technique dans l'environnement propre du laboratoire correspond aux spécifications annoncées par le fabricant et au besoin du laboratoire, afin de produire un résultat sûr et fiable.

Ici, la vérification de méthode sur les paramètres du module BF a permis de valider la conformité aux spécifications du module. Cette vérification ne concerne que les paramètres rendus: le comptage des leucocytes et des globules rouges.

Or, le module BF est capable de fournir d'autres paramètres, non validés par le constructeur, appelés « paramètres de recherche ». En outre, les données obtenues par les différents canaux sont représentées sous forme de graphiques, semblables aux graphiques des NFS ; ces paramètres de recherches et ces graphiques sont intéressants à étudier car ils permettent d'utiliser tous les paramètres et toutes les données obtenues par l'automate. Ce sont ces deux outils qui seront étudiés dans la suite de ce travail.

4 FORMULE CYTOLOGIQUE DU MODULE BF ET CELLULES « HAUTES FLUORESCENCES »

4.1 LA FORMULE DE RECHERCHE

Comme nous venons de le voir, le constructeur a validé pour l'utilisation en routine les paramètres suivants : numération des globules blancs (WBC-BF), des globules rouges (RBC-BF), et de la totalité des cellules présentes (TC-BF) ainsi que le pourcentage PMN et MN de cellules. La pertinence de l'utilisation de ces deux derniers paramètres est discutable : la séparation des populations cellulaires entre cellules mononucléées et cellules polynucléées n'est pas suffisante pour le clinicien. En effet, il a besoin de savoir précisément quelle population cellulaire domine la cytologie pour pouvoir orienter son diagnostic. C'est d'ailleurs pourquoi ces deux paramètres ne sont pas exploités actuellement au laboratoire du CHRU de Nancy.

Mais, en plus de ces paramètres, il est possible de récupérer via le middleware de l'automate XN (Extended-IPU) une formule dite « de recherche ». Cette formule n'étant pas validée par le constructeur, elle n'est donc pas utilisable directement en routine. Elle sépare les populations cellulaires suivantes et en calcule les pourcentages : polynucléaires neutrophiles (NE-BF), polynucléaires éosinophiles (Eo-BF), lymphocytes (LY-BF), monocytes (MO-BF), et cellules de hautes fluorescences (HF-BF). Aucune information précise n'est disponible sur la méthode utilisée pour obtenir cette formule. Il s'agit probablement d'une méthode similaire à celle permettant d'obtenir les formules sanguines : à l'aide des représentations des données analytiques fournies par les différents canaux pour chaque évènement, la séparation entre les populations cellulaires se fait en fonction du centre du nuage et de la densité d'évènements dans ce nuage (système « ACAS » (Adaptive Cluster Analysis System) et non en fonction de seuils fixes.

Pour tester la concordance entre les données fournies par le module et celles obtenues avec la méthode de référence, nous avons évalué cette formule « recherche » avant sa possible mise en application.

4.1.1 COMPARAISON ENTRE LA FORMULE RECHERCHE DU MODULE BF ET LA FORMULE OBTENUE AU MICROSCOPE

4.1.1.1 MATERIELS ET METHODE

Cent cinquante six cytologies de liquides (122 hommes et 34 femmes, l'âge des patients variant entre 26 et 91 ans) ont été comparées. Ces liquides provenaient de différents services cliniques du CHRU et ont été analysés au laboratoire dans un but diagnostique. Après numération et établissement de la formule recherche sur le module BF, une lame a été réalisée par cyto-centrifugation puis colorée au MGG. Les formules cytologiques manuelles ont été obtenues après lecture au microscope (x400) selon la méthode utilisée en routine : classement des cellules en PN, PEo, LY, Monocytes/macrophages, mais aussi cellules mésothéliales et autres cellules. Les pourcentages de cellules de la formule du module BF (Ne-BF, Eo-BF, Ly-BF et MO-BF) ont été comparés pour chaque liquide respectivement aux pourcentages

obtenus au microscope optique de PN (PN-MO), PEo (PEo-MO), Lymphocytes (LY-MO) et Monocytes/macrophages (MO-MO). Les données obtenues ont été compilées avec le logiciel Excel (Microsoft, USA) et analysées avec le logiciel SAS 9,3 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Les corrélations entre les paramètres ont été évaluées par régression linéaire et test de Pearson (R).

4.1.1.2 RESULTATS

Les liquides étudiés ont permis d'obtenir une large gamme de mesure puisque le nombre de leucocytes variait de 0,0004 x 10^9 WBC-BF/L à 17,681 x 10^9 WBC-BF/L.

TABLEAU XVIII: TEST DE PEARSON ENTRE LES POURCENTAGES OBTENUS PAR LE MODULE BF ET LA FORMULE OBTENUE MANUELLEMENT AU MICROSCOPE OPTIQUE

	R PEARSON	P-VALUE
NE-BF / PN-MO	0,947	<0,0001
LY-BF / LY-MO	0,615	<0,0001
MO-BF/ MO-MO	0,553	<0,0001
Eo-BF / PEo-MO	0,593	<0,0001

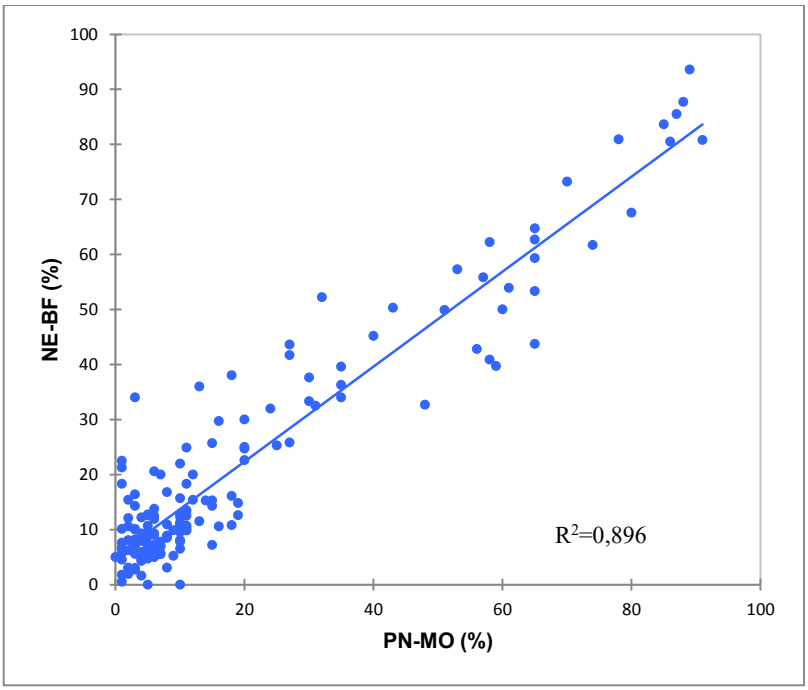


FIGURE 20 : REPRESENTATION DES POURCENTAGES DE PN OBTENUS AU MICROSCOPE OPTIQUE (PN-MO) ET PAR LA FORMULE RECHERCHE DU MODULE BF (NE-BF)

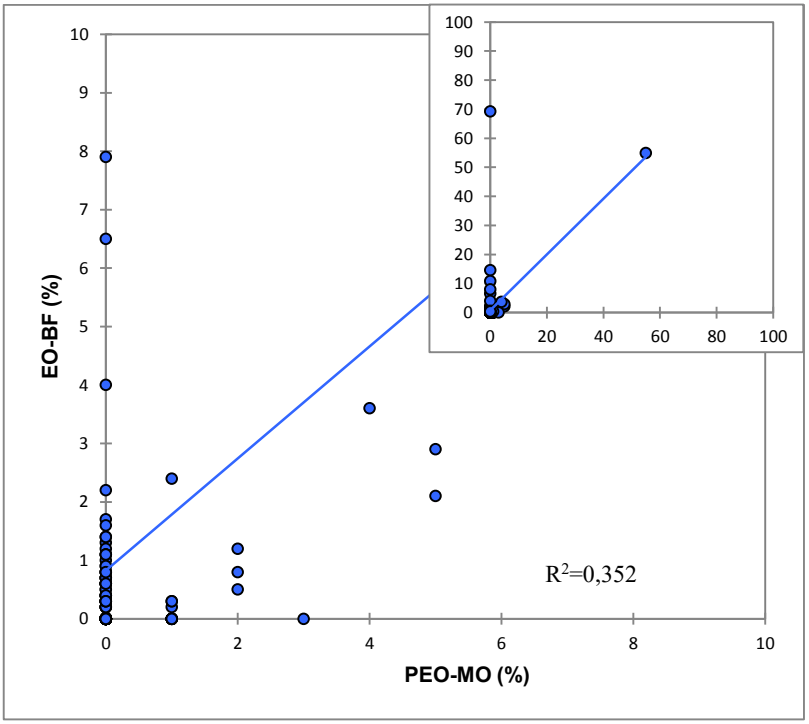


FIGURE 21: REPRESENTATION DES POURCENTAGES DE PEO OBTENUS AU MICROSCOPE OPTIQUE (PEO-MO) ET PAR LA FORMULE RECHERCHE (EO-BF)

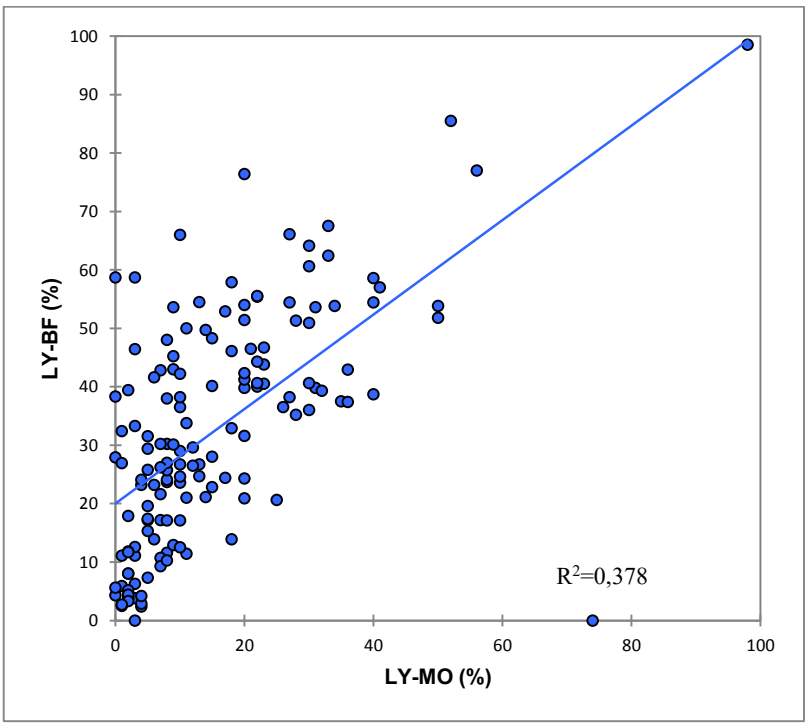


FIGURE 22: REPRESENTATION DES POURCENTAGES DE LY OBTENUS AU MICROSCOPE OPTIQUE (LY-MO) ET PAR LA FORMULE RECHERCHE (LY-BF)

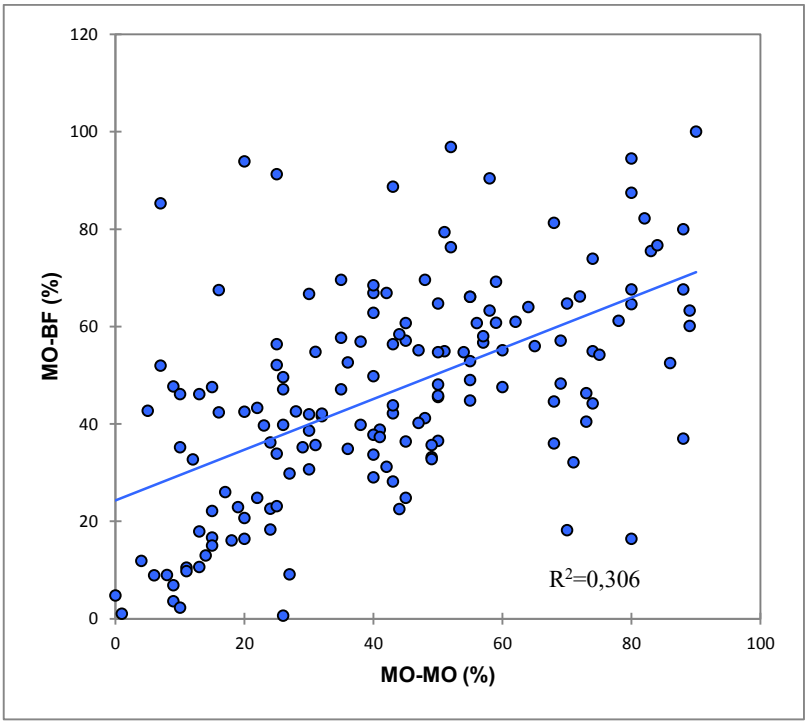


FIGURE 23: REPRESENTATION DES POURCENTAGES DE MONOCYTES/MACROPHAGES OBTENUS AU MICROSCOPE OPTIQUE (MO-MO) ET DU POURCENTAGE MO-BF OBTENU PAR LA FORMULE RECHERCHE

4.1.1.3 DISCUSSION

De façon globale, les deux populations PMN et MN ont été étudiées par Cho (Cho et al. 2015) : dans cette étude, les données PMN et MN fournies par l'automate ont été comparées à la formule cytologique obtenue au microscope. Les liquides étudiés étaient des liquides séreux dont des liquides d'ascites, pleuraux, ainsi qu'en moindre nombre des liquides péricardiques, broncho-alvéolaires, de dialyses péritonéales et articulaires. Le pourcentage PMN a été comparé à la somme des pourcentages des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles ; et le pourcentage MN à la somme des pourcentages des lymphocytes et des monocytes. Il a été montré une bonne corrélation entre les pourcentages PMN et les pourcentages de polynucléaires au microscope optique (r^2=0,88, p<0,001), de même que pour les cellules mononuclées et la somme des lymphocytes et monocytes (r^2=0,88, p<0,001). Quand les liquides avec cellules néoplasiques étaient exclus, cette corrélation était encore meilleure (r^2=0,93 ; p<0,001 dans les deux cas). Ces deux paramètres fournis par le module semblaient donc utilisables en routine.

