



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1

FACULTE DE PHARMACIE

2010

**UTILISATION ET APPORTS DE L'ADVIA® 2120 DANS LA
CARACTERISATION DES HEMOPATHIES MALIGNES**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

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

THESE

Pour l'obtention du DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

Le 25 octobre 2010

Par **Fabien LACROIX**

Né le 17 novembre 1981 à Nancy (54)

MEMBRES DU JURY

Président :	Pr. T. LECOMPTE	PU-PH hématologie biologique CHU Nancy
Directeur :	Dr. S. SALIGNAC	PH hématologie biologique CHU Nancy
Juges :	Pr .C. VIGNERON	PE hématologie faculté pharmacie Nancy
	Dr. D. RANTA	PH hématologie clinique CHU Nancy

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :
Pharmaceutique Hospitalier**

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON ..	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS ..	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA	Physiologie
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI	Toxicologie
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé et environnement
Olivier JOUBERT	Toxicologie, sécurité sanitaire

FACULTÉ DE PHARMACIE**PRÉSENTATION**

Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD

Anglais

**Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois
(Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET.....

Directeur

« 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

Monsieur le Professeur LECOMPTE,

Vous m'avez fait l'honneur de présider cette thèse. Votre esprit scientifique et vos analyses critiques sont reconnus de tous. Vos réflexions sur le bienfondé d'une hypothèse ou le choix du vocabulaire à utiliser en hématologie m'ont beaucoup inspiré ; j'espère ne pas trop les avoir dénaturées. Merci de m'avoir permis de soumettre ce travail à votre sagacité.

Monsieur le Docteur SALIGNAC,

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse. Mon passage en hématologie biologique aura été éclairé par vos connaissances en cytologie et votre volonté de les partager. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler sous votre coupole. Vous avez été un directeur enjoué, impliqué et disponible. Vous m'avez également fait découvrir les joies de l'art maniaque « hors d'âge ». Veuillez trouver en cette thèse l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur VIGNERON

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse après m'avoir enseigné et donné goût à l'hématologie. Je me revois dans l'amphithéâtre Parisot écoutant votre discours qui marquait mon entrée dans les études supérieures. Neuf ans et quelques prolongations plus tard, à l'heure de sortir de la vie étudiante, je suis ravi de pouvoir vous associer à nouveau à un

évènement qui restera gravé dans ma mémoire. Merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises.

Madame le Docteur RANTA,

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse. C'est à un séminaire de mycologie médicale à Paris que j'ai eu la chance de faire votre connaissance il y a quelques années. Puis, lors du semestre que j'ai effectué au sein votre service d'hématologie clinique, j'ai pu compter sur votre aide et vos explications précieuses. Vous m'avez notamment appris à réaliser des prélèvements de moelle osseuse. Je suis très admiratif de votre capacité à assumer des fonctions médicales aussi importantes en y alliant humilité, disponibilité et joie de vivre. Merci d'avoir accepté d'apporter votre expérience à ce jury.

Aux techniciens d'hématologie biologique

Merci d'avoir participé au recueil des données biologiques (en particulier les personnes du secteur de CMF)

A mes parents,

Qu'il est facile d'avancer dans la vie quand on peut compter sur le soutien indéfectible d'un père et d'une mère. Vous avez toujours été là pour moi et je vous en remercie de tout cœur. Les vraies valeurs, je ne les ai pas apprises à l'école mais à vos côtés. Plus que la vie, je vous dois tout ce qu'elle m'a offert. Ces lignes sont l'occasion de vous témoigner mon infinie reconnaissance et tout mon amour. Merci pour tout.

A ma sœur Noémie,

Il paraît qu'on choisit ses amis mais pas sa famille. Sache que si cela dépendait de moi, je ne vois pas de plus heureuse alternative qu'être ton frère. La petite sœur de jadis s'est muée en une jeune femme brillante, dynamique, sensible et joviale. Je suis extrêmement fier de la personne que tu es et du médecin que tu vas devenir. Je t'aime très fort.

A ma famille,

Qui m'a toujours encouragé et soutenu. Une pensée particulière à mes grands parents et à mes oncles Michel et Hubert, partis trop vite.

A mes amis,

Alexandre et Florian avec qui je partage tout depuis le lycée. Nous sommes comme les trois doigts de la main... Non ? Comme trois ronds de flan alors... euh non plus. Les trois moustiquaires peut-être ? Les sages poètes de Saint-Jo ? Le bon, la brute et le truand ? Bon OK j'arrête. Il n'empêche que c'est aux côtés d'un touriste en pantalon africain et d'un

personnage ésotérique à casquette que je me suis épanoui durant les 15 dernières années. Et croyez-moi on n'en a pas fini les amis, j'vous l'demande pas j'vous l'dis !

Thomas, Romain, Marie, les cousins Nico et Julien: nous avons passé beaucoup de bons moments ensemble pour autant de souvenirs et de franches rigolades. Mais rassurez-vous, le meilleur est à venir !

Nico, Léli et mon futur filleul : après les bancs du lycée avec Léli puis les tea party chez Nico en passant par l'incontournable Beaujol, que de bons moments passés ensemble. Cette année, le « Demarche nouveau » sera l'évènement incontournable du mois de novembre, n'en déplaise au père Lagrolle. J'ai hâte de fêter ça !

A mes amis de la faculté : Hervé, Séb et Séb. Nous nous sommes tellement amusés sur les bancs de la fac qu'on a décidé de prolonger ça, pour ma plus grande joie ! Restent de cette période quelques phrases magiques, la fête floraine, une boîte d'Alvityl... et trois amis !

A mes amis biologistes ou sympathisants (et oui il est bon d'en avoir quelques uns dans le milieu) : Allan, Sarah, Alexandre, Olivier, Matthieu, Céline et Dimitri, Mira. Entre tennis, ski et soirées, il n'a parfois pas été simple de garder un peu de temps pour la thèse !

A tous les gens que je n'ai pas cités ici et avec qui j'ai partagé et partagerai encore de bons moments : toutes mes excuses, je vous offre une bière sur simple demande pour me faire pardonner !

A tous ceux qui après m'avoir demandé pendant 4 longues années « Alors ta thèse ? » se sentiront désormais obligés de me répliquer « Quoi de neuf docteur ? », je précise à toutes fins utiles qu'à l'inverse de Bugs, je n'ai pas ingurgité des tonnes de carottes qui auraient pu adoucir mon caractère. Il est donc fort possible que je me montre irritable ;-))

Sommaire

Lexique des acronymes et abréviations	4
Préambule.....	7
1. L'ADVIA® 2120, analyseur de cytologie hématologique : historique, principes et fonctionnement	9
1.1 Présentation générale des ADVIA®	10
1.2 Bref historique de la cytologie hématologique et de la cytochimie en flux	10
1.3 Quelques éléments statistiques.....	11
1.4 Structure, répartition et variations d'activité de la myéloperoxydase. Intérêt dans la différenciation leucocytaire.	13
1.5 Caractéristiques techniques et fonctionnement de l'ADVIA® 2120.....	15
1.5.1 Descriptif technique	15
1.5.2 Le canal hémoglobine	16
1.5.3 Le canal érythrocytes et plaquettes	17
1.5.4 Le canal réticulocyte	19
1.5.5 Le canal peroxydase.....	19
1.5.6 Le canal d'analyse de la densité nucléaire (lobularité) ou canal basophile	27
1.5.7 Règles de substitution pour la numération leucocytaire entre les canaux peroxydase et basophile ; corrections éventuelles.	33
1.5.8 Caractéristiques techniques des ADVIA® 120 et ADVIA® 2120.....	34
2. Utilisations et performances de l'ADVIA® 2120 et des appareils qui l'ont précédé dans la caractérisation des hémopathies malignes. Revue de bibliographie	36
2.1 Détection des blastes et des cellules atypiques par les appareils de cytochimie en flux.....	37
2.1.1 Rappel statistique.	37
2.1.2 Performances des alarmes morphologiques des analyseurs « double canal » dans les principales études disponibles.	39

2.1.3	Estimation du pourcentage de blastes sanguins ou de cellules atypiques par les analyseurs « double canal »	50
2.2	Exploitation des données numériques fournies par les analyseurs de cytochimie en flux pour discriminer et tenter de classer les hémopathies.	50
2.2.1	Paramètres numériques remarquables des LAL.....	51
2.2.2	Paramètres numériques remarquables des LAM	52
2.2.3	Paramètres numériques remarquables des syndromes lymphoprolifératifs chroniques	55
2.2.4	Paramètres numériques remarquables des syndromes myéloprolifératifs	58
2.3	Exploitation des données graphiques des analyseurs pour discriminer et tenter de classer les hémopathies.	59
2.3.1	Les cytogrammes comme outils de classification indépendants.....	59
2.3.2	Les cytogrammes comme aide à la classification cytologique FAB	61
2.3.3	Le PANDA.....	64
3.	Exploitation des données fournies par l'ADVIA® 2120 du laboratoire d'hématologie du CHU de Nancy. Etude de 213 cas d'hémopathies	74
3.1	Matériels, méthodes et objectifs de notre étude	75
3.2	Etude de la sensibilité/spécificité des alarmes des alarmes morphologiques.....	77
3.2.1	Les alarmes, pierres angulaires de l'automatisation	77
3.2.2	Performances globales de l'alarme « BLASTES »	78
3.2.3	Les alarmes morphologiques dans les LAM.....	79
3.2.4	Les alarmes morphologiques dans les LAL.....	81
3.2.5	Les alarmes morphologiques dans les autres hémopathies blastiques.....	85
3.2.6	Les alarmes morphologiques dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques.....	85
3.2.7	Les alarmes morphologiques dans les syndromes mononucléosiques.....	88
3.3	Exploitation des paramètres numériques fournis par l'ADVIA® 2120	89
3.3.1	La formule réalisée par l'appareil.....	89
3.3.2	Les paramètres calculés	95
3.4	Exploitation des paramètres graphiques fournis par l'ADVIA® 2120.....	101

3.4.1	Utilisation de la pré-classification PANDA.....	101
3.4.2	Rapport de nos propres observations	107
3.5	Exploitation des conjectures mises en évidence.....	115
3.5.1	Comment utiliser les informations fournies par l'ADVIA [®] 2120 ?	115
3.5.2	Exemples d'analyse des données fournies par l'ADVIA [®] 2120.....	117
Conclusion		121
Table des figures		122
Table des tableaux.....		124
Bibliographie.....		126
Annexes.....		132

Lexique des acronymes et abréviations

- AREB : anémie réfractaire avec excès de blastes
- ARN : acide ribonucléique
- « ATYP » : alarme signalant la présence de lymphocytes atypiques
- BASO : basophile
- « BLASTES » : alarme signalant la présence de cellules blastiques
- « B-SUSP » : alarme signalant la présence de basophiles suspects
- CHU : centre hospitalier universitaire
- FAB : franco-américano-britannique, en référence à une classification cytologique des hémopathies
- GB : globule blanc
- « GI » : alarme signalant la présence de granuleux immatures
- L ou lympho : lymphocyte
- LABi : leucémie aiguë biphénotypique
- LAI : leucémie aiguë indifférenciée
- LAL : leucémie aiguë lymphoïde
- LAM : leucémie aiguë myéloïde
- LH : lymphome hodgkinien
- LLC : leucémie lymphoïde chronique
- LMC : leucémie myéloïde chroniques
- LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
- LNH : lymphome non hodgkinien
- LP : leucémie à plasmocytes
- LPL : leucémie à prolymphocytes
- LTL : leucémie à tricholeucocytes
- LUC : large unstained cells ou grandes cellules non colorées
- M : monocyte
- MGG : May-Grunwald-Giemsa
- MN : mononucléé
- MNI : mononucléose infectieuse
- MPC : myélome à plasmocytes circulant
- MPO : myéloperoxydase
- MPXI : medium peroxydase index ou moyenne de l'indice d'activité peroxydasique
- PANDA : peroxidase activity and nuclear density analysis ou analyse de l'activité peroxydasique et de la densité nucléaire
- PEROX : peroxydase

- PMN : polymorphonucléé
- PN : polynucléaire neutrophile
- Quotient Q : quotient du rapport $(M+PN)/(LUC+L)$ par le rapport PMN/MN
- SDS : sodium dodécyl sulfate ou laurylsulfate de sodium
- SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
- SLP : syndrome lymphoprolifératif
- SMD : syndrome myélodysplasique
- SMN : syndrome mononucléosique
- SMP : syndrome myéloprolifératif
- TE : thrombocytémie essentielle

Préambule

Durant les 40 dernières années, la biologie médicale a beaucoup évolué et les moyens techniques dont elle dispose se sont considérablement améliorés. La tendance à l'augmentation du degré d'automatisation des analyses concerne toutes les disciplines biologiques, l'hématologie n'y fait pas exception. Les analyseurs de cytologie hématologique ont désormais supplanté les dilutions à la pipette, les colorations artisanales et l'observation par l'œil humain au microscope optique. Pour ce faire, ces appareils ont du faire la preuve de leur capacité à différencier et dénombrer les différents éléments figurés du sang. Les techniques utilisées sont devenues de plus en plus sophistiquées. Elles permettent désormais d'obtenir des informations qu'un observateur microscopique ne pourrait appréhender.

Il existe à l'heure actuelle de nombreux appareils de cytologie hématologique qui utilisent différents principes pour effectuer leur analyse. Notre travail porte sur les analyseurs dits « double canal » qui réalisent la formule leucocytaire à l'aide de deux méthodes complémentaires : une méthode de détection de l'activité peroxydasique cellulaire par cytochimie en flux (canal PEROX) et une méthode d'analyse de la densité nucléaire (canal BASO). Il existe une filiation entre les différents analyseurs pourvus de cette technologie ; le plus récent est l'ADVIA® 2120i, actuellement commercialisé par Siemens Healthcare Diagnostics®.

Par l'analyse fine qu'il réalise et les nombreux paramètres qu'il mesure, l'ADVIA® 2120 permet d'obtenir des renseignements précis sur la nature et le nombre des différentes populations leucocytaires, qu'elles soient physiologiques ou pathologiques. Un de ses rôles essentiels est d'ailleurs de signaler la présence de cellules anormales par le biais d'alarmes qui doivent motiver un examen microscopique attentif du frottis sanguin. Nous pensons qu'une interprétation optimale des renseignements fournis par l'ADVIA® 2120 pourrait permettre une orientation diagnostique précoce. Tirer la quintessence des informations recueillies par l'appareil constituerait un gain de temps pour la suite de la prise en charge médicale. Cela pourrait également permettre au biologiste d'orienter au mieux son examen microscopique vers la recherche de cellules particulières (cellules blastiques, cellules lymphomateuses, etc...).

Après une explication détaillée du fonctionnement des analyseurs « double canal », nous nous sommes intéressés aux performances et à l'exploitation des résultats fournis par ces appareils

dans la caractérisation des hémopathies malignes. Ce travail s'articule autour de deux axes : une revue de la littérature scientifique traitant de ce sujet dans un premier temps suivie d'une étude de cas au CHU de Nancy. Nous avons en effet réuni un ensemble de 213 cas d'hémopathies au diagnostic et recueilli pour chaque patient les données brutes fournies par l'appareil ainsi que d'autres éléments comme la formule microscopique. Nous avons ensuite éprouvé sur cette population les observations et méthodes discriminantes décrites dans les publications avant d'émettre et tester nos propres conjectures. Cela nous a permis d'évaluer en pratique la capacité de l'ADVIA[®] 2120 à caractériser certaines hémopathies malignes.

Partie 1

**L'ADVIA[®] 2120, analyseur de cytologie
hématologique : historique, principes et
fonctionnement.**

1.1 Présentation générale des ADVIA®

Les ADVIA® sont des appareils de biologie automatisée actuellement commercialisés par Siemens Healthcare Diagnostics®. Ils sont utilisés dans des domaines variés tels que la biochimie et l'immunoanalyse (ADVIA® Centaur, ADVIA® 1200, ADVIA® 1650, ADVIA® 1800 et ADVIA® 2400) ou l'hématologie (ADVIA® 120, ADVIA® 2120, ADVIA® 2120i). Le nom ADVIA® vient de la locution latine *ad via* qui signifie littéralement « vers le chemin ».

En hématologie biologique, les ADVIA® 120, 2120 et 2120i ont pour particularité d'utiliser la cytochimie en flux et l'analyse de la densité nucléaire pour distinguer les populations leucocytaires. Ce sont les seuls appareils d'hématologie actuellement sur le marché à utiliser ce double principe.

1.2 Bref historique de la cytologie hématologique et de la cytochimie en flux

C'est à la fin du XIXème siècle avec notamment les travaux de Paul Ehrlich sur les colorants que la cytologie hématologique voit le jour [1]. En effet, en colorant les éléments figurés du sang, il devient possible d'en distinguer les différents constituants par observation microscopique et d'en apprécier les proportions. Au fil des années, les colorants évoluent (Romanovski puis May-Grünwald-Giemsa en Europe, Wright aux Etats-Unis) mais la méthode reste manuelle, longue, fastidieuse, observateur-dépendante et peu précise car effectuée sur un faible nombre de cellules (voir tableau 1). Il faut attendre les années 1950 pour découvrir les premiers appareils de cytologie hématologique automatisée qui fonctionnent selon le principe de variation d'impédance (encore utilisé de nos jours). Toutefois, ces appareils ne réalisent pas la formule leucocytaire et les paramètres mesurés sont peu nombreux [2]. Une observation microscopique parallèle est toujours nécessaire.

Dans les années 1960-70, cette technologie s'améliore et les résultats obtenus sont de plus

en plus satisfaisants, surtout en l'absence d'anomalie cytologique. Le recours à la formule leucocytaire microscopique devient circonstanciel. Pour caractériser certaines pathologies, les biologistes effectuent souvent des colorations cytochimiques (myéloperoxydase, estérase...) sur lame afin de préciser la nature des cellules anormales.

C'est en 1970, lors d'un congrès new-yorkais, que le monde médical découvre la cytochimie en flux [1] : la Technicon Instrument Corporation® y présente pour la première fois son projet de différenciation enzymatique en flux des leucocytes. Cette technologie permet de distinguer les leucocytes selon leur taille et la quantité de myéloperoxydase qu'ils contiennent. Le premier automate équipé de cette technologie innovante, l'Hemalog-D, est commercialisé par la firme Technicon® en 1974. En 1981, cette société combine sa technologie de cytochimie en flux avec celles utilisées pour la mesure de l'hémoglobine et les numérations érythrocytaire et plaquettaire ; le H-6000, automate d'hématologie à 5 canaux [1], est mis sur le marché. Celui-ci est même muni d'un étaleur-colorateur de frottis sanguins. Puis, en 1987, le premier appareil muni d'un canal d'analyse de la densité nucléaire (qui remplace avantageusement l'ancien canal basophile) est commercialisé : c'est le Technicon® H1. Arrivent ensuite le H2 en 1990 et le H3 en 1993. Le Technicon® H3 comporte en plus de ses prédécesseurs un canal de comptage des réticulocytes.

Enfin, en 1998, l'ADVIA® 120 (qui reprend et améliore les performances de cette technologie) est mis sur le marché par Bayer Diagnostics® et optimisé en 2004 sous la forme de l'ADVIA® 2120, puis en 2009 de l'ADVIA 2120i. Ces appareils sont désormais distribués par Siemens Healthcare Diagnostics®.

1.3 Quelques éléments statistiques

Le sang est un tissu conjonctif liquide très riche en cellules puisque les éléments figurés représentent habituellement environ 45 % du volume total de cette suspension. Parmi ces cellules, les leucocytes, bien qu'ultra minoritaires, sont présents à raison de quelques milliards par litre de sang. Ils forment un ensemble hétéroclite de cellules dont les proportions diffèrent largement : à l'état physiologique, le rapport entre la quantité de monocytes et de polynucléaires neutrophiles est de un pour dix environ. Les polynucléaires neutrophiles y sont cent fois plus représentés que les polynucléaires basophiles.

Compte tenu des proportions très différentes des populations leucocytaires et de l'hétérogénéité de répartition de ces cellules lors de la réalisation d'un frottis sanguin sur lame, il est aisément compréhensible que la précision d'une formule leucocytaire réalisée au microscope sur cent ou deux cents cellules soit médiocre. Habituellement, cet examen est réalisé sur cent ou deux cents leucocytes en effectuant des créneaux sur la lame afin d'observer une zone aussi grande que possible. Dans les cas de leucopénies, la formule est réalisée sur cent cellules uniquement, voire cinquante dans les cas les plus sévères ; la précision en est d'autant plus relative.

La table de Rümke (tableau 1) fait correspondre aux pourcentages de leucocytes observés au microscope la précision de cette mesure en fonction du nombre total de cellules comptées. Ainsi, nous pouvons voir que si la formule est réalisée sur deux cents cellules, un pourcentage de monocytes de 5 % correspond à une valeur réelle comprise entre 2,4 et 9,0.

%	100	200	500	1.000	10.000
0	0 - 3.6	0 - 1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0.1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2.0 - 4.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 - 10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6.5
7	2.9 - 13.9	3.9 - 11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6.5 - 7.6
8	3.5 - 15.2	4.6 - 12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8.6
9	4.2 - 16.4	5.4 - 13.9	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 - 17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0
35	25.7 - 45.2	28.4 - 42.0	30.8 - 39.4	32.0 - 38.0	34.0 - 36.0
40	30.3 - 50.3	33.2 - 47.1	35.7 - 44.4	36.9 - 43.1	39.0 - 41.0
45	35.0 - 55.3	38.0 - 52.2	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
50	39.8 - 60.2	42.9 - 57.1	45.5 - 54.5	46.9 - 53.1	49.0 - 51.0

Tableau 1. Table de Rümke. Variation des valeurs relatives d'une population leucocytaire selon le nombre de cellules comptées (d'après le CD-ROM « Das interaktive Handbuch der Hämatologie »)

Les appareils d'hématologie actuels, quelle qu'en soit la technologie, comptent en moyenne dix mille leucocytes par échantillon. Ce nombre beaucoup plus important permet d'augmenter très nettement la précision de la mesure. Dans ce cas, un pourcentage de monocytes de 5 % correspond à une valeur réelle comprise entre 4,5 et 5,5. Notons que les valeurs de précision données par la table de Rümke ne prennent pas en compte les possibles erreurs d'appréciation lors l'établissement de la formule, qu'elle soit réalisée au microscope ou par l'appareil.

1.4 Structure, répartition et variations d'activité de la myéloperoxydase. Intérêt dans la différenciation leucocytaire

L'Hemalog-D et le H6000 effectuaient autrefois une coloration des grains secondaires des polynucléaires basophiles, ce qui permettait de les différencier mais aussi de pratiquer des tests allergologiques de dégranulation [1]. Cette technique a été abandonnée avec la commercialisation du H1 et l'avènement du canal d'analyse de la densité nucléaire. La seule réaction cytochimique utilisée actuellement par les appareils de cytologie hématologique en flux met en évidence la myéloperoxydase. Cette enzyme joue un rôle primordial dans la technique de différenciation des leucocytes mise au point par Technicon Instruments Corporation®.

La myéloperoxydase ou MPO est une protéine hémique tétramérique qui catalyse l'oxydation d'un substrat [2] et intervient dans la défense immunitaire non spécifique en générant *in vivo* des anions hypochlorites [3]. Cette enzyme, d'un poids moléculaire de 146 kDa [1], est trouvée en grande quantité dans les grains azurophiles des polynucléaires neutrophiles, dans le cytoplasme des précurseurs granuleux (début de synthèse au stade myéloblastique puis surtout au stade promyélocytaire) et en faible concentration dans les lysosomes monocytaires. Les polynucléaires éosinophiles contiennent une autre forme de l'enzyme, codée par un gène différent [1]. La MPO représente 5 % du poids sec d'un polynucléaire neutrophile, ce qui est considérable. L'activité myéloperoxydasique d'un polynucléaire éosinophile est 4 à 10 fois supérieure à celle d'un polynucléaire neutrophile tandis que celle d'un monocyte lui est trois fois inférieure.

C'est le manque de standardisation qui a condamné le canal estérase qui équipait les premiers appareils de cytochimie leucocytaire afin de mettre en évidence les monocytes. Ce canal a vite disparu en raison de grandes variations interindividuelles et de nombreuses interférences

médicamenteuses [1].

Si l'on considère les polynucléaires d'un sujet donné, la concentration en MPO dans cette population a un coefficient de variation de 15 % autour de la moyenne [1]. Cette moyenne reste stable dans le temps : le coefficient de variation de la moyenne chez un sujet sain a été calculé à 2,8 % sur 92 analyses en 2 ans. Au niveau interindividuel, le coefficient de variation de la concentration moyenne en MPO a été calculé à 7,7 % dans une étude regroupant 1072 patients hospitalisés [1]. Ces données montrent que la concentration en MPO est un paramètre stable chez les sujets sains mais qui nécessite cependant des seuils de discrimination entre les populations leucocytaires propres à chaque patient. Ces seuils sont calculés automatiquement par les ADVIA® 120 et 2120 à partir de la moyenne et de l'écart type de l'intensité myéloperoxydasique [3].

La démocratisation de la mesure de l'activité peroxydasique en flux a permis de mettre en évidence qu'une personne sur 3000 est totalement MPO déficiente [2, 3], c'est à dire qu'on ne retrouve pas d'activité dans les polynucléaires neutrophiles et monocytes alors que celle des polynucléaires éosinophiles est conservée. Il s'agit d'une anomalie génétique autosomale codominante où les sujets hétérozygotes expriment une déficience partielle. Elle ne semble pas associée à une augmentation du risque infectieux (excepté celui de candidose systémique sévère) mais plutôt à une augmentation du risque oncogène [1].

Des déficiences acquises ont également été découvertes. Au sein d'une étude [4], il a été observé une diminution de l'activité myéloperoxydasique chez 1% d'une large cohorte de patient, laquelle serait corrélée à un état pro-thrombotique. L'hypothèse retenue est celle de la dégranulation des polynucléaires neutrophiles qui s'accompagne de la libération de molécules pro-coagulantes. Une diminution de l'activité myéloperoxydasique a été observée dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les leucémies myéloïdes chroniques (LMC). Cela serait interprétable comme un signe précoce de rechute dans les phases de rémission [2] ainsi que dans les anémies ferriprives et myélodysplasies. Les épisodes infectieux, la grossesse, le diabète sucré seraient des contextes où l'on observe plus fréquemment une diminution de l'activité peroxydasique [2].

A l'inverse, une augmentation de l'activité myéloperoxydasique serait fréquemment observée dans l'anémie de Biermer ou le SIDA, en lien avec la présence de polynucléaires neutrophiles géants [2].

.

1.5 Caractéristiques techniques et fonctionnement de l'ADVIA® 2120



Figure 1. L'ADVIA® 2120 [6]

1.5.1 Descriptif technique

L'ADVIA® 2120 est un appareil de cytologie hématologique destiné aux laboratoires dont le volume d'analyse est moyen ou élevé. Il s'agit d'un système automatisé comprenant trois modules (l'ADVIA® 2120, la station de travail informatique et l'imprimante laser) qui peut exécuter 5 types d'analyses sanguines [7] :

- Numération complète (érythrocytes, leucocytes, plaquettes),
- Numération/formule (avec différenciation des leucocytes),
- Numération/formule/réticulocytes,
- Numération/réticulocytes,
- Réticulocytes seuls

Sa cadence nominale est de 120 analyses par heure en mode numération/formule, ou 74

analyses par heure en mode « réticulocytes ». Trois modes d'aspiration de l'échantillon sont disponibles :

- Automatique en rack (15 racks universels de 10 tubes),
- Manuelle en tube fermé (pour les prélèvements urgents ou à risque),
- Manuelle en tube ouvert (pour les prélèvements de faible volume).

Le volume prélevé est de 175 µL et est indépendant des analyses demandées et du mode d'échantillonnage.

L'ADVIA[®] 2120 est un cytomètre de flux qui utilise la diffraction lumineuse sous deux angles, la lyse différentielle des leucocytes et la coloration de la myéloperoxydase pour caractériser les cellules. L'appareil utilise 5 canaux d'analyse :

- Hémoglobine,
- Erythrocytes et plaquettes,
- Peroxydase,
- Densité nucléaire,
- Réticulocytes.

1.5.2 Le canal hémoglobine

L'échantillon sanguin et le réactif « Hb ADVIA[®] 120 » sont mélangés dans la chambre réactionnelle de l'hémoglobine qui est également la cuve de colorimétrie. Les réactions chimiques qui en découlent s'effectuent en 2 étapes :

- Lyse des globules rouges et libération de l'hémoglobine.
- Oxydation du fer hémique de l'hémoglobine qui passe de l'état ferreux à l'état ferrique, puis combinaison avec un ion hydrogène et une molécule d'eau comme ligand axial pour former le produit de réaction (hydroxyferriporphyrine monohydrate).

Le photomètre mesure alors l'absorbance de la solution à 546 nm pendant 15,5 à 18 secondes et lui fait correspondre la concentration en hémoglobine de l'échantillon.

Ce canal (conjointement au canal érythrocytes et plaquettes) permet de déterminer les paramètres suivants :

- Hémoglobine (g/dL) = $Hb = \log (\text{Absorbance moyenne échantillon} / \text{Absorbance moyenne de référence}) \times \text{facteur d'étalonnage} \times 50$,
- Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (pg) = $TCMH = Hb / GR \times 10$ où GR est le nombre d'érythrocytes en million par microlitre de sang,
- Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (g/dL) = $CCMH = Hb / (GR \times VGM) \times 1000$ où VGM est le Volume Globulaire Moyen exprimé en fL.

Le principal avantage de cette méthode est l'utilisation d'un réactif ne contenant pas d'ions cyanures mais du laurylsulfate de sodium (SDS), beaucoup moins toxique et polluant. La réaction utilisant des ions cyanures est celle utilisée de base sur l'ADVIA[®] 120 où la méthode sans cyanure n'est qu'optionnelle [5].

1.5.3 Le canal érythrocytes et plaquettes

Ce canal nécessite au préalable une sphérisation isovolumétrique des érythrocytes et des plaquettes par ajout d'un réactif spécifique contenant du SDS et du glutaraldéhyde. Ce procédé breveté a pour but qu'à volume égal, toutes les hématies et plaquettes donnent un signal identique quelle que soit leur position dans la cellule lors du comptage (face ou profil) [8].

Un volume constant de dilution cellulaire provenant de la chambre réactionnelle est ensuite acheminé vers la cuve de mesure où les caractéristiques de diffraction laser suivant un petit angle (2 à 3°) et un grand angle (5 à 15°) ainsi que l'absorption lumineuse de chaque cellule sont mesurées. En application de la théorie de Mie [9] sur la diffraction, le volume (appréhendé par la diffraction petit angle) et le contenu (diffraction grand angle) de chaque globule ou plaquette de l'échantillon

sont donc analysés. Les signaux correspondant aux populations érythrocytaires et plaquettaires sont ensuite séparés puis amplifiés ; cela conduit à l'obtention de deux cytogrammes distincts où chaque élément est positionné selon son contenu (concentration en hémoglobine pour les érythrocytes, densité granulaire pour les plaquettes) en abscisse et son volume en ordonnée. Des lignes correspondant aux courbes isoconcentrationnelles et isovolumétriques sont également figurées. Les volumes pris en compte pour le cytogramme des érythrocytes vont de 1 à 180 fL contre 1 à 60 fL pour celui des plaquettes.

Le canal permet d'obtenir les paramètres érythrocytaires suivants :

- Concentration en érythrocytes = GR (M/ μ L) = nombre d'hématies x facteur d'étalonnage x taux de dilution x facteur de correction des coïncidences
- Volume Globulaire Moyen = VGM (fL) = moyenne des volumes mesurés
- Coefficient de variation des volumes = écart-type des volumes / VGM x 100
- CCMH mesurée (g/dL) = moyenne des CCMH individuelles mesurées
- Ecart-type des concentrations en hémoglobine mesurées
- Hématocrite (%) = Hte = GR x VGM / 10

Le canal permet également d'obtenir les paramètres plaquettaires suivants :

- Numération plaquettaire = Plaq (G/L) = numération plaquettaire corrigée x facteur étalonnage GR x facteur étalonnage Plaq x taux de dilution
- Volume Plaquettaire Moyen = VPM (fL) = moyenne des volumes plaquettaires mesurés

Le canal érythrocytes et plaquettes permet de plus de déterminer beaucoup d'autres paramètres avancés (ex : pourcentage de cellules hypochromes...) qui peuvent être exploités par des spécialistes dans le cadre de recherches spécifiques. Il permet la génération d'alarmes morphologiques pour les érythrocytes et plaquettes : anisocytose érythrocytaire, grandes plaquettes, ...

1.5.4 Le canal réticulocyte

Après une sphérisation isovolumétrique de même principe que celle du canal érythrocytes/plaquettes, un colorant cationique des acides nucléiques (l'oxazine 750) est ajouté à l'échantillon. Puis un volume de la dilution réactionnelle est acheminé vers la cuve de mesure où les caractéristiques de diffraction selon un petit angle ainsi que l'absorbance de chaque cellule sont mesurées. Les réticulocytes peuvent alors être distingués des érythrocytes grâce à leurs absorbances plus élevées (ils sont colorés car plus riches en ARN). Un cytogramme volume/concentration en hémoglobine des réticulocytes est généré.

On obtient différentes informations dont :

- Pourcentage de réticulocytes = % rétic = $100 \times \text{nombre de réticulocytes} / \text{nombre de cellules déclenchantes} \times \text{facteur d'étalonnage}$
- Numération réticulocytaire = rétic (G/L) = $\text{GR} \times \% \text{rétic} \times 10$
- Concentration moyenne en hémoglobine des réticulocytes (g/dL) = moyenne de la CCMH mesurée sur la population des réticulocytes.

1.5.5 Le canal peroxydase

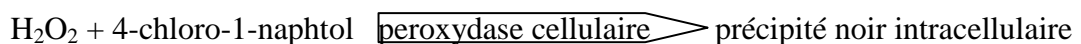
Il s'agit d'un des deux canaux indépendants d'analyse des leucocytes.

1.5.5.1 Fonctionnement

Les réactions cytochimiques utilisées dans ce canal s'effectuent en 2 étapes :

- Lyse thermochimique des globules rouges : le réactif PEROX 1 contenant des agents tensioactifs est ajouté à l'échantillon sanguin dans la cuve réactionnelle puis le mélange est porté à 70°C. Ce traitement provoque la lyse des érythrocytes alors que dans le même temps, le formaldéhyde contenu dans le réactif permet la fixation des leucocytes. L'environnement hypertonique entraîne le rétrécissement et la dentelure des leucocytes, ce qui accroît l'indice de réfraction des cellules et favorise la détection des lymphocytes par rapport au bruit [7].
- Coloration des sites endogènes d'activité peroxydasique : au mélange thermostaté obtenu lors de l'étape précédente sont ajoutés les réactifs PEROX 2 et PEROX 3. Le 4-chloro-1-naphtol contenu dans le réactif PEROX 2 est utilisé comme substrat dans les granulations des leucocytes qui présentent une activité peroxydasique. Le peroxyde d'hydrogène contenu dans le réactif PEROX 3 va alors réagir avec le substrat enzymatique et former un précipité noir au niveau des sites endogènes d'activité peroxydasique.

Très schématiquement, la réaction peut s'écrire comme suit :



Puis un volume constant de cellules en suspension provenant de la cuve réactionnelle est acheminé vers la cuve de mesure optique dans laquelle les caractéristiques d'absorption (liées à la coloration de la peroxydase) et de diffraction de la lumière (volume) sont mesurées pour tous les globules blancs (fig. 2).