Nous avons souhaité explorer la formule population par population. Il existe une corrélation forte et significative pour le pourcentage de polynucléaires neutrophiles (R égal à 0,947). Pour les polynucléaires éosinophiles, le résultat de la corrélation est probablement biaisé par le faible pourcentage de polynucléaires éosinophiles dans les liquides étudiés. Un seul liquide dépassait 15% de polynucléaires éosinophiles. Ce résultat reste donc à confirmer. Nos résultats sont cohérents avec les données publiées par Buoro (Buoro et al. 2016), qui retrouve

une excellente corrélation entre les populations de polynucléaires neutrophiles (R égal à 0,90) .

Dans notre étude les lymphocytes et les cellules du groupe monocytes/macrophages ne sont pas correctement corrélés à leurs équivalents dans la formule de recherche. Les coefficients de régression linéaire sont faibles ; les points sont très nettement dispersés autour de la droite de régression.

Pour les lymphocytes, la lecture au microscope optique semble sous-estimer systématiquement le pourcentage de lymphocytes. Bien qu'étant la méthode de référence, il est possible que la cyto-centrifugation des liquides entraîne une lyse partielle des lymphocytes conduisant à la sous-estimation de leur présence dans le liquide par le comptage microscopique. Ce problème n'a cependant pas été rencontré dans l'étude de Buoro, pour qui les lymphocytes avaient une excellente corrélation (R égal à 0,84) ; pourtant, une cytocentrifugation était aussi appliquée (100g pendant 3min).

Concernant le groupe monocytes-macrophages, sur une lame de cyto-centrifugation, il est difficile de les séparer des cellules mésothéliales, en particulier lorsqu'elles sont altérées et se vacuolisent. Lors de la lecture au microscope, ces deux types cellulaires sont censés être individualisés mais il est plus probable que la mauvaise corrélation entre les deux soit due à la technique manuelle qui manque de précision pour ces populations cellulaires. Dans l'étude de Buoro, il a été montré que la donnée MO-BF correspondait bien à la somme des monocytes et des macrophages ; cependant la corrélation n'était pas bonne pour ces deux populations.

Les cliniciens s'intéressent avant tout à la numération des polynucléaires neutrophiles du liquide d'ascite pour les suspicions d'infection et à la numération des lymphocytes pour les liquides pleuraux. Il n'y a donc pas d'utilité pratique a priori à rendre le pourcentage de monocytes et de macrophages dans ces liquides. Nos résultats montrent une bonne corrélation des polynucléaires neutrophiles de la formule recherche avec les résultats microscopiques. Le laboratoire pourrait donc, dans ce cas, rendre uniquement le pourcentage de polynucléaires neutrophiles et la numération correspondante fournie par l'automate, la revue du frottis n'étant effectuée que pour éliminer la présence de cellules suspectes. L'établissement de la formule cytologique complète ne pourrait être réalisé qu'à la demande du clinicien.

4.1.2 CELLULES HAUTES FLUORESCENCES

Une autre population cellulaire est identifiée par le module BF : les cellules hautement fluorescentes, « HF-BF ». Sur le graphique WDF, un seuil est fixé au-delà duquel les cellules sont classées en HF-BF. Cette population cellulaire est exprimée à la fois en valeur absolue, mais aussi en pourcentage par rapport au nombre total de leucocytes (WBC-BF) (et non par rapport au nombre total de cellules (TC-BF)). Selon le constructeur, les cellules mésothéliales ainsi que les cellules néoplasiques apparaissent dans cette zone.

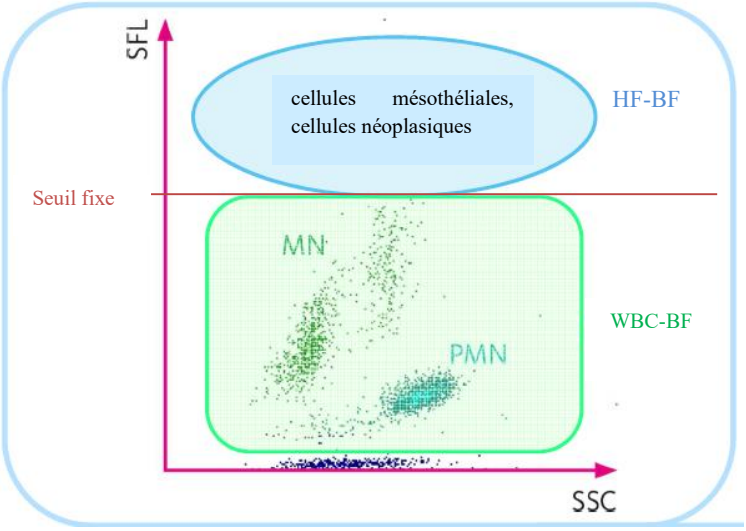


FIGURE 24 : LOCALISATION DES CELLULES HAUTES FLUORESCENCES (HF-BF) SUR LE GRAPHIQUE WDF DU MODULE BF.

4.1.2.1 COURBE ROC

La corrélation entre la détection et la numération des HF-BF et la présence de cellules néoplasiques ne peut être étudiée avec les outils statistiques précédemment utilisés : en effet, cela nécessite une numération des cellules néoplasiques, non réalisable en pratique car ces cellules sont souvent en amas et donc indénombrables. La corrélation peut être réalisée en utilisant une représentation par courbe ROC (Receiver Operating Characteristic). Cet outil statistique permet d'analyser la sensibilité et spécificité d'un test. La courbe ROC correspond à la représentation de la sensibilité en fonction de 1 – spécificité, pour toutes les valeurs seuils du test. Pour avoir un index simple et quantitatif de la discrimination du test, on calcule l'aire sous la courbe (AUC) : un test parfait aura une AUC égale à 1 (la courbe longeant l'angle gauche de la représentation) ; un test sans valeur discriminante, aura une valeur d'AUC égale à 0,5. Cependant la courbe ROC doit être analysée avec précaution : il faut toujours se référer au but visé par la réalisation du test (test de dépistage, test de confirmation) et à la population choisie pour le test (Perneger et Perrier 2004).

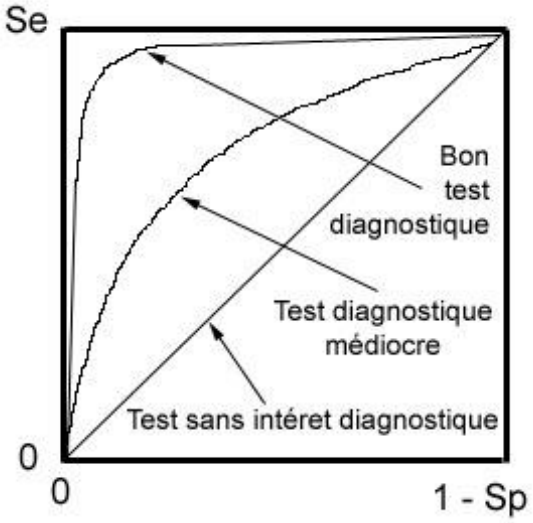


FIGURE 25 : DIFFERENTS ASPECTS DE COURBES ROC ET POTENTIEL DIAGNOSTIQUE D'UN TEST.
(SE : SENSIBILITE ; SP : SPECIFICITE) (D'APRES ADSCIENCE.FR)

Au sujet du paramètre HF-BF du module BF, la courbe ROC permet de définir le seuil de numération d'HF-BF (que ce soit en pourcentage pour 100 WBC-BF ou en valeur absolue) à partir duquel la présence de cellules néoplasiques dans le liquide est hautement probable. Ce seuil pourrait alors être testé pour prédire la présence de cellules néoplasiques pour tout liquide analysé sur le module.

4.1.2.2 UTILISATION DU PARAMETRE HF-BF DU MODULE BF POUR LA DETECTION DE CELLULES NEOPLASIQUES AU CHRU DE NANCY

MATERIELS ET METHODES

Les données de tous les liquides (ascites, pleuraux et de rares articulaires) ont été récoltées du 1/09/2015 au 21/01/2016 sous forme de fichier CSV. Les liquides n'ayant pas de valeurs pour le paramètre HF-BF (liquide hypercellulaire ne permettant aucun établissement de formule par le module BF par exemple) ont été exclus. Seuls 7 liquides contenaient des cellules néoplasiques durant cette période. Le recueil a été étendu, uniquement pour les liquides néoplasiques, du 26/12/2013 au 20/09/2016. Au total, sur 386 liquides, 35 contenaient des cellules néoplasiques. Les liquides ont été classés en deux groupes : liquides non néoplasiques et liquides néoplasiques.

Les données des deux populations ont été analysées sur le logiciel Excel 2010 (Microsoft) avec le module XL STAT (Addinsoft). Des comparaisons de populations ont été réalisées par un test de Mann-Whitney (U-test) (L'hypothèse testée a été que la distribution des données était la même dans les deux groupes). Les p-values <0,05 ont été considérées statistiquement différentes. Des courbes ROC ont été établies.

RESULTATS

Pour l'expression en valeur absolue des HF-BF, une différence significative a été trouvée ($p<0,0001$) entre les liquides néoplasiques et les liquides non néoplasiques. En revanche, pour le pourcentage de HF-BF pour 100 WBC, un $p=0,057$ ne permettait donc pas d'affirmer la différence entre les deux populations. Les valeurs médianes de chaque population sont données dans le Tableau XIX.

TABLEAU XIX: STATISTIQUES DESCRIPTIVES DES POPULATIONS DE LIQUIDES NEOPLASIQUES ET NON NEOPLASIQUES : VALEURS MEDIANES DES LIQUIDES DU CHRU DE NANCY

	Valeur médiane HF-BF (pour 100 WBC)	Valeur médiane HF-BF (valeur absolue) HF-BF / µL (x 10^9 / L)
Liquides non néoplasiques	15,55	24 (0,024)
Liquides néoplasiques	17,05	119 (0,119)

Les courbes ROC ont en outre été réalisées pour les deux expressions du paramètre HF-BF:

(Figure 26 et Figure 27)

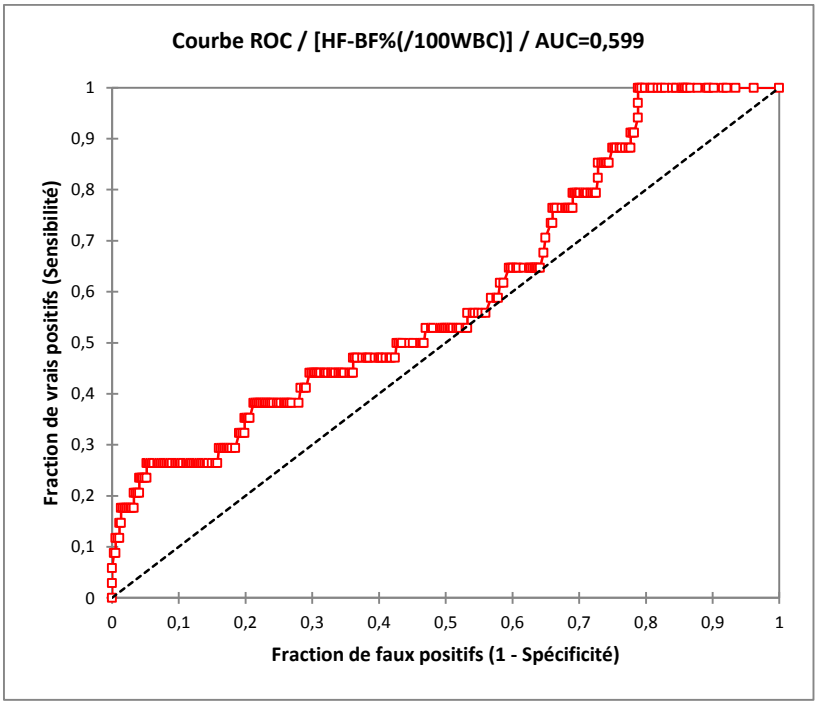


FIGURE 26: COURBE ROC CONCERNANT LE POURCENTAGE HF-BF / 100 WBC-BF ET LA PRESENCE DE CELLULES NEOPLASIQUES DANS LE LIQUIDE

Pour le pourcentage d'HF-BF, l'AUC n'est pas significativement différente de 0,5 ; il n'y a donc pas de valeur discriminante en ce qui concerne la présence de cellules néoplasiques dans un liquide.

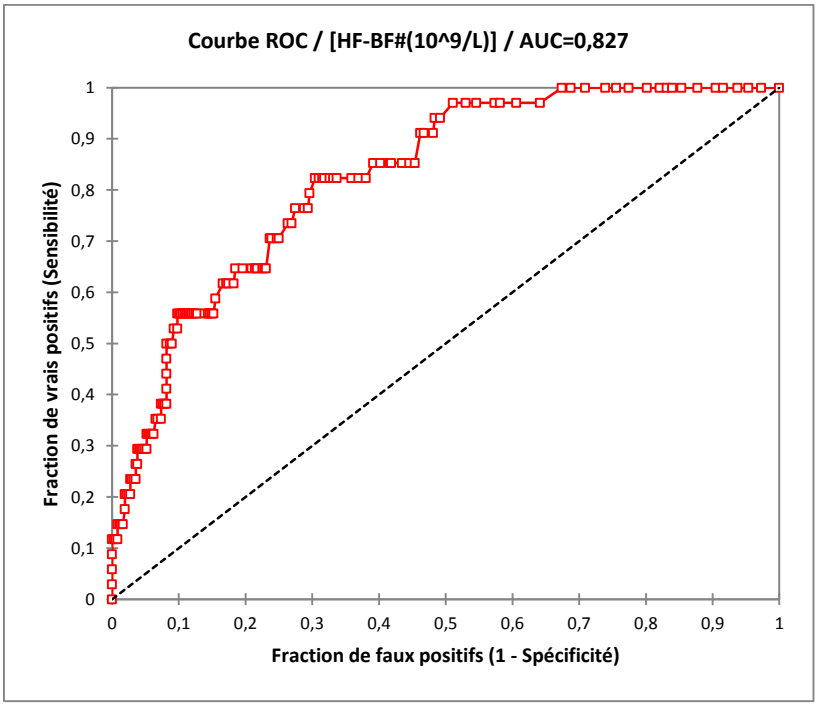


FIGURE 27: COURBE ROC CONCERNANT LA VALEUR ABSOLUE HF-BF (HF-BF X 10^9 /L) ET LA PRESENCE DE CELLULES NEOPLASIQUES DANS LE LIQUIDE.

La courbe ROC créée à partir des valeurs absolues d'HF-BF a une AUC significativement différente de 0,5 : ce paramètre est discriminant. La valeur seuil optimale est obtenue pour 45 HF-BF / µL (0,045 x 10^9 HF-BF /L), avec une sensibilité à 0,82 et une spécificité à 0,69.

DISCUSSION

D'autres équipes ont étudié le lien entre la présence d'HF-BF et la présence de cellules malignes à l'examen microscopique.

Cho et son équipe ont repris les données de 405 liquides (LCR, liquides de séreuses dont liquide d'ascite, liquide pleural, liquide péricardique broncho-alvéolaire, péritonéal et synovial) dont 125 contenaient des cellules néoplasiques. Seule l'expression en pourcentage a été étudiée. Labaere a repris le paramètre HF-BF sur 230 liquides, dont 49 comprenant des cellules malignes (liquides pleuraux, d'ascites, péritonéaux et péricardiques). Enfin, Huang et son équipe ont collectés les données de 90 liquides (41 pleuraux, 48 ascites et 1 liquide articulaire) dont 20 comportaient des cellules tumorales à l'examen microscopique. Ici, les deux types d'expressions des HF-BF ont été étudiés. Les données sont résumées dans le Tableau XX.

TABLEAU XX : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET DE L'ETUDE SUR SITE DES POURCENTAGES HF-BF (/100 WBC)

Auteur	Nombre		Valeur médiane HF-BF (pour 100 WBC)		AUC ROC	Valeur seuil retenue	Sensibilité au seuil	Spécificité au seuil
	Liquides non néoplasiques	Liquides néoplasiques	Liquides non néoplasiques	Liquides néoplasiques				
Cho et al. 2015	280	115	4,15	17,08	0,791	6,9	0,87	0,6
Labaere et al. 2015	181	49	2,6	10,2	0,69	/	/	/
Huang et al. 2016	70	20	/	/	0,60	6,5	0,65	0,62
Etude Nancy	351	35	15,55	17,05	0,59	/	/	/

Pour l'expression en pourcentage des HF-BF, notre résultat diffère en partie de ceux retrouvés dans la littérature. Notre étude a montré une absence de différence entre les liquides néoplasiques et les liquides non néoplasiques. Cela peut être expliqué par le fait que la médiane des pourcentages de HF-BF dans la population de liquides non néoplasiques est bien supérieure dans notre série (15,55 / 100 WBC-BF) par rapport aux résultats des études de Cho (4,15 / 100 WBC-BF) et Labaere (2,6 / 100 WBC-BF). La médiane des pourcentages n'est pas connue dans l'étude de Huang. Cette différence est difficilement explicable : le seuil délimitant la zone « HF » est un seuil fixe selon le constructeur, il n'y a donc a priori pas de problème de « réglage » du seuil entre les automates. Les types des liquides étudiés sont similaires (en particulier avec l'étude de Labaere). L'absence d'informations sur la numération des liquides empêche l'analyse de ce point. Cette expression du paramètre HF-BF, à priori non discriminante au vu de ces résultats, ne pourra pas être utilisée au laboratoire.

TABLEAU XXI : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET DE L'ETUDE SUR SITE DE LA VALEUR ABSOLUE HF-BF

Auteur	Nombre		Valeur médiane HF-BF (valeur absolue) HF-BF / µL (x 10^9 / L)		AUC ROC	Valeur seuil retenue	Sensibilité au seuil	Spécificité au seuil
	Liquides non néoplasiques	Liquides néoplasiques	Liquides non néoplasiques	Liquides néoplasiques				
Labaere et al. 2015	181	49	10,2 (0,0102)	65 (0,065)	0,77	0,017	0,88	0,61
Huang et al. 2016	70	20	/	/	0,67	0,039	0,74	0,62
Etude Nancy	351	35	24 (0,024)	119 (0,119)	0,83	0,045	0,82	0,69

Les données publiées au sujet de la valeur absolue HF-BF sont disponibles dans les études de Labaere et Huang (Tableau XXI). Dans notre étude, les deux populations étaient bien différentes, avec des médianes (liquide non néoplasique : 0,024 x 10^9 /L et liquide néoplasique : 0,119 x 10^9 /L) également supérieures par rapport aux données publiées

(respectivement 0,01 x 10^9 /L et 0,65 x 10^9 /L dans l'étude de Labaere). Le cut-off optimal était lui aussi plus élevé (0,45 x 10^9 /L contre 0,17 x 10^9 /L dans l'étude de Labaere et 0,039 dans l'étude de Huang). Avec le seuil de 0,45 x 10^9 HF-BF/L, sur notre échantillonnage de 386 liquides, le nombre de faux négatif s'élevait à 6 et le nombre de faux positifs à 112. Selon la définition, le paramètre est donc correctement discriminant. Cependant, il s'agit ici d'un paramètre utilisé comme test de dépistage donc le seuil le plus pertinent est celui à partir duquel un liquide est fortement susceptible de comprendre des cellules néoplasiques. Il est donc nécessaire de s'interroger sur la validité du seuil optimal, qui, sur 35 liquides néoplasiques, engendre 6 faux négatifs. Il serait plus judicieux de rechercher le seuil pour lequel aucun liquide néoplasique n'est classé négatif (VPN=1) : dans notre étude, le cut-off de 0,16 x 10^9 /L permet d'éviter tous les faux négatifs, mais le nombre de faux positifs augmente alors à 248. Concrètement, pour une utilisation en routine de ce seuil, si une revue microscopique spéciale à la recherche de cellules néoplasiques est déclenchée pour chaque liquide ayant une valeur d'HF-BF supérieure à 0,16 x 10^9 /L, alors 248 liquides, soit 64%, seraient examinés « en trop ».

Cette étude comporte plusieurs écueils à propos de la population de liquides sélectionnés: aucun sous-groupe en fonction de l'origine du liquide n'a pu être établi, cette donnée ne pouvant pas être extraite du module BF. De plus, le pourcentage de liquide néoplasique par rapport au nombre total de liquide est très inférieur au laboratoire en comparaison des populations étudiées dans la littérature. Cette différence peut être expliquée par le fait qu'au CHRU de Nancy, les liquides biologiques provenant de l'institut de cancérologie de Lorraine sont rarement envoyés pour analyse cytologique au laboratoire de biologie médicale, les prescripteurs se contentant d'une demande d'analyse anatomopathologique. La plupart des liquides néoplasiques étudiés au laboratoire proviennent donc des services d'hépato-gastro-entérologie ou de pneumologie, et parfois d'autres services (dans ce cas, la découverte de la néoplasie est le plus souvent fortuite).

4.2 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons voulu tester si l'utilisation de la formule « recherche » du module BF ainsi que celle du paramètre HF-BF comme marqueurs d'alerte pour la présence de cellules néoplasiques pourraient permettre d'éviter les revues systématiques au microscope optique de tous les frottis de liquides biologiques.

En ce qui concerne la formule « recherche » du module BF, la corrélation entre les lymphocytes et les monocytes/macrophages observés au microscope et les données du module BF, ainsi que le manque de données pour les polynucléaires éosinophiles ne permettent pas de rendre de manière fiable au clinicien la formule « recherche » sans passer par une revue microscopique. De plus, bien que le paramètre HF-BF apparaisse prometteur, il n'est pas possible, avec les données actuelles, d'établir un seuil conciliant une spécificité et une sensibilité applicable à la routine du laboratoire.

Pour ces raisons, il apparait impossible de substituer totalement le microscope optique par la formule de recherche du module BF. Cependant, une formule automatisée partielle, comprenant uniquement les polynucléaires neutrophiles, pourrait être utilisée.

Dans les cas de liquides néoplasiques, la zone HF-BF comporte de nombreux évènements donnant un aspect anormal au graphique, ce qui a été aussi rapporté par Cho (Cho et al. 2015) (Figure 28). Trois cas particuliers sont documentés dans leur étude : deux cas de liquides néoplasiques et un liquide pleural bénin. Ces points sont parfois peu nombreux, la fluorescence est toujours très élevée.

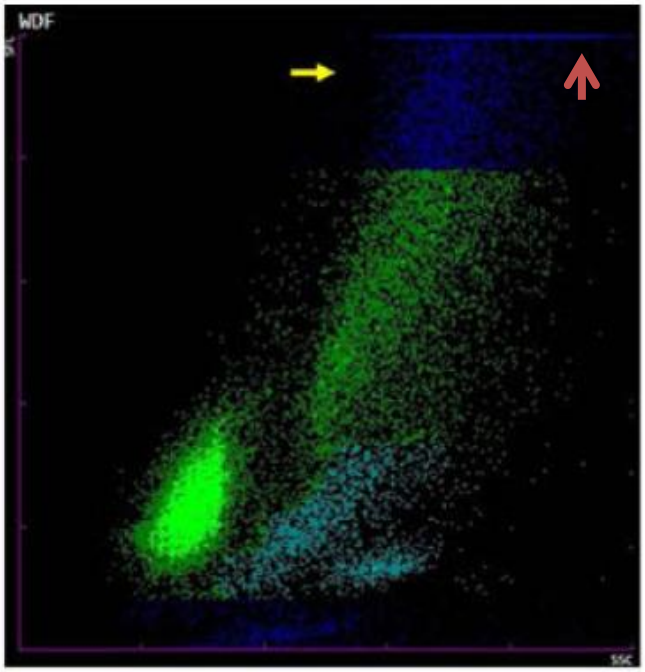


FIGURE 28: ASPECT ANORMAL DU GRAPHIQUE WDF DU MODULE BF. PRESENCE D'UNE GROSSE POPULATION CELLULAIRE DANS LA ZONE DE HAUTE FLUORESCENCE (FLECHE JAUNE), SATURANT SUR LE BORD SUPERIEUR DROIT DE LA REPRESENTATION (FLECHE ROUGE). (D'APRES **CHO ET AL. 2015**))

L'étude de cette zone du graphique WDF, cette fois à l'aide d'un logiciel de traitement de données de cytométrie en flux, pourrait permettre d'individualiser ou de représenter différemment les évènements correspondant aux cellules néoplasiques. Ce travail est présenté dans la partie suivante.

5 ANALYSE DES DONNEES DU MODULE BF PAR LE LOGICIEL INFINICYT

Sur l'automate XN, la formule sanguine est obtenue à partir de nuages de points individualisés sur une représentation graphique du canal WDF (fluorescence des cellules en fonction de la structure cellulaire). De la même manière, la représentation graphique des données des canaux du module BF permet la visualisation de nuages de points nettement séparés.