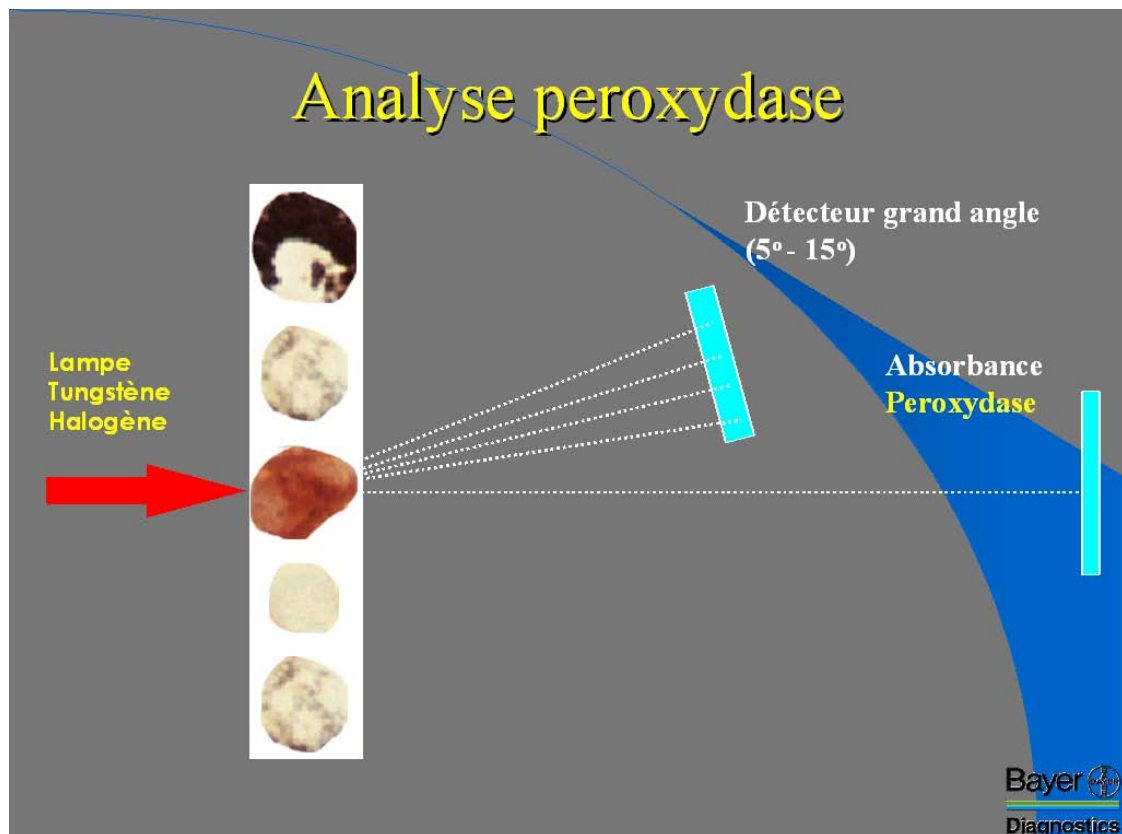


Figure 2. Analyse optique des cellules dans le canal peroxydase [6]

1.5.5.2 Principaux graphiques obtenus

Les signaux détectés sont amplifiés électroniquement puis traités et l'on obtient les informations suivantes :

- L'histogramme PEROX X représente les signaux d'absorption relevés pour toutes les cellules, à l'exclusion de la zone de bruit.
- L'histogramme PEROX Y représente les signaux de diffraction de la lumière de tous les évènements, y compris la zone de bruit.
- L'histogramme Bruit De Fond (BDF) / Lympho représente les signaux de diffraction lumineuse correspondant à la zone de bruit de fond, à la zone des lymphocytes et à celle

des cellules sans activité peroxydasique (« Large Unstained Cells » ou LUC). Les données provenant des zones des monocytes, des neutrophiles et des éosinophiles sont exclues.

- Le cytogramme peroxydase ou cytogramme PEROX (fig. 3 et 4) est formé des données couplées de diffraction et d'absorption. Il comporte 100 canaux de comptage sur chaque axe : il met en relation la quantité de peroxydase contenue dans les cellules en abscisse avec leur taille en ordonnée. Cette représentation graphique met en évidence différentes populations cellulaires. L'analyse des populations ainsi séparées permet d'identifier chaque type de cellule en fonction de sa position puis de comptabiliser le nombre de cellules dans chaque population. Les lignes (ou seuils) qui séparent les différentes populations de cellules sont calculées par le logiciel du système, échantillon par échantillon (ce qui n'était pas le cas sur les appareils antérieurs à l'ADVIA® 120 où ces seuils étaient fixes, prédéterminés). Les figures 3 et 4 sont des exemples de cytogramme PEROX d'un individu sain où les différentes populations cellulaires ont été indiquées.

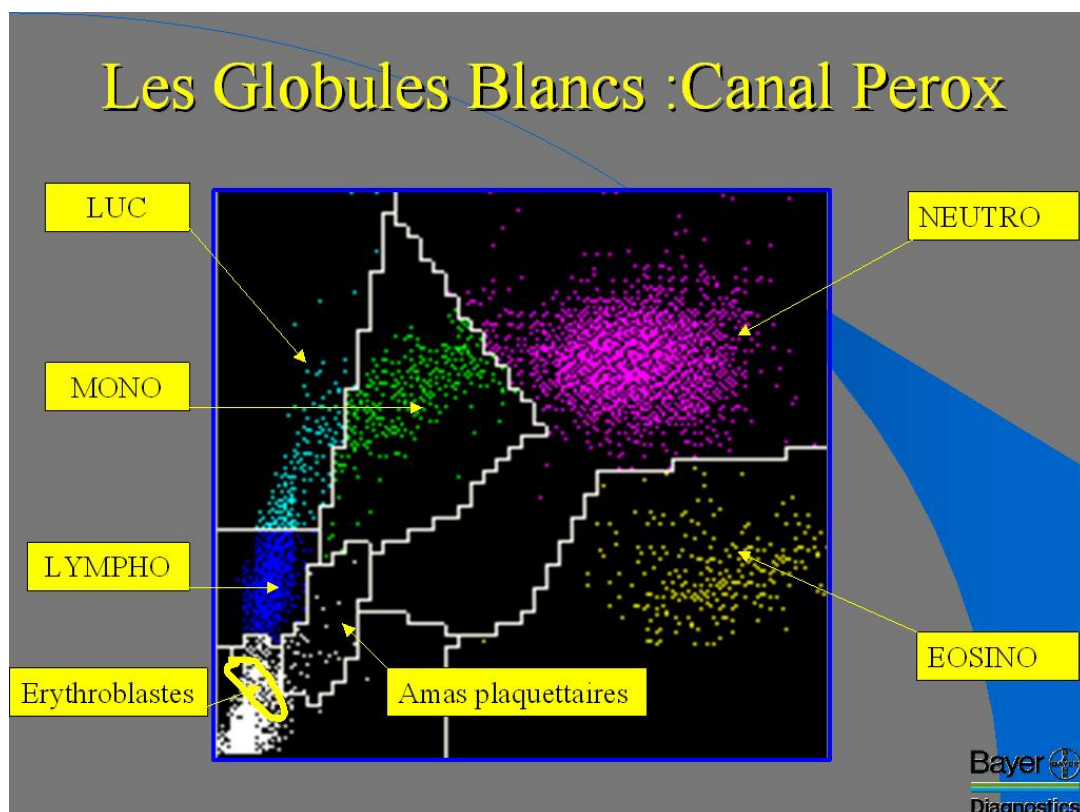


Figure 3. Position des différentes populations cellulaires sur le cytogramme PEROX [6]

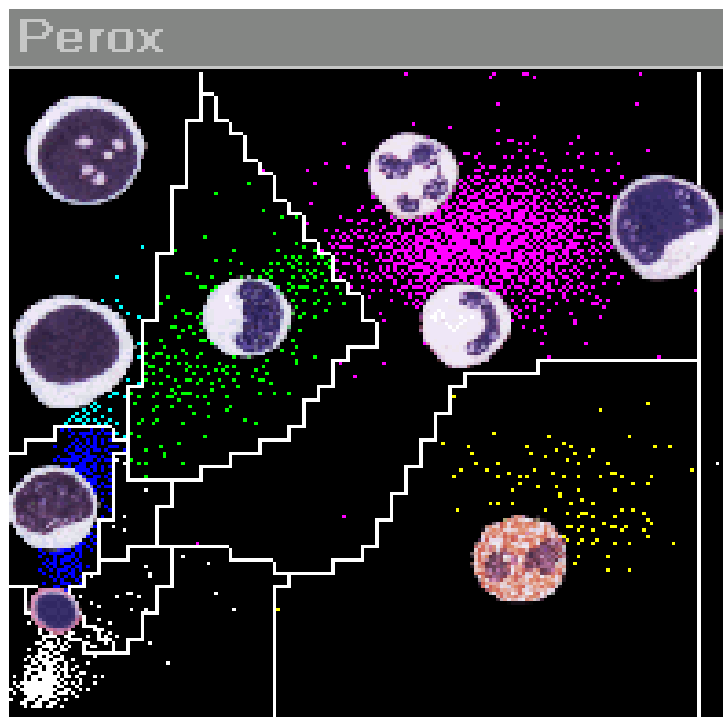


Figure 4. Représentation des différentes cellules sur le cytogramme PEROX [7]

1.5.5.3 Emplacement des cellules anormales sur le cytogramme peroxydase

Lorsqu'il existe des cellules anormales, leur taille et leur niveau d'activité peroxydasique déterminent leur emplacement sur le cytogramme PEROX :

- Les érythroblastes apparaissent dans la zone dédiée située entre la zone de bruit de fond et la zone des lymphocytes.
- Les lymphocytes atypiques sont de grandes cellules sans activité peroxydasique qui peuvent apparaître dans la zone des « Large Unstained Cells » ou LUC.
- Les blastes et autres grandes cellules anormales de grandes tailles sans activité peroxydasique (ex : cellules métastatiques, cellules myéloïdes déficientes en peroxydase) sont le plus souvent situés dans la zone des LUC.

- Les précurseurs granuleux sont de grandes cellules avec une forte activité peroxydasique qui peuvent apparaître dans la zone des neutrophiles ou dans la zone de saturation à droite du cytogramme.
- Les « band cells » apparaissent dans la zone des neutrophiles en raison de leur taille et de leur degré de coloration à la peroxydase similaires à ce type de cellules.
- Les amas plaquettaires apparaissent dans une zone dédiée qui débute dans la zone de bruit du cytogramme PEROX et se termine à la droite de la zone des lymphocytes.
- Les érythrocytes non lysés peuvent apparaître en bas, le long de l'axe des ordonnées du cytogramme PEROX (pas d'activité peroxydasique).

1.5.5.4 Principaux paramètres numériques obtenus

- Numération leucocytaire = GBp (G/L) = GBbrut x (facteur étalonnage / (1 – fracDT*))

* : fracDT désigne la fraction de temps pendant laquelle le canal est occupé par le traitement des événements en cuve de mesure. Lorsqu'il est en train d'identifier un événement particulier, le canal PEROX est incapable de traiter un autre événement. En mesurant ce temps mort, l'analyseur peut ainsi compenser ces événements.

** : % HPX désigne le pourcentage d'événements dont les valeurs d'absorption sont 1,4 supérieures à la moyenne des abscisses de la population des neutrophiles sur le cytogramme PEROX.

- Pourcentage de polynucléaires neutrophiles = %NEUT = ((100 x nombre de neutrophiles) + % HPX**) / nombre total d'événements sur le cytogramme PEROX
- Numération des polynucléaires neutrophiles = #NEUT (G/L) = (%NEUT / 100) x GB
- Pourcentage de lymphocytes = %LYMPH = ((100 x nombre de lymphocytes) / nombre

total d'évènements sur le cytogramme PEROX) - %BASO

- Numération lymphocytaire = #LYMPH (G/L) = (%LYMPH / 100) x GB
- Pourcentage de monocytes = %MONO = (100 x nombre de monocytes) / nombre total d'évènements sur le cytogramme PEROX
- Numération monocyttaire = #MONO (G/L) = (%MONO / 100) x GB
- Pourcentage de polynucléaires éosinophiles = %EOS = (100 x nombre d'éosinophiles) / nombre total d'évènements sur le cytogramme PEROX
- Numération des polynucléaires éosinophiles = #EOS (G/L) = (%EOS / 100) x GB
- Pourcentage de LUC = %LUC = (100 x nombre de LUC) / nombre total d'évènements sur le cytogramme PEROX
- Numération des LUC = #LUC (G/L) = (%LUC / 100) x GB
- Valeur moyenne de l'indice d'activité peroxydasique = intensité de coloration de la population des neutrophiles relative à l'archétype = MPXI = (abscisse moyenne des neutrophiles – abscisse moyenne des neutrophiles archétype) / abscisse moyenne de l'ensemble archétype – 5,4. Ce calcul très complexe prend en compte la localisation des polynucléaires neutrophiles, la variance selon les axes du nuage, le nombre de cellules dans le nuage et l'angle entre l'axe des abscisses et l'axe principal du nuage [5].
- Numération érythroblastique (uniquement sur l'ADVIA[®] 2120) = #ERYT (G/L).
Effectuée de trois manières par analyse de la région correspondante sur le cytogramme PEROX. Le système utilise ensuite des règles de sélection pour déterminer laquelle de ces trois valeurs ou de la valeur calculée à partir du canal BASO va être rendue.

1.5.5.5 Alarmes générées

Le canal PEROX permet de générer un certain nombre d'alarmes morphologiques ou techniques. Parmi elles :

- Lymphocytes atypiques ou « ATYP » : se déclenche en cas d'excès de LUC, à savoir $\%LUC \geq 4,5$ ou $\%LUC - \%BLASTES \geq 1,5$.
- Granulocytes immatures ou « GI » : se déclenche lorsque les cellules contenant la myéloperoxydase sont en excès par rapport aux cellules polymorphonucléées du canal basophile, c'est à dire $((\%NEUT + \%EOS) - \%PMN) \geq 5$.
- Déficit en myéloperoxydase ou « DEF MPO » : se déclenche lorsque les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles n'ont pas d'activité peroxydase dans le canal peroxydase et les populations PMN sont normales dans le canal d'analyse de la densité nucléaire. $[\%PMN - (\%NEUT + \%EOS)] \geq 25$ sans alarme ERYT, avec vallée MN-PMN valide dans le canal basophile.
- Suspicion d'érythroblastes ou « ERYT » : se déclenche différemment sur les ADVIA® 120 et 2120. Sur l'ADVIA® 2120, l'alarme se déclenche lorsque le nombre de GB dépasse 3 G/L et que le pourcentage d'érythroblastes dépasse 2,0 ou alors dès que le nombre d'érythroblastes dépasse 0,2 G/L.
- Suspicion d'amas plaquettaires ou « AGREGATS » : se déclenche lorsque le total des amas dans la zone dédiée du cytogramme PEROX dépasse 300 évènements. Le total des plaquettes est affiché afin d'avertir l'utilisateur que ce résultat peut être erroné en raison de la présence de ces amas. Le nombre d'amas est exclu de la numération GBp et la formule sanguine.
- Pas de vallée perox ou « PX-NV » : se déclenche lorsqu'il n'y a pas de séparation correcte entre les populations bruit de fond et lymphocytes, sauf si la corrélation entre GBp et GBb est vérifiée et si $0 \leq \%NEUT\% + \%EOS - \%PMN \leq 7,5$.
- Saturation perox ou « PX-SAT » : se déclenche lorsque le nombre d'évènements dans la

zone de saturation est supérieur à 10 % sauf s'il y a corrélation entre GBb et GBp. GBp ne prend pas en compte les événements issus de la zone de saturation.

- Bruit de fond perox ou « PX-NO » : se déclenche lorsque les signaux provenant de la zone de bruit de fond dépassent 60 % du total des signaux, sauf si la corrélation entre GBp et GBb est vérifiée et si $0 \leq \%NEUT\% + \%EOS - \%PMN \leq 7,5$
- Absence de corrélation entre GBp et GBb ou « WBC-CE ». Ce message se déclenche lorsque la différence entre le nombre de leucocytes mesuré par le canal basophile et le nombre de leucocytes mesuré par le canal peroxydase est trop importante. Les conditions de déclenchement sont :

- ✓ $|GBb - GBp| \geq 10^3 / \mu L$ si $2.10^3 \leq GBb \leq 10.10^3$
- ✓ $|GBb - GBp| \geq 10\%$ de GBb si $GBb \geq 10.10^3$
- ✓ $|GBb - GBp| \geq 20\%$ de GBb si $GBb \leq 2.10^3$

1.5.6 Le canal d'analyse de la densité nucléaire (lobularité) ou canal basophile

1.5.6.1 Fonctionnement

Il s'agit du second canal d'analyse des leucocytes. Il repose sur le principe de lyse différentielle des membranes cytoplasmiques. Les réactions cytochimiques préalables à la mesure s'effectuent en deux étapes :

- Lyse des globules rouges et des plaquettes à l'aide du réactif BASO
- Lyse de la membrane plasmique des globules blancs (« stripping ») à l'exception des polynucléaires basophiles, par action conjointe du réactif BASO et d'une élévation de température

Le réactif BASO contient de l'acide phtalique et un agent tensio-actif. Il permet la libération

des noyaux leucocytaires à l'exception des polynucléaires basophiles qui conservent leur cytoplasme.

Un volume constant de cellules en suspension provenant du bain-marie réactionnel (température = 33 °C) est ensuite acheminé vers la cuve de mesure optique. Les caractéristiques de diffraction de la lumière laser selon un petit angle (2-3°) et selon un grand angle (5-15°) sont mesurées pour chaque noyau nu ou polynucléaire basophile (fig. 5).

Ces mesures sont les reflets respectifs de la taille et de la morphologie (associant forme et densité) nucléaire ou cellulaire. Les leucocytes ainsi traités peuvent alors être classés en cellules mononucléées (MN) ou polymorphonucléées (PMN) en fonction de la forme et de la complexité de leur noyau. Les basophiles, restés intacts, peuvent être facilement différenciés des noyaux nus, plus petits. Les signaux optiques enregistrés dans la cuve de mesure sont convertis en pulsions électriques à l'aide de photodiodes.

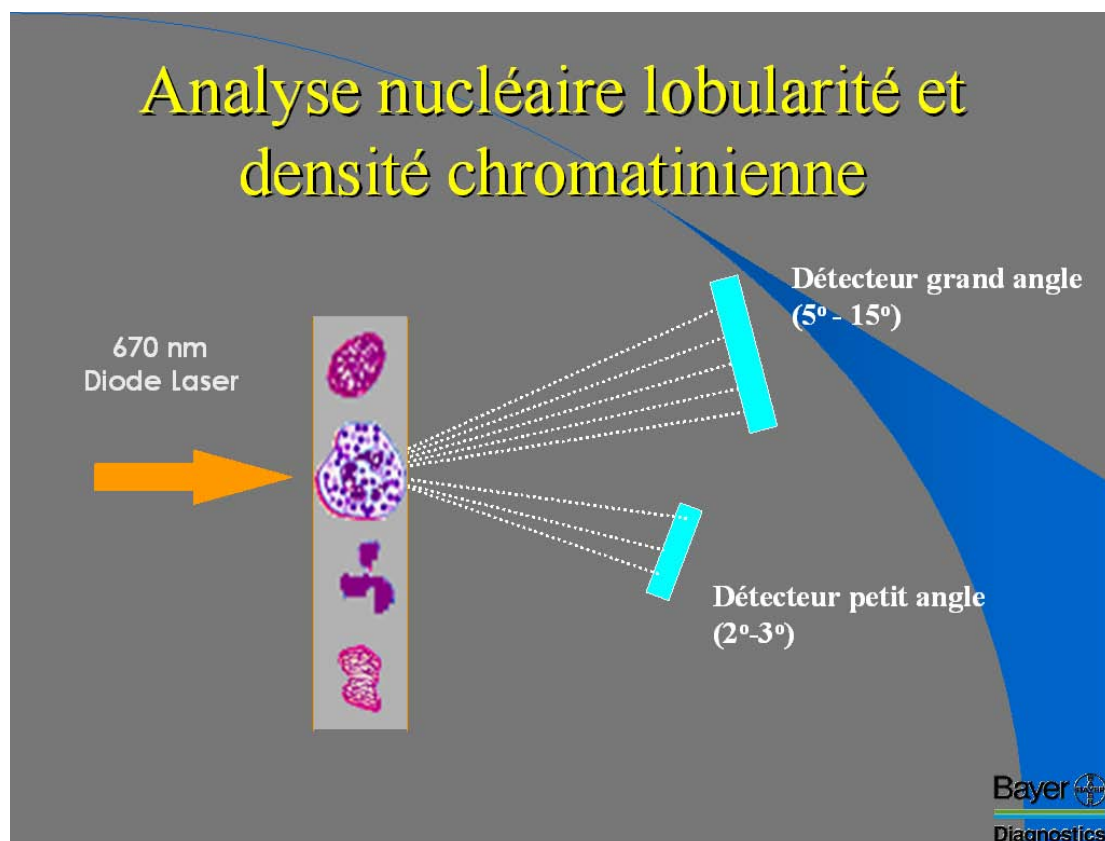


Figure 5. Analyse optique des noyaux leucocytaires et des polynucléaires basophiles dans le canal BASO [6]

1.5.6.2 Principaux graphiques obtenus

Une fois le traitement terminé, le canal permet d'établir les graphiques suivants :

- L'histogramme BASO X représente les signaux de diffraction grand angle de la lumière laser et donc la morphologie nucléaire des populations MN et PMN.
- L'histogramme BASO Y représente les signaux de diffraction petit angle de la lumière laser, c'est à dire la taille des populations MN seules.
- Le cytogramme BASO est formé par les signaux couplés de diffraction petit angle (en ordonnée) et grand angle (en abscisse) de la lumière laser. Il comporte 50 canaux de comptage sur chaque axe. Des populations distinctes peuvent être mises en évidence : noyaux de blastes, noyaux de monocytes et de lymphocytes (MN), noyaux de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (PMN), polynucléaires basophiles, polynucléaires basophiles suspects. Chaque population est alors dénombrée. Les différentes zones du cytogramme et les populations correspondantes chez un individu sain sont indiquées sur les figures 6 et 7. Dans la plupart des cas, ces zones sont analysées par archétype. Cependant, lorsque l'analyse des populations ne correspond pas à un archétype normal en raison d'un nombre de cellules faible ou de la présence d'une seule population identifiable, le logiciel a recours à une analyse par histogrammes pour délimiter les différentes zones. Pour déterminer les seuils de séparation, il utilise les données des histogrammes BASO X (seuil de la vallée MN/PMN) et BASO Y (seuil des basophiles).

1.5.6.3 Emplacement des cellules anormales sur le cytogramme BASO

Les cellules que l'on ne rencontre pas à l'état physiologique dans la circulation sanguine ont une position déterminée par la taille de leur noyau, sa forme et sa densité chromatinienne :

- Les blastes apparaissent dans une zone dédiée, proche de l'origine des axes

- Les lymphocytes atypiques apparaissent dans la zone des cellules mononucléées,
- Les promyélocytes et myélocytes apparaissent dans la zone des cellules mononucléées,
- Les métamyélocytes et band cells apparaissent entre les populations mononucléées et polymorphonucléées,
- Les érythroblastes apparaissent dans la zone des PMN en raison de leur très forte condensation chromatinienne.

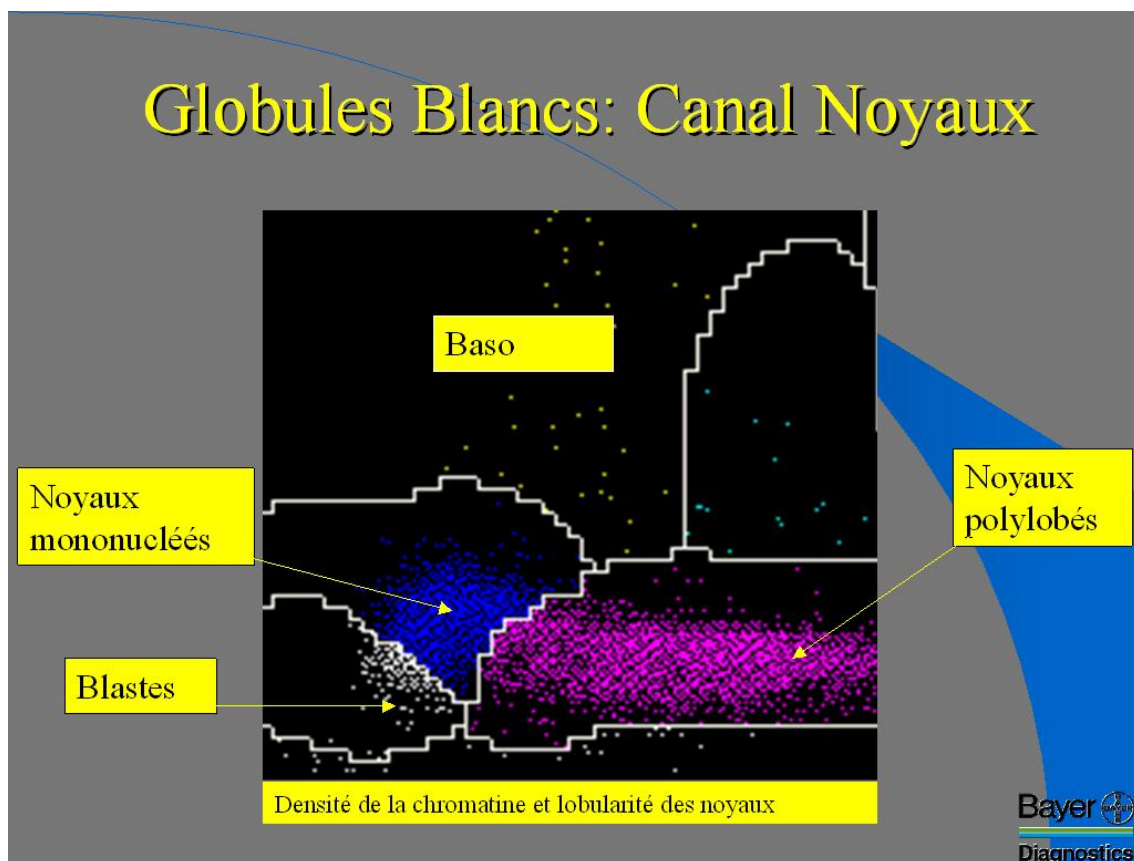


Figure 6. Les différentes zones du cytogramme BASO [6]

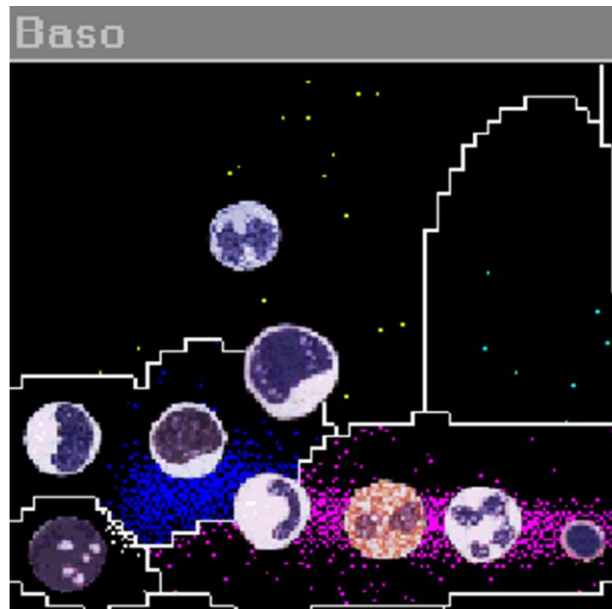


Figure 7. Représentation des différentes cellules sur le cytogramme BASO [7]

1.5.6.4 Principaux paramètres numériques obtenus

- Numération leucocytaire = GBb (G/L) = GBbrut x (facteur étalonnage / (1 – fracDT*))
- Pourcentage de polynucléaires basophiles = %BASO = 100 x (nombre baso / nombre total d'évènements sur le cytogramme BASO)
- Numération des polynucléaires basophiles = #BASO (G/L) = (%BASO / 100) x GBb
- Pourcentage de blastes = %BLASTES = 100 x (blastés / nombre total d'évènements sur le cytogramme BASO)
- Pourcentage de cellules mononucléées = %MN = 100 x (MN / nombre total d'évènements sur le cytogramme BASO)
- Pourcentage de cellules polymorphonucléées = %PMN = 100 x (PMN / nombre total d'évènements sur le cytogramme BASO)

- Numération érythroblastique = #ERYT (G/L) = #PMN - #NEUT - #EOS. Le système utilise ensuite des règles de sélection pour déterminer laquelle de cette valeur ou des trois valeurs calculées à partir du canal PEROX va être rendue.

* : fracDT désigne la fraction de temps pendant laquelle le canal est occupé par le traitement des évènements en cuve de mesure. Lorsqu'il est en train d'identifier un évènement particulier, le canal BASO est incapable de traiter un autre évènement. En mesurant ce temps mort, l'analyseur peut ainsi compenser ces évènements

1.5.6.5 Alarmes générées

Le canal BASO permet de générer un certain nombre d'alarmes morphologiques ou techniques. Parmi elles :

- Blastos ou « BLASTES » : se déclenche en cas d'excès de cellules dans la zone des blastos du cytogramme BASO, plus sensiblement encore si le nombre de LUC mesuré par le canal PEROX est augmenté. Les seuils de déclenchement sont

$$1,5 \leq \%BLASTES \leq 5 \text{ et } \%LUC \geq 4,5$$

$$\text{ou } \%BLASTES > 5\% \text{ des GBb}$$

$$\text{ou } \%BASO + \%B-SUSP + \%B-SAT \geq 10$$

- Formule gauche ou « F GAUCHE ». Destinée à mettre en évidence la présence de polynucléaires neutrophiles non segmentés, l'alarme se déclenche lorsque que des évènements sont détectés dans la vallée MN/PMN et uniquement si %NEUT > 30
- Basophiles suspect ou « B-SUSP » : se déclenche lorsque le nombre d'évènements acquis dans la zone supérieure du cytogramme baso dépasse 5 %. Elle évoque un défaut de lyse de la membrane plasmique de certaines cellules anormales ou une basophilie importante.
- Bruit de fond BASO ou « B-NO » : se déclenche lorsque les évènements comptés dans la zone de bruit de fond (zone inférieure aux MN et PMN, proche de l'axe des abscisses)

correspondent à plus de 10 % du total des signaux. Elle peut signaler une forte lipémie, une éosinophilie extrême ou la présence de parasites sanguins.

- Pas de vallée MN/PMN ou « B-NV » : se déclenche lorsque le cytogramme BASO ne présente pas de séparation correcte entre les populations mononucléées et polymorphonucléées, sauf si il y a bien concordance entre les résultats des canaux BASO et PEROX (absence d'alarme WBC-CE et $0 < [(\%NEUT + \%EOS) - \%PMN] < 7,5$)
- Saturation BASO ou « B-SAT »: se déclenche lorsque le nombre d'évènements comptés dans la zone de saturation BASO (supérieure droite) dépasse 2,5 % du total des signaux
- Absence de corrélation entre GBp et GBb (WBC-CE). Ce message est déclenché si :
 - ✓ $|GBb - GBp| \geq 10^3 / \mu L$ si $2.10^3 \leq GBb \leq 10.10^3$
 - ✓ $|GBb - GBp| \geq 10 \%$ de GBb si $GBb \geq 10.10^3$
 - ✓ $|GBb - GBp| \geq 20 \%$ de GBb si $GBb \leq 2.10^3$

1.5.7 Règles de substitution pour la numération leucocytaire entre les canaux peroxydase et basophile ; corrections éventuelles

Par défaut, la numération leucocytaire rendue est celle effectuée par le canal basophile (GBb) s'il n'y a pas d'alarme de bruit de fond (B-NO) ni d'alarme de saturation (B-SAT).

Si la numération GBb est affichée avec une alarme B-NO ou B-SAT, la numération rendue est celle effectuée par le canal peroxydase (GBp) sauf si les alarmes PX-NV, PX-SAT ou PX-NO apparaissent.

Lorsque les numérations GBb et GBp ont toutes les deux des alarmes critiques, c'est GBb qui est rendu.

Lorsque $GBb < 1 \text{ G/L}$, GBp n'est jamais affichée comme résultat. C'est alors GBb qui est

rendue comme telle, affichée avec une alarme.

Lorsque des érythroblastes sont détectés, l'analyseur corrige automatiquement le nombre de GB (uniquement sur l'ADVIA[®] 2120). GB rendu = GB / (1 + %ERYT/100).

1.5.8 Caractéristiques techniques des ADVIA[®] 120 et ADVIA[®] 2120

1.5.8.1 Domaines de linéarité

Type cellulaire (unité)	Domaine de linéarité
Globules blancs totaux (G/L)	0,02 – 400
Globules rouges (T/L)	0,0 - 7,0
Plaquettes (G/L)	5 – 3500
Hémoglobine (g/dL)	0,0 – 22,5
Réticulocytes (%)	0,2 – 24,5

Tableau 2. Domaines de linéarité des différents canaux de l'ADVIA[®] 2120 [5]

1.5.8.2 Délai pré-analytique acceptable

Paramètres	Unités	Stabilité à t° ambiante (h)	Stabilité à + 4°C (h)
Leucocytes	G/L	36	56
Erythrocytes	T/L	48	72
Hb	g/dL	72	72
VGM	fL	8	24
CCMH	g/dL	8	24
Indice d'anisocytose	%	72	72
Plaquettes	G/L	48	48
Volume plaquettaire moyen	fL	8	8
%NEUT	%	36	72
%LYMPH	%	36	72
%MONO	%	72	72
%EOS	%	8	72
%BASO	%	72	56
%LUC	%	72	72
%RETIC	%	24	72
VGM réticulocytaire	fL	8	24
CCMH réticulocytaire	g/dL	8	24

Tableau 3. Durée de stabilité pour différents paramètres mesurés par l'ADVIA[®] 2120 [5]

Partie 2

**Utilisation et performances de l'ADVIA[®] 2120
et des appareils qui l'ont précédé dans la
caractérisation des hémopathies malignes.
Revue de bibliographie.**

2.1 Détection des blastes, cellules atypiques et précurseurs granuleux par les appareils de cytochimie en flux

La détection de cellules blastiques, lymphocytes atypiques ou précurseurs granuleux par l'appareil génère les alarmes « BLASTES », « ATYP » ou « GI » selon les critères développés précédemment.

La problématique de la spécificité et de la sensibilité des alarmes signalant la présence de cellules blastiques ou atypiques est primordiale. En effet, en pratique courante, ces deux alarmes morphologiques ainsi que l'alarme des granuleux immatures vont imposer la réalisation d'un frottis coloré pour l'observation microscopique, même en l'absence d'anomalies quantitatives associées. Leur rôle d'aiguillage est fondamental.

La sensibilité semble donc le paramètre à privilégier dans les hémopathies malignes afin de détecter idéalement toute cellule blastique ou morphologiquement anormale présente dans l'échantillon analysé. Cela n'est évidemment pas réaliste car augmenter inconsidérément la sensibilité des alarmes conduirait à des déclenchements intempestifs, c'est à dire à une forte diminution de la spécificité et à un nombre important de « faux positifs » ; cela se traduirait par un nombre d'observations microscopiques superflues très augmenté et donc à une mauvaise efficacité technique. Dans l'optique d'effectuer un *screening* idéal, les alarmes doivent donc avoir des valeurs de sensibilité et spécificité les plus proches possibles de 100 %.

2.1.1 Rappel statistique

Considérons l'alarme « BLASTES ». La réponse de l'appareil est binaire : soit il détecte des blastes et déclenche en conséquence l'alarme A, soit il n'en détecte pas et ne la déclenche pas (nous appellerons ce cas A'). Si l'on s'intéresse à l'échantillon en lui même, l'observation microscopique, considérée comme le *gold standard*, permet de déterminer s'il contient effectivement des cellules blastiques (cas B) ou s'il n'en contient pas (cas B').

Lorsqu'une série d'échantillons est analysée en parallèle par un appareil d'hématologie et par un observateur microscopique, on peut consigner les résultats dans un tableau de contingence [10] comme suit :

	A	A'	Total
B	VP	FN	n_B
B'	FP	VN	$n_{B'}$
Total	n_A	$n_{A'}$	N

Tableau 4. Tableau de contingence pour N individus

- VP est le nombre d'échantillons contenant des blastes où l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée (vrais positifs)
- FN est le nombre d'échantillons contenant des blastes où l'alarme « BLASTES » ne s'est pas déclenchée (faux négatifs).
- FB est le nombre d'échantillons ne contenant pas de blaste où l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée (faux positifs).
- VN est le nombre d'échantillons ne contenant pas de blaste où l'alarme « BLASTES » ne s'est pas déclenchée (vrais négatifs).
- n_A est le nombre d'échantillons où l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée.
- $n_{A'}$ est le nombre d'échantillons où l'alarme « BLASTES » ne s'est pas déclenchée.
- n_B est le nombre d'échantillons contenant des blastes.
- $n_{B'}$ est le nombre d'échantillons ne contenant pas de blastes.