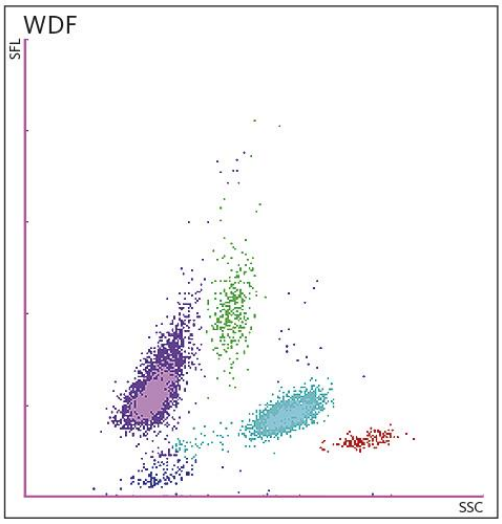


FIGURE 29: REPRESENTATION WDF D'UNE FORMULE SANGUINE. CHAQUE NUAGE DE POINT CORRESPOND A UNE POPULATION CELLULAIRE (D'APRES SYSMEX®)

Par analogie avec la formule sanguine (Figure 29), chaque nuage de point observé sur la représentation WDF du module BF correspond à une population cellulaire présente dans le liquide biologique. Lors de l'analyse de ces liquides néoplasiques sur le module BF, nous avons noté que certaines « anomalies » du graphique du module BF étaient parfois observées, notamment l'apparition de points décalés dans la zone HF-BF. Nous avions également vérifié qu'en extrayant les données automates (sous forme de fichier .FCS) du module BF, il était possible de ré-analyser ces données avec l'aide d'un logiciel dédié de cytométrie en flux.

Afin de déterminer s'il était possible de détecter la présence de cellules néoplasiques dans le liquide avec les données d'analyses du module BF et des représentations graphiques adaptées, nous avons tenté d'isoler dans un premier temps les nuages de points habituels, c'est-à-dire ceux présents dans le cas de liquides sans cellules néoplasiques. Notre but était la création d'un masque « normal ». Nous avons fait l'hypothèse que l'application de ce masque d'analyse sur des liquides néoplasiques pourrait peut-être permettre d'isoler une population d'évènements supplémentaires, correspondant alors aux cellules néoplasiques.

5.1 ANALYSE DES DONNEES .FCS D'UNE SERIE DE LIQUIDES NON NEOPLASIQUES

5.1.1 LOGICIEL INFINICYT®

Le logiciel Infinicyt® (Cytognos SL, Salamanca, Espagne) est un logiciel permettant l'intégration des données cytométriques à partir des fichiers type .FCS et une analyse multidimensionnelle des populations étudiées. Chaque évènement, c'est-à-dire chaque cellule analysée correspondant à un point sur les diverses représentations. Les données sont exploitées à l'aide de plusieurs représentations : DotPlots, histogramme, diagramme 2 D ou 3D, barres de populations. On peut aussi utiliser l'Automatic Population Separator (APS) qui permet de séparer les populations en prenant en compte toutes les données disponibles, et pas uniquement 2 ou 3 dimensions. Grâce à ce logiciel, on peut créer un protocole d'analyse des populations, permettant une analyse identique et automatique des données de différents fichiers. L'analyse devient alors indépendante de l'opérateur.

Pour chaque cellule analysée, le module BF regroupe les valeurs de fluorescence (SFL), de déviation frontale (FSC et FSCW) et latérale de la lumière (SSC) dans un fichier .FCS. Plusieurs graphiques peuvent être générés à partir de ces informations. Les représentations utilisés ici sont : SSC linéaire en fonction de FSC linéaire ; SFL linéaire en fonction de SSC linéaire (correspondant au WDF du XN); FSCW logique en fonction de SSC linéaire, FSC logique en fonction de SFL linéaire, ainsi que les APS 1, 2, 3. Ces différentes représentations permettent de visualiser toutes les données disponibles collectées par le module BF sous forme de différents nuages de points. Il est possible de fenêtrer un groupe de points sur une des représentations : chaque évènement présent dans cette zone est alors affectée à une population cellulaire et se colore en conséquence sur toutes les représentations. Cet outil permet de visualiser la position des différentes populations sur plusieurs représentations simultanément. Le logiciel Infinicyt® propose en outre, pour chaque population, les caractéristiques de la population cellulaire : nous avons porté une attention particulière au pourcentage d'évènement dans la population par rapport à la totalité des évènements.

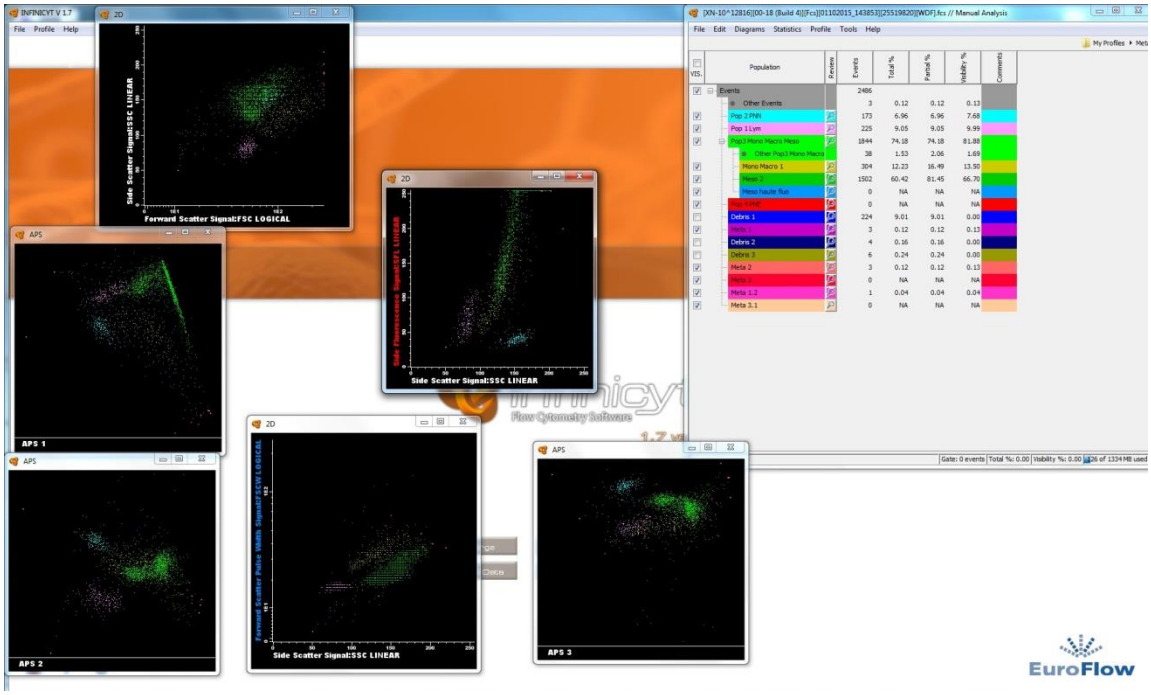


FIGURE 30: LOGICIEL INFINICYT®. DIFFERENTES REPRESENTATIONS DES DONNEES DISPONIBLES POUR L'ANALYSE D'UN LIQUIDE. A GAUCHE, LES DIFFERENTES REPRESENTATIONS CHOISIES. DANS LA FENETRE DE DROITE, LES POPULATIONS CELLULAIRES AFFECTEES AUX NUAGES SONT COLOREES DE DIFFERENTES MANIERES AFIN D'ETRE INDIVIDUALISEES SUR LES REPRESENTATIONS.

5.1.2 MATERIELS ET METHODES

Notre but a été d'individualiser, grâce au logiciel Infinicyt®, les différents nuages de points présents dans les représentations de liquides non néoplasiques et d'en rechercher les populations cellulaires correspondantes.

Seuls les liquides dépourvus de cellules néoplasiques ont été utilisés dans un premier temps. Les liquides trop riches ou trop pauvres en cellules (rendant impossible l'individualisation de nuages de points), les liquides hémorragiques ou comportant de nombreux débris ont été exclus, ainsi que les liquides articulaires (la rareté des métastases dans ce type de liquide ainsi que la présence possible de cellules synoviales ont motivé ce choix). Trente liquides (9 liquides pleuraux et 21 liquides d'ascites) ont été retenus. Pour chaque liquide, les données d'analyses du module BF ont été extraites de l'automate sous forme de fichier .FCS.

Avec le logiciel Infinicyt®, le pourcentage du nombre d'évènements sélectionnés (dans un nuage de points) par rapport au nombre d'évènements total est comparé aux pourcentages des différentes populations cellulaires obtenues au microscope optique. La position des nuages de points sur le graphique a, en outre, aidé à l'affectation d'une population cellulaire au nuage.

5.1.3 RESULTATS

Pour les liquides non néoplasiques, plusieurs nuages se distinguaient clairement sur la représentation SFL en fonction de SSC (qui correspond au WDF de l'automate) (Figure 31).

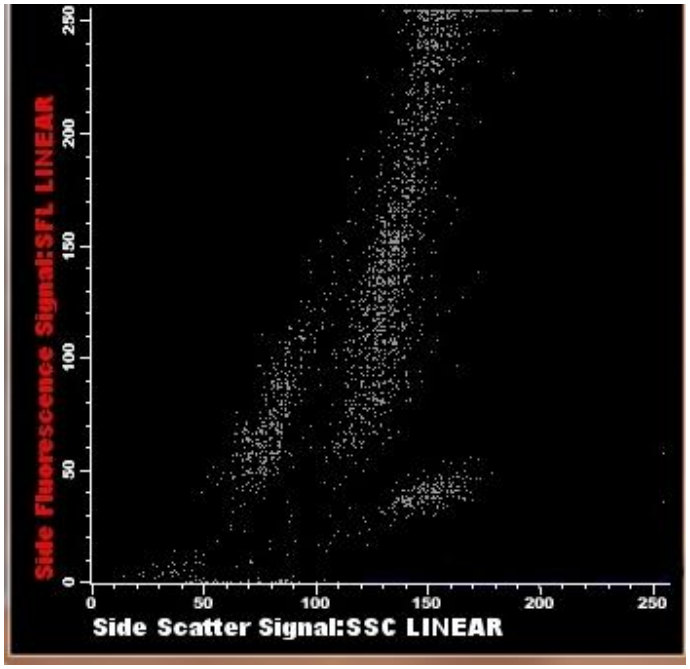


FIGURE 31 : REPRESENTATION BRUTE DES DONNEES .FCS D'UN LIQUIDE NON NEOPLASIQUE (SFL EN FONCTION DE SSC). ON DISTINGUE PLUSIEURS NUAGES D'EVENEMENTS DISTINCTS LES UNS DES AUTRES.

Un premier nuage a été fenêtré. Par analogie avec le placement des populations d'une analyse de sang total sur la représentation WDF de l'automate, ainsi que par comparaison avec les résultats des pourcentages de la formule du liquide obtenus au microscope optique et le pourcentage d'évènements dans cette fenêtre, nous avons assigné la population correspondante à ce nuage de points, c'est-à-dire les lymphocytes (Figure 32).

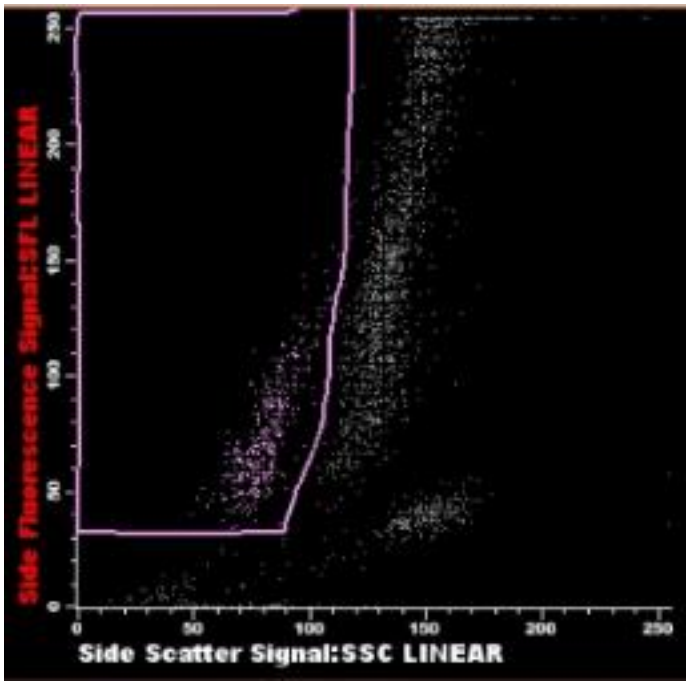


FIGURE 32 : FENETRAGE DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE

Les nuages correspondants à la population des polynucléaires neutrophiles a été fenêtrée ensuite (Figure 33).

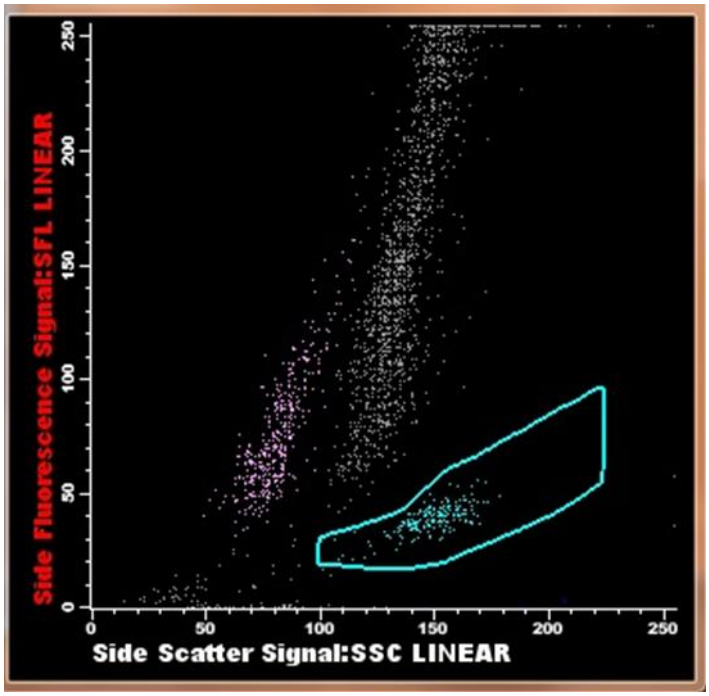


FIGURE 33: FENETRAGE DE LA POPULATION DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES.

Enfin, il était visible sur la représentation type WDF que le nuage de points (coloré en vert sur la Figure 34) situé au centre du graphique comportait deux populations mais elles ne pouvaient pas être séparées distinctement. Lorsque la totalité du nuage était entourée, il apparaissait alors en deux parties distinctes sur la représentation FSCW en fonction de SSC.

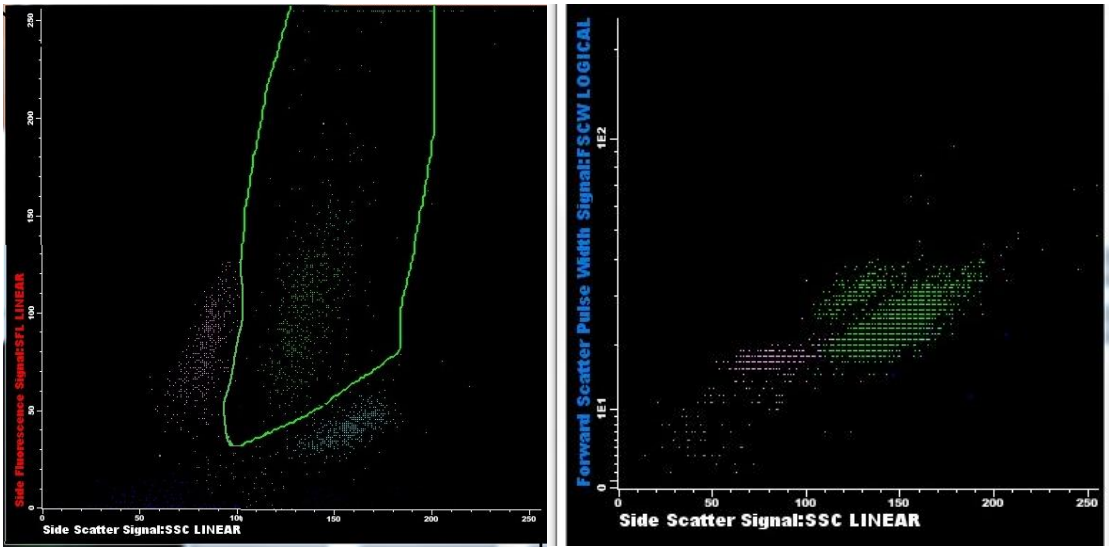


FIGURE 34: SEPARATION DE LA POPULATION MONOCYTES/MACROPHAGES ET MESOTHELIALES.

C'est donc sur cette représentation FSCW en fonction de SSC que, par analogie avec les résultats des formules cytologiques établies au microscope, deux populations (monocytes/macrophages et cellules mésothéliales) ont été individualisées, puis vérifiées (Figure 35).

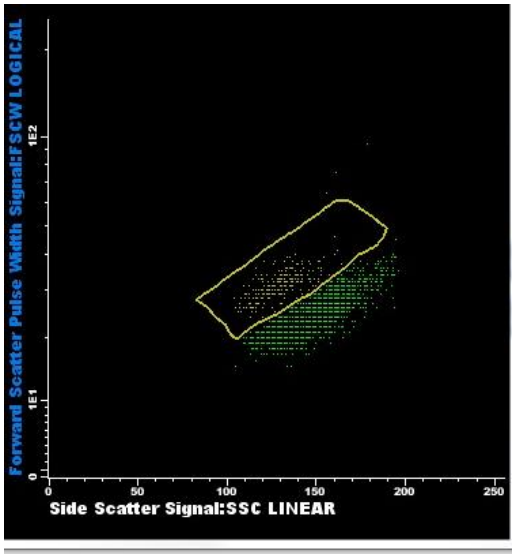


FIGURE 35: SEPARATION DES CELLULES MESOTHELIALES DU GROUPE MONOCYTES MACROPHAGES A L'AIDE D'UNE SECONDE REPRESENTATION.

Une fois tous les nuages visibles fenêtrés, les évènements non affectés, situés en bas de la représentation type WDF, ont été nommés « débris cellulaire » (Figure 36).

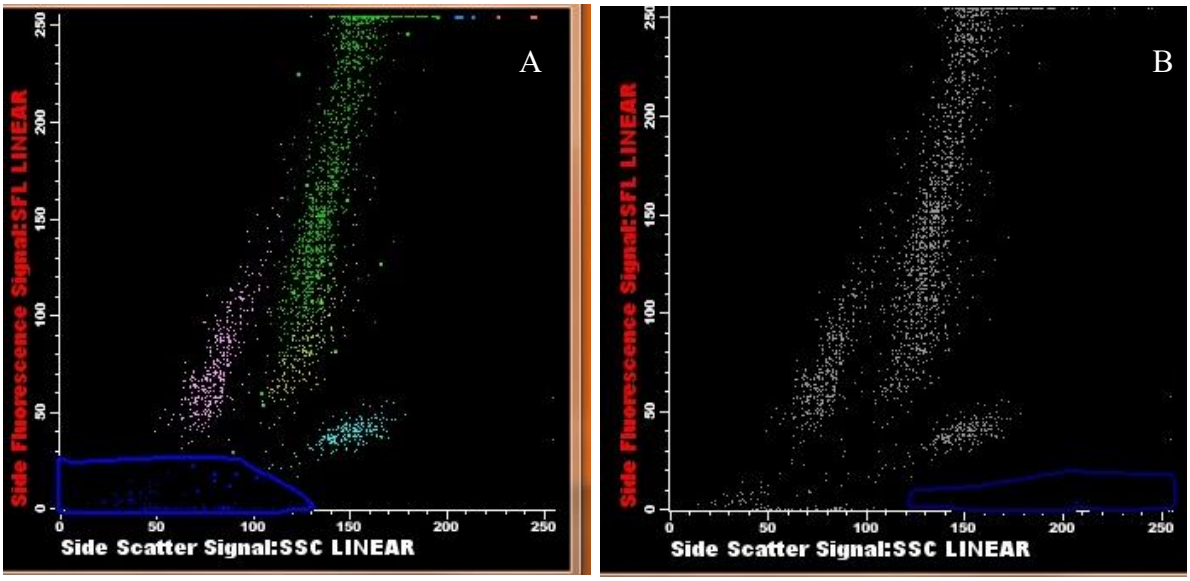


FIGURE 36: ZONES DES DEBRIS CELLULAIRES 1 (A) ET DEBRIS CELLULAIRES 2 (B)

La quasi-totalité des évènements a été ainsi affectée à une population cellulaire ou à des débris. Nous avons ainsi constitué un masque d'analyse, appelé « normal », présenté sur la Figure 37. Nous l'avons appliqué sur les 30 fichiers .FCS extraits du module BF. Avec ce masque, le nombre d'évènement non affecté à une population cellulaire était très faible. Nous avons pu alors affiner les différents fenêtrages. Un liquide riche en polynucléaires éosinophiles (15% de la formule) a finalement permis le fenêtrage de cette population. Au final, sur les 30 liquides testés, aucun n'avaient plus de 1,8% d'évènements non affectés.

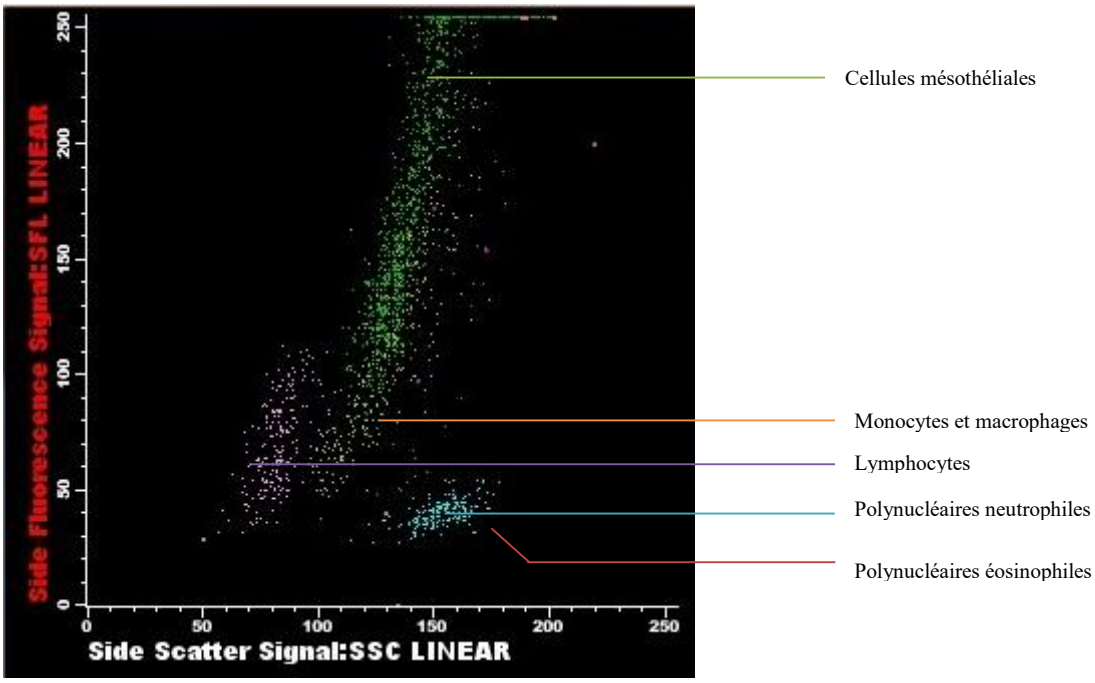


FIGURE 37: REPRESENTATION WDF SUR LE LOGICIEL INFINICYT® ET POPULATION CELLULAIRE INDIVIDUALISEE A L'AIDE DU MASQUE D'ANALYSE « NORMAL »

5.2 APPLICATION AUX LIQUIDES NEOPLASIQUES

5.2.1 CREATION DES ZONES « META »

5.2.1.1 MATERIELS ET METHODES

Le masque des populations cellulaires « normales » a été appliqué aux liquides comprenant des cellules néoplasiques dans le but de rechercher des évènements en dehors des populations normales ; notre hypothèse était que ces évènements correspondaient alors potentiellement aux cellules néoplasiques.

Les données .FCS de 20 liquides contenant des cellules néoplasiques à l'examen microscopique ont été extraites du module BF, recueillis du 1er septembre 2015 au 20 septembre 2016, soit 20 liquides (les fichiers .FCS des liquides antérieurs au 1er septembre 2015 n'ont pas pu être récupéré, contrairement aux fichiers .CSV). Elles ont été analysées selon le masque des populations cellulaires normales. Des évènements non affectés à une population existante ont été recherchés sur toutes les représentations disponibles. Les nuages de points ainsi révélés étaient affectés systématiquement à une nouvelle population, nommée arbitrairement « META1 », « META2 »... Une fois toutes les populations suspectes fenêtrées, nous avons appliqués ce nouveau masque sur tous les fichiers de liquides néoplasiques afin d'obtenir le nombre d'évènement dans chaque zone « META » pour chacun des liquides.

5.2.1.2 RESULTATS

A l'aide des 20 liquides néoplasiques, 5 nouveaux nuages ont été mis en évidence. Nous avons constaté que ces zones étaient toutes isolées sur les diagrammes APS et non pas sur la représentation WDF (Figure 38 à 42).