La sensibilité (%) de l'alarme correspond à $VP / n_B \times 100$

La spécificité (%) de l'alarme correspond à $VN / n_{B'} \times 100$

La valeur prédictive positive (%) de l'alarme correspond à $VP / n_A \times 100$

La valeur prédictive négative (%) de l'alarme correspond à $VN / n_{A'} \times 100$

2.1.2 Performances des alarmes morphologiques des analyseurs « double canal » dans les principales études disponibles

2.1.2.1 Une première étude aux conclusions dithyrambiques

En 1987, conjointement à la commercialisation du Technicon® H1 qui est le premier appareil équipé du canal d'analyse de la densité nucléaire, d'Onofrio et coll. [11] évaluent la capacité de l'analyseur à mettre en évidence les hémopathies blastiques grâce à l'alarme « BLASTES » qui résulte des données combinées des canaux BASO et PEROX. Par rapport aux appareils de la précédente génération, le Technicon® H1 porte alors de nombreux espoirs en matière de détection des blastes sanguins grâce à son canal BASO tout à fait innovant.

Sur une période de trois semaines, 131 échantillons sanguins sont collectés. Ils proviennent de 43 patients atteints de leucémies aiguës à différentes phases : 4 au diagnostic, 2 en rechute, 35 en cours de traitement, 4 en rémission complète. Parallèlement à l'analyse sur l'automate, un examen microscopique par 3 cytologistes est effectué sur un minimum de 100 cellules (tableau 5). Chez les patients pour lesquels l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée alors que l'examen microscopique n'a pas mis en évidence de cellules blastiques (« faux positifs »), les résultats du myélogramme (notamment le pourcentage de blastes) sont examinés.

Dans cette étude, la sensibilité de la recherche des blastes par l'appareil par rapport à l'examen microscopique est de 100 %, ce qui est idéal. La valeur prédictive négative de l'alarme est également de 100 %. Les échantillons analysés comptent entre 4 et 95 % de blastes à la formule microscopique. La spécificité est moins bonne (55,7 %) et la valeur prédictive positive est de 44,2 %. Cependant, les auteurs avancent que chez tous les patients « faussement positifs », la moelle osseuse contient plus de 12 % de blastes. Conjugué au constat qu'il s'agit le plus souvent d'échantillons cytopéniques, d'Onofrio et coll. émettent l'hypothèse que la détection des blastes par le Technicon® H1 pourrait être plus sensible que l'examen microscopique sur lame. Pour appuyer leur théorie, ils précisent que la moelle des patients où l'alarme ne s'est pas déclenchée contient toujours moins de 6 % de blastes.

	Présence de blastes (microscope / H1)				Total
	+/+	+/-	-/+	-/-	
Diagnostic ou rechute	21	0	0	0	21
Traitement en cours	13	0	43	46	102
Rémission complète	0	0	0	8	8
Total	34	0	43	54	131
		FAUX NEGATIFS	FAUX POSITIFS		

Tableau 5. Comparaison des résultats de l'alarme « BLASTES » du Technicon® H1 et de l'examen microscopique.

Cette publication loue donc les performances de l'alarme « BLASTES » mais il nous semble regrettable qu'elle ne précise pas la nature des leucémies aiguës étudiées. En effet, certaines cellules comme les lymphoblastes de petite taille rencontrés dans la leucémie aiguë lymphoïde (LAL) de type 1 (FAB) sont plus difficilement identifiables par l'appareil ; celui-ci peut les compter comme des lymphocytes.

2.1.2.2 Rappel cytologique sur les lymphoblastes

Les leucémies aiguës lymphoïdes sont des hémopathies malignes dues à la prolifération médullaire de cellules immatures, les lymphoblastes, retrouvés secondairement dans la circulation sanguine.

Il existe plusieurs types de LAL ainsi que différentes classifications (morphologique, immunologique, cytogénétique). La classification cytologique franco-américano-britannique (FAB), bien que désuète aujourd'hui, permet cependant d'appréhender les différents types morphologiques de lymphoblastes qui peuvent être rencontrés. Cette classification définit trois types de LAL [12] en

fonction de la morphologie lymphoblastique (tableau 6).

Type de leucémie	LAL 1	LAL 2	LAL 3 (Burkitt)
Taille des blastes	Petite	Grande, hétérogène	Grande, homogène
Chromatine	Fine	Fine	Mottes, aspect dense
Nucléole(s)	Non visible	1 ou + (25 % des blastes)	2 à 5
Rapport nucléocytoplasmique	> 0,9 dans plus de 75 % des blastes	< 0.8 dans plus de 25 % des blastes	0,8 – 0,9
Contour du noyau	Irrégulier	Irrégulier	Régulier
Basophilie du cytoplasme	Modérée	Variable	Intense
Vacuoles cytoplasmiques	Non	Non ou rare	Nombreuses
Commentaires	Surtout enfants	Surtout adultes	Rares (< 5 % des LAL)

Tableau 6. Eléments de classification morphologique (FAB) des LAL [13]

Sur le cytogramme peroxydase, les lymphoblastes se situent théoriquement dans la zone des grandes cellules sans activité peroxydasique, à savoir les LUC. Mais d'après leur morphologie, il est aisément possible de comprendre pourquoi les petits lymphoblastes de LAL 1 (FAB) peuvent être confondus avec des lymphocytes. Dans de tels cas, le déclenchement de l'alarme « BLASTES » dépend entièrement du canal basophile, les signaux correspondant aux cellules blastiques devant obligatoirement dépasser 5 % des signaux leucocytaires détectés par ce canal. Ce cas de figure est d'autant plus problématique que la chromatine des noyaux lymphoblastiques est généralement plus dense que celle des myéloblastes et que les contours nucléaires sont parfois irréguliers (LAL1). Cela peut induire en erreur le canal BASO qui les recense alors parmi les mononucléés.

2.1.2.3 Des études successives aux résultats contrastés

Dans les études qui ont suivi, les performances des alarmes morphologiques des analyseurs de cytologie hématologique Technicon® et affiliés ont été plus nuancées. Les principales d'entre elles sont recensées ci-après.

En 1988, Krause et coll. publient un article [14] sur l'utilisation du Technicon® H1 dans la caractérisation des leucémies. Ils étudient 90 cas de leucémies au diagnostic ou en première rechute après traitement. Les résultats obtenus concernant les alarmes sont rapportés dans le tableau 7, à l'exception des dix cas de LMC (données indisponibles).

	LAM1	LAM2	LAM3	LAM4	LAM5	LAL	LLC	LNH	LTL
Effectif	6	14	3	12	4	25	10	3	3
Alarme BLASTES (%)	100	100	100	100	100	80	20	66	100
Alarme ATYP (%)	-	-	-	-	-	84	40	66	66

Tableau 7. Déclenchement des alarmes du Technicon® H1 dans les différentes hémopathies [14]

Si l'alarme « BLASTES » n'a pas été prise en défaut dans les cas de leucémie aiguë myéloïde (LAM), elle l'a été à quatre reprises pour des LAL. Elle s'est déclenchée à tort dans 20 % des cas de leucémie lymphoïde chronique (LLC) et dans la plupart des cas de leucémie à tricholeucocytes et lymphome non hodgkinien (LNH) en phase leucémique, dépassant même l'alarme « ATYP » attendue. En revanche, l'alarme « ATYP » s'est montrée légèrement plus sensible que l'alarme « BLASTES » dans les LAL.

En 1989, les travaux diligentés par Kline [15] portent sur une cohorte de 35 patients leucémiques à différents stades (diagnostic, rémission, rechute). Ils font état d'une sensibilité globale de l'alarme « BLASTES » du H1 de 83,8 % et d'une spécificité de 78 %. Ils précisent qu'en excluant les patients en leucopénie sévère (< 1 G/L), on porte la spécificité à 89 %, sans augmenter la sensibilité. Ce constat plutôt surprenant laisse entendre que l'alarme se déclenche à tort plus volontiers dans les cytopénies sévères, chose qui n'est pas rapportée par ailleurs dans la littérature scientifique. Nous regrettons là encore l'absence de détails concernant le type de leucémie.

En 1991, Ialongo et coll. publient le résultat d'une étude [16] portant sur 62 patients atteints de LAL au diagnostic, dont 24 LAL de type 1 (FAB). L'alarme « BLASTES » du Technicon® H1 utilisé lors de ces travaux est vivement critiquée par les auteurs pour sa sensibilité médiocre ; avec 44 % de faux négatifs, on est loin des résultats publiés par l'équipe de d'Onofrio quatre ans auparavant. Les auteurs citent en exemple le cas d'un patient souffrant de LAL de type 1 (FAB) avec 37 % de blastes pour lequel l'appareil n'a objectivé qu'une lymphocytose et n'a émis aucune alarme morphologique. Dans les LAL2 (FAB), la sensibilité est légèrement plus élevée mais reste très insuffisante.

La sensibilité de l'alarme « BLASTES » dans les LAL apparaît donc comme médiocre, de même que celle de l'alarme « ATYP » (tableau 8). Nous déplorons cependant l'absence de données concernant la sensibilité globale des alarmes morphologiques (pourcentage d'échantillons ayant déclenché l'une, l'autre ou les deux alarmes).

Classification FAB	LAL1	LAL2	LAL3
Effectif	24	35	3
Alarme BLAST (%)	54,2	60	33,3
Alarme ATYP (%)	37,5	45,7	66,7

Tableau 8. Déclenchement des alarmes morphologiques dans l'étude de Ialongo et coll. [16]

L'étude espagnole [17] de Fernandez-Castro et Vilora dont les résultats sont publiés en 1995 est particulièrement intéressante puisqu'elle porte uniquement sur l'utilité des alarmes du Technicon® H1 dans la détection des blastes circulants. Au cours de ces travaux, 1269 échantillons veineux provenant de 91 enfants atteints de leucémie aiguë sont analysés par l'appareil et au microscope. Ces enfants sont hospitalisés en pédiatrie et les prélèvements sanguins sont effectués indépendamment du stade de la maladie (diagnostic, traitement, rémission ou rechute). A l'observation microscopique, la présence de blastes est affirmée dans 225 échantillons (17,7 %). Les résultats sont rapportés dans le tableau 9

Si les auteurs avancent que les 2,2 % de faux négatifs sont cinq échantillons contenant moins de 5 % de blastes et qu'ils proviennent du même patient, nous pouvons nous interroger sur la possibilité pour l'appareil de détecter aussi finement la présence de blastes dans 85 cas sur 90 lorsque leur proportion est inférieure à 5 %. En effet, l'analyseur émet les alarmes « BLASTES » ou

« ATYP » uniquement lorsque que le pourcentage d'évènements dans les zones dédiées des cytogrammes dépasse 4,5 ou 5 % (voir conditions exactes de déclenchement au chapitre précédent) ; ces conditions rendent théoriquement indétectable la présence de blastes en très faible proportion. La sensibilité de la détection des blastes paraît ici d'autant plus exceptionnelle si l'on considère que 85 de ces 91 leucémies aiguës pédiatriques sont des LAL, dont 36 de type 1 (FAB) dont la morphologie lymphoblastique rend difficile la mise en évidence.

Blastes (%)	Effectif	Faux négatifs (%)	Positifs affichant l'alarme :			
			« BLASTES » seule (%)	« ATYP » seule (%)	« BLASTES » et « ATYP » (%)	Alarme quantitative (%)
≤ 5	90	5,5	5,6	38,9	33,4	16,6
6-10	20	0	15	15	45	25
11-20	25	0	20	8	64	8
21-30	21	0	14,3	9,5	66,7	9,5
31-40	14	0	21,4	0	71,4	7,1
41-50	10	0	20	0	80	0
51-60	9	0	0	0	77,8	22,2
61-70	10	0	30	10	60	0
71-80	12	0	25	16,7	58,3	0
81-90	10	0	0	10	90	0
91-100	4	0	0	25	75	0
Total	225	2,2	12,3	21,4	54,1	12,2

Tableau 9. Analyse du déclenchement des alarmes selon le pourcentage de blastes sanguins dans l'étude de Fernandez-Castro et Vilorio [17].

En y regardant de plus près, nous constatons que 22,1 % des blastes détectés alors que le sang en contient moins de 5 % ne déclenchent ni l'alarme « BLASTES », ni l'alarme « ATYP ». En effet, 16,6 % sont signalés par une des alarmes quantitatives dites « critiques » dont la nature n'est malheureusement pas précisée par les auteurs. Si l'on ne considère que les deux alarmes principales (seules ou conjointes), le pourcentage de faux négatifs s'élève à 14,4 %, ce qui semble plus réaliste au vu des performances relevées dans les travaux antérieurs et du recrutement de l'étude très riche en LAL. De plus, dans leurs travaux, Fernandez-Castro et coll. s'intéressent à la sensibilité de l'alarme « BLASTES » considérée isolément dans les 85 cas de LAL : ils mettent en évidence 33,6 % de faux négatifs. Toutefois, contrairement aux résultats attendus, la proportion de faux négatifs est identique chez les patients atteints de LAL de type 1 ou de LAL de type 2 (FAB).

De manière intéressante, la valeur prédictive positive des alarmes concernant la présence de blastes a été calculée : elle est de 34,9 % en cas d'alarme « ATYP » seule, de 66,8 % pour l'alarme « BLASTES » seule et de 75,8 % pour les deux alarmes conjointes. L'alarme « BLASTES » se révèle donc être assez spécifique, en particulier lorsqu'elle est associée à l'alarme « ATYP ». En observant les cas de faux positifs, Fernandez-Castro et Vilorio ont remarqué qu'ils sont étroitement liés à une monocytose post-chimiothérapique. Cette monocytose réactionnelle, dont la maturité est incomplète, apparaît entre 8 et 17 jours (14 en moyenne) après l'induction chimiothérapique et coïncide avec une augmentation des LUC ; elle précède la fin de l'agranulocytose d'une dizaine de jours et causerait le déclenchement intempestif des alarmes morphologiques.

Plus récemment, en 1997, des travaux menés par Dorfman [18] sur 26 cas d'hémopathies blastiques ont donné des résultats proches de ceux obtenus par Kraus et coll. neuf ans auparavant. Dans cette étude, la première utilisant l'ADVIA® 120, les échantillons de sang veineux périphérique des patients ont été analysés simultanément par le Technicon® H3, l'ADVIA® 120 et l'observation microscopique sur 400 cellules. Les échantillons sanguins (qui contiennent tous des blastes), la moelle ou un ganglion du patient ont également été phénotypés par cytométrie en flux. Les résultats sont exposés dans les tableaux suivants et sont à considérer avec précaution en raison de la faiblesse des effectifs étudiés.

Appareil	Technicon® H3	ADVIA® 120
Alarme « BLASTES »	17/17	17/17
Alarme « ATYP »	4/17 (2 LAM2, 2 LAM5)	9/17 (2 LAM2, 2 LAM4, 3 LAM5, 2 LAM secondaires)
Numération GB (G/L)	1,3 – 86,3	1,3 – 96,8

Tableau 10 Déclenchement des alarmes morphologiques pour les 17 cas de LAM [18].

L'alarme « BLASTES » n'est jamais prise en défaut dans les cas de LAM (tableau 10). Elle l'est sur les deux analyseurs pour un cas de LAL qui contient seulement 6 % de blastes, soit le plus faible pourcentage parmi les trois échantillons (tableau 11). L'alarme « ATYP » de l'ADVIA® a heureusement permis que ce patient ne passe pas entre les mailles du filet de détection.

Appareil	Technicon® H3	ADVIA® 120
Alarme « BLASTES »	1/3	2/3
Alarme « ATYP »	2/3	3/3
Numération GB (G/L)	2,3 – 25,8	2,3 – 25,0

Tableau 11. Déclenchement des alarmes morphologiques pour les 3 cas de LAL [18].

Appareil	Technicon® H3	ADVIA® 120
Alarme « BLASTES »	1/1	1/1
Alarme « ATYP »	1/1	1/1
Numération GB (G/L)	23,1	23,2

Tableau 12. Résultats obtenus pour l'unique cas de leucémie biphénotypique [18.]

Appareil	Technicon [®] H3	ADVIA [®] 120
Alarme « BLASTES »	2/5	3/5
Numération GB (G/L)	-	-

Tableau 13. Déclenchement de l'alarme « BLASTES » pour les 2 cas de LMC et les 3 SMD [18].

Notons que le sang des cinq patients (tableau 13) atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) ou syndrome myélodysplasique (SMD) contient à chaque fois moins de 10 % de blastes. Un des deux échantillons dont la proportion de blastes est de 1% selon le comptage manuel a même déclenché l'alarme « BLASTES » sur l'ADVIA[®] 120. Cela nous laisse évidemment sceptique compte-tenu des conditions de déclenchement des alarmes énoncées auparavant.

Appareil	Technicon [®] H3	ADVIA [®] 120	Microscope
Numération GB (G/L)	1,7 – 219,7	1,8 – 207,0	-
Alarme « ATYP » / cellules lymphoïdes atypiques détectées	11/11	11/11	11/11 (2 à 30 %)
Alarme « BLASTES » / blastes détectés	3/11 (1 LLC, 2 LNH)	5/11 (2 LLC, 2 LNH, 1 LPL)	0/11

Tableau 14. Déclenchement des alarmes morphologiques pour les 11 cas de SLP [18].

L'alarme « ATYP » s'est révélée sensible à 100 % chez les onze patients atteints d'un syndrome lymphoprolifératif chronique (SLP) mais l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée à tort à 3 reprises pour le Technicon[®] H3 et 5 fois pour l'ADVIA[®] 120 (tableau 14)

Nous ne pouvons que déplorer la faiblesse des effectifs qui ne permettent pas d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Sur les 37 hémopathies étudiées, la sensibilité de l'alarme « BLASTES » sur l'ADVIA[®] 120 est donc de 88,4 % et sa spécificité de 54,5 %. L'alarme « ATYP » s'est quant à elle déclenchée dans les 11 cas de syndromes lymphoprolifératifs recensés.

Au final, les données de la littérature sont assez contrastées en ce qui concerne les performances des alarmes morphologiques. Elles semblent globalement assez satisfaisantes, notamment en termes de sensibilité pour la détection des blastes dans les LAM à pourcentage de blastes élevés. Pour les LAL et les leucémies où le pourcentage de blastes est faible, la prudence est de mise. Cela mérite que nous y portions une attention toute particulière lors de l'analyse de nos résultats.

2.1.2.4 Comparaison des appareils utilisant la cytochimie en flux avec ceux de principe « Coulter »

Quand Technicon[®] a commercialisé le H1, l'arrivée du canal BASO a été présentée comme un outil révolutionnaire dans la détection des cellules morphologiquement anormales. Il est vrai que l'analyse de la densité nucléaire par un canal spécifique apportait des informations supplémentaires imperceptibles à l'époque par les appareils utilisant l'impédancemétrie. Depuis, les analyseurs qui utilisent le principe « Coulter » pour compter et mesurer le volume des cellules ont se sont eux aussi améliorés. Pour exemple, l'appareil Beckman-Coulter[®] LH750 effectue désormais une analyse du contenu par diffraction laser ainsi qu'une mesure de l'opacité cellulaire par radiofréquence qui donne des informations sur la taille et la structure du noyau [19]. Dès lors, qu'en est-il de l'acuité des alarmes ?

En 2010, une équipe de Philadelphie (Shelat et coll.) a publié les résultats d'une étude [20] comparant l'efficacité de la détection des blastes par l'ADVIA[®] 2120 avec celle de l'appareil Beckman-Coulter[®] LH750. Les deux technologies actuelles d'analyse des globules blancs y sont ainsi comparées. Les travaux portent sur 390 échantillons sanguins provenant de patients hospitalisés ou en consultation externe, incluant des services de pédiatrie et d'oncologie. Les échantillons ont été analysés en parallèle sur les deux appareils et une formule microscopique sur cent cellules a été réalisée et considérée comme la référence. Une des particularités de cette étude est que les auteurs ne considèrent pas uniquement l'alarme « BLASTES » ; ils estiment que la présence de blastes est suspectée quand au moins une des quatre alarmes suivantes se déclenche : « BLASTES », « BASO NO VALLEY », « ATYP » et « LUC > 7 % ». La présence de l'alarme « BASO NO VALLEY » parmi les alarmes critiques est très surprenante et nous ne parvenons pas à justifier ce choix. L'alarme « B-SUSP », reliée à un éventuel défaut de lyse leucocytaire nous aurait

paru plus appropriée. De plus, il y a redondance entre l'alarme « ATYP » et « LUC > 7% » (cette dernière ne figure d'ailleurs pas parmi la liste des alarmes générées par l'ADVIA® 2120). Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 15.

Le calcul de la sensibilité plaide nettement en faveur en faveur de l'ADVIA® 2120 : 100 % contre 62 % seulement avec le LH750 (différence significative, $p < 0,0001$). Logiquement, en contrepartie, la spécificité est meilleure sur l'appareil Beckman-Coulter (86 % contre 49 %). Les auteurs précisent que deux échantillons contiennent seulement 2 % de blastes (dont l'un n'a pas été mis en évidence sur le LH750) et que sur les 52 échantillons « faux positifs » du LH750, 11 (19%) méritent toutefois d'être examiné au microscope au vu des critères seuils de leucopénie-thrombopénie. Parmi les 11 « faux négatifs » du LH750, on compte 3 leucémies aiguës myéloïdes et 8 leucémies lymphoblastiques.

	Blasts present	Blasts absent	Total
ADVIA 2120*			
Blasts flagged	29 TP	183 FP	212
Blasts not flagged	0 FN	178 TN	178
Total	29	361	390
LH750†			
Blasts flagged	18 TP	52 FP	70
Blasts not flagged	11 FN	309 TN	320
Total	29	361	390

The 100-cell manual differential was the reference standard to determine if blasts were 'present' or 'absent'.

TP, true-positive; FP, false-positive; FN, false-negative; TN, true-negative; sensitivity, % of samples with blast flags when blasts were present; specificity, % of samples without blast flags when blasts were absent; PPV, % of samples where blasts were present among samples that triggered blast flags; NPV, % of samples where blasts were absent among samples where blast flags were not triggered.

Efficiency = (TP + TN)/Total.

*Sensitivity (100%), specificity (49.3%), PPV (13.7%), NPV (100%), efficiency (53.1%).

†Sensitivity (62.1%), specificity (85.6%), PPV (25.7%), NPV (96.6%), efficiency (83.8%).

Tableau 15. Performances des alarmes « BLASTES » de l'ADVIA® 2120 et du LH750 [20].

Les résultats obtenus avec l'ADVIA® 2120 sont à rapprocher des travaux inauguraux de d'Onofrio et coll. sur Technicon® H1 qui rapportaient déjà une sensibilité de 100 %, laquelle n'a

jamais été retrouvée jusqu'à l'étude de Shelat et coll. L'ADVIA[®] 2120 serait donc plus sensible dans sa reconnaissance des blastes que le LH750. Mais la récente arrivée sur le marché du Beckman-Coulter Unicel DxH 800 dont les performances en matière de détection des blastes sont supérieures au LH 750 [21] relance à nouveau le débat.

2.1.3 Estimation du pourcentage de blastes sanguins ou de cellules atypiques par les analyseurs « double canal »

S'il est un point sur lequel les auteurs sont unanimes, c'est sur le fait que l'estimation du pourcentage de blastes par l'appareil qui ne corresponde pas au compte microscopique. En 1993, l'équipe de Ialongo constate déjà que le comptage manuel des blastes ne montre aucune corrélation avec le pourcentage de blastes estimé par le Technicon[®] H1 [16], lequel est toujours sous-estimé.

En 1997, Dorfman et ses collaborateurs réitèrent ce constat avec des appareils plus récents : le pourcentage de blastes affiché par l'ADVIA[®] 120 est en moyenne inférieur à celui du Technicon[®] H3 [18]. De plus, les deux automates sous-estiment le pourcentage de blastes par rapport au comptage manuel.

Dans cette même étude, ils mettent également en évidence la mauvaise corrélation (quoiqu'un peu meilleure pour l'ADVIA[®]120) entre le pourcentage de LUC et le pourcentage de cellules atypiques (comptage manuel) dans 11 cas de syndromes lymphoprolifératifs.

2.2 Exploitation des données numériques fournies par les analyseurs de cytochimie en flux pour discriminer et tenter de classer les hémopathies.

La plupart des études menées jusqu'alors ont peiné à déterminer des paramètres et des valeurs seuils qui permettraient, sinon de caractériser une hémopathie, d'en préciser à coup sûr la nature (aiguë / chronique, lymphoïde / myéloïde, ...). Ceci s'explique par la grande variabilité des valeurs obtenues pour une même hémopathie chez deux patients différents, l'exemple le plus

courant étant celui des formes cytopéniques ou hypercytaires d'un même type de leucémie aiguë (FAB). Certains auteurs sont néanmoins parvenus à mettre en évidence des paramètres numériques remarquables au cours des études qu'ils ont réalisées ; nous allons tenter d'en faire la revue de synthèse.

2.2.1 Paramètres numériques remarquables des LAL

Comme nous l'avons évoqué auparavant, les lymphoblastes peuvent se situer dans la zone des LUC ou des lymphocytes sur le cytogramme PEROX. En conséquence, les paramètres numériques importants concernent principalement ces deux catégories.

L'étude de Ialongo et coll. sur le monitoring hématologique des LAL par cytochimie en flux automatisée (Technicon[®] H1) lui a permis de mettre en évidence quelques grands axes [16] :

- 87 % des patients ont un pourcentage de lymphocytes supérieur au pourcentage de polynucléaires neutrophiles (« inversion de formule »). Ce constat est également dressé par Krause et coll. où il est vérifié dans chacun des 25 cas de LAL étudiés [14].
- Chez 80 % des patients on observe une augmentation des LUC. Attention toutefois car il arrive que des échantillons avec un pourcentage de LUC normal aient un pourcentage de blastes sanguins supérieur à 10 % (10 cas sur 62), en cas de blastes de petite taille.
- L'étude ne montre pas de différence significative entre les pourcentages de lymphocytes retrouvés dans les LAL de type 1 ou 2 (FAB).
- Quand la numération leucocytaire est inférieure à 10 G/L, le pourcentage de LUC n'est pas statistiquement différent dans les LAL 1 ou les LAL 2 (FAB). En revanche, les LAL 2 hypercytaires ont un pourcentage de LUC plus élevé que les LAL 1 hypercytaires.
- Dans 53 % des cas, l'appareil a détecté une hyperbasophilie. Il s'agit d'un artéfact causé par la lyse incomplète des cellules dans le canal basophile et qui est lié au nombre élevé

de leucocytes présents. Cette interférence s'atténue lorsque l'échantillon est dilué.

Pour Tsakona et ses collaborateurs qui ont cherché à différencier les LAL des LAM à l'aide du Technicon[®] H1, trois constats généraux sont mis en évidence [22] :

- Le pourcentage moyen de lymphocytes est significativement supérieur dans les LAL par rapport aux LAM.
- Le pourcentage moyen de monocytes est significativement supérieur dans les LAM par rapport aux LAL.
- Le MPXI moyen est significativement plus élevé dans les LAM que dans les LAL.

Si l'on cherche à appliquer ces théories à un échantillon en particulier, cela nécessite de déterminer des seuils, ce que les auteurs n'ont pas fait jusqu'à présent. Il est vrai que ces valeurs limites semblent très difficiles à définir tant il existe d'exceptions et de cas équivoques. Si cela était proposé, nous pourrions alors imaginer un système de score de probabilité diagnostique intégrant ces critères mais cela n'a malheureusement jamais été développé par les auteurs.

2.2.2 Paramètres numériques remarquables des LAM

Les LAM représentent un ensemble de leucémies plus variées encore dans leur présentation morphologique que les LAL. Dans les sous-types 1 à 5 de la classification FAB, les blastes expriment la myéloperoxydase à différents degrés et peuvent donc être localisés dans des zones autres que celle des LUC sur le cytogramme PEROX. Cela va de la zone des monocytes pour les blastes exprimant faiblement la myéloperoxydase à l'extrême droite de la zone des polynucléaires pour les promyélocytes atypiques de la LAM3 (FAB). A l'aide du canal peroxydase et des données chiffrées qui en découlent, le biologiste dispose donc d'outils pour en affiner la caractérisation.

2.2.2.1 Le MPXI

Quand on cherche les paramètres dignes d'intérêt dans l'approche numérique des LAM, le premier qui vient à l'esprit est le MPXI. Défini comme la valeur moyenne de l'indice d'activité peroxydasique, il correspond à l'intensité moyenne de coloration des cellules ayant une activité peroxydasique. Ce paramètre exclusif propre aux appareils d'hématologie munis d'un canal PEROX a fait l'objet de nombreuses études pour des usages variés : il présenterait un intérêt dans le diagnostic des anémies mégaloblastiques [23] où il est très augmenté mais également en infectiologie [24, 25] ou en oncologie pour le suivi des aplasies post-chimiothérapiques [26, 27].

Le MPXI semble néanmoins d'un intérêt limité dans la mise en évidence des LAM0, 5a, 6 et 7 de la classification FAB où les blastes n'ont pas d'activité myéloperoxydasique : comme pour les LAL, il prend en compte uniquement les polynucléaires neutrophiles et monocytes résiduels. En revanche, il doit théoriquement apporter des informations pertinentes dans les LAM1, 2, 3, 4 et 5b (FAB). Eivazi-Ziaei a récemment publié un article [28] sur le MPXI et 72 LAM au diagnostic. Il a utilisé le Technicon® H1 lors de ces travaux. Les effectifs et les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Type de LAM (FAB)	Effectif	MPXI : moyenne (\pm écart-type)
LAM0	3	1,4 (\pm 7,5)
LAM1	3	-16,6 (\pm 14,4)
LAM2	28	-6,5 (\pm 18,1)
LAM3	7	16,7 (\pm 21,9)
LAM4	12	-15,9 (\pm 12,3)
LAM5	2	-18,7 (\pm 6,2)
LAM6	1	1,8
LAM7	1	-1,6
Non classes	15	-3,0 (\pm 16,3)
Total	72	-5,3 (\pm 18,2)

Tableau 16. Valeurs du MPXI dans les différentes LAM (FAB) [28].

Dans cette étude, l'auteur indique que les valeurs les plus faibles du MPXI sont observées dans les cas de LAM1, 4 ou 5 (FAB). Il attribue ce résultat au fait que les blastes rencontrés dans ces leucémies ont une faible activité myéloperoxydasique. Pour donner du crédit à cette explication, il aurait fallu préciser les pourcentages de blastes contenus dans les échantillons car elle n'est valable que si leur proportion est élevée. Il constate également que 75 % des LAM3 (FAB) ont des MPXI très élevés. Mais le problème reste entier pour les 25 % restants. Au final, si l'on se réfère au tableau, on peut voir qu'un MPXI très bas orientera bien vers une LAM1, ou 4 ou 5 (différentiables par ailleurs par des critères graphiques) et qu'une valeur très élevée sera très évocatrice d'une LAM3. En revanche, toutes les valeurs intermédiaires, c'est à dire la majorité, ne permettent pas d'augurer du sous-type de LAM (FAB) rencontré. L'hétérogénéité des MPXI mesurés pourrait être accentuée par le fait qu'il existe un nombre sensiblement augmenté de polynucléaires MPO-déficients dans plus de la moitié des LAM de type 1 à 4 de la classification FAB [29].

Précédemment, Tsakona et coll. ont déjà tenté d'utiliser le MPXI comme paramètre discriminant. Leurs observations sont sensiblement différentes [22] :

- Pour la LAM1 (FAB), le MPXI moyen est inférieur à tous les autres types.
- Pour la LAM2 (FAB): le MPXI moyen est supérieur à tous les autres types, exception faite de la LAM3.
- Pour la LAM3 (FAB) : le MPXI moyen est supérieur à tous les autres types.
- Pour les LAM4, 5 et 7 (FAB) : le MPXI moyen est faible et ne permet pas de les discerner entre elles.

Au final, si le MPXI peut parfois orienter vers un certain type de LAM (LAM3 (FAB) principalement), sa valeur nous semble trop fluctuante, car trop influencée par les polynucléaires et monocytes résiduels. Il ne permet donc pas de réelle discrimination.

2.2.2.2 La formule leucocytaire

Peu d'études font cas de valeurs remarquables dans les LAM, préférant exploiter le cytogramme peroxydase qui est beaucoup plus informatif. Tsakona et coll. [22] précisent néanmoins que le pourcentage moyen de polynucléaires croît de la LAM1 à la LAM2 puis la LAM3 (FAB) (voir tableau 17). L'équipe de Krause souligne quant à elle que la détection de blastes sanguins conjuguée à une monocytose relative est très évocatrice d'une LAM4 ou d'une LAM5, avec un pourcentage moyen de LUC supérieur dans les LAM4 (ce dernier constat n'est pas partagé par Tsakona et coll.).

FAB type	Cases n	Neutrophils %	Lymphocytes %	LUCs %	MPXI value
M0, 1	2	9.6 ± 7.2	47.9 ± 6.3	31.5 ± 3.8	-31.0 ± 13.3
M2	6	37.7 ± 18.0	26.4 ± 16.7	12.0 ± 14.2	16.3 ± 21.8
M3	4	52.2 ± 46.6	40.9 ± 47.7	1.2 ± 0.6	18.2 ± 16.2
M4	11	31.6 ± 24.8	27.2 ± 22.5	26.3 ± 20.4	-12.5 ± 14.6
M5	5	22.3 ± 16.1	24.7 ± 16.0	28.1 ± 31.2	-20.7 ± 14.2
M6	1	50.1	23.4	24.5	- 9.6
M7	4	38.4 ± 31.1	36.1 ± 23.4	11.5 ± 6.4	-12.1 ± 10.1
AML	33	33.3 ± 23.5	29.6 ± 21.1	20.4 ± 19.6	-12.6 ± 18.3
ALL	7	19.4 ± 25.0	67.1 ± 30.0	10.8 ± 9.6	- 0.6 ± 5.6

Tableau 17. Valeur moyenne (± écart-type) du MPXI et des pourcentages de polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et LUC dans l'étude de Tsakona et coll. [22].

2.2.3 Paramètres numériques remarquables des syndromes lymphoprolifératifs chroniques

2.2.3.1 Bref rappel d'hématologie

Les syndromes lymphoprolifératifs (SLP) chroniques sont des proliférations malignes de lymphocytes tumoraux à partir du tissu lymphoïde (ganglions, rate, amygdales, moelle osseuse,

plaques de Peyer...). Sous ce terme générique sont regroupés les lymphomes hodgkiniens (LH) ou non-Hodgkiniens, la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la leucémie prolymphocytaire (LPL), les proliférations plasmocytaires comme le myélome et la leucémie à tricholeucocytes (LTL). Il s'agit d'hémopathies non blastiques qui s'accompagnent pour certaines d'un passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine (LLC notamment).

2.2.3.2 Paramètres d'intérêt pour les LLC

Parmi les syndromes lymphoprolifératifs chroniques, la LLC est le plus fréquent. Sa mise en évidence grâce aux appareils de cytochimie en flux n'est pourtant que rarement abordée dans les différentes publications. Conformément à la cytologie, le lymphocyte de la LLC (petit lymphocyte mature) est reconnu comme tel par l'appareil et le premier signe d'appel est donc une lymphocytose.

L'étude menée par Krause [14] comporte dix cas de LLC et tous présentent une lymphocytose relative. Dans quatre cas, le nombre de LUC est augmenté, déclenchant l'alarme « ATYP ». Cela peut être attribué à la présence d'un contingent de prolymphocytes dans certaines LLC.

Des travaux menés par Lanza [30] laissent entrevoir une corrélation entre les nombres de LUC et de blastes mesurés par l'appareil (qui sont les plus élevés chez les patients aux stades les plus avancés de la maladie) et certains facteurs pronostiques. Le nombre de LUC mesuré par l'appareil serait corrélé positivement aux facteurs suivants : lymphocytose périphérique, importance de la splénomégalie, pourcentage de prolymphocytes, pourcentage d'immunoblastes et pourcentage de grands lymphocytes granuleux. De plus, la chimiothérapie visant à réduire la masse tumorale s'accompagnerait d'une plus grande baisse des LUC que des lymphocytes. Une brutale augmentation des LUC serait évocatrice d'une transformation en leucémie prolymphocytaire.

Le nombre de cellules dans la zone des blastes est quant à lui corrélé positivement au nombre d'immunoblastes circulants. Une augmentation rapide du nombre de blastes mesuré par l'appareil est très évocatrice d'un syndrome de Richter. Il apparaît également qu'un pourcentage de blastes mesuré par l'appareil supérieur à 7 % serait le plus pertinent des facteurs pronostiques cytologiques en terme de durée de survie (autres facteurs : lymphocytose > 50 G/L, pourcentage de

LUC supérieur à 12, rapport LUC / lympho > 0,16, nombre de LUC > 2,2 G/L). Lanza et coll. militent pour que le pourcentage de blastes mesuré par l'appareil soit intégré aux facteurs pronostics de la LLC.