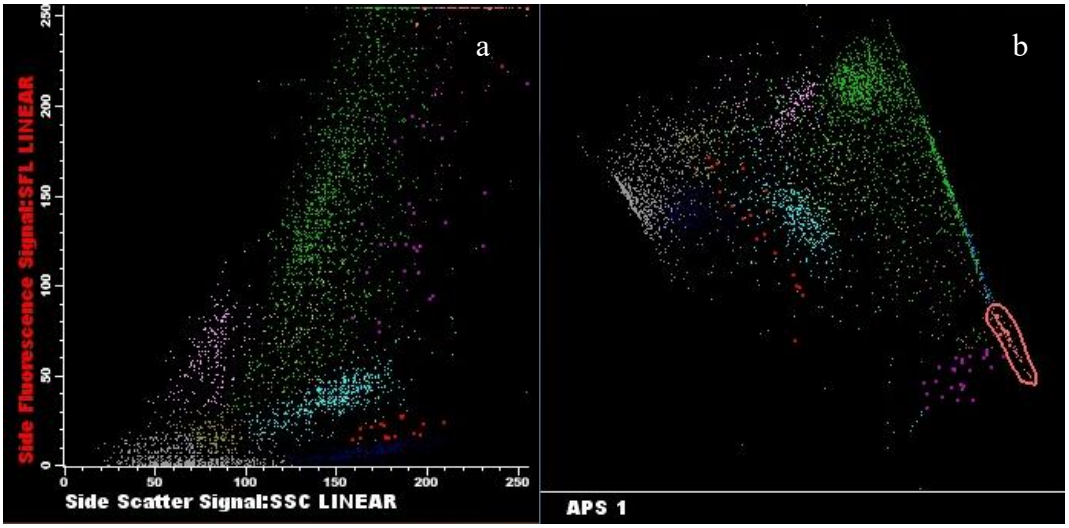


FIGURE 38: REPRESENTATION WDF (A) ET APS (B) D'UN LIQUIDE <u>NEOPLASIQUE</u>. UN ENSEMBLE DE POINTS APPARAIT DANS LA ZONE META2 (EN ROSE) : CE SONT POTENTIELLEMENT DES CELLULES NEOPLASIQUES.

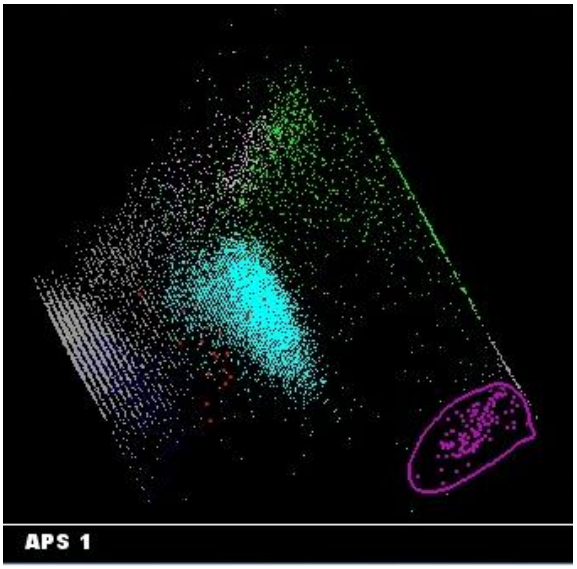


FIGURE 39: ZONE META1 SUR UNE REPRESENTATION APS

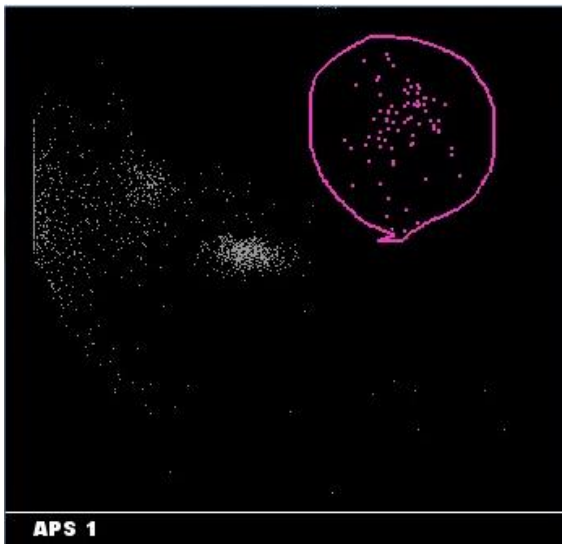


FIGURE 40: ZONE META12 SUR REPRESENTATION APS

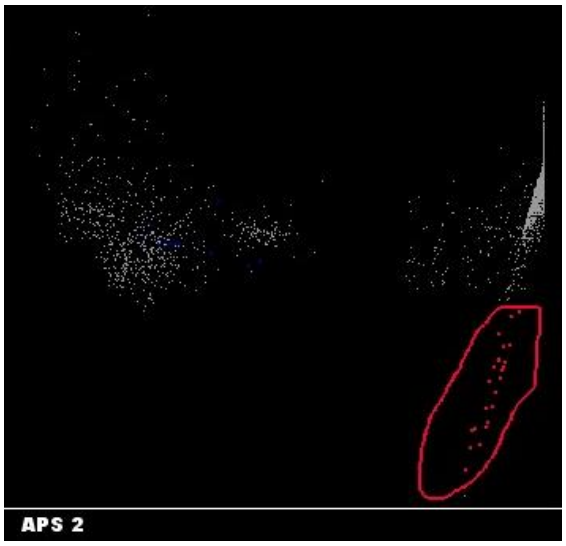


FIGURE 41: ZONE META3 SUR REPRESENTATION APS

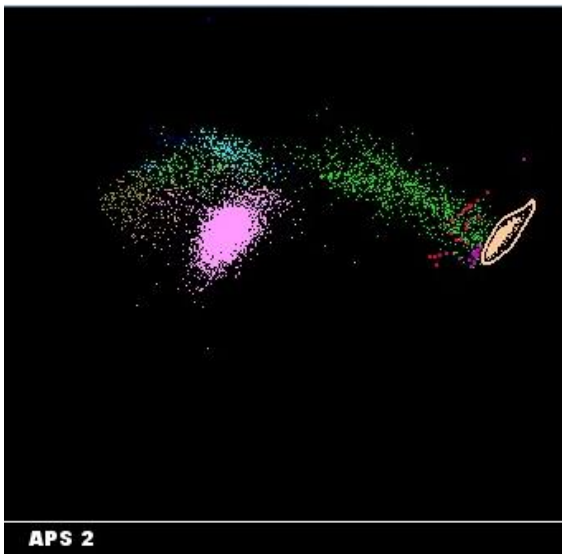


FIGURE 42: ZONE META31 SUR UNE REPRESENTATION APS

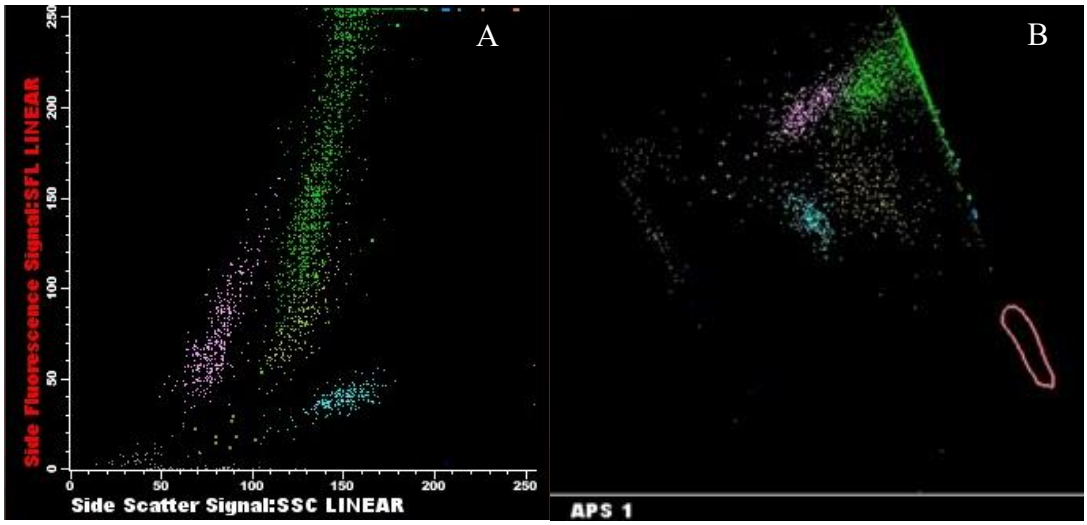


FIGURE 43: EXEMPLE DE REPRESENTATION WDF (A) ET APS (B) D'UN LIQUIDE <u>NON NEOPLASIQUE</u>. DANS LA ZONE « META2 » VISIBLE SUR LE DIAGRAMME APS (EN SAUMON), AUCUN EVENEMENT N'APPARAIT.

Pour les 20 liquides, les évènements correspondant aux 5 zones ont été dénombrés par le logiciel et compilé dans le Tableau XXII.

TABLEAU XXII: DIAGNOSTICS ONCOLOGIQUES DES LIQUIDES ETUDIES ET NOMBRE D'EVENEMENTS DANS LES DIFFERENTES ZONES META (NR : NON RENSEIGNE)

DIAGNOSTIC ONCOLOGIQUE	TYPE	META1	META2	META3	META12	META31
Adénocarcinome du cardia	Pleural	51	1619	2	170	1
Adénocarcinome mammaire	Pleural	2	41	0	1	1
Adénocarcinome ovarien	Ascite	10	29	3	15	0
Adénocarcinome ovarien	Ascite	278	616	1	140	67
Adénocarcinome ovarien	Ascite	2	19	2	0	0
Adénocarcinome pancréas	Ascite	75	163	4	27	0
Adénocarcinome pancréas	Ascite	26	108	1	35	0
Adénocarcinome pancréas	Ascite	113	97	0	14	0
Adénocarcinome poumon	Ascite	12	146	1	66	0
Adénocarcinome poumon	Pleural	12	61	0	77	0
Carcinome non à petites cellules	Pleural	200	5809	1	2068	94
Adénocarcinome vésicule biliaire	Ascite	9	53	0	21	0
Adénocarcinome vésicule biliaire	Ascite	6	180	0	54	0
Cancer de l'endomètre	Pleural	139	3084	9	80	43
Cancer digestif	Pleural	27	1179	1	583	4
Carcinome pancreatobiliaire	Ascite	11	64	0	19	0
Carcinome pancreatobiliaire	Ascite	14	96	0	75	0
NR	Ascite	27	2326	14	0	70
NR	Pleural	38	650	4	83	5
NR	Pleural	9	556	1	160	5

5.2.1.3 DISCUSSION

Cinq nuages de points suspects sont obtenus par analyse des liquides néoplasiques. La présence d'évènements dans chaque zone varie pour chacun des liquides. Ce qui signifie que les cellules néoplasiques correspondant potentiellement aux évènements possèdent des caractéristiques de structure, de taille et de fluorescence différentes. La multiplicité des types de cellules néoplasiques analysées ici (cancer du sein, cancer de l'ovaire, cancer bronchique…) et de leurs caractéristiques cytologiques peut expliquer ce phénomène. Cependant, un nombre trop faible de chaque type de cancer et l'absence de diagnostic précis pour certains ne permettent pas de tirer des conclusions franches.

5.2.2 INTERET DES ZONES « META » POUR LE DEPISTAGE DE LA PRESENCE DE CELLULES NEOPLASIQUES DANS LE LIQUIDE

Nous avons ensuite testé la validité du masque comprenant les populations cellulaires normales et les populations néoplasiques.

5.2.2.1 MATERIELS ET METHODES

Le masque précédemment créé a été appliqué sur la totalité des liquides pleuraux et d'ascites non néoplasiques analysés au laboratoire du 28 avril 2015 au 16 janvier 2016 (529 liquides). Une fois cette stratégie d'analyse appliquée identiquement, le nombre d'évènement généré pour chaque liquide a été récupéré pour chaque zone, ainsi que les données des liquides néoplasiques précédemment analysées. Toutes ces données ont été compilées. Puis, pour évaluer la puissance diagnostique de chacune des zones, des statistiques descriptives et des courbes ROC ont été réalisées à l'aide des logiciels XLStat (Addinsoft) et Excel 2010 (Microsoft).

5.2.2.2 RESULTATS

Pour toutes les zones, la répartition du nombre d'évènements diffère entre les deux groupes de liquides (Test de Mann-Whitney au risque de 5%). Les valeurs minimales et maximales d'évènements pour chaque zone indiquent qu'il existe des liquides non néoplasiques générant de nombreux évènements dans une zone META. Inversement, des liquides néoplasiques peuvent ne générer aucun évènement dans une ou plusieurs de ces zones (Tableau XXIII).

TABLEAU XXIII: STATISTIQUES DESCRIPTIVES DES DIFFERENTES ZONES ETUDIEES POUR DES LIQUIDES NON NEOPLASIQUES ET NEOPLASIQUES.