2.2.3.3 Paramètres distinctifs des différents SLP

Pour distinguer les différents syndromes lymphoprolifératifs chroniques, seules les valeurs des lymphocytes et des LUC importent puisque les cellules tumorales sont comptées dans l'une ou l'autre de ces catégories.

Dès 1981, les travaux de Patterson cherchent à discriminer les syndromes lymphoprolifératifs chroniques au regard du pourcentage de LUC [31] : chez les patients atteints de leucémie à tricholeucocytes, le pourcentage de LUC est nettement plus élevé que pour les patients atteints de LLC et l'on retrouve constamment une profonde neutropénie et une monocytopénie. Dans les leucémies à prolymphocytes, le pourcentage de LUC mesuré est semblable à celui de la leucémie à tricholeucocytes, c'est à dire plus élevé que dans la LLC mais l'auteur n'a pas observé de neutropénie. Les deux cas de leucémie lymphoplasmocytaire et le cas de lymphome de Sezary ne se sont pas distingués numériquement des cas de LLC.

En 1997, Dorfman propose la prise en compte du ratio LUC sur lymphocytes pour discriminer LLC, leucémie prolymphocytaire et lymphomes malins non hodgkiniens en phase leucémique [18]. Sur l'ADVIA[®] 120 aussi bien qu'à l'observation microscopique, ce rapport semble différer assez sensiblement (voir tableau 18) sans toutefois que les effectifs, beaucoup trop faibles, ne permettent d'en tirer des conclusions statistiquement significatives. Dorfman communique également sur l'excellente corrélation entre le ratio calculé d'après les valeurs de l'ADVIA[®] 120 et le rapport lymphocyte atypique sur lymphocytes d'après l'observation microscopique [32].

Ratio Atyp (ou LUC) / Lympho :	Technicon® H3	ADVIA® 120	Microscope
- LLC	0,20	0,20	0,18
- LPL	0,28	0,80	0,62
- LNH	0,95	2,27	1,80

Tableau 18. Etude du rapport lymphocytes atypiques (ou LUC) sur lymphocytes dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques [18].

Une étude israélienne a par ailleurs montré que le MPXI était significativement augmenté dans 56 % des cas de lymphomes (hodgkiniens ou non, à l'exception des LNH dits de bas grade de malignité), contre 2,3 % dans la totalité de la population hospitalisée prise en compte dans l'étude [33]. Ces informations n'ont à notre connaissance jamais été exploitées.

En marge de ces études, les travaux de Mentz et coll. sur la détection de l'apoptose des cellules lymphoïdes [34] ont révélé que les lymphocytes apoptotiques se situent non pas dans la partie des mononucléés du cytogramme BASO mais bien dans les polynucléés. Dès lors, pourquoi ne pas imaginer utiliser le ratio PMN/MN pour suivre la lyse des lymphoblastes dans le suivi des chimiothérapies des LAL ?

2.2.4 Paramètres numériques remarquables des syndromes myéloprolifératifs

Les syndromes myéloprolifératifs regroupent notamment la polyglobulie de Vaquez, la leucémie myéloïde chronique, la thrombocytemie essentielle et la myélofibrose primitive. Dans ces pathologies, l'analyse par cytochimie en flux n'apporte aucune information supplémentaire par rapport aux appareils dépourvus de cette technologie, exception faite peut-être de la LMC dont le cytogramme PEROX est assez remarquable. Ceci explique que ces hémopathies ne sont pas ou très peu abordées dans la bibliographie. Les canaux GR (pour la polyglobulie) et plaquettes (pour la thrombocytemie essentielle) de l'ADVIA® 2120 peuvent cependant fournir des informations intéressantes que nous ne développerons pas ici.

2.3 Exploitation des données graphiques des analyseurs pour discriminer et tenter de classer les hémopathies.

Si les biologistes et techniciens qui utilisent les appareils d'hématologie ADVIA[®] 120 ou ADVIA[®] 2120 commencent toujours leur expertise par l'analyse des cytogrammes PEROX et BASO, c'est qu'à la lecture de ceux-ci on peut détecter bon nombre d'anomalies cytologiques potentielles. Dès la mise sur le marché du Technicon[®] H6000, les chercheurs ont émis des conjectures graphiques pour mettre en évidence certaines hémopathies : à partir du cytogramme peroxydase d'abord, puis à l'aide du cytogramme basophile également avec l'avènement du canal d'analyse de la densité nucléaire.

2.3.1 Les cytogrammes comme outils de classification indépendants

Devant la multitude d'informations fournies par les cytogrammes, certains auteurs ont essayé de classer les hémopathies directement en fonction de leurs caractéristiques graphiques.

L'étude publiée en 1983 par Takubo et coll. propose une classification des leucémies aiguës myéloïdes grâce au cytogramme peroxydase de l'Hemalog D et tente d'établir une corrélation entre cette classification et la réponse thérapeutique [35].

Ces travaux s'appuient sur une précédente étude diligentée par Hirasawa qui tentait d'établir des corrélations entre le cytogramme peroxydase et la classification FAB chez 23 patients atteints de leucémie aiguë [36]. Devant les résultats insuffisants obtenus par cette étude, Takubo et coll. ont voulu stratifier leur étude en trois groupes selon l'aspect du cytogramme peroxydase et tenter d'établir des corrélations entre ces groupes et la réponse thérapeutique obtenue.

L'étude a été menée sur 71 patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes non traitées chez lesquels le pourcentage de blastes sanguins dépassait 20 %. Ces cas se répartissent en 15 LAM1, 31 LAM2, 7 LAM3, 2 LAM4, 16 LAM5 (FAB). Le traitement mis en œuvre dans le cadre de l'étude est une polychimiothérapie selon les protocoles de l'époque.

Les trois groupes définis par les auteurs ont les caractéristiques suivantes (voir fig.8) :

- Groupe 1 : activité myéloperoxydasique nulle ou très faible, pourcentage de LUC très élevé. 5 LAM1, 6 LAM2, 2 LAM5 et 1 LAM4. Taux de rémission complète : 35,7 %
- Groupe 2 : important contingent de cellules à activité myéloperoxydasique modérée et de grande taille (zone des monocytes). 3 LAM1, 4 LAM2, 10 LAM5. Taux de rémission complète : 58,8 %
- Groupe 3 : cellules à activité peroxydasique marquée, de taille moyenne, situées à droite des lymphocytes sur le cytogramme. 7 LAM1, 21 LAM2, 7 LAM3, 4 LAM5 et 1 LAM4. Taux de rémission complète : 85,0 %

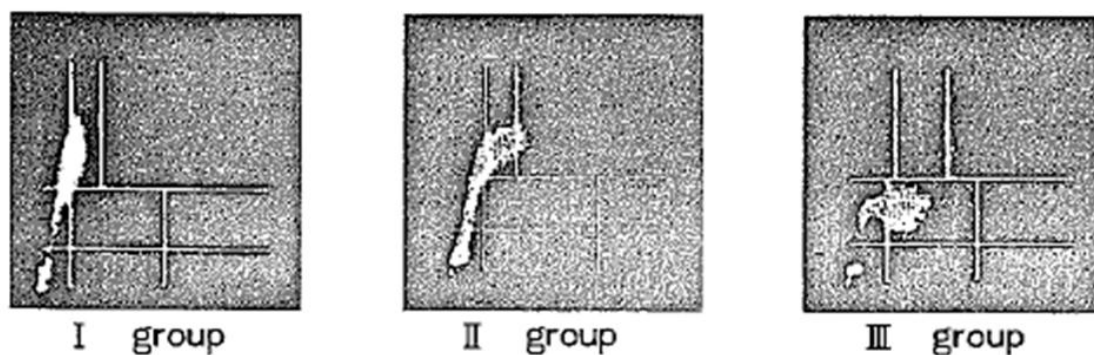


Figure 8. Cytogrammes PEROX des trois groupes défini par Takubo et coll. [36].

A travers cette classification, nous observons toute la variabilité graphique des types de LAM selon la classification FAB qui pourtant repose sur la cytologie. Un même type de LAM est souvent présent dans chacun des trois groupes graphiques.

La différence du taux de rémission complète est significative ($p < 0,005$) entre les groupes 1 et 3 uniquement. Les auteurs ont relevé des différences statistiquement significatives entre les groupes en termes de médiane de survie mais pas de durée de rémission. Bien que finalement peu fructueuse, cette étude a l'originalité de proposer une classification des leucémies myéloïdes aiguës qui découle directement du cytogramme PEROX. Elle montre indirectement, et c'est ce que nous en retiendrons, l'hétérogénéité de présentation graphique d'un même type de LAM (FAB).

Dans leur étude sur les LAL [16], Ialongo et coll. essaient de stratifier les patients en deux groupes selon un type d'anomalie du cytogramme BASO du Technicon® H1. Ils remarquent en effet une déformation de la population des cellules mononucléées dans 77 % des cas de LAL avec décalage vers la gauche du nuage de points en raison d'un nombre augmenté de noyau de faible densité. Deux déformations « types » sont observées (fig. 9) : une dite lenticulaire (10 LAL 1, 15 LAL 2 (FAB)), l'autre qualifiée de globulaire (14 LAL 1, 10 LAL 2). Ils tentent alors d'éprouver statistiquement la différence des pourcentages de LUC et de déclenchement de l'alarme « BLASTES » dans les deux groupes. La seule différence significative observée entre ces deux groupes est une augmentation des LUC dans les LAL de type 2 (FAB) à distribution lenticulaire par rapport aux LAL 2 à distribution globulaire. Au final, cette distinction inédite n'apporte rien de réellement exploitable.

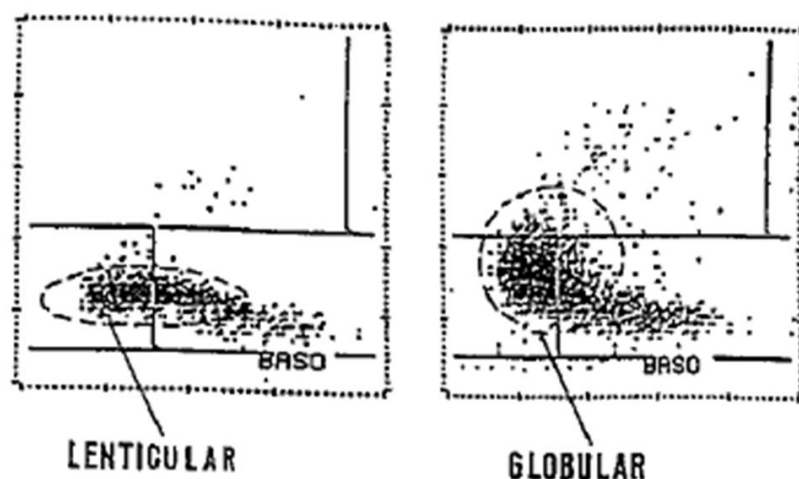


Figure 9. Déformations du cytogramme BASO dans certaines LAL [16].

2.3.2 Les cytogrammes comme aide à la classification cytologique FAB

Dès la mise à disposition des appareils de cytochimie en flux, les auteurs ont tenté d'établir des corrélations entre cytogrammes et hémopathies. Ces travaux ont été poursuivis jusqu'à définir des cytogrammes « type » pour certaines d'entre elles. Dans la plupart des cas, seul le canal peroxydase a été pris en considération. Et c'est en conséquence pour les LAM que l'on dispose du plus d'informations. Les travaux de Tsakona et coll., publiés en 1994, sont d'un grand intérêt car ils font correspondre à chaque sous type de LAM selon la classification FAB un cytogramme peroxydase caractéristique. Le sang de 40 patients atteints de leucémie aiguë y a été analysé par le

Technicon[®] H1. Les cytogrammes de chaque type (FAB) sont décrits comme suit (figure 10) [22] :

- Dans la LAM1 (2 cas) la majeure partie des blastes se situe dans la zone des LUC. Très peu de cellules ont une activité myéloperoxydasique suffisante pour pouvoir être recensées dans le secteur des polynucléaires neutrophiles.
- Dans la LAM2 (6 cas) les blastes ont une activité myéloperoxydasique supérieure à la LAM1 d'où la présence de cellules dans la zone des polynucléaires. Cependant, la zone de forte concentration cellulaire est située plus en bas à gauche que le nuage des neutrophiles sur un cytogramme normal. Cela montre que la majorité des blastes de LAM2 a une activité peroxydasique moyenne plus faible que les polynucléaires neutrophiles, bien que ces cellules de taille modérée puissent exprimer la peroxydase à des degrés très variables.
- Dans la LAM3 (4 cas) le cytogramme est tout à fait remarquable du fait de la forte concentration cellulaire en haut à droite du cytogramme qui correspond aux promyélocytes, dont la taille et l'activité peroxydasique sont très importantes.
- Dans la LAM4 (11 cas) la présence d'un contingent de cellules dans la zone des LUC correspond aux monoblastes. Les cellules situées au dessus de la zone habituelle des monocytes, à la droite des LUC sont donc de grande taille et d'activité peroxydasique faible. Il pourrait s'agir de monoblastes en cours de maturation. Les auteurs remarquent également le contingent de cellules situé dans la zone des polynucléaires neutrophiles mais situé plus en haut à droite que le nuage habituel. Il s'agirait de précurseurs granuleux, promyélocytes et myélocytes notamment. Le nombre de monocytes matures étant très réduit, la zone des monocytes est donc quasi vide. Cela donne au final au cytogramme l'apparence d'un « L inversé » que Tsakona et son équipe décrivent comme caractéristique.
- Dans la LAM5 (5 cas), l'angle entre les deux bras du « L inversé » est beaucoup moins prononcé que dans la LAM4 en raison du nombre important de monocytes matures présents dans la zone éponyme. Le bras horizontal est aussi plus court, conséquence de l'absence de cellules à forte activité peroxydasique.
- Dans l'unique LAM6 recensée dans l'étude, les cellules forment très distinctement un V

sur le cytogramme peroxydase avec deux zones de forte densité cellulaire : l'une dans les LUC et l'autre dans les neutrophiles. Tsakona y voit la manifestation de la coexistence de deux types cellulaires de morphologie totalement différente : érythroblastes et myéloblastes. Les grandes variations de taille et activité peroxydasique de ces cellules seraient responsables de la large distribution des cellules dans ces deux zones.

- Dans la LAM7 (4 cas) la zone de forte densité cellulaire est située dans la zone des neutrophiles, les blastes étant de grande taille et d'activité peroxydasique modérée. A noter que la zone des LUC reste quasiment vide.
- Enfin, dans la LAL (7 cas), la majorité des cellules se partage entre la zone des LUC et celle des lymphocytes. La présence de polynucléaires neutrophiles dans la zone éponyme donne au cytogramme peroxydase un aspect en Y assez prononcé.

Ce sont ces observations qui ont permis à l'équipe de Tsakona de dresser de manière schématique le cytogramme peroxydase attendu dans les différentes leucémies qu'il a étudiées (fig. 10). Ces travaux viennent contredire ceux de Krause et coll. dont la conclusion est qu'à l'exception de la LAM3, les LAM ne peuvent pas être différenciées par leur cytogramme peroxydase

Tsakona et coll. donnent également une précision très importante : ils estiment qu'il faut un minimum de 5 G/L de leucocytes pour que les cytogrammes soient interprétables. Ils ajoutent que plus le nombre de blastes sanguins est élevé, plus les cytogrammes sont caractéristiques. Ils expliquent que les leucémies dont la leucocytose est supérieure à 20 G/L donnent toujours des cytogrammes remarquables, même lorsque le pourcentage de blastes sanguins est faible. Nous pouvons toutefois leur objecter qu'il est peu probable qu'une leucémie aiguë dont la leucocytose est importante ait un faible pourcentage de blastes.

Bien que réalisée sur des effectifs faibles, cette étude a ouvert la voie aux tentatives de conjectures graphiques des hémopathies à partir des cytogrammes fournis par les appareils de cytochimie en flux. C'est en partie grâce à ces avancées que d'Onofrio a pu tenter d'établir un outil d'orientation diagnostique à partir des cytogrammes PEROX et BASO, le PANDA.

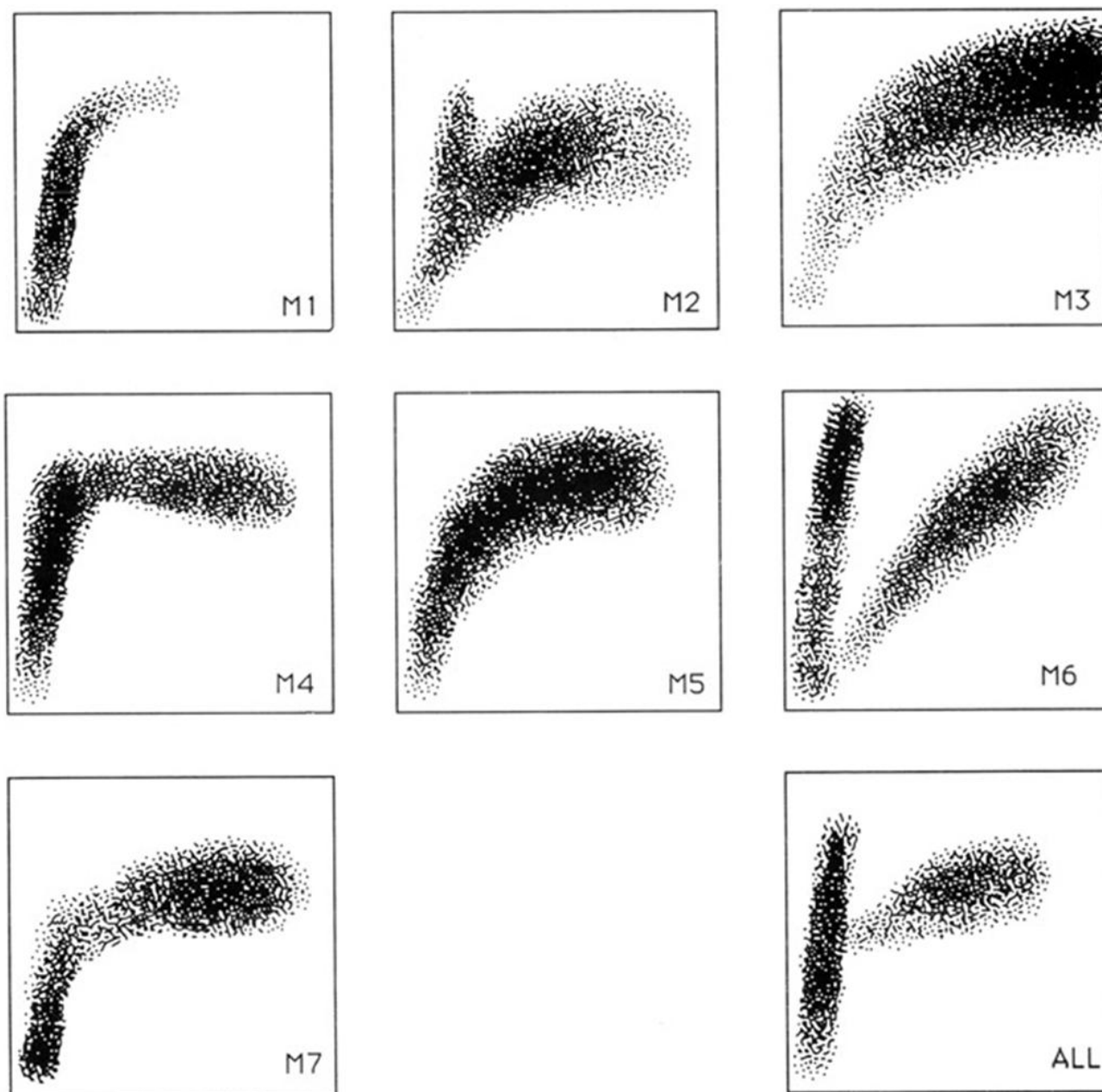


Figure 10. Représentation schématique des cytogrammes PEROX dans les différents types de leucémies aiguës (FAB).

2.3.3 Le PANDA

En 2001, Giuseppe d'Onofrio publie les résultats d'une étude [37] qui permet une détermination graphique des hémopathies malignes qu'il nomme PANDA (Peroxydase Activity and Nuclear Density Analysis). Il définit trois types de cytogrammes BASO et sept types de cytogrammes PEROX dont la combinaison va permettre de préciser la nature de l'hémopathie. En

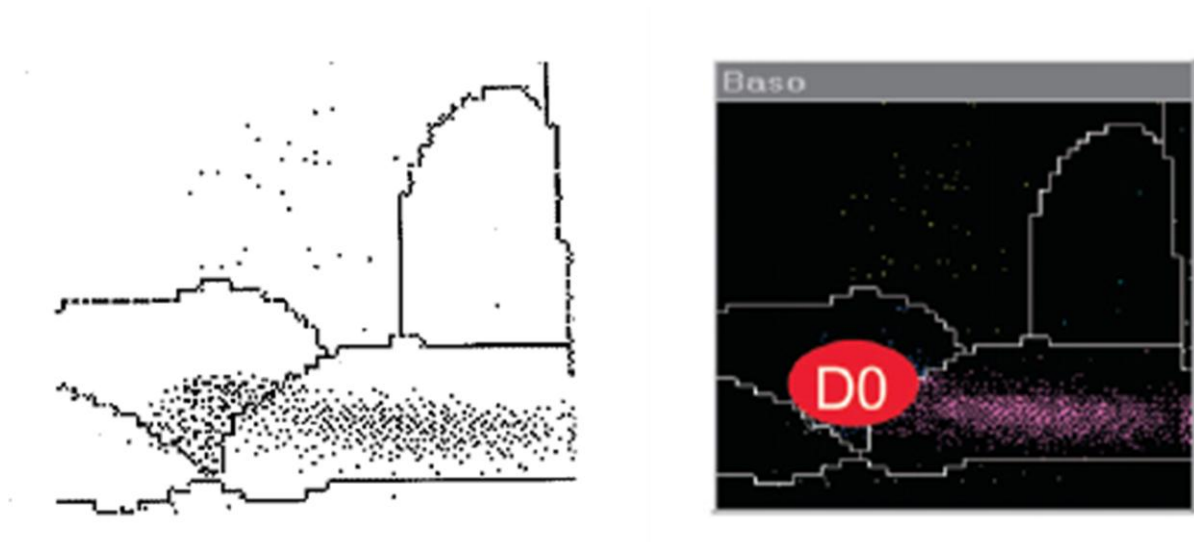
réalité, cette classification ne porte quasiment que sur les leucémies, lesquelles représentent d'ailleurs la presque totalité des cas étudiés.

Pour décrire une hémopathie leucocytaire, d'Onofrio reprend une démarche intellectuelle simple en deux étapes. La première consiste à déterminer s'il s'agit d'une forme aiguë (donc blastique) ou chronique. Pour ce faire, il exploite les données fournies par le canal basophile. La seconde permet de préciser la nature lymphoïde ou myéloïde de la prolifération maligne : il utilise pour cela le cytogramme peroxydase.

2.3.3.1 Les trois types de cytogramme BASO

A partir du canal d'analyse de la densité nucléaire, d'Onofrio définit trois cytogrammes types appelés D0, D1 et D2.

Le type D0 (fig. 11) correspond à un cytogramme dont la partie gauche, celle des cellules mononucléées, a une forme habituelle et témoigne de la maturité des cellules analysées. Ce type d'image est rencontré dans les hémopathies non blastiques (syndromes lymphoprolifératifs, LMC, lymphocytose virale, très rarement LAL à petits blastes) ou d'une déficience en MPO.



Le type D1 (fig. 12) correspond à un cytogramme dont la population des cellules mononucléées est déviée vers la zone des blastes, en bas à gauche du graphe basophile. Cette anomalie déclenche l'alarme « BLASTES » de l'appareil, signant la présence de cellules à chromatine immature. Cette déformation est évocatrice d'une leucémie aiguë, d'une LMC en acutisation ou d'un lymphome de haut grade de malignité.

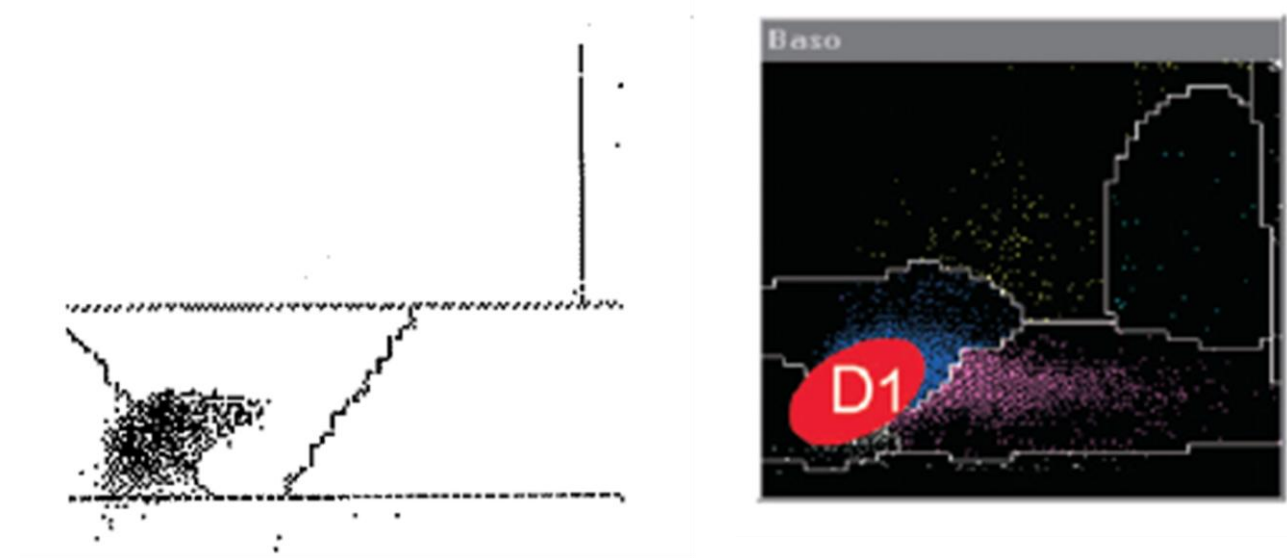


Figure 12. Exemple de cytogrammes BASO de type D1 [5, 37].

Le type D2 (fig. 13) correspond à un cytogramme dont la population des cellules mononucléées est déviée vers le haut, indiquant la présence de grandes cellules à chromatine hétérogène. Cela est évocateur d'un syndrome mononucléosique, en particulier d'une mononucléose infectieuse (MNI).

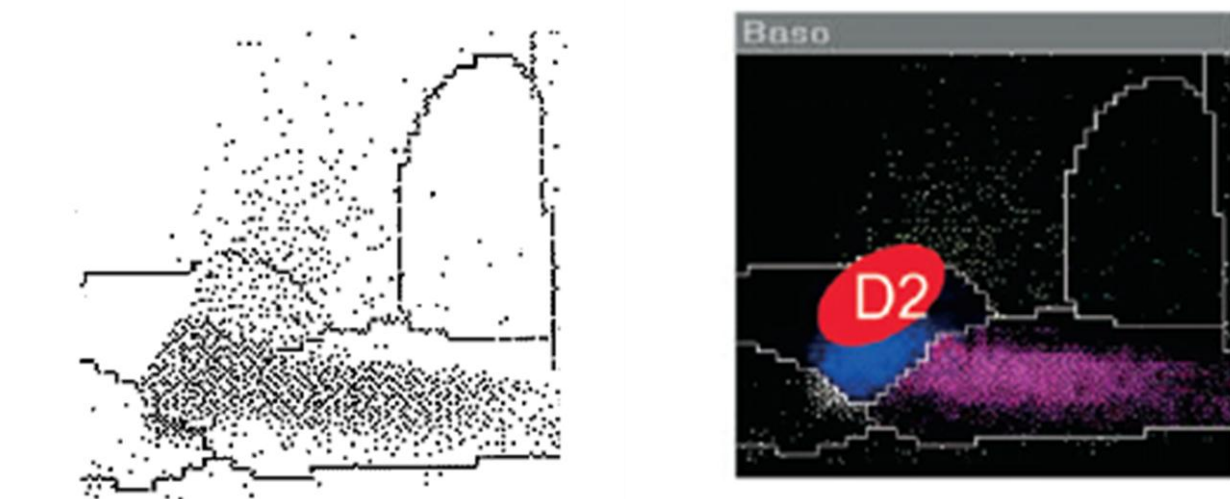


Figure 13 Exemple de cytogrammes BASO de type D2 [5, 37]

2.3.3.2 Les sept types de cytogramme PEROX

A partir du canal peroxydase, sept catégories sont définies en fonction de la position des nuages de points : P0, P1, P2, P3, P4, P5 et P6.

P0 (fig. 14) correspond à un cytogramme dont les cellules malignes ne possèdent aucune activité peroxydasique et donc aucune différenciation granuleuse. Le pourcentage de LUC y est élevé. Cela évoque une LAL, une LLC, un lymphome en phase leucémique, un syndrome mononucléosique, une LAM0, une LAM5a, une LAM6, une LAM7 (FAB) ou encore une déficience complète en MPO.

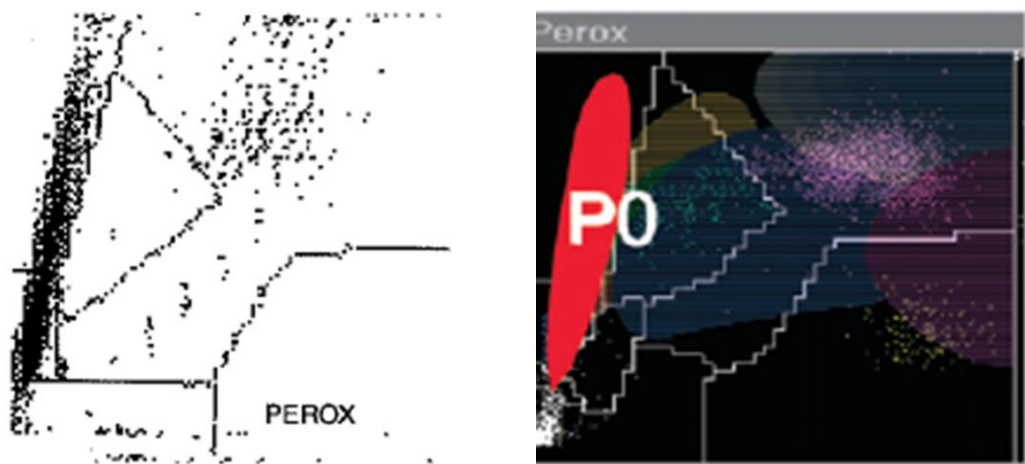


Figure 14. Exemple de cytogrammes PEROX de type P0 [5, 37].

P1 (fig. 15) correspond à un cytogramme dont une faible proportion des cellules de grande taille possède une activité myéloperoxydasique, laissant entrevoir un début de différenciation granuleuse ou une différenciation partielle. Cette catégorie est évocatrice d'une LAM1, d'une LAM2 ou d'une LAM5 (FAB).

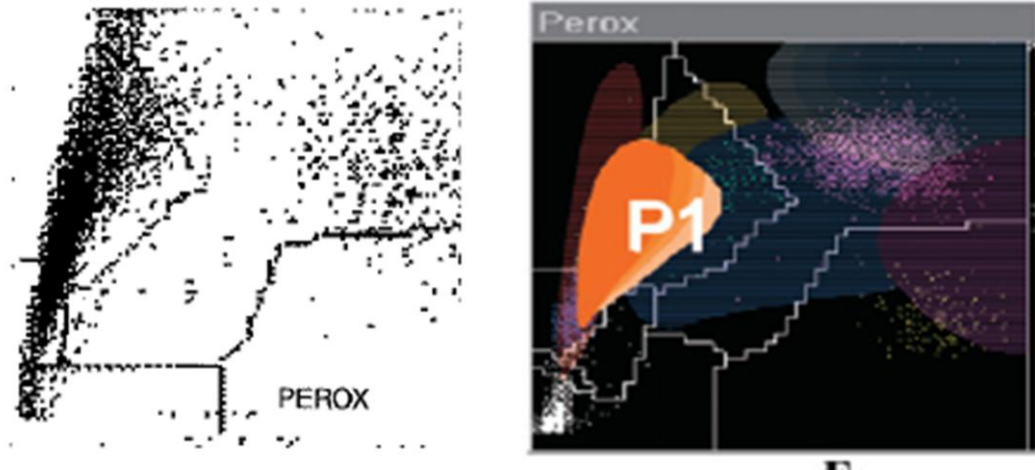


Figure 15. Exemple de cytogrammes PEROX de type P1 [5, 37]

P2 (fig. 16) correspond à un cytogramme dont un nuage de cellules se détache distinctement de la population des LUC et se positionne autour de la zone des monocytes, à la limite gauche de la zone des polynucléaires neutrophiles. Ce type de graphe est évocateur d'une LAM1, d'une LAM2, d'une LAM4, d'une LAM5 (FAB) ou d'une déficience partielle en MPO.

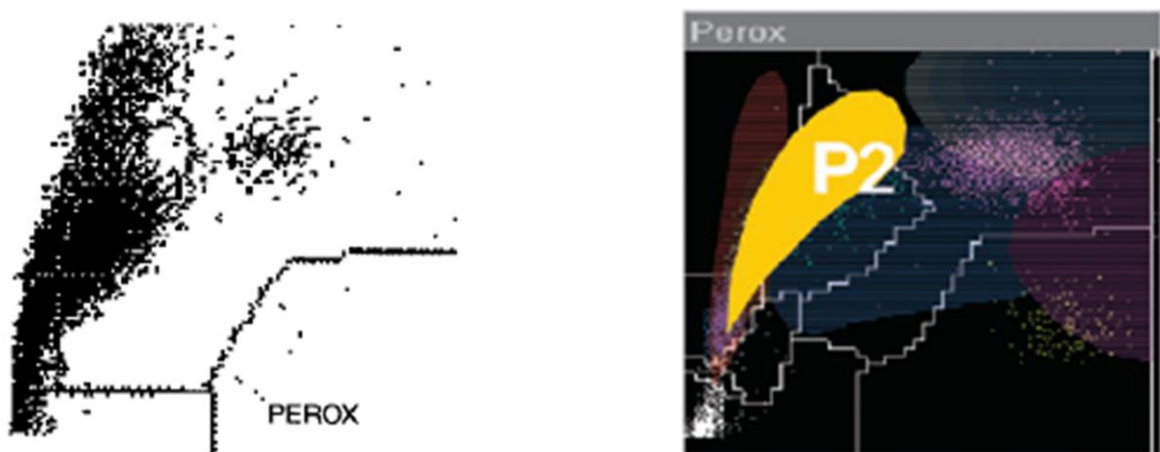


Figure 16. Exemple de cytogrammes PEROX de type P2 [5, 37]

P3 (fig. 17) correspond à un cytogramme où les cellules qui prolifèrent possèdent une activité peroxydasique modérée à forte et ont une taille homogène, situées dans la zone des monocytes et des polynucléaires neutrophiles. Cette configuration évoque une LAM2 ou une LAM4 (FAB).

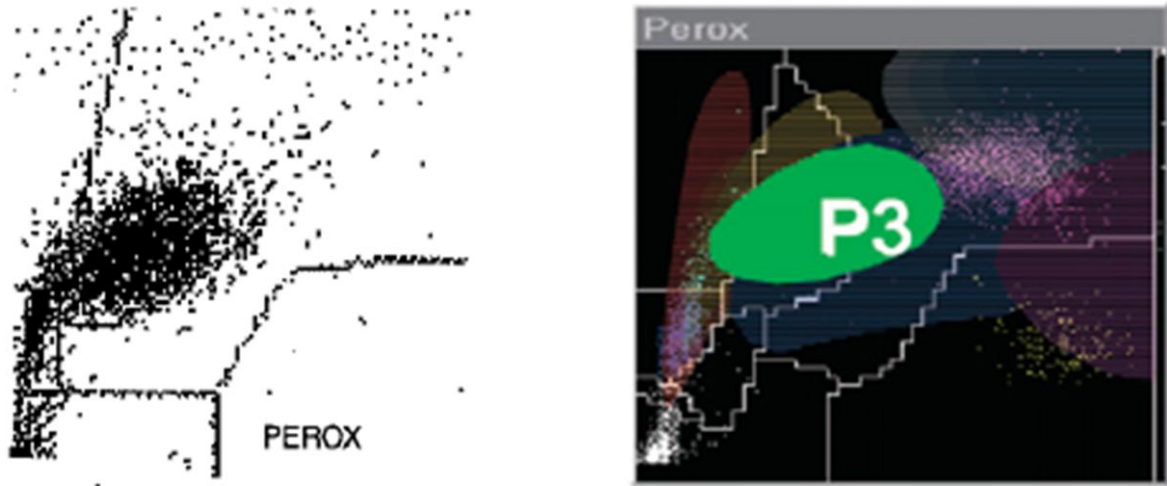


Figure 17. Exemple de cytogrammes PEROX de type P3 [5, 37]

P4 (fig. 18) correspond à un cytogramme où les cellules pathologiques possèdent une activité peroxydasique forte et hétérogène, situées transversalement dans la zone des monocytes et des polynucléaires. Cela oriente plutôt vers une LMC, une LAM2 ou une LAM4 (FAB).