ZONE	COMPARAISON DE POPULATION (TEST DE MANN-WHITNEY AU RISQUE DE 5%)	LIQUIDE NON NEOPLASIQUE (N=529)				LIQUIDE NEOPLASIQUE (N=20)			
		MOYENNE	MEDIANE	MINIMUM	MAXIMUM	MOYENNE	MEDIANE	MINIMUM	MAXIMUM
META1	Différente (p < 0,001)	16,7	1	0	1876	53,1	20	2	278
META2	Différente (p < 0,001)	67,2	4	0	2493	844,9	154	19	5809
META3	Différente (p < 0,001)	1,7	0	0	132	2,2	1	0	14
META12	Différente (p < 0,001)	71	3	0	2651	184,4	60	0	2068
META31	Différente (p < 0,001)	0,321	0	0	66	14,5	0	0	94

TABLEAU XXIV: DONNEES DES COURBES ROC ETABLIES POUR CHAQUE ZONE « META»

ZONE	META1	META2	META3	META12	META31
AUC	0,867	0,91	0,692	0,749	0,704
Comparaison de l'AUC à 0,5 (Test bilatéral au risque 5%)	oui (p<0,001)	oui (p<0,001)	Non réalisée	oui (p<0,001)	Non réalisée
Nombres d'évènements pour sensibilité et spécificité maximale	8	18	0	13	0
Nombre d'évènements pour VPN =1	2	19	Pas de seuil où VPN=1	Pas de seuil où VPN=1	Pas de seuil où VPN=1

En ce qui concerne les courbes ROC, les zones META3 et META31 n'ont pas été exploitées : l'allure des courbes (Figure 44) ainsi que les AUC faibles (Tableau XXIV) indiquent que le nombre d'évènements recensés dans ces zones n'est pas discriminant pour la présence de cellules néoplasiques.

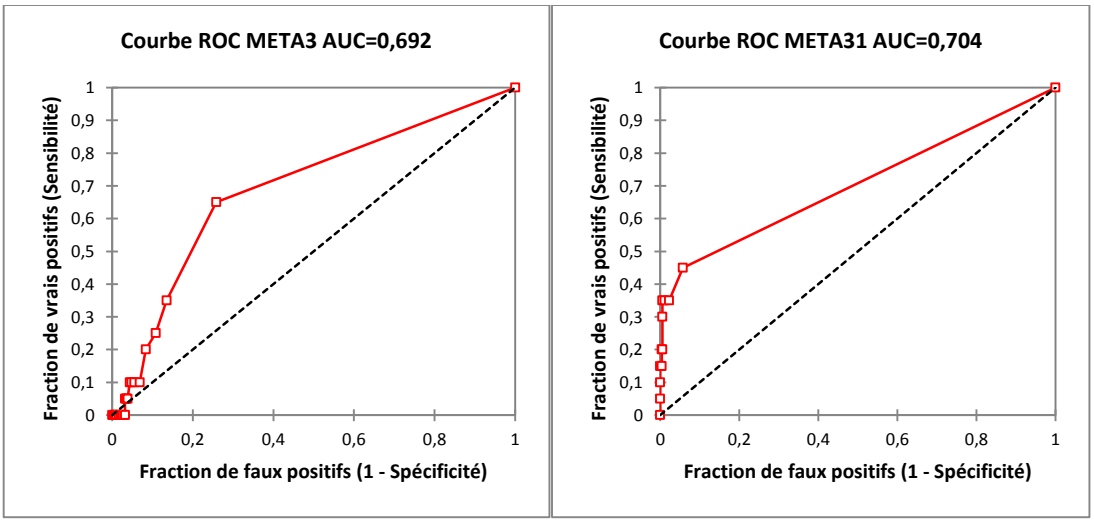


FIGURE 44: COURBES ROC CORRESPONDANT A LA ZONE META3 (A) ET META31 (B)

Comme déjà mentionné, l'intérêt d'un test de dépistage est de définir un seuil limitant au maximum le nombre de faux négatif, ce qui correspond à une valeur prédictive négative (VPN) = 1, D'après le tableau XXI, la zone META12, bien qu'étant discriminante (AUC différente de 0,5), ne permet pas d'obtenir un seuil d'évènement utilisable pour une VPN = 1, Cette zone n'est donc pas non plus retenue.

Seules deux zones paraissaient donc intéressantes : la zone META1 (Figure 45) et la zone META2 (Figure 46).

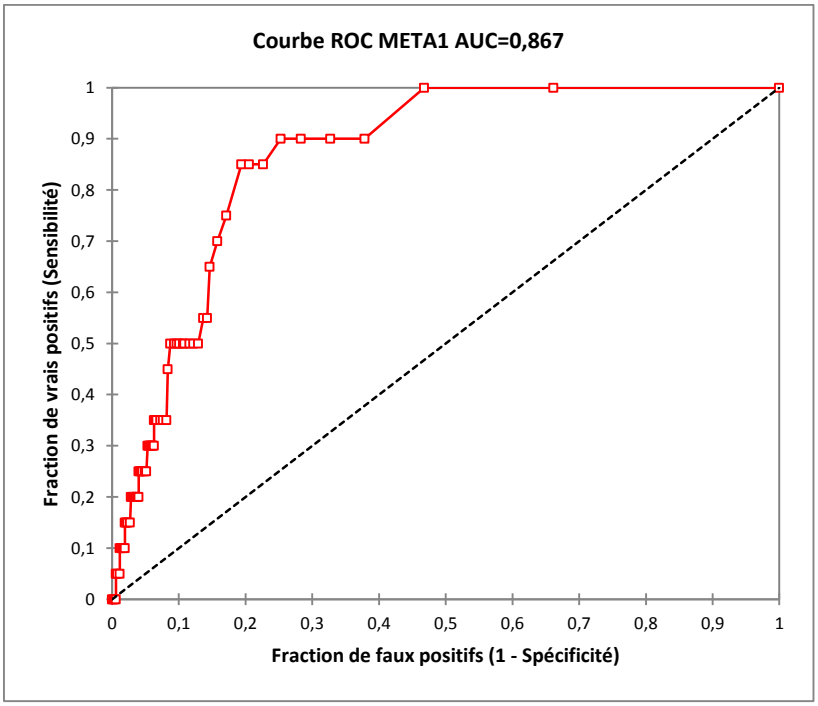


FIGURE 45: COURBE ROC CORRESPONDANT A LA ZONE META1

Pour la zone META1, l'AUC de la courbe ROC est égale à 0,867 et elle est significativement différente de 0,5 ($p<0,001$) (Tableau XXIV). Cette zone est donc considérée comme discriminante. Cependant, le seuil à partir duquel la VPN devient inférieure à 1 est égal à 2 évènements, ce qui paraît faible. Effectivement, à ce seuil, il y a 246 liquides classés faux positifs.

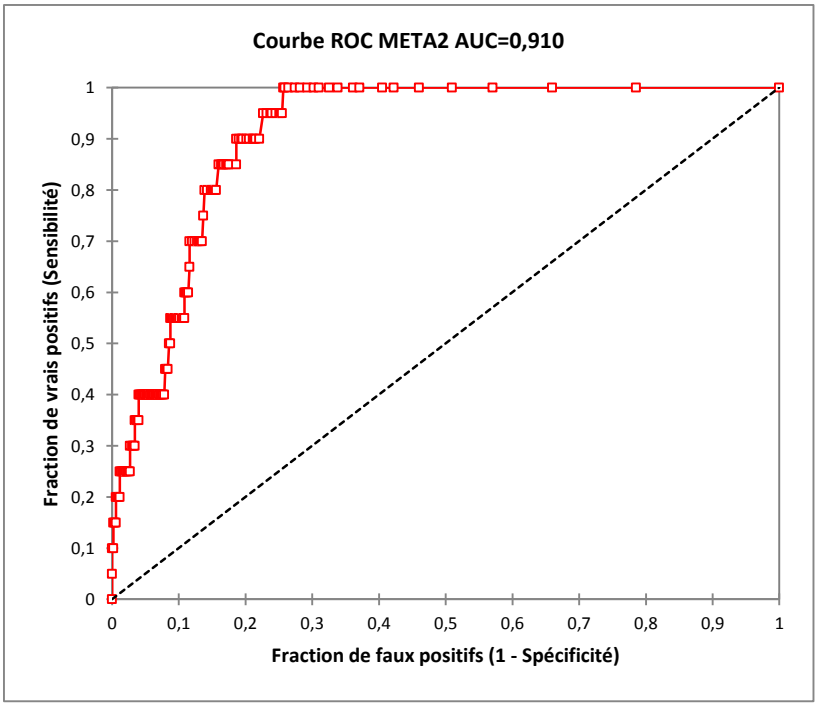


FIGURE 46: COURBE ROC CORRESPONDANT A LA ZONE META2

Pour la zone META2, l'allure de la courbe indique clairement que le test est discriminant, ce qui est confirmé par l'AUC égale à 0,91, significativement différente de 0,5 ($p<0,001$) (Tableau XXIV). Ici, le nombre d'évènements pour lequel la sensibilité et la spécificité sont maximales est identique au nombre d'évènements maximum pour lequel la valeur prédictive négative est égale à 1. Ce seuil est de 18 évènements. Si on retient ce seuil pour discriminer les liquides entre négatif et positif, on obtiendrait 135 faux positifs.

5.2.2.3 DISCUSSION

Les cellules néoplasiques contenues dans les liquides sont détectées comme les autres cellules, elles doivent donc apparaître sur les graphiques de représentations des données. Même si sur le graphique classique proposé par le module BF, ces points n'apparaissent pas distinctement, avec des représentations différentes et une analyse des données sur un logiciel de cytométrie en flux, des nuages de points distincts ont été isolés, permettant le ciblage de zones de détection de cellules suspectes. Ces zones peuvent alors être observées pour alerter sur la possibilité de présences de cellules néoplasiques dans le liquide. Cette notion de dépistage nécessite que le seuil du nombre d'évènements dans la zone retenue à partir duquel le liquide est soupçonné de contenir des cellules néoplasiques soit suffisamment bas pour ne manquer aucune métastase : la valeur prédictive négative doit donc être égale ou proche à 1, Avec l'étude statistique sous forme de courbe ROC, il est apparu que seule la zone META2 présentait un intérêt dans ce cadre. Avec cette zone, le nombre de faux positifs induits était de 135 (sur un total de 549 liquides, soit 24,6%), ce qui était élevé. Cela signifie que, pour une application en pratique, selon laquelle les frottis de liquides ne seraient revus au microscope que si le nombre d'évènements dans la zone META2 est supérieur au seuil défini, un seuil situé à 18 induirait la lecture de 135 frottis inutiles, mais éviterait la lecture de 391 frottis de liquides négatifs. Notre cohorte de 20 liquides néoplasiques n'était pas suffisante pour établir une telle règle d'analyse. L'analyse doit être prolongée avec d'autres liquides néoplasiques, les zones pouvant ainsi être retravaillées afin de coller au mieux aux populations cellulaires néoplasiques.

En outre, se pose la question de l'application d'une telle stratégie d'analyse sur des données issues d'un autre module BF. Nous avons souhaité tester notre analyse sur une autre série de liquides, analysés sur un module BF dans un centre hospitalier belge, pour évaluer la robustesse de cette stratégie.

5.3 APPLICATION A UNE SERIE DE LIQUIDES ANALYSES SUR UN AUTRE MODULE BF

Le CHU de Mont Godinne, à Namur en Belgique, a fourni les fichiers .FCS de 527 liquides analysés sur le module BF de leur chaîne XN. Ces fichiers étaient anonymes. Ces liquides étaient des liquides pleuraux, d'ascites, péritonéaux, articulaires. Les liquides broncho-alvéolaires ainsi que les LCR ont été exclus lors de l'extraction des données. Vingt-cinq de ces liquides comprenaient, après analyse microscopique, des cellules classées suspectes. Ces fichiers .FCS ont été analysés selon la même stratégie d'analyse décrite précédemment. Les résultats ont été exportés dans un tableur Excel pour étude.

En appliquant le seuil de 18 pour la zone META2, comme réalisé sur la cohorte de liquide de Nancy, on obtient pour les 527 liquides : 383 vrais négatifs, 19 vrais positifs, 116 faux positifs et 6 faux négatifs, soit une VPN de 0,98. Les VPN sont donc différentes selon les cohortes de liquides, avec un seuil identique.

Les résultats de l'application de la stratégie d'analyse développée à Nancy sur une autre cohorte de liquides analysée avec un autre module BF montre la difficulté de transposition directe d'une stratégie d'analyse d'un module BF à l'autre. Cela peut s'expliquer de différentes manières : d'abord par la différence dans la sélection des liquides entre les deux cohortes analysées ; ensuite, pour la cohorte de liquides extérieurs, le type de cellules néoplasiques n'est pas connu et il manque la confirmation anatomopathologique de leurs présences. Mais plus probablement, cela s'explique par une différence entre les données d'analyses extraites du module : une différence de calibration entre les deux modules entrainerait un décalage dans le positionnement des évènements sur les graphiques, sans impacter sur le nombre d'évènements détectés. Or les zones ciblées dans la stratégie d'analyse sont fixes et ne s'adaptent donc pas au décalage des différents nuages. Il y a donc une perte d'informations pour certaines zones qui ne sont pas centrées sur les nuages de populations cellulaires. Ce problème pourrait être réglé avec un système d'analyse non fixe, qui détecte les centres de nuages d'évènements et se positionne en conséquence (ce qui est le cas dans l'analyse de la formule sanguine par le XN).