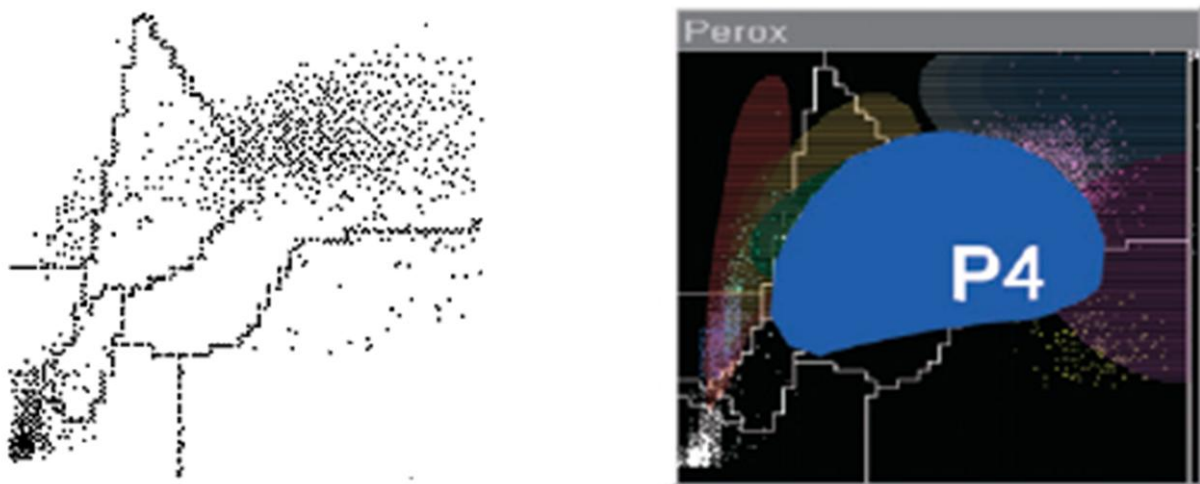


Figure 18. Exemple de cytogrammes PEROX de type P4 [5, 37]

P5 (fig. 19) correspond à un cytogramme qui objective la présence de très grandes cellules à forte activité myéloperoxydasique. Cela évoque un syndrome myélodysplasique, une LMC, une LAM3 variant microgranulaire (FAB).

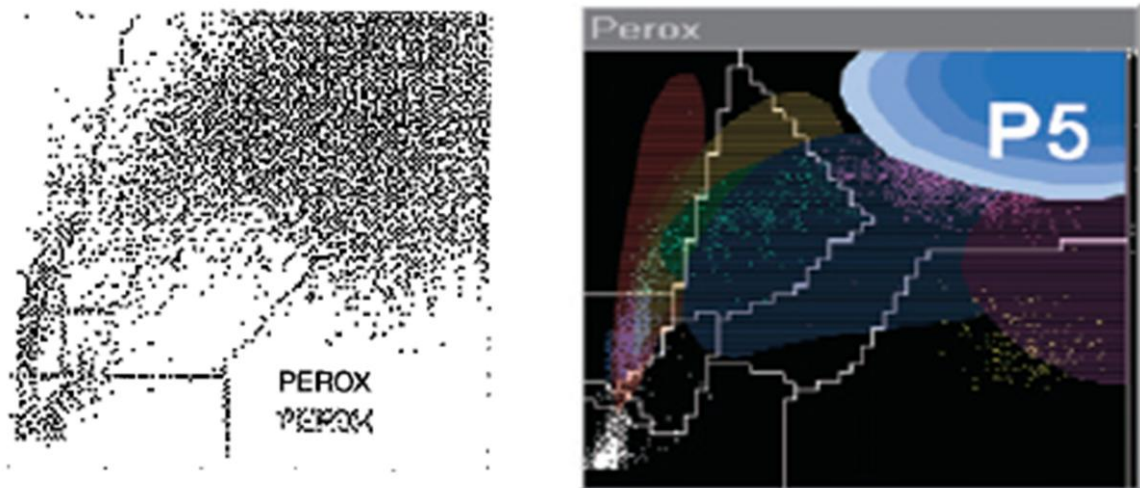


Figure 19. Exemple de cytogrammes PEROX de type P5 [5, 37]

P6 (fig. 20) correspond à un cytogramme dont les cellules malignes possèdent une activité peroxydasique extrêmement importante. Il est très évocateur d'une LAM3.

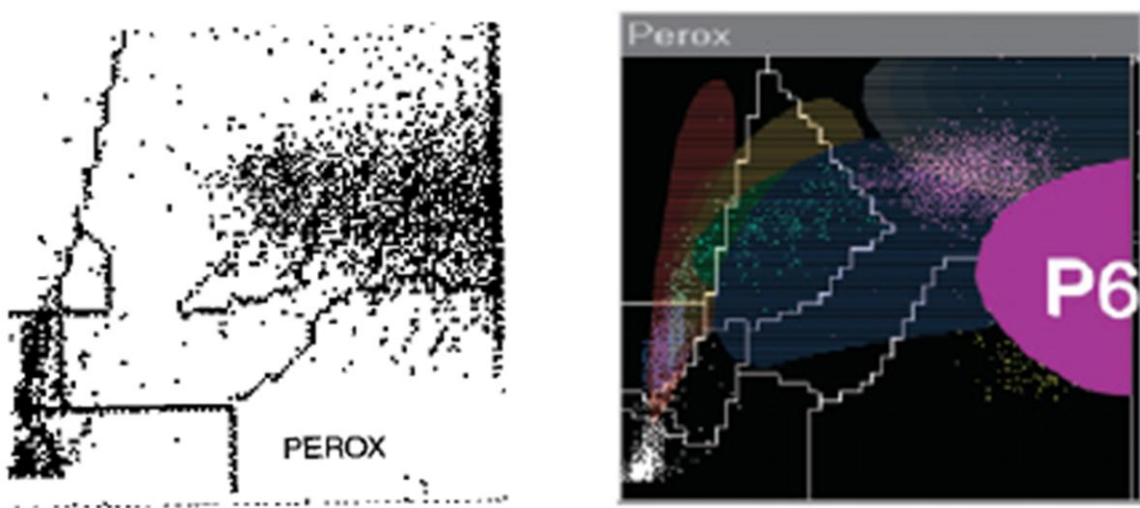



Figure 20. Exemple de cytogrammes PEROX de type P6 [5, 37]

2.3.3.3 Utilisation de la grille de classification PANDA

La combinaison des informations des canaux BASO et PEROX permet d'orienter la classification pathologique d'après la grille de classification PANDA (tableau 19). Nous remarquons qu'une même hémopathie peut relever de plusieurs catégories graphiques, ce qui semble judicieux au vu de la variété de présentation d'une même pathologie relevée précédemment [35]. Par exemple, une LAM de type 2 (FAB) peut être évoquée en présence des cytogrammes P1, P2, P3 ou P4 associés au cytogramme D1. Nous remarquons également que pour certaines combinaisons, par exemple D1-P0, la gamme d'hémopathie envisagée est très vaste : cette configuration est en effet compatible avec une LAL, un LNH ou une LAM de type 0, 5a, 6 ou 7 (FAB). Le PANDA est donc une méthode de pré-classification des hémopathies mais ne peut en aucun cas se substituer à la démarche diagnostique traditionnelle.



	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
D0	LLC, LPL, HCL, LAL (L1-L3) Déficit total en MPO	Déficit sévère en MPO	Déficit partiel en MPO	LMC	LMC	SIDA SMD LMMC	
D1	LAL (L1-L3), LMNH, LAMO, LAM5a, LAM6, LAM7	LAM1 LAM5a LAM2 LAM4	LAM2 LAM4 LAM5a LAM5b LAM1	LAM2 LAM4 LMC en acutisation	LAM2 LAM3v LAM4	LAM3v LMC atyp.	LAM3
D2	MNI Syndrome viral						

Tableau 19. Grille de classification d'après la méthode PANDA [37]

Pathologie	Effectif	Nombre de cas où la classification concorde	Efficacité (%)
LAM	42	40	97,6
LAL	37	30	81,1
LMC	19	19	100
LMC en acutisation	6	4	66,7
SLP	45	45	100
MNI	17	15	88,1
Myélobiose primitive	14	11	81,1
Total	180	164	91,1

Tableau 20. Evaluation de l'efficacité de la méthode PANDA [37]

Dans sa publication, d'Onofrio éprouve sa méthode en l'appliquant au classement des hémopathies qu'il avait étudiées dans des travaux précédents à l'aide du Technicon[®] H3 et arrive à une concordance globale de 91,1 % sur les 180 cas envisagés (tableau 20). Nous ne sommes pas parvenus à comprendre comment d'Onofrio a pu évaluer l'efficacité de sa méthode sur la myélobiose primitive alors qu'elle ne fait pas partie des pathologies envisagées dans le PANDA.

Ces bons résultats permettent à d'Onofrio de proposer sa méthode comme une aide préalable à l'examen microscopique de frottis sanguins et comme outil permettant une meilleure sélection des anticorps monoclonaux à utiliser dans le phénotypage des leucémies. Il espère la création d'un logiciel qui permettrait la reconnaissance automatique et le tri des différents cytogrammes pathologiques dans les catégories D et P, aboutissant au final à un véritable système d'expertise pré-diagnostique PANDA. C'est dans ce sens que d'Onofrio et Zini ont tenté de développer des systèmes de « réseaux neuronaux » [38] qui assimilent simultanément les données numériques et graphiques (comme celles du PANDA) des ADVIA[®] afin d'orienter précisément le diagnostic à partir des résultats de l'hémogramme. Présentés en 2005 comme très encourageants [39], testés sur 1000 patients, les résultats de cette recherche ne sont actuellement toujours pas connus. Il semblerait donc que le projet se soit heurté à des difficultés. Il existe un précédent avec une intégration informatique des paramètres érythrocytaires par des réseaux neuronaux. Les résultats de la méthode étaient pourtant concluants, notamment pour la pré-classification des hémoglobinoopathies [40] mais l'outil n'a jamais été utilisé en pratique courante.

2.3.3.4 Performances de la grille de pré-classification PANDA

En 2005, Gibbs publie les résultats d'une étude [41] où il teste les performances de la pré-classification PANDA par analyse rétrospective de 140 cytogrammes anormaux sur ADVIA[®] 120. Parmi les cas étudiés, 18 LAM dont 17 ont été reconnues comme telles. Les sous-types de LAM (FAB) ont été correctement classés à l'exception de deux LAM1 suspectées d'être des LAM2 ou LAM4. Pour l'auteur, le PANDA est efficace pour mettre en évidence une LAM mais beaucoup moins pour en donner la sous-classe FAB (du fait des catégories où l'on peut trouver plusieurs LAM).

Gibbs constate que les huit LNH de bas grade de sa cohorte ont des profils de LLC (D0-P0) pour six d'entre eux et des profils de type D1-P0 pour les deux autres. Cela va plutôt à l'encontre du PANDA qui classe les lymphomes dans la catégorie D1-P0. Précisons toutefois que les LNH envisagés par le PANDA sont des lymphomes de haut grade de malignité dont la moins grande maturité des lymphocytes pourrait expliquer cette différence.

SMD, LMMC, SMP et myélofibrose, non pris en compte par d'Onofrio, ont des profils plus variables : D0-P3, D0-P4 ou D0-P5 voire D1 lorsqu'il existe un excès de blastes.

Sur les quinze syndromes mononucléosiques rencontrés, douze ont été classés correctement (D2-P0) mais trois avaient un cytogramme basophile normal (D0-P0). L'auteur précise également que trois patients avaient un myélome leucémique (hémopathie non envisagée dans la classification PANDA) et que dans les trois cas le cytogramme était de type D1-P0.

Au final, la classification PANDA est correcte à 77,8 % dans cette étude. Ce pourcentage augmente même à 93,8 si l'on retire les pathologies non étudiées par d'Onofrio (myélome, LMMC, SMP autres que LMC, lymphomes de bas grade). Ces résultats confirment donc ceux de d'Onofrio ainsi que l'utilité du PANDA dans la mise en évidence des leucémies aiguës et chroniques.

Partie 3

**Exploitation des données fournies par
l'ADVIA[®] 2120 du laboratoire d'hématologie
du CHU Nancy.**

Etude de 213 cas d'hémopathies

3.1 Matériels, méthodes et objectifs de notre étude

Le but de notre étude est de tester les performances de l'ADVIA® 2120 dans le diagnostic biologique des hémopathies et de confronter nos résultats avec les résultats obtenus dans les travaux détaillés auparavant.

Notre travail porte sur une cohorte de 213 patients dont le diagnostic d'hémopathie a été fait au CHU de Nancy entre septembre 2006 et juin 2009. Ces patients étaient hospitalisés à l'hôpital de Brabois du CHU de Nancy pour la plupart, une minorité provenant d'hôpitaux périphériques d'où les lames et échantillons biologiques ont été envoyés au service d'hématologie biologique pour expertise. Nous avons rassemblé les résultats d'héogrammes de 213 patients effectués au moment du diagnostic ; pour chaque échantillon de sang veineux périphérique nous avons conservé les données « brutes » (ou « *raw data* ») fournies par l'ADVIA® 2120 et les résultats de la formule microscopique réalisée par les techniciennes expérimentées du secteur de cytologie du laboratoire, sous la responsabilité des biologistes. Nous disposons la plupart du temps du frottis sanguin correspondant coloré au MGG. La consultation des résultats des myélogrammes et des immunophénotypages ainsi que des recherches auprès du service d'anatomo-pathologie du CHU de Nancy nous ont permis de déterminer avec précision et exactitude la nature de ces hémopathies.

Quelques précisions méthodologiques toutefois :

- Cette étude ne recense pas toutes les hémopathies diagnostiquées au CHU de Nancy durant la période des travaux, loin s'en faut. Il n'y a pas eu de tri ou de choix pour la sélection des patients, les dossiers ont été récupérés par les techniciennes du secteur de cytométrie en flux lors des demandes d'immunophénotypage ou par le Dr. Salignac lorsqu'il avait connaissance d'une nouvelle hémopathie.
- Cette étude n'est pas représentative de la prévalence des hémopathies malignes au diagnostic. D'une part, seules les pathologies s'accompagnant d'un passage des cellules anormales dans la circulation systémique sont ici considérées. C'est pourquoi des hémopathies comme le myélome par exemple y sont largement sous représentées. D'autre part, certaines catégories trop peu représentées qui présentaient un intérêt particulier au niveau de notre travail ont été complétées à partir des

données dont nous disposions. Par exemple, pour les leucémies à tricholeucocytes, l'effectif de patients a été complété à partir du fichier des immunophénotypes.

- Les patients pour lesquels nous ne disposions pas des renseignements suffisants pour établir avec certitude la nature de la pathologie n'ont pu être retenus dans cette étude.
- Le service d'hématologie biologique du CHU de Nancy dispose de deux appareils ADVIA[®] 2120 paramétrés à l'identique dont la concordance est vérifiée régulièrement. Les « *raw data* » analysées proviennent indifféremment de l'un ou l'autre analyseur.

Les 213 cas étudiés se répartissent comme suit :

- 75 leucémies aiguës myéloïdes : 3 LAM0, 21 LAM1, 14 LAM2, 12 LAM3, 7 LAM4, 16 LAM5, 1 LAM6, 1 LAM7 (FAB)
- 39 leucémies aiguës lymphoïdes : 20 LAL1, 19 LAL2 (FAB)
- 2 leucémies aiguës biphénotypiques (Labi)
- 1 leucémie aiguë indifférenciée (LAI)
- 30 leucémies lymphoïdes chroniques (LLC)
- 18 lymphomes non hodgkiniens (LNH) : 7 lymphomes du manteau, 3 lymphomes folliculaires, 3 lymphomes spléniques à lymphocytes villeux, 2 lymphomes de Sezary, 3 lymphomes B diffus à grandes cellules
- 5 leucémies prolymphocytaires (LPL)
- 13 leucémies à tricholeucocytes (LTL)
- 3 myélomes à plasmocytes circulants (MPC) et 3 leucémies à plasmocytes (LP)

- 2 leucémies myéloïdes chroniques (LMC) en transformation leucémique aiguë
- 1 polyglobulie de Vaquez en acutisation leucémique
- 1 thrombocytémie essentielle (TE)
- 2 anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB)
- 2 leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC)
- 16 syndromes mononucléosiques (SMN)

3.2 Etude de la sensibilité/spécificité des alarmes des alarmes morphologiques

3.2.1 Les alarmes, pierres angulaires de l'automatisation

Les alarmes sont les garde-fous de la cytologie hématologique automatisée. En effet, elles occupent un rôle central dans la décision de réaliser ou non un frottis sanguin coloré en vue de l'examen microscopique. D'autres critères participent à cette décision : les anomalies quantitatives (leucopénie et/ou thrombopénie sévères notamment) ou en cas de demande expresse du prescripteur pour les patients considérés à risque. A noter qu'au CHU de Nancy, la formule leucocytaire manuelle au microscope est systématique pour les patients pris en charge par les services d'hématologie clinique adulte et pédiatrique.

L'objectif des alarmes en termes de performance est donc d'avoir la sensibilité la plus proche de 100 % afin qu'aucun échantillon sanguin contenant des cellules anormales ne puisse passer entre les mailles du filet de détection. Il s'agit également de garder une spécificité convenable afin de ne pas engendrer la réalisation de lames à tout va. Lorsque les alarmes sont prises en défaut, en l'absence d'anomalie quantitative, les cellules malignes ne sont pas mises en évidence et cela peut

occasionner un retard au diagnostic particulièrement délétère dans ce type de pathologie. Nous allons donc y porter une grande attention.

3.2.2 Performances globales de l'alarme « BLASTES »

Parmi les alarmes morphologiques qui commandent un examen microscopique, l'alarme « BLASTES » est sans doute la plus importante. Le tableau 21 rapporte les performances de l'alarme « BLASTES » *sensu stricto*. Nous avons inclus dans les hémopathies blastiques les deux cas de syndrome de Richter ainsi qu'un cas de lymphome immunoblastique.

	Hémopathies blastiques*	Hémopathies non blastiques	TOTAL
Alarme « BLASTES » déclenchée	110	37	147
Alarme « BLASTES » non déclenchée	16	50	66
TOTAL	126	87	213

Tableau 21. Déclenchement de l'alarme « BLASTES » parmi les échantillons sanguins analysés.

* : hémopathies dans lesquelles le pourcentage de myéloblastes, lymphoblastes, blastes indifférenciés ou immunoblastes est supérieur ou égal à 1.

La sensibilité globale de l'alarme « BLASTES » dans notre étude est de 87,3 % et sa spécificité de 57,5 %. Ces performances en matière de sensibilité sont assez similaires à celles relevées dans les études de Krause [14] Dorfman [18] et Kline [15] mais inférieures à celles annoncées par d'Onofrio en 1987 [11]. La valeur prédictive positive de cette alarme est ici de 74,8 %, sa valeur prédictive négative de 75,8 %.

Une comparaison entre leucémies myéloblastiques et lymphoblastiques montre qu'il existe une différence statistiquement significative entre le déclenchement de l'alarme « BLASTES » dans

les LAL et dans les LAM (test du « chi-deux », $p < 0,01$). Cette différence est en faveur d'une acuité plus importante de l'alarme « BLASTES » dans les LAM que dans les LAL (voir tableau 22). Conformément à ce qui a été décrit, c'est dans les LAL de type 1 (FAB) que l'alarme est le plus souvent prise en défaut. Toutefois, la différence observée entre LAL 1 et LAL 2 n'est pas suffisante pour être statistiquement significative (test du « chi-deux », $p = 0,29$).

	LAM	LAL		Autres hémopathies blastiques
		LAL1	LAL2	
Alarme « BLASTES » déclenchée	68	12	16	14
Alarme « BLASTES » non déclenchée	5	8	3	0
TOTAL	73	20	19	14
		39		

Tableau 22. Déclenchement de l'alarme « BLASTES » dans les hémopathies blastiques.

3.2.3 Les alarmes morphologiques dans les LAM

Sur les 75 cas de LAM recensés, 73 ont des blastes circulants selon l'examen microscopique et 68 d'entre eux ont été signalés par l'alarme « BLASTES » (tableau 22). Les deux échantillons non blastiques proviennent de patients atteints de LAM3 (FAB) cytopéniques sans passage sanguin des blastes médullaires. La sensibilité de l'alarme « BLASTES » dans les LAM est donc de 93,2 %. A l'examen des cinq faux négatifs (tableau 23), nous ne pouvons dégager aucune tendance concernant un ou plusieurs sous-types de LAM (FAB). Le pourcentage de blastes à l'examen microscopique de ces cinq cas est compris entre moins de 1 % et 23 %.

	Type de LAM	Numération leucocytaire (G/L)	Pourcentage de blastes à l'examen microscopique	Alarme « GI »
Patient 1	LAM1	0,92	4	non
Patient 2	LAM1	1,20	23	+++
Patient 3	LAM2	1,98	5	non
Patient 4	LAM3	0,68	8	+++
Patient 5	LAM3	1,55	< 1	Non

Tableau 23. Données biologiques des cinq patients « faux négatifs » pour l'alarme « BLASTES »

Il apparaît clairement que tous les échantillons sanguins faussement négatifs sont cytopéniques avec, de surcroît, un faible pourcentage de blastes pour quatre d'entre eux. Rappelons que le déclenchement de l'alarme « BLASTES » est conditionné par la présence de plus de 5 % des évènements dans la zone correspondante du cytogramme BASO ou par un pourcentage de blastes compris entre 1,5 et 5 accompagné d'une élévation des LUC à plus de 4,5 %. Il est donc aisément compréhensible que les trois patients dont la proportion de blastes sanguins est inférieure ou égale à 5 % n'aient pas été détectés.

Nous devons néanmoins signaler qu'à *contrario*, 2 LAM2 (FAB) avec des pourcentages de blastes respectifs de 2 et 3 % ont déclenché l'alarme « BLASTES ». L'échantillon avec 2 % de blastes compte 4,64 G/L de leucocytes tandis que celui avec 3 % est fortement cytopénique avec seulement 0,64 G/L de leucocytes. Ces deux derniers exemples montrent que de faibles proportions de blastes peuvent être détectées par l'appareil, même en cas de cytopénie(s) intense(s). En consultant les tables de Rümke, nous pouvons cependant émettre quelques réserves sur l'exactitude du pourcentage de blastes déterminé au microscope dans les échantillons sanguins leucopéniques car la formule y est le plus souvent réalisée sur 50 cellules. Dès lors, l'incertitude statistique demeure très importante sachant que lorsque l'observation est réalisée sur 100 cellules, 3 % de blastes peuvent correspondre à une proportion réelle de 0,6 à 8,5 %.

Globalement, il ressort que l'alarme « BLASTES » est quasi-infaillible dans les LAM quand il y a conjonction d'un pourcentage de blastes élevé et d'une hyperleucocytose. Les cas de leucopénie et les faibles pourcentages de blastes, à plus forte raison les deux simultanément, déclenchent de façon plus aléatoire cette alarme.

Nous devons toutefois tempérer ce constat ; l'alarme « BLASTES » n'est pas la seule qui motive la réalisation d'un frottis sanguin après analyse par l'ADVIA® 2120. En effet, la présence de l'alarme signalant des lymphocytes atypiques ou des granuleux immatures commande également la confection d'une lame en vue d'un examen microscopique. Si l'alarme « ATYP », liée au nombre de LUC, est de moindre intérêt dans les LAM où les blastes expriment la peroxydase, l'alarme « GI » est plus pertinente. Or on constate que parmi les cinq faux négatifs de l'alarme « BLASTES », les deux dont le pourcentage de blastes était supérieur à 5 % ont déclenché l'alarme « GI » (tableau 23). Au final, seules trois LAM avec blastes circulants sont passées entre les mailles des différentes alarmes morphologiques. Cela correspond à une sensibilité cumulée des alarmes « BLASTES » et/ou « GI » de 95,9 %.

Pour les trois cas sans alarme morphologique, le pourcentage de blastes ne dépasse pas 5 % et il y a une leucopénie très importante. La leucopénie étant par elle même un critère de décision pouvant motiver la réalisation d'une lame, ces trois échantillons doivent systématiquement faire l'objet d'un examen microscopique en l'absence d'antécédent récent connu (voir conditions de réalisation des lames propres à chaque laboratoire).

En conclusion, les alarmes « BLASTES » et/ou « GI » affichent une sensibilité cumulée de 95,9 % parmi les LAM, ce qui est un très bon résultat. La prudence reste toutefois de mise devant les cas de leucopénies blastiques qui peuvent passer inaperçu, à plus forte raison lorsque le pourcentage de blastes est faible.

3.2.4 Les alarmes morphologiques dans les LAL

Dans les LAL, l'alarme « ATYP », liée à la présence de cellules de grande taille sans activité peroxydasique ou LUC, est à considérer au même titre que l'alarme « BLASTES ». L'alarme « BLASTES » prise isolément s'y révèle moins performante que dans les LAM : sur les 39 échantillons, tous blastiques, seuls 28 ont déclenché l'alarme « BLASTES », ce qui correspond à une sensibilité de 71,8 %. Avec 28,2 % de faux négatifs parmi les patients atteints de LAL, nous arrivons à des niveaux proches de ceux mis en évidence dans l'étude de Fernandez-Castro et Vilora [17] qui estimaient la sensibilité de l'alarme « BLASTES » seule à 66,4 % dans les 85 cas de LAL recensés. Cette sensibilité médiocre est principalement due à la difficulté par l'appareil à reconnaître

les petits lymphoblastes à chromatine moins relâchée comme ceux de la LAL de type 1 (FAB). Logiquement, l'ADVIA® 2120 a mieux détecté les blastes circulants dans la LAL2 (16/19 soit 84,2 %) que dans la LAL1 (12/20 soit 60 %). Le tableau 24 fait l'inventaire des onze cas faussement négatifs.

	Type de LAL (FAB)	GB (G/L)	Blastes (%) à la formule microscopique	Lymphocytes (%) selon l'ADVIA® 2120	Alarme « ATYP »
Patient 1	LAL1	9,59	67	75,70	non
Patient 2	LAL1	7,23	45	74,69	+++
Patient 3	LAL1	4,59	17	81,92	non
Patient 4	LAL1	2,42	5	63,22	non
Patient 5	LAL1	3,36	5	81,25	non
Patient 6	LAL1	6,38	7	27,43	non
Patient 7	LAL1	15,83	80	77,45	++
Patient 8	LAL1	19,01	55	90,95	non
Patient 9	LAL2	4,03	50	76,92	non
Patient 10	LAL2	2,69	10	83,64	+
Patient 11	LAL2	6,38	14	63,48	+++

Tableau 24. Données biologiques des onze patients « faux négatifs » pour l'alarme « BLASTES »

La sensibilité cumulée des alarmes morphologiques « BLASTES » et/ou « ATYP » est donc de 82,1 % (70 % pour les LAL1, 94,7 % pour les LAL2 (FAB)). Même associées, ces deux alarmes restent trop faillibles pour représenter un maillage efficace dans la mise en évidence des blastes de LAL.

Contrairement aux LAM où elles n'ont été prises à défaut que dans les leucopénies et les faibles proportions de blastes, ces alarmes ne sont pas parvenues à détecter une blastose sanguine relative de 55 % accompagnée d'une leucocytose à 19 G/L (patient 8, fig. 21). Pour comparaison, nous joignons un cliché du frottis d'un patient de notre étude atteint de LAL2 (FAB) avec 96 % de

blastés (fig. 22).

La consultation des pourcentages de lymphocytes rendus par l'appareil montre que certains lymphoblastes ont été recensés comme des lymphocytes. Si ce phénomène est explicable d'après la morphologie des lymphoblastes de LAL1, l'argument est beaucoup moins recevable pour le patient 9, atteint d'une LAL2 avec 50% de blastés sans leucopénie, qui n'a déclenché aucune alarme morphologique.

La situation est plus problématique ici que pour les cas de LAM cytopéniques envisagés précédemment : en l'absence d'alarme morphologique et de critère quantitatif, il est évident que ces échantillons auraient échappé à un examen microscopique sans demande expresse du prescripteur, chose rare en laboratoire de ville.

Nous pouvons remarquer que dix des onze cas où l'alarme « BLASTES » ne s'est pas déclenchée s'accompagnent de ce que l'on appelait autrefois une « inversion de formule », c'est à dire d'un pourcentage de lymphocytes supérieur au pourcentage de polynucléaires neutrophiles (et même ici supérieur à 50 %). En raison des performances médiocres des alarmes morphologiques de l'ADVIA® 2120 dans les LAL, il convient de porter une attention particulière aux échantillons sanguins pour lesquels l'appareil met en évidence une lymphocytose relative et de réaliser une lame lorsque le patient n'est pas connu ou que les antécédents ne présentent pas cette anomalie. Cette précaution n'est pourtant pas des plus aisées à mettre en œuvre, notamment dans les laboratoires travaillant avec des services de pédiatrie : chez l'enfant, « l'inversion de formule » est physiologique.

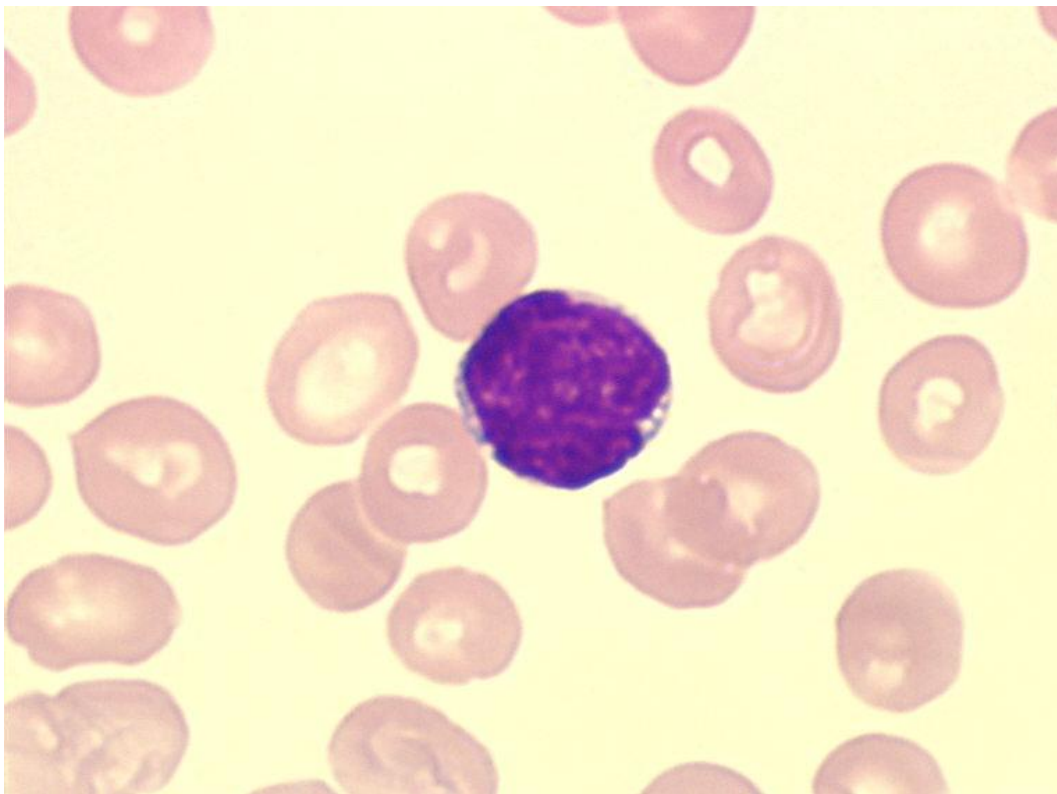


Figure 21. Lymphoblaste du patient 8 (LAL1) pour lequel l'alarme « BLASTES » ne s'est pas déclenchée (x 1000)

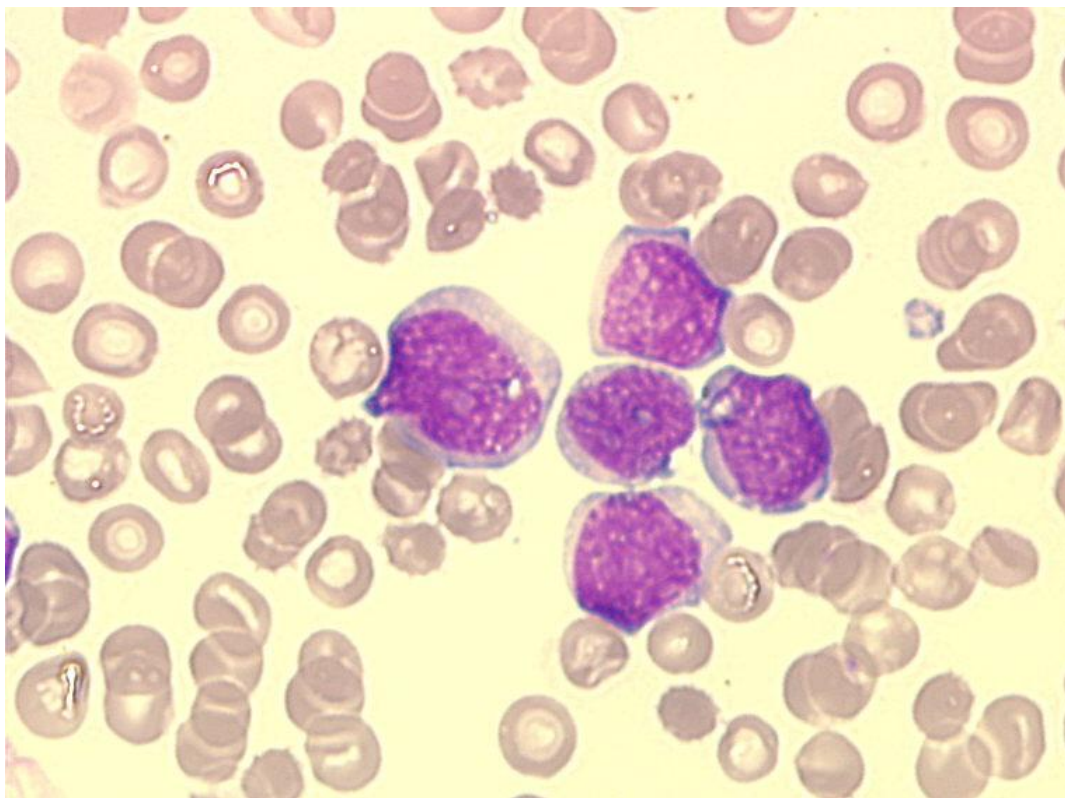


Figure 22. Lymphoblastes d'un patient atteint de LAL2 (FAB) pour lequel l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée (x 630)

3.2.5 Les alarmes morphologiques dans les autres hémopathies blastiques

L'alarme « BLASTES » s'est déclenchée dans les quatorze autres cas d'hémopathies blastiques : deux leucémies aiguës biphénotypiques, une leucémie aiguë indifférenciée, deux leucémies myéloïdes chroniques, une polyglobulie de Vaquez en acutisation, deux anémies réfractaires avec excès de blastes, une leucémie myélomonocytaire chronique, deux syndromes de Richter et trois lymphomes B diffus à grandes cellules primitifs. Ce bon résultat est d'autant plus surprenant que certains échantillons ne contiennent que peu de blastes (4 % pour une des deux AREB et pour la polyglobulie essentielle). De plus, dans tous les cas, l'alarme « BLASTES » est associée à l'alarme « ATYP » et/ou à l'alarme « GI ». Précisons néanmoins qu'aucun de ces patients n'est leucopénique.

3.2.6 Les alarmes morphologiques dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques

3.2.6.1 La LLC

La leucémie lymphoïde chronique est la leucémie la plus fréquente en Europe [42]. Le rôle des alarmes morphologiques dans sa découverte au cours d'un hémogramme dit « de routine » est mineur compte tenu de la morphologie lymphocytaire dans cette pathologie. En effet, les lymphocytes qui s'accumulent dans la LLC sont pour la plupart des petits lymphocytes matures, cytologiquement identiques à ceux que l'on peut rencontrer chez un sujet indemne d'hémopathie. L'étude de Krause et coll. a toutefois montré que l'alarme « ATYP » se déclenche parfois [14], sans doute en raison de la présence d'une population minoritaire de prolymphocytes dans certaines LLC. Dans les travaux de Krause l'alarme « ATYP » s'est déclenchée dans quatre cas sur dix. Il s'agirait d'un facteur de mauvais pronostic [30]. Dans notre étude, vingt des trente échantillons sanguins provenant de patients atteints de LLC ont déclenché l'alarme « ATYP », soit les deux tiers.

Nous remarquons également que l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée à quatre reprises, toujours conjointement à l'alarme « ATYP ». Là encore il s'agirait d'un facteur pronostique péjoratif

[30]. Dans deux cas sur les quatre, l'alarme s'est déclenchée au niveau 1 (le plus faible sur une échelle de 3). Les deux autres échantillons, qui ont déclenché l'alarme « BLASTES » à des niveaux supérieurs, sont les deux seules LLC en transformation lymphomateuse (syndrome de Richter) présents dans notre cohorte. Ce constat est tout à fait conforme aux observations de Lanza et coll. pour qui l'augmentation du nombre de blastes mesuré par l'appareil est corrélée à la présence d'immunoblastes [30]. L'alarme « BLASTES » chez un patient atteint de LLC doit donc faire suspecter un syndrome de Richter.

En ce qui concerne le diagnostic de cette hémopathie, le rôle des alarmes morphologiques reste anecdotique. La suspicion biologique de LLC se fera plutôt devant une lymphocytose absolue (alarme quantitative) chez les sujets de plus de cinquante ans.

3.2.6.2 Les lymphomes

Parmi les résultats publiés sur la sensibilité des alarmes morphologiques, très peu font cas des patients atteints de lymphomes. Il est vrai que le diagnostic de ces pathologies se fait essentiellement en anatomo-pathologie par examen ganglionnaire *via* une biopsie. Néanmoins, certaines cellules lymphomateuses peuvent envahir le sang et la moelle. L'hémogramme n'est donc pas un élément diagnostique mais peut être considéré comme partie intégrante du bilan d'extension de certains lymphomes non hodgkiniens. Il est donc souhaitable que l'appareil détecte la présence de ces cellules lymphoïdes anormales.

Les 18 échantillons provenant de patients atteints de LNH contiennent tous des cellules lymphomateuses (tableau 25) selon l'examen microscopique et l'immunophénotypage sanguin. Treize ont déclenché l'alarme « ATYP » parfois conjointement à l'alarme « BLASTES ». Cinq ne déclenchent aucune alarme morphologique leucocytaire alors que le sang contient entre 1 et 25 % de cellules anormales. Rappelons que les trois cas de lymphome B diffus à grandes cellules ont été classés parmi les hémopathies blastiques dans les paragraphes précédents en raison de la présence d'immunoblastes ou de centroblastes.

Aucune tendance ne se dégage au sein des LNH. Avec une sensibilité globale de 72 %, l'alarme « ATYP » ne permet pas une détection infailible des cellules lymphomateuses. Nous

recommandons donc aux utilisateurs d'ADVIA® 2120 de réaliser systématiquement un frottis sanguin coloré dans le cadre du bilan d'extension d'un lymphome.

Type de lymphome	Effectif	Sensibilité de l'alarme « ATYP » (%)
Lymphome du manteau	7	71,4
Lymphome folliculaire	3	66,7
SLVL	3	66,7
Lymphome de Sezary	2	50
Lymphome B diffus à grandes cellules	3	100
TOTAL	18	72,2

Tableau 25. Déclenchement de l'alarme « ATYP » dans les cas de lymphomes avec cellules atypiques circulantes.

3.2.6.3 Les autres SLP

Parmi les cinq leucémies polymphocytaires que nous avons recensées, quatre ont déclenché l'alarme « ATYP ». Celle qui n'a pas déclenché cette alarme a en revanche déclenché l'alarme « BLASTES ». Les alarmes morphologiques ont donc ici parfaitement rempli leur rôle.

Lorsque l'on s'intéresse aux leucémies à tricholeucocytes, nous remarquons que l'alarme « ATYP » ne s'est déclenchée que six fois sur treize, et l'alarme « BLASTES » à sept reprises. Les tricholeucocytes sont décrits comme des cellules d'assez grande taille (12-25 µm de diamètre), de rapport nucléo-cytoplasmique inférieur aux lymphocytes et à la chromatine plus fine. Leur membrane externe est hérissée de fins prolongements qui leur donnent un aspect chevelu. La perception de cet aspect chevelu par l'appareil nous paraît très hypothétique en raison de l'aspect dentelé pris par les leucocytes en milieu hypertonique lors de l'analyse par le canal PEROX afin d'augmenter l'indice de réfraction. Rien ne permet donc d'affirmer que cet aspect chevelu soit conservé. Quant au canal BASO, le noyau des tricholeucocytes est certes moins dense que celui des leucocytes mais la chromatine y reste plus compacte que dans les cellules blastiques. Cela pourrait expliquer l'aspect très aléatoire du déclenchement des alarmes morphologiques en présence de tricholeucocytes : l'échantillon le plus fortement leucopénique (0,92 G/L et 14 % de tricholeucocytes) a en effet été signalé par une alarme (« ATYP ») contrairement à un autre qui

contient 14,96 G/L de leucocytes dont 40 % de tricholeucocytes.

Il ressort que les alarmes morphologiques ne sont pas efficaces pour détecter les tricholeucocytes et que les signes évocateurs au niveau de l'hémogramme sont à chercher ailleurs, notamment en présence d'une monocytopenie (voir plus loin).

Enfin, nous notons que les trois myélomes et les trois leucémies à plasmocytes ont déclenché à la fois l'alarme « ATYP » et l'alarme « BLASTES »

3.2.7 Les alarmes morphologiques dans les syndromes mononucléosiques

De manière intéressante, les lymphocytes hyperbasophiles présents dans les syndromes mononucléosiques ont tous été signalés par l'alarme « ATYP ». Les lymphocytes activés de la mononucléose semblent donc facilement détectables de par leur grande taille. Notons que le sang de tous les patients contenait au minimum 8 % de lymphocytes hyperbasophiles.

Toutefois, dans douze cas sur seize, l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée conjointement. Il semblerait que l'alarme « BLASTES » se déclenche plus facilement dans les syndromes mononucléosiques que dans les LAL, ce qui est paradoxal et peut induire l'observateur microscopique en erreur. En effet, il existe un risque de confusion entre les lymphocytes activés et les cellules blastiques, d'autant plus grand que l'observateur est peu expérimenté. Le déclenchement de l'alarme dans les syndromes mononucléosiques est dû à l'augmentation LUC (accompagné d'un pourcentage de blastes supérieur à 1,5) et non à un pourcentage de blastes mesuré supérieur à 5.

3.3 Exploitation des paramètres numériques fournis par l'ADVIA® 2120

3.3.1 La formule réalisée par l'appareil

Hémopathie		PN (%)	L (%)	M (%)	LUC (%)	MPXI	Effectif
LAL		14,3 ± 15,9	66,7 ± 18,2	1,6 ± 1,5	15,7 ± 13,9	4,3 ± 5,2	39
dont	LAL1	9,9 ± 14,6	73,7 ± 15,2	1,1 ± 0,8	13,8 ± 11,4	4,2 ± 5,3	20
	LAL2	19,0 ± 16,3	59,3 ± 18,6	2,2 ± 1,8	17,7 ± 16,3	4,5 ± 5,3	19
LAM		30,2 ± 24,1	25,0 ± 20,2	17,0 ± 17,6	24,5 ± 23,8	1,2 ± 13,2	75
dont	LAM0	7,1 ± 9,1	43,4 ± 37,9	4,1 ± 3,2	43,5 ± 36,6	-5,0 ± 1,3	3
	LAM1	26,0 ± 21,8	27,1 ± 24,3	26,4 ± 22,7	16,1 ± 21,7	-8,0 ± 9,4	21
	LAM2	39,6 ± 22,1	24,7 ± 18,7	16,8 ± 15,2	16,5 ± 13,1	6,7 ± 9,4	14
	LAM3	60,3 ± 17,5	24,9 ± 18,7	2,6 ± 2,4	2,4 ± 2,0	16,9 ± 14,1	12
	LAM4	17,5 ± 5,2	22,6 ± 11,2	24,6 ± 16,9	33,0 ± 22,1	-2,8 ± 10,7	7
	LAM5	16,9 ± 18,1	19,3 ± 17,1	14,9 ± 11,8	47,1 ± 23,7	-0,4 ± 10,6	16
	LAM6	20,6	26,3	31,6	21,0	4,1	1
	LAM7	7,1	40,1	1,3	47,9	-1,1	1
LAbi		31,1 ± 30,5	21,1 ± 7,2	3,6 ± 1,6	14,2 ± 10,3	18,1 ± 6,9	2
LAI		4,2	0,9	1,9	92,1	9,1	1
LLC		21,0 ± 15,7	63,8 ± 16,8	2,3 ± 1,3	11,1 ± 12,3	2,7 ± 8,2	30
LNH		38,4 ± 25,5	41,1 ± 24,9	3,9 ± 2,4	15,2 ± 15,6	1,9 ± 8,2	18
LP et MPC		24,8 ± 10,6	35,4 ± 13,5	5,7 ± 3,6	30,7 ± 9,3	4,1 ± 1,8	6
LPL		23,9 ± 24,8	63,7 ± 27,0	2,9 ± 2,2	7,3 ± 4,2	10,9 ± 21,7	5
LTL		33,9 ± 20,9	49,4 ± 16,6	1,4 ± 1,7	13,6 ± 13,5	3,4 ± 8,1	13
SMP		64,8 ± 15,8	13,8 ± 13,0	4,6 ± 2,3	12,6 ± 7,3	-4,9 ± 7,0	4
SMD		36,6 ± 14,5	15,4 ± 11,0	24,3 ± 11,0	21,0 ± 15,1	2,5 ± 17,3	4
MNI		27,4 ± 17,1	46,1 ± 16,1	5,2 ± 2,9	18,6 ± 11,2	0,7 ± 7,3	16

Tableau 26. Principaux paramètres numériques mesurés (moyenne ± écart-type) dans les différentes hémopathies de notre étude.

Les moyennes et écart-types des pourcentages de LUC, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et monocytes ainsi que la valeur du MPXI dans les différentes hémopathies sont rapportées dans le tableau 26. Nous allons tenter d'en analyser les tendances.

3.3.1.1 Les polynucléaires neutrophiles

La zone des polynucléaires neutrophiles contient des cellules de grande taille à forte activité peroxydasique. Pour autant, le pourcentage de PN ne permet pas de différenciation nette entre hémopathies lymphoïdes et myéloïdes. Il est certes en moyenne statistiquement plus élevé dans les LAM que dans les LAL (test de Student, $p < 0,0001$) mais les valeurs relevées dans la plupart des LAM (à l'exception des LAM3) se démarquent insuffisamment des autres hémopathies pour avoir un pouvoir discriminant satisfaisant. Deux hémopathies possèdent toutefois un pourcentage de polynucléaires neutrophiles remarquablement élevé : il s'agit de la LAM3 (FAB) et des syndromes myéloprolifératifs. Dans ces pathologies, le pourcentage de PN mesuré est toujours supérieur à 50 % à l'exception de deux LAM3 leucopéniques. Nous recoupons également nos observations avec celle de Tsakona [25] : la proportion de polynucléaires neutrophiles est croissante de la LAM0 à la LAM3 (FAB). En dehors de ces constats, il nous semble qu'il s'agit d'un paramètre peu informatif.

3.3.1.2 Les lymphocytes

Ialongo et coll. ont observé dans leurs travaux sur les LAL que le Technicon[®] H1 dénombre plus de lymphocytes que de polynucléaires neutrophiles dans 87 % des cas [16]. C'est aussi le cas pour trente-six des trente-neuf LAL de notre étude, soit 92,3 %. Nous remarquons que c'est dans les LAL et les LLC que le pourcentage de lymphocytes est le plus élevé (tableau 26). Avec en moyenne respectivement 66,7 et 63,8 %, ces pathologies se distinguent assez nettement des autres en terme de lymphocytose relative. Logiquement, il existe une différence significative du pourcentage de lymphocytes entre LAL et LAM (test de Student, $p < 10^{-15}$). Notons que le pourcentage de lymphocytes est en moyenne plus élevé dans la LAL1 (73,7) que dans la LAL2 (59,3). Bien que de signification statistique équivoque (test de Student, $p = 0,012$), cette différence conforte l'hypothèse selon laquelle les lymphoblastes de LAL1 (FAB) seraient plus fréquemment confondus avec des

lymphocytes par l'analyseur que ceux de LAL2. Conformément au principe des vases communicants, la tendance inverse est observée au niveau des LUC puisque les lymphoblastes se partagent entre ces deux zones.

A deux reprises dans des LAM nous avons remarqué que l'appareil a rendu un pourcentage de lymphocytes égal à zéro. Or, à la consultation du cytogramme BASO de ces patients, des éléments sont bien visibles dans la zone des lymphocytes. Après investigation auprès du fabricant, nous avons obtenu l'explication suivante : les deux cas en cause sont des échantillons qui contiennent une faible proportion de lymphocytes. A chaque fois, en parallèle, le canal BASO a mis en évidence une basophilie insuffisamment importante pour déclencher l'alarme « B-SUSP ». Or, en l'absence de l'alarme « B-SUSP », le chiffre des polynucléaires basophiles est automatiquement déduit du nombre de lymphocytes car ces deux cellules apparaissent dans la même zone du cytogramme PEROX. Lorsque le nombre de basophiles (réels ou artéfactuels) mesuré par le canal BASO est similaire au nombre de lymphocytes mesuré par le canal PEROX, l'ADVIA® 2120 rend donc un nombre de lymphocytes nul de manière erronée.

3.3.1.3 Les monocytes

Pour Krause [14], la monocytose est évocatrice d'une LAM de type 4 ou 5 (FAB). D'après nos observations, nous pensons plus largement qu'un pourcentage de monocytes élevé est très évocateur d'une LAM ou d'un syndrome myélodysplasique. En effet, le pourcentage moyen de monocytes est supérieur à 14 dans les LAM de types 1, 2, 4, 5 et 6 (FAB) ainsi que dans nos deux cas de LMMC et une des deux AREB (la seconde en contient 9,2 %). Ce pourcentage moyen est inférieur à 6 dans toutes les autres hémopathies recensées. Nous retenons le seuil de 9 % de monocytes comme évocateur d'une LAM 1, 2, 4, 5, 6 ou d'un syndrome myélodysplasique : en dehors de trois syndromes mononucléosiques et d'une leucémie à plasmocytes dont le pourcentage de monocytes est compris entre 10 et 12, aucune autre hémopathie ne contient des monocytes dans des proportions aussi importantes (contre 42 LAM). Cela correspond à une valeur prédictive positive de 91,3 % tout à fait remarquable.

De manière surprenante, la LAM5 (FAB) n'est pas celle dont la proportion de monocytes est la plus élevée. Le pourcentage moyen de monocytes y est même inférieur à celui des LAM en

général. Ceci s'explique par les grandes disparités cytologiques entre les variantes 5a (dite monoblastique) et 5b (dite pro-monocytaire) de la classification FAB. Si l'on considère uniquement les LAM5a, la moyenne des monocytes est seulement de $8,6 \% \pm 8,0$ contre $25,4 \% \pm 9,6$ pour les LAM5b, différence statistiquement significative (test de Student, $p < 0,01$). La LAM1 (FAB) affiche le plus haut pourcentage de monocytes ; il s'agit en réalité d'une majorité de myéloblastes qui expriment faiblement la peroxydase.

Enfin, il est notable que la plus faible proportion de monocytes est relevée dans la cohorte des patients atteints de LAL de type 1 (FAB) avec $1,1 \%$ en moyenne, alors que nous l'attendions chez les patients atteints de leucémie à tricholeucocytes, pathologie qui s'accompagne d'une monocytopenie caractéristique. Toutefois, nous avons parmi les LTL une forme atypique où l'on peut trouver $7,1 \%$ de monocytes. Si l'on exclut ce cas des calculs, le pourcentage moyen de monocytes passe de $1,4$ à $0,9 \%$ pour les patients atteints de LTL, soit la valeur la plus faible.

3.3.1.4 Les LUC

Ialongo fait le constat d'un pourcentage de LUC augmenté dans 80% des cas de LAL [16] : nous vérifions cette observation vingt-neuf fois sur trente-neuf, c'est à dire dans $74,4 \%$ des cas. Conformément à ce qu'Ialongo et coll. ont observé, six échantillons sanguins, trois LAL1 et trois LAL2 (FAB), contiennent plus de 10% de blastes sans que le pourcentage de LUC mesuré par l'appareil soit augmenté. Le nombre d'évènement détectés dans la zone des blastes du cytogramme basophile était cependant augmenté dans deux des trois LAL2 (FAB) sans LUC alors que ce n'était pas le cas pour les LAL1 (FAB).

Patterson propose de différencier les syndromes lymphoprolifératifs d'abord en fonction de la proportion de LUC [31], puis au regard d'une éventuelle neutropénie ou monocytopenie associée. Nous n'avons pas pu confirmer ses observations dans notre étude. En effet, les pourcentages moyens de LUC relevés sont similaires dans la LLC ($11,1$), la LTL ($12,6$) et les LNH ($13,3$). Curieusement, cette valeur est plus faible dans les LPL ($7,3$), ce qui est en parfaite contradiction avec l'hypothèse de Patterson. La comparaison du chiffre des LUC donné par l'appareil avec celui des lymphocytes atypiques de l'examen microscopique se révèle souvent discordante. Il semble là encore que les tricholeucocytes, les cellules lymphomateuses et les prolymphocytes soient parfois situés dans la

zone des lymphocytes.

Logiquement, la plus forte proportion de LUC (56 %) parmi les LLC a été mise en évidence chez un patient atteint d'un syndrome de Richter.

Nous avons remarqué une élévation constante des LUC dans les hémopathies à plasmocytes circulants (LP et MPC) : ils sont toujours estimés à plus de 20 % dans ces hémopathies (30,7 % en moyenne). Il semble qu'il y ait une concordance entre le nombre de LUC mesuré par l'ADVIA® 2120 et le nombre de plasmocytes observés sur le frottis sanguin. Cette corrélation n'est pas éprouvable statistiquement en raison de la trop petite taille des échantillons.

Notons que la seule leucémie aiguë indifférenciée de notre étude affiche 92,1 % de LUC. Ce chiffre est à rapprocher des 87 % de blastes comptés au microscope.

3.3.1.5 Les polynucléaires basophiles

Chez Ialongo et coll., une hyperbasophilie absolue ($> 0,1$ G/L) est observée dans 53 % des cas de LAL [16]. C'est le cas de vingt-quatre patients atteints de LAL dans notre étude soit 61,5 %. Considérée comme un artéfact lié à un défaut de lyse, Ialongo écrit que l'hyperbasophilie est intimement liée à l'importance de la leucocytose et qu'elle s'atténue avec la dilution de l'échantillon. Nous constatons que son importance semble proportionnelle à la leucocytose mais qu'elle existe de manière discrète pour de nombreuses LAL normocytaires. L'hyperbasophilie artéfactuelle n'est pas retrouvée uniquement dans les LAL : nous avons observé ce phénomène dans 54,6 % des LAM, 73,3 % des LLC et 83,3 % des lymphomes. Il est le plus souvent discret et la présence des cellules anormales en grande quantité n'est probablement pas la seule explication à cette lyse incomplète. Il semble qu'il existe une augmentation intrinsèque de la résistance à la lyse des cellules pathologiques.

En lien avec le précédent constat, nous avons observé que les hyperbasophilies artéfactuelles les plus importantes provoquent des erreurs dans la formule sanguine rendue par l'ADVIA® 2120 dont le total dépasse parfois largement 100 %. Après avoir contacté des responsables au sein de l'entreprise Siemens Healthcare Diagnostics® qui commercialise actuellement ces appareils, nous

avons obtenu des éclaircissements. Les polynucléaires basophiles sont des cellules de taille moyenne dépourvues d'activité peroxydasique ; ils apparaissent en conséquence dans la zone des lymphocytes du cytogramme PEROX. Habituellement, le nombre de polynucléaires basophiles mesuré par le canal BASO est déduit du nombre de lymphocytes mesuré par le canal PEROX. Cependant, lorsque le pourcentage de cellules comptabilisées dans les zones des polynucléaires basophiles et des basophiles suspects est supérieur à 5 %, l'alarme « B-SUSP » se déclenche et annule cette soustraction automatique. Dans ce cas, les polynucléaires basophiles s'ajoutent à la formule réalisée sur le cytogramme PEROX. On a alors une formule leucocytaire dont le total dépasse systématiquement 100 %. L'alarme « B-SUSP » doit donc impérativement commander la réalisation d'un frottis sur lame en vue d'un examen microscopique sous peine de rendre une formule incohérente. Quand elle met en évidence une lyse incomplète, elle est le plus souvent synonyme de la présence de blastes d'où sa prise en compte en tant qu'alarme signalant la présence de blastes par certains auteurs.

3.3.1.6 Le MPXI

Bien qu'une analyse de variance pour le MPXI des sous-types de LAM (FAB) montre qu'il existe des différences significatives entre les groupes, nous ne pouvons cacher une certaine déception quant à la pertinence de la moyenne de l'indice d'activité peroxydasique. A la lumière des résultats exposés dans le tableau 26, nous remarquons qu'une même valeur peut être retrouvée dans une leucémie lymphoblastique, une leucémie myéloblastique de type 2 (FAB) ou une leucémie à plasmocytes. Nous constatons que les écart-types pour chaque hémopathie sont très importants, témoins d'une grande disparité des valeurs pour une même pathologie.

	LAM0	LAM1	LAM2	LAM3	LAM4	LAM5	LAM6	LAM7
MPXI dans notre étude	-5,0 (±1,3)	-7,8 (±9,6)	6,7 (±9,4)	16,9 (±14,1)	-2,8 (±10,7)	-0,4 (±10,6)	4,10	-1,10
MPXI des travaux d'Eivazi-Ziaei	1,4 (± 7,5)	-16,6 (± 14,4)	-6,5 (± 18,1)	16,7 (± 21,9)	-15,9 (± 12,3)	-18,7 (± 6,2)	1,8	-1,6

Tableau 27. Valeurs moyennes du MPXI (± écart-type) dans notre étude et celle d'Eivazi-Ziaei [28]

Le tableau 27 compare nos résultats avec ceux publiés par Eivazi-Ziaei [28] dans les différents types de LAM (FAB). Seules concordent les valeurs observées dans la LAM3 qui sont les plus élevées. Néanmoins, la valeur des écart-types dans les deux études montre qu'il existe des LAM3 avec des MPXI modérés. Parmi nos échantillons, trois LAM3 sur les dix qui contiennent des promyélocytes atypiques ont d'ailleurs un MPXI inférieur à 3.

Nos résultats confirment malgré tout ceux de Tsakona et coll. [22] : c'est bien dans la LAM1 (FAB) que le MPXI est le plus faible parmi les LAM. Dans la LAM2, le MPXI moyen est supérieur à tous les autres types excepté la LAM3. Dans LAM4, 5 et 7 (FAB), le MPXI moyen est faible et ne permet pas de les discerner entre elles. Il existe néanmoins des différences significatives pour le MPXI (test de Student, $p < 0,01$) entre les LAM0 et LAM3, LAM1 et LAM3, LAM4 et LAM3, LAM5 et LAM3, LAM1 et LAM2. Pourtant au vu des grandes variabilités objectivées par les écarts-types, ces observations paraissent anecdotiques.

En ce qui concerne l'élévation supposée du MPXI dans les LNH (à l'exception de ceux de bas grade), nous n'avons rien relevé qui pourrait corroborer l'hypothèse de Froom et coll. [33].

3.3.2 Les paramètres calculés

A partir des paramètres numériques rendus par l'appareil, nous avons essayé de calculer quelques rapports (tableau 29) afin de dégager quelques tendances parmi les hémopathies.

3.3.2.1 Le rapport LUC/lympho

Le rapport entre les grandes cellules sans activité peroxydasique et les lymphocytes a déjà été abordé dans des travaux antérieurs, principalement dans les syndromes lymphoprolifératifs. Il est cité par Lanza et coll. [30] comme un facteur de mauvais pronostic dans les LLC lorsqu'il est supérieur à 0,16. Il est surtout proposé par Dorfman comme paramètre discriminant entre LLC, LPL et LNH en phase systémique. D'après les observations de celui-ci, le rapport LUC/lympho des LLC serait en moyenne inférieur à celui des LPL, lui-même inférieur à celui des LNH. De plus, le ratio

issu des données fournies par l'ADVIA® 2120 serait très fidèle au ratio cellules atypiques sur lymphocytes issu de la formule microscopique. Nous comparons nos résultats avec les siens dans le tableau 28.

	LLC	LPL	LNH
LUC/lympho chez Dorfman	0,20 (6)	0,80 (3)	2,27 (2)
LUC/lympho dans notre étude	0,23 (30)	0,13 (6)	0,57 (21)

Tableau 28. Valeurs moyennes du rapport LUC/lympho calculé à partir des valeurs de l'ADVIA® 2120 dans les travaux de Dorfman et les nôtres (les effectifs sont indiqués entre parenthèses).

Nos observations ne concordent pas avec celles de Dorfman. La similitude des moyennes de ce ratio est confortée par l'analyse de variance qui ne met pas en évidence de différence statistiquement significative entre les trois groupes. Si l'on ajoute à cela l'importance des écarts-types (tableau 29), nous concluons le rapport LUC/lympho ne se révèle pas être un paramètre pertinent pour distinguer ces trois hémopathies.

Par ailleurs, nous pouvons mettre en évidence une élévation du rapport LUC/lympho dans les hémopathies myéloïdes à l'exception des LAM3 (FAB). Il est en moyenne de 3,65 pour l'ensemble des LAM (sauf LAM3), SMP et SMD confondus. Nous expliquons ces valeurs par la présence de blastes sans activité peroxydasique associés à une lymphopénie. Dans les autres hémopathies (à l'exception du cas de LAI), ce ratio est en moyenne de 0,34. Cette différence est statistiquement significative (test de Student, $p < 0,0001$). Le cas de la leucémie indifférenciée est à signaler puisque la forte élévation des LUC conjuguée à une profonde lymphopénie conduit à une valeur de rapport extrêmement élevée. Signalons également que les leucémies à plasmocytes et les myélomes à plasmocytes circulants se sont distingués par un rapport LUC/lympho intermédiaire entre les hémopathies myéloïdes et les autres. Nous attribuons cela à l'augmentation des LUC dans ces pathologies (liée au pourcentage de plasmocytes) sans lymphopénie ou lymphocytose associée.

Afin de différencier les LAL et les LAM3 (FAB) des autres LAM, nous proposons le seuil de 1 pour le rapport LUC/lympho. En effet, une valeur supérieure à 1 dans un contexte de présence de blastes rend très improbable l'éventualité d'une LAL ou d'une LAM3. Parmi nos 39 patients atteints de LAL, un seul a en effet un rapport LUC/lympho supérieur à 1 (il s'agit d'une LAL de type 2 (FAB) dont le rapport vaut 1,62). Par comparaison, 33 LAM parmi les 63 LAM0, 1, 2, 4, 5, 6 ou 7 (FAB) ont un ratio supérieur à 1 ou incalculable en raison d'un pourcentage de lymphocytes nul.

Hémopathie		LUC/L	(M+PN)/(LUC+L)	PMN/MN	Effectif
LAL		0,28 ± 0,33	0,31 ± 0,62	0,32 ± 0,48	39
dont	LAL1	0,21 ± 0,22	0,21 ± 0,49	0,27 ± 0,43	20
	LAL2	0,36 ± 0,40	0,43 ± 0,73	0,37 ± 0,53	19
LAM		2,97* ± 5,36	2,28* ± 3,75	0,31 ± 0,47	75
dont	LAM0	5,57 ± 8,88	0,14 ± 0,16	0,05 ± 0,04	3
	LAM1	2,71* ± 6,09	2,74* ± 4,47	0,18 ± 0,26	21
	LAM2	2,17* ± 4,38	2,26* ± 2,85	0,62 ± 0,64	14
	LAM3	0,13 ± 0,14	4,65 ± 5,64	0,62 ± 0,74	12
	LAM4	1,81 ± 1,03	1,22 ± 1,68	0,14 ± 0,10	7
	LAM5	6,34 ± 6,54	1,01 ± 1,71	0,13 ± 0,12	16
	LAM6	0,80	1,11	0,15	1
	LAM7	1,19	0,09	0,15	1
Labi		0,62 ± 0,27	1,36 ± 1,49	1,50 ± 0,34	2
LAI		99,16	0,07	0,19	1
LLC		0,23 ± 0,43	0,43 ± 0,62	0,79 ± 0,90	30
LNH		0,65 ± 0,79	3,15 ± 9,00	1,59 ± 2,84	18
LP et MPC		1,02 ± 0,57	0,51 ± 0,31	0,43 ± 0,17	6
LPL		0,13 ± 0,08	0,75 ± 1,21	0,47 ± 0,60	5
LTL		0,31 ± 0,30	0,80 ± 0,85	0,81 ± 0,85	13
SMP		1,67 ± 1,48	4,62 ± 5,19	1,58 ± 1,08	4
SMD		7,88 ± 14,18	1,85 ± 0,88	0,58 ± 0,54	4
MNI		0,49 ± 0,38	0,71 ± 0,84	0,64 ± 0,62	16

Tableau 29. Principaux paramètres numériques calculés (moyenne ± écart-type) dans les différentes hémopathies de notre étude.

* : à l'exclusion de deux patients (1 LAM1 et 1 LAM2) dont le pourcentage de lymphocytes est nul.

3.3.2.2 Rapport entre les leucocytes à activité peroxydasique et les autres

Nous avons calculé le rapport des cellules possédant une activité peroxydasique sur les cellules qui en sont dépourvues. Cela correspond à la somme des monocytes et des polynucléaires neutrophiles divisée par le total des LUC et des lymphocytes. Conformément à nos attentes, ce rapport est plus élevé dans les hémopathies myéloïdes dont les cellules malignes sécrètent la peroxydase. Les LAM (hors LAM0 et LAM7), les SMP et les SMD s'accompagnent tous d'un rapport important.

Le cas des lymphomes est cependant problématique : nous y avons relevé un rapport $(M+PN)/(LUC+L)$ très élevé. Si l'on retire de ce calcul un échantillon de lymphome du manteau dont le rapport est très élevé (38,9) en raison d'une myélémie atypique pour cette pathologie, la moyenne de ce rapport passe à 1,04, ce qui reste assez élevé. Bien que disparates, les ratios calculés sont supérieurs aux autres syndromes lymphoprolifératifs sans que nous parvenions à expliquer ce phénomène de manière satisfaisante. Cette observation est à rapprocher de celle de Froom [33] qui a relevé une augmentation significative du MPXI dans plus d'un lymphome sur deux, sans que cette particularité ait jamais trouvé écho.

3.3.2.3 Rapport mononucléés/polymorphonucléés et quotient Q

A partir des données fournies par le canal BASO, nous pouvons calculer le ratio PMN sur MN qui correspond au rapport du nombre de leucocytes polymorphonucléés sur les mononucléés. Au regard des valeurs affichées dans les différentes pathologies, il semble difficile de tirer des informations pertinentes de ce paramètre. Il est logiquement élevé dans les SMP puisqu'il s'agit de proliférations myéloïdes plutôt matures. Tout comme le ratio $(M+PN)/(LUC+L)$, une élévation est observée dans certains lymphomes de manière inexpliquée. Les autres hémopathies ne se distinguent pas réellement entre elles.

Hémopathie		(MN/PMN) x (M+PN) / (LUC+L)	Pourcentage de cas où le rapport est supérieur à 2
LAL		0,91 ± 0,88	3
dont	LAL1	0,60 ± 0,31	0
	LAL2	1,24 ± 1,14	5
LAM		47,08* ± 32,31	74*
dont	LAM0	2,92 ± 1,69	67
	LAM1	53,10 ± 113,23	86
	LAM2	40,56 ± 126,10	64
	LAM3	105,24 *± 228,30	90*
	LAM4	29,59 ± 63,30	86
	LAM5	15,47 ± 39,43	56
	dont	LAM5a	2,96 ± 4,46
		LAM5b	36,33 ± 61,59
	LAM6	7,2	100
	LAM7	0,63	0
Labi		1,04 ± 1,23	0
LAI		0,83	0
LLC		0,68 ± 0,39	0
LNH		1,20 ± 0,74	17
LP et MPC		1,14 ± 0,32	0
LPL		1,03 ± 0,67	0
LTL		0,97 ± 0,19	0
SMP		3,85 ± 3,14	75
SMD		5,88 ± 5,01	75
MNI		1,05 ± 0,36	0

Tableau 30. Valeurs prises par le quotient Q des rapports (M+PN)/(LUC+L) et PMN/MN

*les deux LAM3 (FAB) circulant sans blaste ne sont pas prises en compte

En revanche, lorsque l'on compare les ratios $(M+PN)/(LUC+L)$ et PMN/MN , nous constatons qu'ils prennent souvent des valeurs semblables, sauf dans les hémopathies myéloïdes. On observe en effet dans les LAM, SMP et SMD une nette discordance entre ces deux rapports. Le rapport des rapports est équivalent à $(MN/PMN) \times (M+PN) / (LUC+L)$. Nous l'appellerons quotient Q. Les résultats sont consignés dans le tableau 30.

La différence entre les valeurs prises par le quotient Q dans les LAL et les LAM est statistiquement significative (test de Student, $p < 0,01$) et ce malgré des écarts-types élevés. Un quotient Q supérieur à 2 semble être fortement présomptif d'une hémopathie myéloïde : 74 % d'entre elles ont un quotient Q supérieur à 2 contre 3 % des autres hémopathies de l'étude. Si l'on observe attentivement les trois cas de lymphomes où le quotient Q est supérieur à 2, on s'aperçoit qu'il existe à chaque fois une myélémie associée indiquée lors de l'examen microscopique. Quant à l'unique cas de LAL où le quotient dépasse 2, il s'agit d'un échantillon pour lequel le numérateur et le dénominateur du quotient Q sont quasi nuls (forme indéterminée) en raison d'une blastose proche de 100 %.

Parmi les LAM, nous remarquons que c'est parmi les LAM5 (FAB) que l'on observe le plus faible pourcentage de cas où le quotient Q est supérieur à 2. C'est aux LAM5a (FAB) que ce résultat est imputable puisque toutes les LAM5b avaient un quotient Q élevé (tableau 30).

Visualiser ce que représente le quotient Q n'est pas chose facile. De manière schématique, il pourrait s'écrire $(\text{Perox}+ / \text{Perox}-) / (PMN/MN)$ où Perox+ désigne les cellules possédant une activité peroxydasique et Perox- celles qui n'en ont pas. Cela revient à écrire $Q = (MN \times \text{Perox}+) / (PMN \times \text{Perox}-)$. Une myélémie ou la présence de myéloblastes exprimant la peroxydase se traduisent par une augmentation des cellules mononucléées à activité peroxydasique. Cela majore donc le quotient Q. La présence de blastes sans activité peroxydasique, de lymphocytes normaux ou atypiques ou encore de cellules matures avec activité peroxydasique va faire évoluer de manière antinomique les différents termes du numérateur et du dénominateur, d'où un quotient plus faible. Dès lors, comment expliquer l'élévation du quotient Q (certes inférieure à la moyenne des LAM) observée dans certaines LAM0 et LAM5a (FAB) où les blastes n'ont pas d'activité peroxydasique ? En regardant au cas par cas, nous nous sommes aperçus que tous les cas de LAM0 et LAM5a dont le quotient Q dépasse 2 s'accompagnent d'une myélémie pointée par l'examen microscopique. Cela coïncide avec le constat effectué précédemment sur les lymphomes.