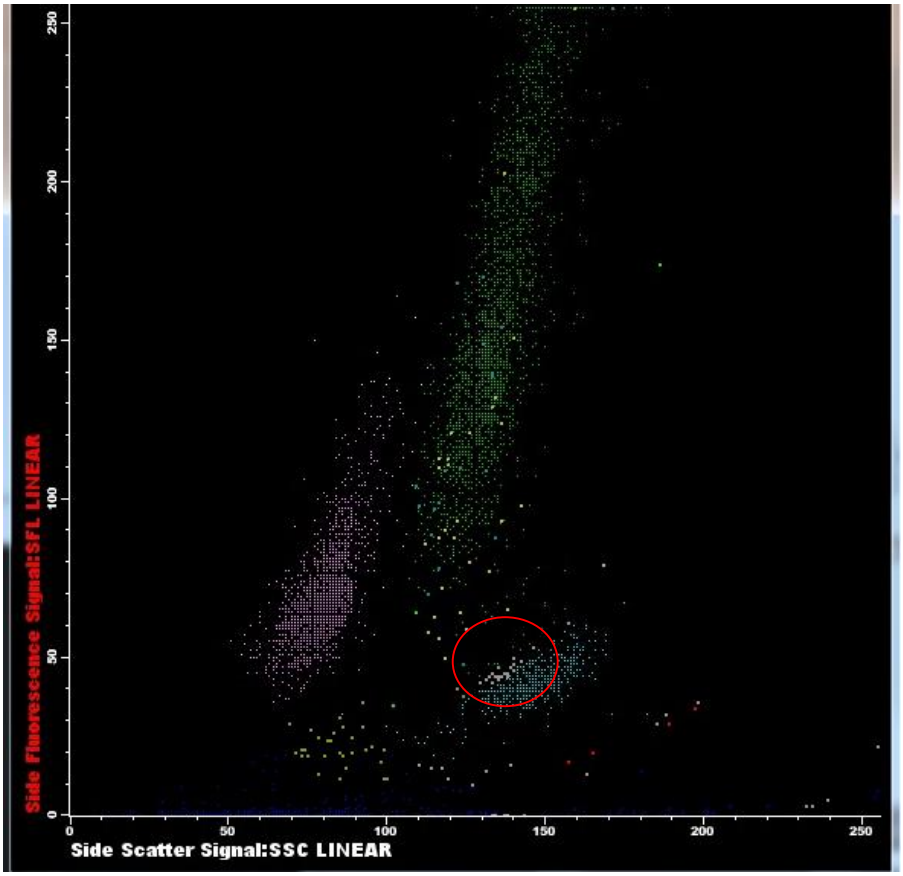


FIGURE 47 : REPRESENTATION SFL EN FONCTION DE SSC D'UN LIQUIDE BIOLOGIQUE ANALYSE SUR UN AUTRE MODULE BF. EN ROUGE, DES EVENEMENTS NON AFFECTES MONTRANT LE DECALAGE DES NUAGES DE POINTS.

L’établissement de la formule cytologique étendue aux cellules métastatiques est possible pour le module BF au-delà de la simple classification PM et MN proposée par le constructeur. Cela nécessite le développement d’un système d’analyse des nuages de points comme cela a été réalisé pour la formule sanguine. La visualisation des cellules néoplasiques est difficile sur les graphiques actuels, mais une optimisation de leur représentation pourrait être réfléchie. Il serait probablement possible de mettre en place des systèmes d’alarmes analytiques de même type que les alarmes « blastes » déjà existantes pour l’analyse de la formule sanguine.

CONCLUSION GENERALE

L'étude cytologique des liquides constitue une part variable du travail d'un laboratoire de biologie médicale. Les techniques utilisées pour cette analyse sont encore uniquement manuelles dans la plupart des laboratoires. Cependant, quelques constructeurs ont développé des modules pour automates d'hématimétrie ou même des automates dédiés pour ces analyses.

Le constructeur SYSMEX® a mis sur le marché un module analytique Bodyfluid, adossé à son automate d'hématimétrie XN et dédié à l'analyse des liquides. Notre travail a permis de constater que de nombreux paramètres disponibles restent non utilisables en routine sans une validation approfondie par le laboratoire, et sont de ce fait sous exploités. Nous avons montré que le module BF possède un potentiel analytique important, de par la possibilité de proposer une formule automatisée robuste, avec un système d'analyse de cytométrie en flux adapté, ainsi que par la possibilité de développer un système d'alarme pour la suspicion de cellules néoplasiques dans le liquide. Nous avons d'ailleurs eu à ce sujet des contacts avec l'équipe recherche et développement de SYSMEX®.

SYSMEX® vient de développer un nouveau mode analytique appelé le système hsA. Ce mode est clairement développé pour permettre une analyse adaptée aux LCR sans besoin de technique cytologique manuelle. Le constructeur annonce une augmentation de la précision du comptage des globules blancs et des globules rouges, le rendu d'une formule cytologique validée comprenant les lymphocytes, monocytes, polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, ainsi qu'un algorithme fonctionnel pour détecter et alarmer les cellules pathologiques présentes. Ce module n'est à ce jour pas encore commercialisé, mais a déjà été étudié par l'équipe de Fleming.

Notre travail s'est donc inscrit dans cette logique d'amélioration des systèmes analytiques existants et disponibles pour les laboratoires de biologie médicale.

BIBLIOGRAPHIE

Bardin T. Biologie du liquide synovial. Revue Française des Laboratoires. 2008;1998(300):71-5.

Boer K, Deufel T, Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. Clin Biochem. 2009;42(7-8):684-91.

Bourner G, De la Salle B, George T, Tabe Y, Baum H, Culp N, et al. ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. Int J Lab Hematol. 2014;36(6):598-612.

Buffet C. Conduite à tenir devant une ascite. EMC - Hépatologie. 2012;7(3):1-8.

Buoro S, Mecca T, Azzarà G, Seghezzi M, Dominoni P, Crippa A, et al. Cell Population Data and reflex testing rules of cell analysis in pleural and ascitic fluids using body fluid mode on Sysmex XN-9000. Clin Chim Acta. 2016;452:92-8.

Carrier P, Jacques J, Debette-Gratien M, Legros R, Sarabi M, Vidal E, et al. L'ascite non liée à la cirrhose : physiopathologie, diagnostic et étiologies. Rev Med Interne. 2014;35(6):365-71.

Caumartin Y, Dujardin T. Ascite chyleuse postopératoire en urologie [Internet]. Urofrance.org. [cité 29 oct 2016]. Disponible sur: http://urofrance.org/science-et-recherche/base-bibliographique/article/html/lascite-chyleuse-postoperatoire-en-urologie.html

Cho Y-U, Chi H-S, Park SH, Jang S, Kim Y-J, Park C-J. Body fluid cellular analysis using the Sysmex XN-2000 automatic hematology analyzer: focusing on malignant samples. Int J Lab Hematol. 2015;37(3):346-56.

Clinical Laboratory Standards Institute. Body Fluid Analysis for cellular composition; Approved guidelines. Vol. CLSI Document H56-A. 2006.

Debray M-P, Bancal C, Dombret M-C. Plèvre normale et pathologique non tumorale. EMC-Radiologie et imagerie médicale - cardiovasculaire - throacique - cervicale. 2013;8(3).

Fleming C, Brouwer R, Lindemans J, de Jonge R. Validation of the body fluid module on the new Sysmex XN-1000 for counting blood cells in cerebrospinal fluid and other body fluids. Clin Chem Lab Med. 2012;50(10):1791-8.

Grancher T, Jeanne G. Biologie des liquides d'épanchement. Biomérieux; 2006.

Huang W-H, Lu L-P, Wu K, Guo F-Y, Guo J, Yu J-L, et al. Extent of agreement between the body fluid model of Sysmex XN-20 and the manual microscopy method. J Clin Lab Anal. 7 déc 2016;

Kjeldsberg. Chapter 5 : Pleural et Pericardial Fluid. In: Kjeldsberg's Body Fluid Analysis. ASCP Press. 2015.

Labaere D, Boeckx N, Geerts I, Moens M, Van den Driessche M. Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer. Int J Lab Hematol. 2015;37(5):715-22.

Lesesve J-F. Cyto-hématologie des liquides d'épanchement. Formation Biologie Prospective; 2016.

Li A, Grönlund E, Brattsand G. Automated white blood cell counts in cerebrospinal fluid using the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000. Scand J Clin Lab Invest. 2014;74(8):673-80.

Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. Ann Intern Med. 1972;77(4):507-13.

Marengo MF, Suarez-Almazor ME, Lu H. Neoplastic and paraneoplastic synovitis. Rheum Dis Clin North Am. 2011;37(4):551-72.

Paris A, Nhan T, Cornet E, Perol J-P, Malet M, Troussard X. Performance evaluation of the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyzer. Int J Lab Hematol. 2010;32(5):539-47.

Pastré J, Roussel S, Israël Biet D, Sanchez O. Pleural effusion: diagnosis and management. Rev Med Interne. 2015;36(4):248-55.

Perneger T, Perrier A. Analyse d'un test diagnostique : courbe ROC, ou « receiver operating characteristic ». Rev Mal Respir. 2004;21(2 Pt 1):398-401.

Raphaël, M. Ponction d'ascite. Journal Européen des Urgences et de Réanimation. 2014;(26):128-9.

Ricos and al. Desirable Biological Variation Database specifications - Westgard [Internet]. Westgard QC. [cité 30 sept 2016]. Disponible sur: https://www.westgard.com/biodatabase1.htm

Sysmex Corporation. XN Series Mode d'emploi. Sysmex Corporation; 2015.

Tercic D, Bozic B. The basis of the synovial fluid analysis. Clin Chem Lab Med. 2001;39(12):1221-6.

Zeitoun P, Lacaine F. Abord clinique en gastro-entérologie. Springer Science & Business Media; 2003.

Zimmermann M, Ruprecht K, Kainzinger F, Heppner FL, Weimann A. Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. Int J Lab Hematol. 2011;33(6):629-37.

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE DE LORRAINE

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 20 juin 2017

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Delphine GERARD

Sujet : Liquides d'épanchements : analyse par l'hématimètre XN (SYSMEX®), évaluation de la formule automatisée et mise en évidence des cellules pathologiques par cytométrie en flux.

Jury :

Président : Mme. Béatrice FAIVRE, Professeur
Directeurs : M Jean-François LESESVE, Médecin
M. Julien PERRIN, Maître de conférences
Juge : M. Guillaume GAUCHOTTE, Professeur
M. Bernard CHATELAIN, Professseur

Vu,

Nancy, le 23/05/17.

Le Président du Jury

B. FAIVRE

Directeur de Thèse

LESESVE

M.

Co Directeur

J. PERRIN

Vu et approuvé,

Nancy, le 23 . 05 . 2017

Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 13 JUIN 2017

Le Président de l'Université de Lorraine,

Université de Lorraine Le Président

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 9869

N° d'identification :

TITRE

Liquides d'épanchements: analyse par l'hématimètre XN (SYSMEX®), évaluation de la formule automatisée et mise en évidence des cellules pathologiques par cytométrie en flux.

Thèse soutenue le 20 06 2017

Par Delphine GERARD

RESUME :

L'analyse des liquides biologiques est primordiale dans certaines pathologies. Parmi les différentes analyses disponibles, la réalisation de la numération des éléments cellulaires ainsi que l'établissement d'une formule cytologique permet d'orienter le clinicien vers l'étiologie de l'anomalie.

Ces analyses cytologiques sont classiquement réalisées à l'aide de méthodes manuelles : numération sur cellule de comptage type Nageotte, réalisation d'une cytocentrifugation ou d'un frottis pour lecture au microscope optique. Cependant, ces analyses sont automatisables, comme la numération et la formule sanguine le sont. Des automates d'analyses dédiés ont été développés par plusieurs fournisseurs, notamment SYSMEX® avec le module BODYFLUID.
Grace à ce module, il est possible d'obtenir une numération des hématies et des éléments nucléés. Ces numérations sont validées par le constructeur. Le module réalise en outre une formule « recherche », non validée, contenant différents paramètres cytologiques.

Le but de ce travail a été d'évaluer le module BODYFLUID : tout d'abord en réalisant une vérification de méthode des numérations ; puis en comparant les données de la formule « recherche » avec les données obtenues par microscopie optique. Enfin, nous avons souhaité étudier la possibilité d'isoler les cellules tumorales présentes dans un liquide en traitant les données brutes du module sur un logiciel de cytométrie en flux.

MOTS CLES : **Liquides biologiques - SYSMEX® - Automatisation – Vérification de méthodes – cellules tumorales – Cytométrie en flux**

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Jean-François LESESVE, PH Dr Julien PERRIN, MCU-PH	Service d'hématologie biologique CHRU Nancy Faculté de Pharmacie Université de Lorraine	Expérimentale ☒ Bibliographique ☐ Thème ☒

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène/Environnement
3 – Médicament 4 – Alimentation – Nutrition
⑤ - Biologie 6 – Pratique professionnelle