Si l'on considère le quotient Q avec une valeur seuil de 2 comme un test permettant d'établir

la nature myéloïde ou non d'une hémopathie, nous pouvons construire le tableau de contingence suivant :

	Quotient $Q \geq 2$	Quotient $Q < 2$	TOTAL
Hémopathies myéloïdes	60	23	83
Hémopathies non myéloïdes	4	126	130
TOTAL	64	149	213

Tableau 31. Répartition des échantillons en fonction de leur quotient Q

Il existe une différence statistiquement significative entre les hémopathies myéloïdes et les hémopathies non myéloïdes lorsque l'on pose la valeur 2 comme discriminante (test du « chi-deux », $p < 10^{-15}$). La sensibilité du test est de 72,3 % et sa spécificité de 97,0 %. La valeur prédictive positive est de 93,8 % et la valeur prédictive négative de 84,6 %. Ces valeurs sont tout à fait remarquables.

Au final, le quotient Q apparaît comme un paramètre très intéressant. Une valeur supérieure à 2 est un argument de poids en faveur d'une hémopathie de nature myéloïde en raison de sa forte valeur prédictive positive. Compte tenu du fait que nous sommes les premiers à faire ce constat, d'autres observations sont cependant nécessaires pour confirmer solidement ce postulat.

3.4 Exploitation des paramètres graphiques fournis par l'ADVIA® 2120

3.4.1 Utilisation de la pré-classification PANDA

A partir des cytogrammes BASO et PEROX dont nous disposons, nous avons testé la pré-classification PANDA telle qu'elle a été proposée par d'Onofrio [37]. Quelques précisions sur les

problèmes que nous avons rencontrés :

- Nous avons utilisé le modèle D2 pour décrire le cytogramme BASO uniquement lorsqu'il n'y avait pas d'excès de blastes associé (c'est-à-dire pas de modèle D1). Le modèle D2 est en effet trop peu spécifique car il existe une déviation du nuage vers le haut à chaque fois qu'un défaut de lyse leucocytaire est observé. Or ces cas là sont le plus souvent blastiques et il nous a semblé nécessaire de privilégier l'aspect inférieur gauche du graphique, plus informatif. Nous aurions éventuellement pu mentionner le type D2 en sus, la présentation la plus habituelle des cytogrammes où il existe un défaut de lyse lié à la présence de blastes étant une superposition des types D1 et D2 (fig. 23)

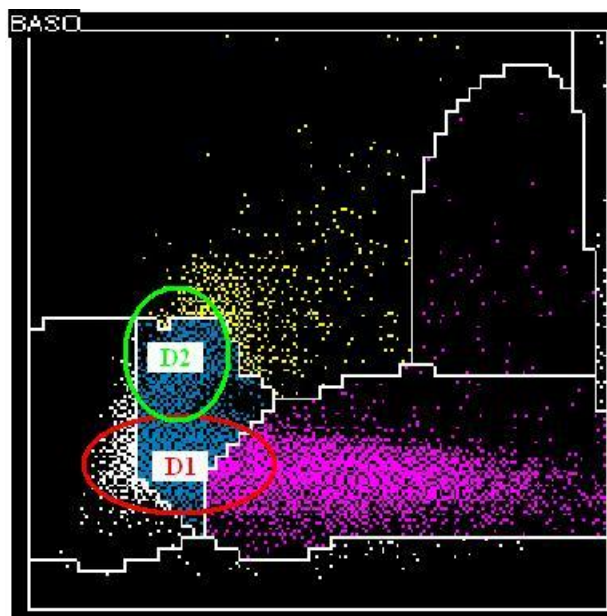


Figure 23. Cytogramme BASO d'une LAL où se superposent les modèles D1 et D2 de la méthode PANDA.

- Le choix parmi les 7 cytogrammes PEROX existant a parfois été très difficile. Nous avons confronté nos jugements avec le Dr Salignac afin de faire correspondre au mieux les cytogrammes des patients avec les modèles PANDA.
- A plusieurs reprises, nous nous sommes aperçus que pour rendre une description fidèle du cytogramme PEROX que nous analysions, il aurait été nécessaire de superposer deux cytogrammes-type, par exemple P0 + P4 (fig. 24).

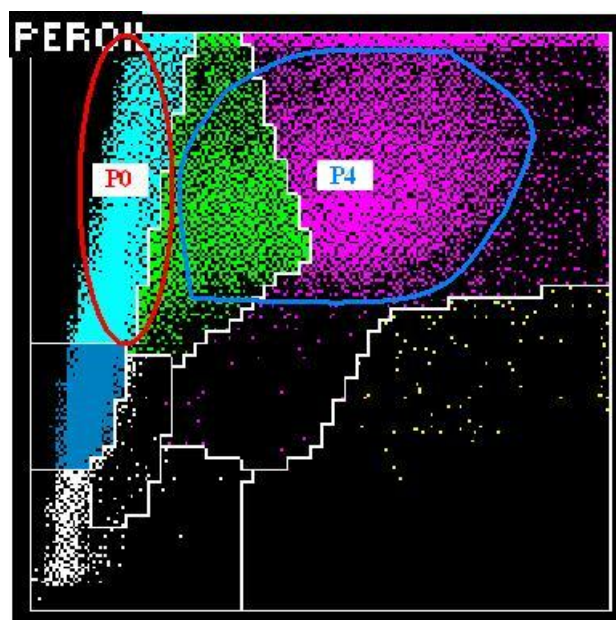


Figure 24. Cytogramme PEROX d'une LAM0 (FAB) avec myélémie associée où se superposent les modèles P0 et P4 de la classification PANDA.

- Pour les formes très leucopéniques, il est quasi impossible de rapprocher les cytogrammes du patient avec les cytogrammes-type. Il faudrait sans doute exclure de la classification les échantillons contenant moins de 1 G/L de leucocytes. (fig. 25)

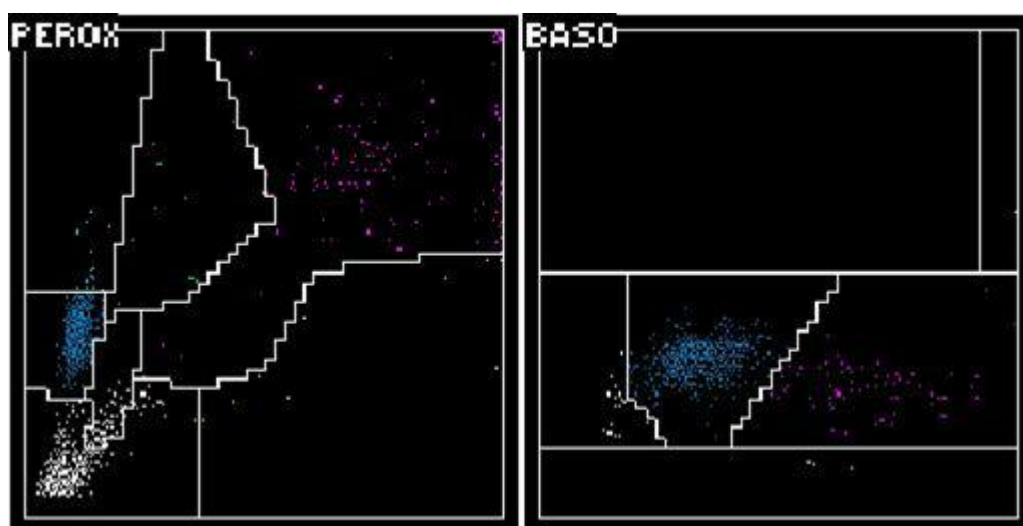


Figure 25. Cytogrammes provenant d'un patient atteint d'une LAM3 avec cytopénie importante.

Hémopathie		Combinaisons PANDA associées	Taux de concordance (%)
LAL		-	87,2
dont	LAL1	D0-P0 ou D1-P0	100
	LAL2	D1-P0	73,7
LAM classées par sous-type		-	68,0 (69,9*)
dont	LAM0	D1-P0	100
	LAM1	D1-P1 ou D1-P2	52,3
	LAM2	D1-P1 ou D1-P2 ou D1-P3 ou D1-P4	64,3
	LAM3	D1-P6	55,6 (71,4*)
	LAM3variant	D1-P4 ou D1-P5	100
	LAM4	D1-P1 ou D1-P2 ou D1-P3 ou D1-P4	100
	LAM5a	D1-P0 ou D1-P1 ou D1-P2	100
	LAM5b	D1-P2	50
	LAM6	D1-P0	0
	LAM7	D1-P0	100
LLC hors Richter		D0-P0	100
LNH dont Richter		D1-P0	21,7
LPL		D0-P0	60,0
LTL		D0-P0	61,5
LMC en acutisation		D1-P3	50
SMD		D0-P5	25
SMN		D2-P0	68,8
TOTAL		-	69,7 (70,4*)

Tableau 32. Evaluation de l'efficacité de la méthode PANDA

* Taux obtenu en excluant les deux LAM3 sans blaste sanguin

Nous affichons donc des résultats moins bons que ceux précédemment publiés. Là où d'Onofrio [37] et Gibbs [41] annoncent respectivement 91,1 % et 93,8 % de concordance globale,

nous ne trouvons que 69,7 % parmi les 188 patients dont les hémopathies sont prises en compte par le PANDA. Nous mettons en avant la difficulté à classer certaines hémopathies, le choix étant sans aucun doute observateur-dépendant. Les hémopathies leucopéniques ne devraient pas être classées selon la méthode PANDA en raison de l'impossibilité pour l'utilisateur de leur faire correspondre un modèle type et du risque d'erreurs qui en découle.

Dans notre cohorte, onze des seize patients atteints de syndrome mononucléosique ont une combinaison de type D2-P0, un de type D1-P0 et les quatre autres de type D0-P0. Le cytogramme de type D1 est très problématique dans les syndromes mononucléosiques en raison des erreurs que cela peut induire.

Deux des trois myélomes leucémiques et une des trois leucémies à plasmocytes recensés dans notre étude ont un profil de type D1-P0, conformément aux trois cas de myélome envisagés par Gibbs [41]. Le myélome restant et les deux autres LP ont un profil de type D0-P0.

D'après notre expérience, la méthode PANDA ne peut être utilisée seule en l'état. En effet, à l'imprécision de cette classification vient s'ajouter l'inexactitude dans 30 % des cas. Bien qu'innovante et bien pensée, la méthode PANDA n'est sans doute pas assez efficace pour pouvoir être utilisée en pratique courante comme le propose d'Onofrio [37] (afin de sélectionner les anticorps monoclonaux pour l'immunophénotypage). Il serait néanmoins intéressant de l'utiliser en complément de l'analyse de certaines données chiffrées fournies par l'ADVIA® 2120 qui permettraient d'affiner et renforcer les conjectures graphiques issues du PANDA.

Il existe cependant des profils très caractéristiques qui, lorsqu'ils sont observés, sont quasi pathognomoniques d'un type de leucémie : le profil D1-P6 (fig. 26) par exemple est caractéristique d'une LAM 3 (FAB). Il est en revanche incorrect de prétendre que toutes les LAM3 se présentent sous ce profil, d'où la mise en défaut de la méthode PANDA (exemple : formes leucopéniques, fig. 25)

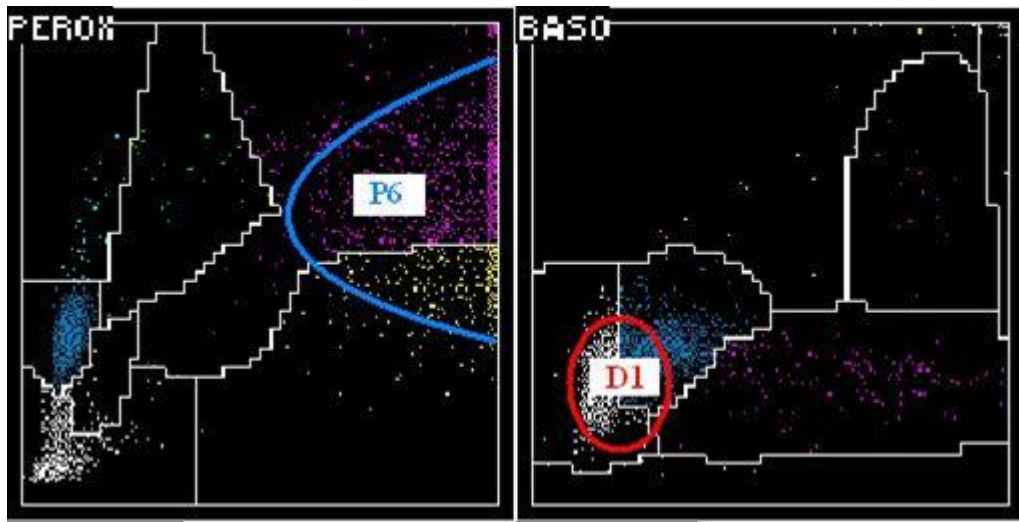


Figure 26. Cytogrammes d'un patient atteint de LAM3 (FAB)

Un profil de type D1-P0 avec de très grandes cellules sans activité peroxydasique (aspect des LUC dit « en fusée » qui vont jusqu'au bord supérieur du cytogramme) est très évocateur d'une LAM5a (FAB) (fig. 27).

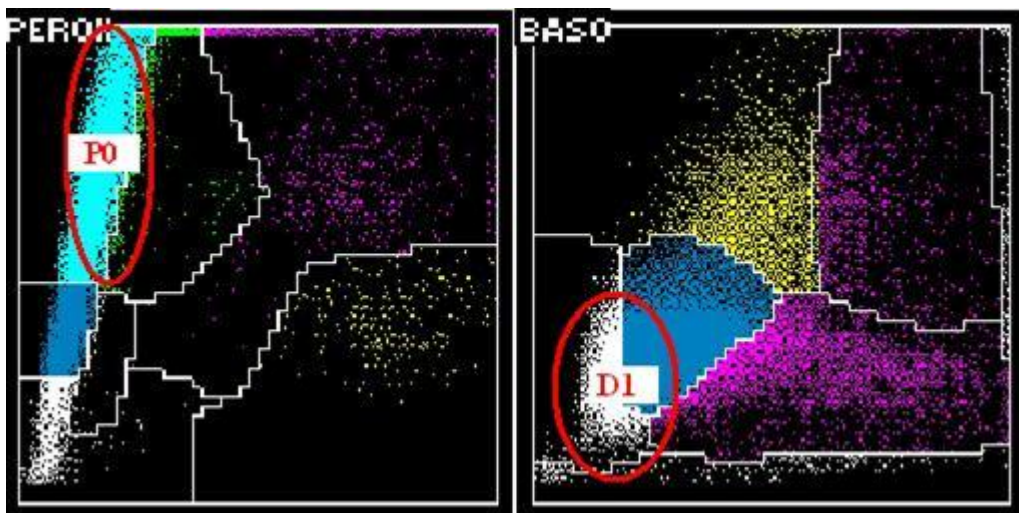


Figure 27. Cytogrammes d'un patient atteint de LAM5a.

3.4.2 Rapport de nos propres observations

Lors de notre analyse des cytogrammes, nous avons remarqué quelques traits particuliers qui nous ont semblé digne d'intérêt. Nous développons ces constats graphiques ci-après.

3.4.2.1 Aspect du nuage de blastes

Nous savons qu'un décalage vers la gauche du nuage des mononucléés sur le cytogramme BASO est un signe d'appel pour une blastose sanguine. Ce phénomène est d'ailleurs exploité dans la méthode PANDA [37]. Après examen attentif de la zone des blastes, nous avons constaté que cette déformation peut prendre deux aspects typiques : l'un dit « en bec » où l'extrémité inférieure gauche du nuage des MN plonge vers le coin du cytogramme et la zone de bruit de fond (fig. 28), l'autre dite « ovoïde » où la déformation forme un disque ou une ellipse qui ne dévie pas vers l'origine des axes (fig. 29). La déformation « ovoïde » correspond à l'ensemble des types lenticulaire et globulaire définis par Ialongo [16]. Le tableau 33 montre la fréquence de chacune de ces déformations dans les leucémies aiguës de notre étude. Nous n'avons pas classé les faux négatifs pour l'alarme « BLASTES » ainsi que les échantillons très leucopéniques ($< 1 \text{ G/L}$) car il est impossible de déterminer leur appartenance à l'un des deux groupes.

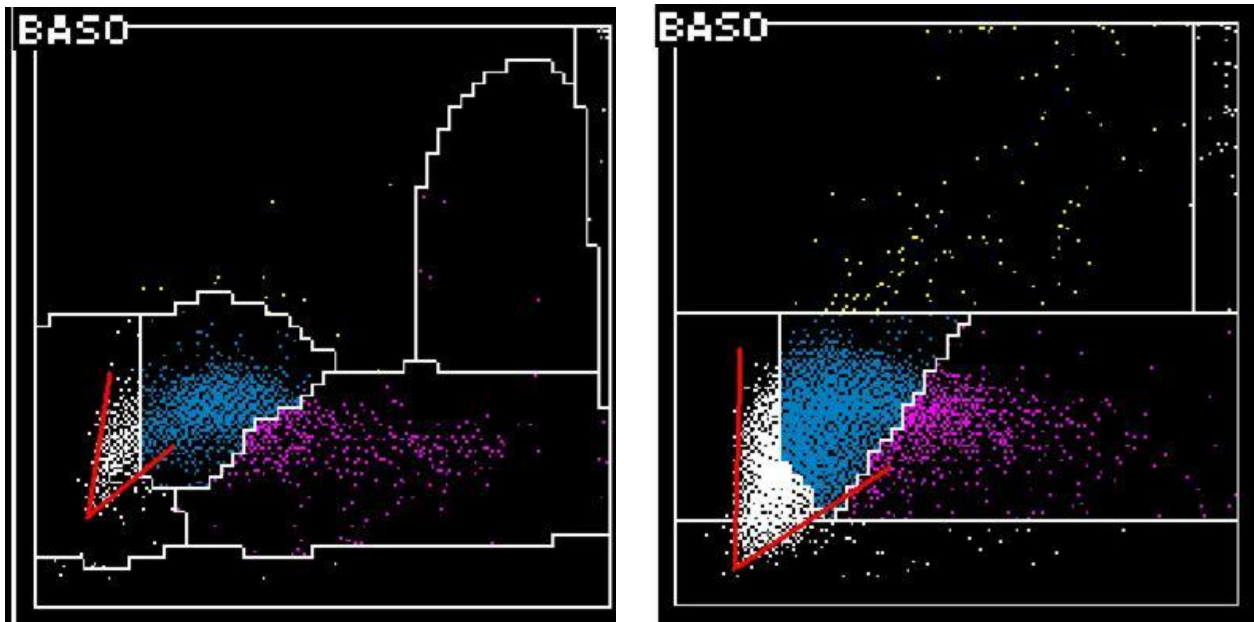


Figure 28. Cytogrammes BASO présentant une déformation « en bec » dans la zone des blastes.

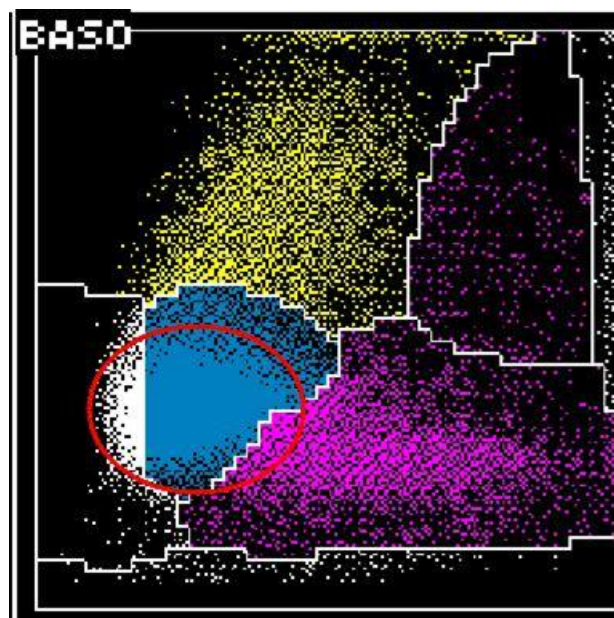


Figure 29. Cytogramme BASO présentant une déformation « ovoïde » dans la zone des blastes.

Comme pour les catégories du PANDA, la détermination de l'aspect du nuage de blastes est observateur-dépendant. L'avantage est qu'ici, les deux déformations ont des formes mutuellement exclusives et il est difficile d'être tenté de classer une même hémopathie dans les deux catégories simultanément comme cela est parfois le cas avec les catégories du PANDA.

Hémopathie		Aspect « en bec »	Aspect « ovoïde »	Absence de déformation ou cytopénie empêchant la classification
LAM		51 (70)	15 (20)	7 (10)
dont	LAM0	3 (100)	0	0
	LAM1	16 (76)	3 (14)	2 (10)
	LAM2	5 (36)	6 (43)	3 (21)
	LAM3	8 (80)	0	2 (20)
	LAM4	4 (57)	3 (43)	0
	LAM5	15 (94)	1 (6)	0
	LAM6	0	1 (100)	0
	LAM7	0	1 (100)	0
LAL		5 (13)	22 (56)	12 (31)
dont	LAL1	0	12 (60)	8 (40)
	LAL2	5 (26)	10 (53)	4 (21)
Labi		0	1 (50)	1 (50)
LAI		0	1 (100)	0

Tableau 33. Fréquence des deux déformations-type parmi les leucémies aiguës. Le chiffre entre parenthèse indique la fréquence parmi l'ensemble des hémopathies de même type.

Le tableau précédent est sans équivoque : l'aspect « en bec » est beaucoup plus fréquent dans les LAM que dans les autres leucémies aiguës (test du « chi-deux », $p < 10^{-7}$). A l'inverse, l'aspect « ovoïde », majoritaire dans les LAL, est largement sous-représenté dans les LAM, différence là aussi significative (test du « chi-deux », $p < 0,001$). Il convient néanmoins de relativiser ce constat : les LAM avec une déformation « en bec » ne représentent que 70 % des LAM blastiques de notre cohorte tandis que les LAL ont une déformation « ovoïde » dans 56 % des

cas seulement. Il s'agit donc d'aspects assez évocateurs mais non systématiques. Dès lors, nous sommes en droit de nous interroger sur la signification d'un aspect « en bec » sur le cytogramme BASO d'une LA. A l'aide du tableau 34, nous pouvons établir que la valeur prédictive positive d'une déformation « en bec » est de 91 % pour détecter une LAM (uniquement lorsque l'hypothèse d'une leucémie aiguë est déjà vérifiée). L'aspect « ovoïde » est lui moins discriminant : on le retrouve dans 20 % des LAM mais également dans les LAI et LA biphénotypiques. Sa valeur prédictive positive pour détecter une LAL n'est que de 62 %.

Précisons également que les deux syndromes de Richter, quatre lymphomes et les deux AREB ont une déformation « ovoïde » tandis que deux SMD et cinq hémopathies non blastiques (deux LTL, deux LP et une MNI) ont une déformation « en bec ».

	Aspect « en bec »	Aspect « ovoïde »	Total
LAM	51	15	66
Autre LA	5	24	29
Total	56	39	95

Tableau 34. Répartition des LAM et des autres LA pour chacune des deux déformations.

En conclusion, nous retenons donc de cette analyse que la présence d'une déformation « en bec » du cytogramme BASO est à considérer comme un argument pertinent en faveur d'une LAM. Une déformation « ovoïde » est moins informative mais peut toujours conforter l'hypothèse d'une leucémie aiguë non myéloïde ou d'un lymphome lymphoblastique.

3.4.2.2 LLC, LNH et résistance à la lyse

Nous avons déjà évoqué le phénomène de résistance à la lyse de certaines cellules tumorales qui peut provoquer une hyperbasophilie artéfactuelle et le déclenchement de l'alarme « B-SUSP ». Dans les LA, les blastes non lysés se situent principalement au dessus de la zone des mononucléés du cytogramme BASO et l'extrémité droite du nuage de point déborde souvent au dessus de la zone des polymorphonucléés (fig. 30). Nous avons remarqué que lorsque ce phénomène de résistance à la lyse se produit dans les LNH ou la LLC, le nuage de points qui en résulte prend une position

différente. En effet, dans la LLC, le nuage formé par les cellules non lysées est décalé vers la droite et se situe au dessus de la zone des PMN. Nous imputons ce phénomène à la plus grande densité nucléaire de ces cellules par rapport aux cellules mononucléées habituelles (à l'instar des noyaux érythroblastiques qui apparaissent dans la zone des PMN). Si le défaut de lyse n'est pas systématique dans ces hémopathies (il n'est observé que dans dix des vingt-huit LLC hors Richter et six des dix-huit LNH), il se manifeste à chaque fois dans cette configuration « décalée vers la droite » sur le cytogramme BASO (fig. 31). Il semblerait que ce décalage soit plus important dans les LLC que dans les lymphomes.

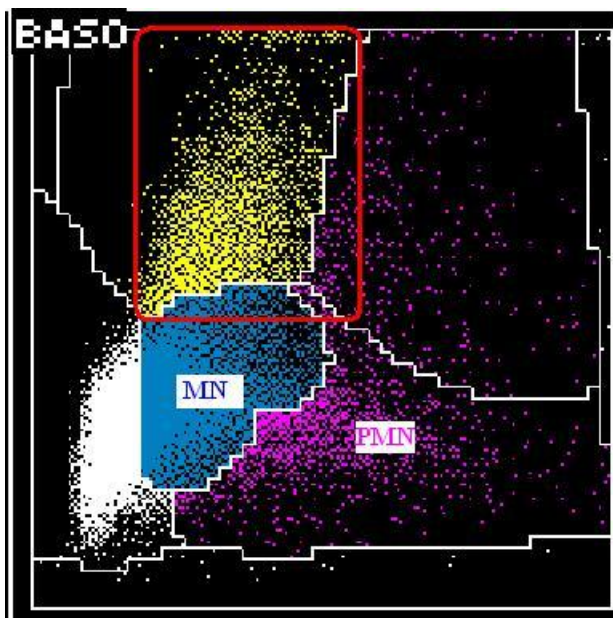


Figure 30. Cytogramme BASO d'une patiente atteinte de LAM1 (FAB) avec phénomène de résistance à la lyse.

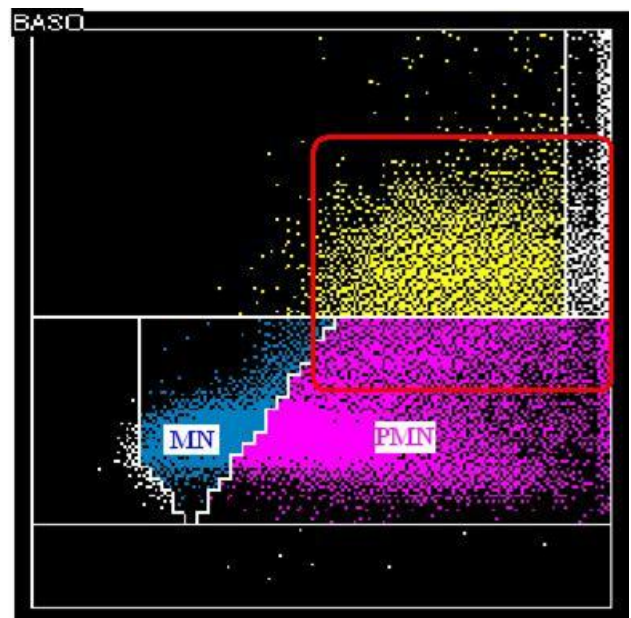


Figure 31. Cytogramme BASO d'une patient atteinte de LLC avec phénomène de résistance à la lyse.

Parfois, dans les LNH, un contingent de cellules anormales s'individualise dans la zone située au dessus de la vallée MN/PMN. A cette population nous pouvons faire correspondre un nuage de points situé dans la zone des LUC du cytogramme PEROX (fig. 32). Nous pensons que ces deux nuages matérialisent la position des cellules lymphomateuses sur les deux cytogrammes. Cette image caractéristique est observée dans 4 cas de LNH sur les 18 que compte notre étude. Précisons que nous n'avons jamais retrouvé cette configuration parmi les autres hémopathies étudiées.

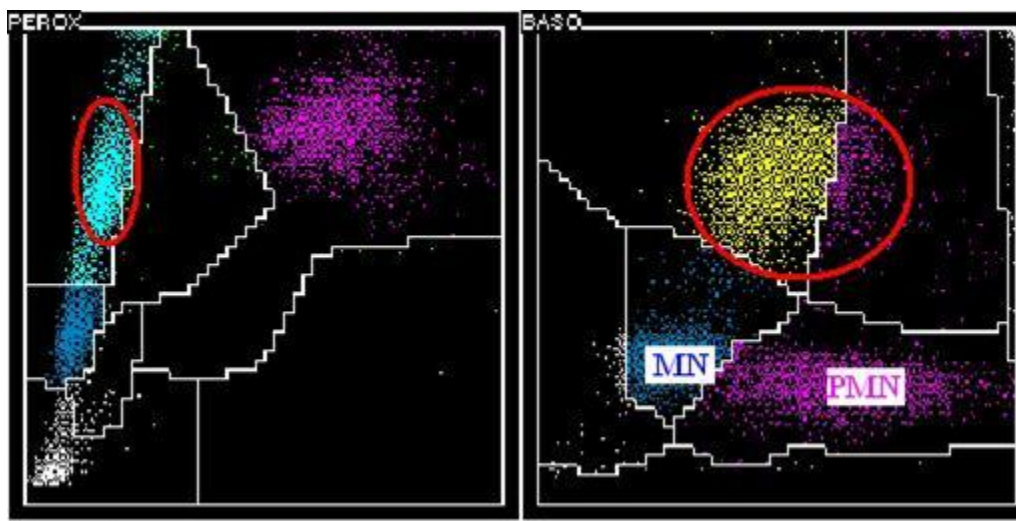


Figure 32. Cytogrammes d'un patient atteint d'un lymphome du manteau.

3.4.2.3 Aspects particuliers des cytogrammes des leucémies à tricholeucocytes

Les tricholeucocytes sont des cellules d'assez grande taille, sans activité peroxydasique (nature lymphoïde B) dont la chromatine est assez relâchée [43]. Ils apparaissent donc généralement dans la partie basse des LUC sur le cytogramme PEROX (fig. 33), dans la continuité du nuage de lymphocytes (on peut imaginer qu'il existe de nombreuses formes intermédiaires en termes de taille). Le nuage ne dépasse généralement pas la moitié de la hauteur de la zone des LUC, contrairement aux monoblastes par exemple qui atteignent fréquemment le bord supérieur. Dans la plupart des cas (douze fois sur treize), la zone correspondant aux monocytes est quasiment vide, reflet d'une monocytopénie caractéristique. Une leucopénie ou une pancytopenie ne sont pas rares. Il existe de plus rares formes avec hyperleucocytose (trois cas sur treize dans notre cohorte) dont les cytogrammes peuvent avoir des allures atypiques.

Sur le cytogramme BASO, les tricholeucocytes sont situés dans la partie gauche du nuage des mononucléés, débordant parfois légèrement dans la zone des blastes (fig. 33). Le phénomène de résistance à la lyse est relativement rare, sans doute du fait du faible nombre de cas accompagnés d'hyperleucocytose. Nous l'avons observé à deux reprises et les cellules résistantes à la lyse se situent au-dessus des mononucléés. Notons que les trois formes hypercytaires ont un cytogramme BASO très atypique qui laisse faussement augurer de la présence de blastes (alarme « BLASTES +++ », aspect du nuage « en bec » pour deux d'entre elles et « ovoïde » pour le troisième).

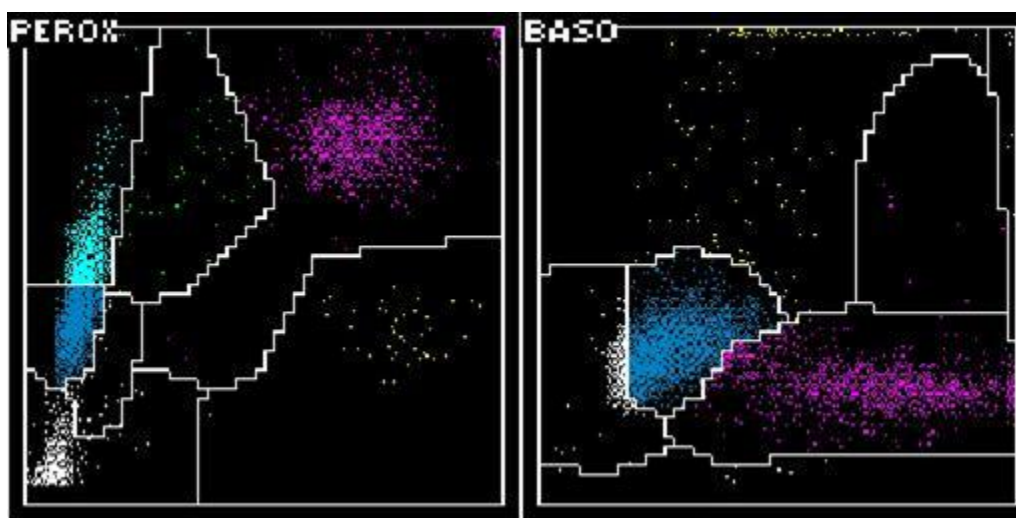


Figure 33 Présentation habituelle d'une leucémie à tricholeucocytes

3.4.2.4 Aspects particuliers des cytogrammes des syndromes mononucléosiques

Les lymphocytes de la mononucléose sont également appelés lymphocytes hyperbasophiles ou lymphocytes activés. Il s'agit d'une population lymphoïde particulière de nature CD8+ (rarement NK), dont le caractère activé ou stimulé se traduit par une basophilie cytoplasmique parfois très forte (= grande quantité d'ARN), une augmentation de la taille cellulaire (jusqu'à 3 fois la taille d'un lymphocyte) et la persistance d'une texture chromatinienne mature (rares nucléoles). Le niveau d'activation variable des cellules amène un grand polymorphisme cellulaire : polymorphisme de taille (cellules petites + moyennes + grandes), de basophilie cytoplasmique (du bleu ciel au bleu intense, avec distribution irrégulière de la basophilie dans la cellule), de forme nucléaire (arrondi ou contourné) [43].

Les cytogrammes observés dans les syndromes mononucléosiques sont en adéquation avec la morphologie cellulaire (fig. 34). Sur le cytogramme PEROX, les lymphocytes hyperbasophiles se répartissent entre la base des LUC pour les plus petits jusqu'à la partie haute pour les plus grands. Le cytogramme BASO ne montre pas de signe d'immaturité nucléaire. La déformation blastique observée dans un de nos cas de syndrome mononucléosique est probablement due au fait qu'il est survenu au décours d'une hémopathie maligne chez un enfant immunodéprimé plutôt qu'au syndrome mononucléosique en lui-même. En revanche, dans treize cas sur seize, on retrouve un

défaut de lyse induisant une déviation vers le haut du nuage des MN. Il s'agit de la déformation D2 citée dans les travaux du PANDA [37]. Précisons qu'elle ne peut être évocatrice d'un syndrome mononucléosique qu'en l'absence de déformation blastique associée.

Plus curieusement, nous avons relevé l'existence d'un nombre restreint d'évènements isolés dans le coin inférieur gauche du cytogramme BASO (fig. 34). Après avoir considéré ce nuage de points comme un artéfact lié à l'échantillon, nous nous sommes aperçus qu'il existe de manière semblable pour douze des seize syndromes mononucléosiques recensés. Plus étonnant encore, ce constat n'est valable que pour douze des 197 hémopathies (hors SMN) de l'étude : 6 LAM, 4 LAL, 1 LP et 1 TE. Cette différence est statistiquement significative (test du « chi-deux », $p < 10^{-15}$). Dès lors, il serait intéressant de connaître la nature de ces éléments situés dans le coin inférieur gauche. Peut être s'agit-il de débris leucocytaires car on observe dans les syndromes mononucléosiques un pourcentage de cellules en apoptose pouvant aller jusqu'à 20 % du total cellulaire. Ceci étant, nous savons que les noyaux lymphocytaires apoptotiques apparaissent dans la zone des PMN du cytogramme BASO ; il paraît donc peu probable qu'ils soient à l'origine de ce phénomène [34].

C'est donc avec une légitimité très empirique que nous affirmons qu'un échantillon sanguin non blastique, contenant de nombreux LUC, dont le cytogramme BASO révèle une déviation vers le haut des MN et la présence d'une petite population isolée dans le coin inférieur gauche est très évocateur d'un syndrome mononucléosique.

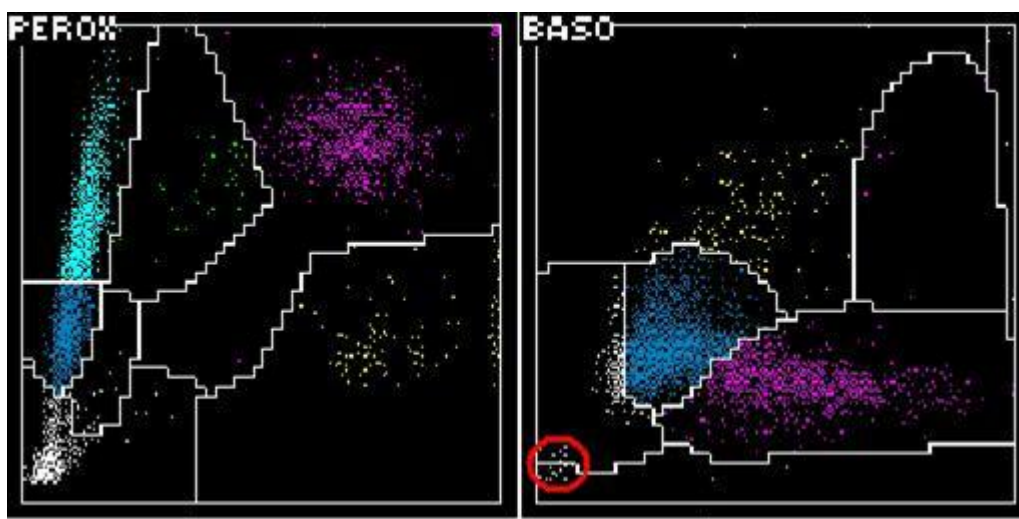


Figure 34. Présentation habituelle d'un syndrome mononucléosique.

3.5 Exploitation des conjectures mises en évidence

3.5.1 Comment utiliser les informations fournies par l'ADVIA® 2120 ?

A l'instar des batteries de tests d'identification bactérienne, nous avons rassemblé dans le tableau 35 la fréquence de certains résultats fournis par l'appareil dans les différentes hémopathies de notre étude. Comme nous avons pu le constater, il n'existe pas de critères absolus permettant de caractériser à coup sûr chaque hémopathie. L'hypothèse diagnostique ne peut se construire que sur un faisceau d'arguments. Nous pourrions imaginer un système de score qui intégrerait ces informations ainsi que les considérations graphiques dont nous avons débattu pour rendre, en fonction des données brutes de l'appareil, le diagnostic le plus probable. Cela rentre tout à fait dans l'optique de la création de réseaux neuronaux [38, 39] applicables à l'ADVIA® 2120 pour lesquels notre travail pourrait constituer une base de données intéressante. Nous pouvons également imaginer une combinaison de ces renseignements émanant de données numériques ou des alarmes avec les données graphiques du PANDA [37].

	BLAS- TES	ATYP	GI	PN>50 %	L>PN	M >9 %	LUC/L > 1	Q>2	bec	ovoïde
LAM0	+++	++	+	0	++++	0	+	++	++++	0
LAM1	+++	++	++	+	++	+++	+	+++	+++	+
LAM2	+++	++	+++	++	+	++	++	++	++	++
LAM3	+++	+	+++	+++	R	0	0	+++	+++	0
LAM4	+++	+++	++	0	+++	++++	+++	+++	++	++
LAM5 a	+++	+++	+	0	++	+	+++	+	+++	R
LAM5 b	+++	++	++++	+	R	++++	+++	++++	++++	0
SMP	++++	++	+++	++++	0	0	+++	+++	0	+++
SMD	++++	+++	++	+	0	++++	++	+++	++	++
LAL1	++	+++	0	R	+++	0	0	0	0	++
LAL2	+++	++	R	R	+++	0	R	R	+	++
LA <i>bi</i>	++++	++	++	++	++	0	0	0	0	++
LLC*	R	++	0	R	+++	0	R	0	0	0
LNH	++	++	+	+	++	0	+	+	0	+
LP et MPC	++++	++++	R	0	++	R	++	0	+	++
LPL	++	++	R	0	+++	0	0	0	0	++
LTL	++	++	0	+	++	0	0	0	+	R
MNI	+++	++++	R	R	+++	+	+	0	R	R

Tableau 35. Fréquence de certaines caractéristiques appréhendées grâce à l'ADVIA® 2120 dans les hémopathies étudiées

* Sauf Richter

Légende :

- ✓ 0 : aucun cas recensé
- ✓ R : un seul cas recensé, le plus souvent atypique
- ✓ + : peu fréquent (moins de un cas sur trois)
- ✓ ++ : fréquent (entre un et deux cas sur trois)
- ✓ +++ : très fréquent (plus de deux cas sur trois)
- ✓ ++++ : systématique

3.5.2 Exemples d'analyse des données fournies par l'ADVIA[®] 2120

Le tableau 35 rassemble les principaux résultats de notre étude et la fréquence de nos observations dans les différentes hémopathies envisagées. De manière très empirique, nous allons tenter de l'utiliser pour caractériser quelques pathologies parmi celles que nous avons recensées. Cela donne une idée de ce que pourrait réaliser un système informatique approprié à partir d'une base de données beaucoup plus vaste.

3.5.2.1 Monsieur B.

Prenons l'exemple d'un de nos patients et mettons nous en situation pratique. Il s'agit de Monsieur B. âgé de 57 ans dont l'analyse de l'échantillon sanguin donne les résultats exposés dans le tableau 36 et la figure 35.

BLASTES	ATYP	GI	PN>50 %	L>PN	M >9 %	LUC/L > 1	Q>2	Aspect
Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Bec

Tableau 36. Analyse des données fournies par l'ADVIA[®] 2120 après analyse du sang de Mr. B

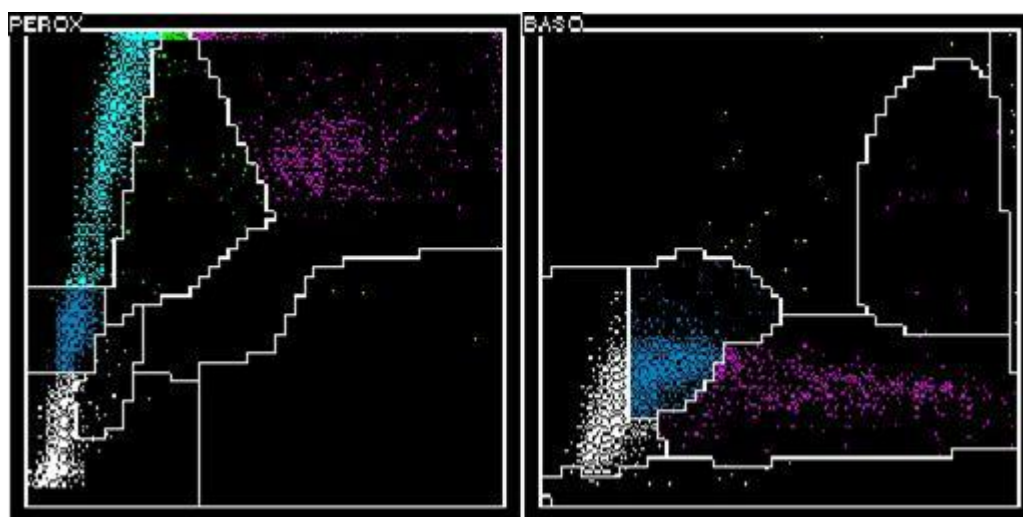


Figure 35. Cytogrammes de Mr. B.

Si l'on se reporte au tableau 35, le fait que l'on retrouve « une inversion de formule », un pourcentage de monocytes supérieur à 9, un rapport LUC/L supérieur à 1, un quotient $Q > 2$ et une déformation blastique « en bec » permet d'exclure toutes les hémopathies à l'exception des LAM de type 1, 2, 4, 5a ou 5b (FAB). Après cette sélection drastique, nous pouvons considérer le cytogramme PEROX (fig. 35) de Mr. B et nous apercevoir qu'il est de type D1-P0. Or, si l'on consulte la grille de pré-classification PANDA [37], nous pouvons nous apercevoir que la seule hémopathie compatible avec ce profil parmi les 5 types envisagés est la LAM5a. Nous pouvons même ajouter que l'image des LUC « en fusée » est très évocatrice de cette pathologie. Cette conjecture se révèle exacte : le myélogramme dont a bénéficié Mr B. a permis de mettre en évidence une LAM5a (FAB).

3.5.2.2 Monsieur K.

Monsieur K. est un patient âgé de 28 ans pour lequel l'ADVIA[®] donne les résultats exposés dans le tableau 37 et la figure 36.

BLASTES	ATYP	GI	PN>50 %	L>PN	M >9 %	LUC/L>1	Q>2	Aspect
Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	ovoïde

Tableau 37. Analyse des données fournies par l'ADVIA[®] 2120 après analyse du sang de Mr. K

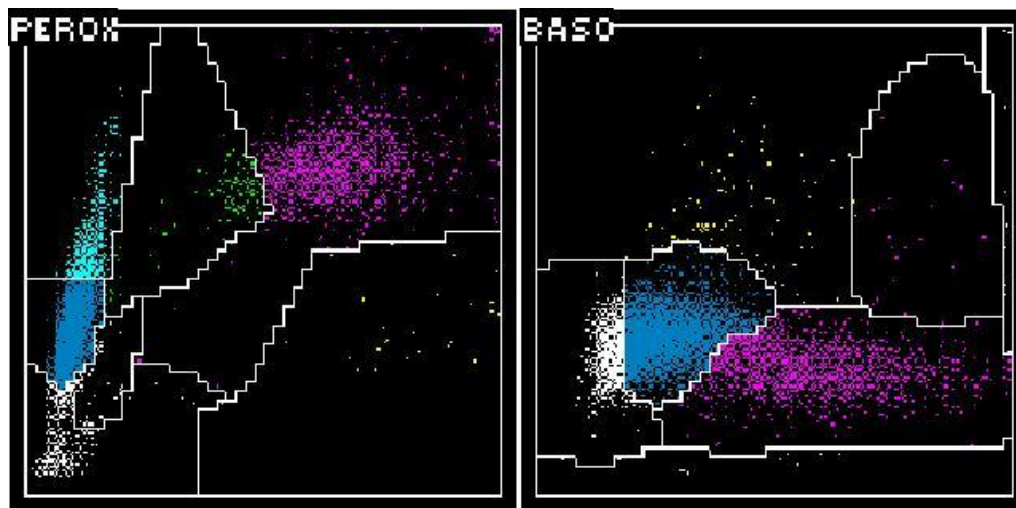


Figure 36. Cytogrammes de Mr. K.

Le pourcentage de monocytes, le rapport LUC/lympho, le quotient Q et l'aspect du nuage de blastes permettent d'écarter l'hypothèse d'une hémopathie myéloïde (tableau 35). De plus, la présence de blastes (fig. 36) élimine l'éventualité d'une LLC ou d'une MNI et rend très improbable une LTL. L'absence d'alarme « ATYP » est à considérer comme contraire à la possibilité d'une hémopathie à plasmocytes circulants. Les hypothèses diagnostiques les plus probables sont donc celles d'une LAL, un lymphome circulant ou une leucémie polylmphocytaire. L'examen microscopique révèle la présence de 80 % de lymphoblastes de taille moyenne à grande. Le myélogramme indique qu'il s'agit d'une LAL de type 2 (FAB).

3.5.2.3 Monsieur F.

Monsieur F. a 62 ans lorsqu'il consulte au service d'hématologie adulte. L'hémogramme réalisé suite à sa consultation fournit les résultats suivants (tableau 38 et fig. 37)

BLASTES	ATYP	GI	PN>50 %	L>PN	M >9 %	LUC/L>1	Q>2	Aspect
Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non	ras

Tableau 38. Analyse des données fournies par l'ADVIA[®] 2120 après analyse du sang de Mr. K.

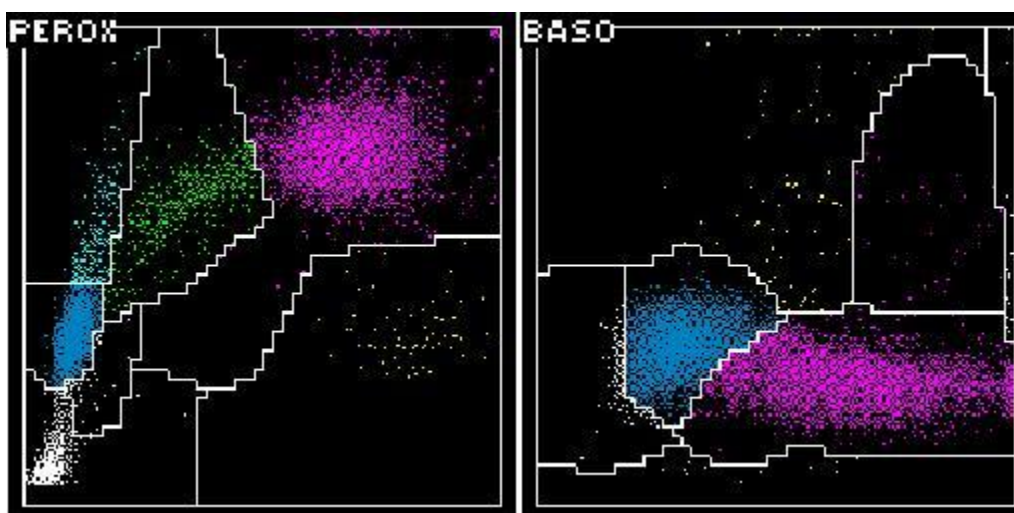


Figure 37. Cytogrammes de Mr. F.

L'absence d'alarme, le pourcentage de monocytes, le quotient Q ainsi que l'absence de

déformation du nuage des MN sur le cyogramme BASO éludent bon nombre d'hypothèses diagnostiques à l'exception des LAL, LLC, LNH, LPL, MNI et LTL (tableau 35). Le rapport LUC/lympho supérieur à 1 permet de privilégier l'éventualité d'un lymphome ou d'un syndrome mononucléosique sans pouvoir exclure totalement une LLC. L'absence de déviation de type D2 sur le cyogramme BASO et de nuage de points en bas à gauche sont en faveur du lymphome. Ce cas de figure est également compatible avec la configuration « à droite » des quelques cellules résistantes à la lyse. L'immunophénotypage et la cytologie montrent qu'il s'agit d'un lymphome folliculaire.

Conclusion

L'ADVIA® 2120 fournit de nombreuses données dont l'exploitation peut aider à caractériser les hémopathies et les discriminer entre elles. Il nous paraît intéressant d'établir un système de score diagnostique semblable à celui des identifications biochimiques bactériennes. Le moyen idéal pour mettre en œuvre ce procédé semble l'utilisation des « réseaux neuronaux ». Sous la forme d'une application informatique, il est possible par ce biais d'assimiler et d'interpréter une multitude d'informations numériques et/ou graphiques. L'intégration d'un tel dispositif à la station de travail informatique de l'ADVIA® 2120 permettrait à l'analyste de rendre, en cas de résultats perturbés, une ou plusieurs propositions diagnostiques assortie(s) d'un score de probabilité.

Il n'est pas question pour autant de prétendre faire un diagnostic d'hémopathie à partir du seul hémogramme. Il s'agit plutôt d'optimiser la prise en charge de chaque pathologie afin d'orienter au mieux les examens nécessaires au diagnostic et limiter les actes invasifs ou coûteux aux situations appropriées.

Pour le biologiste, cet outil est à considérer comme un moyen de porter une attention particulière à la recherche de certains éléments spécifiques à l'examen microscopique du frottis sanguin. C'est également une aide à l'identification des cellules anormales.

Compte tenu du grand potentiel de l'ADVIA® 2120, il convient de poursuivre le développement d'un système d'exploitation des données recueillies à partir des nombreuses conjectures que les études, dont la nôtre, ont mis en évidence.

Table des Figures

Figure 1. L'ADVIA [®] 2120 [6]	15
Figure 2. Analyse optique des cellules dans le canal peroxydase [6]	21
Figure 3. Position des différentes populations cellulaires sur le cytogramme PEROX [6]	22
Figure 4. Représentation des différentes cellules sur le cytogramme PEROX [7]	23
Figure 5. Analyse optique des noyaux leucocytaires et des polynucléaires basophiles dans le canal BASO [6]	28
Figure 6. Les différentes zones du cytogramme BASO [6]	30
Figure 7. Représentation des différentes cellules sur le cytogramme BASO [7].....	31
Figure 8. Cytogrammes PEROX des trois groupes défini par Takubo et coll. [36].....	60
Figure 9. Déformations du cytogramme BASO dans certaines LAL [16].....	61
Figure 10. Représentation schématique des cytogrammes PEROX dans les différents types de leucémies aiguës (FAB).	64
Figure 11. Exemple de cytogrammes BASO de type D0 [5, 37].....	65
Figure 12. Exemple de cytogrammes BASO de type D1 [5, 37].....	66
Figure 13 Exemple de cytogrammes BASO de type D2 [5, 37].....	66
Figure 14. Exemple de cytogrammes PEROX de type P0 [5, 37].....	67
Figure 15. Exemple de cytogrammes PEROX de type P1 [5, 37]	68
Figure 16. Exemple de cytogrammes PEROX de type P2 [5, 37]	68
Figure 17. Exemple de cytogrammes PEROX de type P3 [5, 37]	69
Figure 18. Exemple de cytogrammes PEROX de type P4 [5, 37]	69
Figure 19. Exemple de cytogrammes PEROX de type P5 [5, 37]	70
Figure 20. Exemple de cytogrammes PEROX de type P6 [5, 37]	70
Figure 21. Lymphoblaste du patient 8 (LAL1) pour lequel l'alarme « BLASTES » ne s'est pas déclenchée (x 1000)	84
Figure 22. Lymphoblastes d'un patient atteint de LAL2 (FAB) pour lequel l'alarme « BLASTES » s'est déclenchée (x 630).....	84
Figure 23. Cytogramme BASO d'une LAL où se superposent les modèles D1 et D2 de la méthode PANDA.	102
Figure 24. Cytogramme PEROX d'une LAM0 (FAB) avec myélémie associée où se superposent les modèles P0 et P4 de la classification PANDA.....	103
Figure 25. Cytogrammes provenant d'un patient atteint d'une LAM3 avec cytopénie importante.	

.....	103
Figure 26. Cytogrammes d'un patient atteint de LAM3 (FAB)	106
Figure 27. Cytogrammes d'un patient atteint de LAM5a.....	106
Figure 28. Cytogrammes BASO présentant une déformation « en bec » dans la zone des blastes.	108
Figure 29. Cytogramme BASO présentant une déformation « ovoïde » dans la zone des blastes	108
Figure 30. Cytogramme BASO d'une patiente atteinte de LAM1 (FAB) avec phénomène de résistance à la lyse.....	111
Figure 31. Cytogramme BASO d'une patient atteinte de LLC avec phénomène de résistance à la lyse.	111
Figure 32. Cytogrammes d'un patient atteint d'un lymphome du manteau.....	112
Figure 33 Présentation habituelle d'une leucémie à tricholeucocytes	113
Figure 34. Présentation habituelle d'un syndrome mononucléosique.	114
Figure 35. Cytogrammes de Mr. B.....	117
Figure 36. Cytogrammes de Mr. K.	118
Figure 37. Cytogrammes de Mr. F.	119

Table des tableaux

Tableau 1. Table de Rümke. Variation des valeurs relatives d'une population leucocytaire selon le nombre de cellules comptées	12
Tableau 2. Domaines de linéarité des différents canaux de l'ADVIA® 2120 [5].....	34
Tableau 3. Durée de stabilité pour différents paramètres mesurés par l'ADVIA® 2120 [5]	35
Tableau 4. Tableau de contingence pour N individus	38
Tableau 5. Comparaison des résultats de l'alarme « BLASTES » du Technicon® H1 et de l'examen microscopique.	40
Tableau 6. Eléments de classification morphologique (FAB) des LAL [13]	41
Tableau 7. Déclenchement des alarmes du Technicon® H1 dans les différentes hémopathies [14] ..	42
Tableau 8. Déclenchement des alarmes morphologiques dans l'étude de Ialongo et coll. [16]	43
Tableau 9. Analyse du déclenchement des alarmes selon le pourcentage de blastes sanguins dans l'étude de Fernandez-Castro et Vilorio [17].	44
Tableau 10 Déclenchement des alarmes morphologiques pour les 17 cas de LAM [18].	46
Tableau 11. Déclenchement des alarmes morphologiques pour les 3 cas de LAL [18].....	46
Tableau 12. Résultats obtenus pour l'unique cas de leucémie biphénotypique [18.].....	46
Tableau 13. Déclenchement de l'alarme « BLASTES » pour les 2 cas de LMC et les 3 SMD [18].	47
Tableau 14. Déclenchement des alarmes morphologiques pour les 11 cas de SLP [18].	47
Tableau 15. Performances des alarmes « BLASTES » de l'ADVIA® 2120 et du LH750 [20].....	49
Tableau 16. Valeurs du MPXI dans les différentes LAM (FAB) [28].....	53
Tableau 17. Valeur moyenne (\pm écart-type) du MPXI et des pourcentages de polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et LUC dans l'étude de Tsakona et coll. [22].	55
Tableau 18. Etude du rapport lymphocytes atypiques (ou LUC) sur lymphocytes dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques [18].	58
Tableau 19. Grille de classification d'après la méthode PANDA [37]	71
Tableau 20. Evaluation de l'efficacité de la méthode PANDA [37]	72
Tableau 21. Déclenchement de l'alarme « BLASTES » parmi les échantillons sanguins analysés...	78
Tableau 22. Déclenchement de l'alarme « BLASTES » dans les hémopathies blastiques.	79
Tableau 23. Données biologiques des cinq patients « faux négatifs » pour l'alarme « BLASTES »	80
Tableau 24. Données biologiques des onze patients « faux négatifs » pour l'alarme « BLASTES »	82

Tableau 25. Déclenchement de l'alarme « ATYP » dans les cas de lymphomes avec cellules atypiques circulantes.	87
Tableau 26. Principaux paramètres numériques mesurés (moyenne \pm écart-type) dans les différentes hémopathies de notre étude.	89
Tableau 27. Valeurs moyennes du MPXI (\pm écart-type) dans notre étude et celle d'Eivazi-Ziaei [28]	94
Tableau 28. Valeurs moyennes du rapport LUC/lympho calculé à partir des valeurs de l'ADVIA [®] 2120 dans les travaux de Dorfman et les nôtres (les effectifs sont indiqués entre parenthèses).	96
Tableau 29. Principaux paramètres numériques calculés (moyenne \pm écart-type) dans les différentes hémopathies de notre étude.	97
Tableau 30. Valeurs prises par le quotient Q des rapports (M+PN)/(LUC+L) et PMN/MN	99
Tableau 31. Répartition des échantillons en fonction de leur quotient Q	101
Tableau 32. Evaluation de l'efficacité de la méthode PANDA	104
Tableau 33. Fréquence des deux déformations-type parmi les leucémies aiguës. Le chiffre entre parenthèse indique la fréquence parmi l'ensemble des hémopathies de même type.	109
Tableau 34. Répartition des LAM et des autres LA pour chacune des deux déformations.	110
Tableau 35. Fréquence de certaines caractéristiques appréhendées grâce à l'ADVIA [®] 2120 dans les hémopathies étudiées	116
Tableau 36. Analyse des données fournies par l'ADVIA [®] 2120 après analyse du sang de Mr. B... ..	117
Tableau 37. Analyse des données fournies par l'ADVIA [®] 2120 après analyse du sang de Mr. K... ..	118
Tableau 38. Analyse des données fournies par l'ADVIA [®] 2120 après analyse du sang de Mr. K... ..	119

Index des références bibliographiques

- [1] Ross DW. Flow cytochemistry and WBCs in disease. Diagnostic Medicine. June 1985.
- [2] d'Onofrio G. Medical relevance of myeloperoxidase measurement by flow cytochemistry. Proceedings of the Technicon® international colloquium on laboratory hematology. 1988 Feb 19 ; Paris, France.
- [3] Kutter D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon® automated hematology. J Mol Med. 1998 ; 76(10):669-75. Review.
- [4] d'Onofrio G, Mancini R, Vallone R, Alfano G, Candido A, Palla M, Mango G. Acquired neutrophil myeloperoxidase deficiency: an indicator of subclinical activation of blood coagulation? Blood Cells. 1983 ;9 (3):455-66.
- [5] Harris N, Kunicka J, Kratz A. The ADVIA® 2120 hematology system: flow cytometry-based analysis of blood and body fluids in the routine hematology laboratory. Lab Hematol. 2005 ; 11(1):47-61.
- [6] Manuel de formation de l'utilisateur ADVIA® 2120.
- [7] Guide de l'opérateur ADVIA® 2120.
- [8] Mollard JF. Hematocrit : measurement techniques and their limitations in a blood gas determination. Ann Biol Clin. 2003 ; 61(2):165-74.
- [9] England JM. Improvements in red cell measurements and indices on the H*1. Proceedings of the Technicon® international colloquium on laboratory hematology. 1988 Feb 19 ; Paris, France.
- [10] Huguier M, Fahault A. Biostatistiques au quotidien. 2ème éd. Paris : Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, 2003, 107-108.
- [11] d'Onofrio G, Mancini S, Leone G, Bizzi B, Mango G. Identification of blast cells in peripheral blood through automatic assessment of nuclear density: a new tool for monitoring patients with acute leukaemia. Br J Haematol. 1987 ; 66(4):473-7.

- [12] Löffler H, Gassmann W. Morphology and cytochemistry of acute lymphoblastic leukaemia. *Baillieres Clin Haematol*. 1994 Jun ; 7(2):263-72. Review.
- [13] Sebahoun G. *Hématologie clinique et biologique*. 2ème éd. Rueil-Malmaison : Arnette, 2005, 279.
- [14] Krause JR, Costello RT, Krause J, Pechansky L. Use of the Technicon® H-1 in the characterization of leukemias. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 ; 112(9):889-94.
- [15] Kline A, Bird A, Adams L, Wale C, Edwards F, Perreira E. Identification of blast cells in the peripheral blood of patients with acute leukaemia using the Technicon® H-1. *Clin Lab Haematol*. 1989 ; 11(2):111-6.
- [16] Ialongo P, Lubrano MC, Fenu S, Vignetti M, Mandelli F. Haematological monitoring of acute lymphoblastic leukemia by automated flow cytochemistry (Bayer/Technicon® H*1). *Haematologica*. 1993 ;78(2):89-94.
- [17] Fernandez-Castro M, Vilorio A. Utility of the Technicon® H-1 flags in the detection of peripheral blood blast cells of paediatric acute leukaemia patients. *Acta Haematol*. 1995 ; 93:9-12.
- [18] Dorfman DM, Fitzpatrick PA, Nieves I, Weinberg DS, Wybenga DR. ADVIA® 120 hematology system : clinical utility in the analysis of hematopoietic malignancies. *Proceedings of the first international Bayer diagnostics central lab symposium*. 1997 Apr 20-22 ; Rome, Italy.
- [19] Aulesa C, Pastor I, Naranjo D, Piqueras J, Galimany R. Validation of the Coulter LH 750 in a hospital reference laboratory. *Lab Hematol*. 2003 ; 9(1):15-28.
- [20] Shelat SG, Canfield W, Shibutani S. Differences in detecting blasts between ADVIA® 2120 and Beckman-Coulter LH750 hematology analyzers. *Int J Lab Hematol*. 2010 ; 32(1 Pt 2):113-6.
- [21] Barnes PW, Eby CS, Shimer G. Blast flagging with the UniCel DxH 800 Coulter Cellular Analysis System. *Lab Hematol*. 2010 ; 16(2):23-5.
- [22] Tsakona CP, Kinsey SE, Goldstone AH. Use of flow cytochemistry via the H*1 in FAB identification of acute leukaemias. *Acta Haematol*. 1992 ; 88(2-3):72-7.

- [23] Ziaei JE, Dastgiri S. Role of myeloperoxidase index in differentiation of megaloblastic and aplastic anemia. *Indian J Med Sci.* 2004 ; 58(8):345-8.
- [24] Yonezawa K, Horie O, Yoshioka A, Matsuki S, Tenjin T, Tsukamura Y et al. Association between the neutrophil myeloperoxidase index and subsets of bacterial infections. *Int J Lab Hematol.* 2010 [Epub ahead of print].
- [25] Tsakona CP, Goldstone AH. Patterns of primary degranulation as indicated by the mean myeloperoxidase index (MPXI) during bacteraemia in lymphoma transplants treated with growth factors. *Clin Lab Haematol.* 1992 ; 14(4):273-80.
- [26] Bononi A, Lanza F, Ferrari L, Gusella M, Gilli G, Abbasciano V et al. Predictive value of hematological and phenotypical parameters on postchemotherapy leukocyte recovery. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009 ; 76(5):328-33.
- [27] Giordano G, Ferrucci PF, Nicci C, Grafone T, Tambaro R, Papini S et al. Medium adsorbance fraction of reticulocyte and myeloperoxidase index may individuate a patient subset with a low risk of chemotherapy-related neutropenia. *Oncol Rep.* 2009 ; 21(1):193-8.
- [28] Eivazi-Ziaei J. Myeloperoxidase index and subtypes of acute myeloid leukemia. *J Pak Med Assoc.* 2009 ; 59(6):406-7.
- [29] Bendix-Hansen K, Nielsen HK. Myeloperoxidase-deficient polymorphonuclear leucocytes (IV) : Relation to FAB-classification in acute myeloid leukaemia. *Scand J Haematol.* 1985 ; 35(2):174-7.
- [30] Lanza F, Moretti S, Latorraca A, Scapoli G, Rigolin F, Castoldi G. Flow cytochemical analysis of peripheral lymphocytes in chronic B-lymphocytic leukemia. Prognostic role of the blast count determined by the H*1 system and its correlation with morphologic features. *Leuk Res.* 1992 ; 16(6-7):639-46.
- [31] Patterson KG, Goldstone AH, Richards JD, Cawley JC. A hemalog D analysis of chronic lymphocytic leukaemia and other lymphoproliferative disorders affecting the blood. *J Clin Pathol.* 1981 ; 34(5):473-8.

- [32] Dorfman DM, Fitzpatrick PA, Nieves I, Weinberg DS, Wybenga DR. ADVIA® 120 hematology system : analysis of B-cell lymphoproliferative disorders. Proceedings of the first international Bayer diagnostics central lab symposium. 1997 Apr 20-22 ; Rome, Italy.
- [33] Froom P, Quitt M, Aghai E. The mean leukocyte myeloperoxidase index in hematological patients. *Am J Clin Pathol*. 1989 ; 92(6):791-3.
- [34] Mentz F, Baudet S, Blanc C, Issaly F, Binet JL, Merle-Beral H. Simple, fast method of detection apoptosis in lymphoid cells. *Cytometry*. 1998 ; 32(2):95-101.
- [35] Takubo T, Kubota Y, Oguma S, Ueda T, Shibata H, Nakamura H et al. Classification of acute non-lymphocytic leukemia according to the distribution picture of peroxidase activity and cell size: correlation between the classification and therapeutic response. *Blood Cells*. 1983 ; 9(3):501-14.
- [36] Hirasawa Y, Funato T, Saito M, Tokuhiko H, Kuto F, Nagoka T et al. Application of Hemalog-D to the FAB classification of acute leukemia. *Jpn J Clin Hematol*. 1982 ; 23:27-32.
- [37] d'Onofrio G. PANDA – Innovative classification of hematopoietic malignancies. *Bloodline rev*. 2001 ; 2-R:3-6.
- [38] Zini G, d'Onofrio G. Neural network in hematopoietic malignancies. *Clin Chim Acta*. 2003 ; 333(2):195-201.
- [39] Zini G. Artificial intelligence in hematology. *Hematology*. 2005 ; 10(5):393-400. Review.
- [40] Kratz A, Rubattu L, Maier-Redelsperger M, Amendola G, Danise P, d'Onofrio G et coll. Automated pre-classification of anemia based on the results of a routine automated hematology system. Poster introduced in the American Society of Hematology 47th annual meeting. 2005 dec 10-13 ; Atlanta, USA.
- [41] Gibbs GJ. Peroxidase activity and nuclear density analysis (PANDA) in the diagnosis of haematological malignancy. *Br J Biomed Sci*. 2005 ; 62(3):142-4.

[42] Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006 ;107(3):859-61.

[43] Bain BJ. *Blood cells : a practical guide* - 4th ed.

Annexe 1

Principales données recueillies pour les patients atteints de LAM de type 0, 1 ou 2 (FAB)

Diagnostic	GB (G/L)	PN (%)	L (%)	M (%)	PE (%)	PB (%)	LUC (%)	LUC/Lympho	(Mono+PN)/(LUC+L)	PMN/MN	Quotient Q	MPXi	Blast manuel	PANDA	Aspect
LAM0	46,86	2,50	81,09	0,62	0,13	1,09	14,55	0,18	0,03	0,03	0,97	-5,00	92	D1/P0	bec
LAM0	117,04	1,31	5,35	4,84	0,07	3,79	84,63	15,82	0,07	0,02	4,02	-3,60	96	D1/P0	bec
LAM0	186,15	17,62	43,89	6,98	0,12	5,14	31,38	0,71	0,33	0,09	3,78	-6,30	80	D1/P0+P4	bec
LAM1	17,94	38,80	14,44	15,05	1,39	1,00	29,26	2,03	1,23	0,11	11,44	-14,40	39	D1/P4	bec
LAM1	8,87	20,63	41,26	9,24	1,47	3,95	27,40	0,66	0,44	0,16	2,76	-1,20	56	D1/P1	bec
LAM1	22,98	2,70	75,94	6,48	0,48	0,91	13,49	0,18	0,10	0,02	5,25	3,90	88	D1/P1	bec
LAM1	1,75	34,29	36,00	11,43	1,14	0,57	16,57	0,46	0,87	1,07	0,82	-5,00	21	D1/P0	bec
LAM1	0,92	16,30	77,17	2,17	0,00	0,00	4,35	0,06	0,23	0,20	1,14	9,60	4	D0/P0	ras
LAM1	91,23	10,56	27,66	33,48	0,07	2,55	25,69	0,93	0,83	0,08	10,54	-25,80	92	D1/P2	rond
LAM1	0,94	6,30	65,50	13,30	3,90	1,40	9,60	0,15	0,26	0,28	0,93	-7,30	10	D1/P1	bec
LAM1	3,84	10,16	26,04	57,29	0,00	0,78	5,73	0,22	2,12	0,05	45,79	-7,00	82	D1/P2	rond
LAM1	3,8	22,37	50	20,79	2,11	0,53	4,21	0,08	0,80	0,08	9,89	-6,80	52	D1/P3	bec
LAM1	7,55	33,64	3,18	32,45	0,66	0,53	29,67	9,33	2,01	0,70	2,89	-6,80	40	D1/P2	bec
LAM1	88,09	18,38	5,35	57,79	0,39	2,16	15,93	2,98	3,58	0,03	105,40	-7,60	88	D1/P3	bec
LAM1	8,28	65,58	20,65	7,97	2,42	0,72	2,66	0,13	3,16	0,06	49,58	-8,40	60	D1/P1+P4	bec
LAM1	61,7	37,12	17,80	8,61	0,26	1,72	34,47	1,94	0,87	0,27	3,19	-9,70	38	D1/P2	rond
LAM1	135,94	90,8	0	5,8	0,57	2,66	0,16	#DIV/0!	596,91	0,04	14188,07	-8,9	91	D1/P4	bec
LAM1	6,69	19,88	20,63	45,59	0,45	2,24	11,36	0,55	2,05	0,19	10,85	-6,10	68	D1/P3	bec
LAM1	1,2	33,60	49,50	13,50	0,40	0,30	2,70	0,05	0,90	0,31	2,89	-8,20	23	D0/P3	ras
LAM1	21,4	7,48	13,32	72,24	0,14	0,93	5,89	0,44	4,15	0,06	74,72	-22,30	94	D1/P1	bec
LAM1	34,49	23,08	5,42	69,73	0,00	1,22	0,55	0,10	15,54	0,03	479,20	-27,40	94	D1/P3	bec
LAM1	26,16	44,69	5,20	45,68	2,94	0,69	0,76	0,15	15,15	0,07	219,26	-4,50	68	D1/P4	bec
LAM1	31,23	1,95	10,95	4,87	0,16	1,06	81,01	7,40	0,07	0,03	2,64	8,40	8	D1/P1	bec
LAM1	191,03	7,86	2,62	20,48	0,08	6,24	68,96	26,29	0,40	0,02	22,79	-13,40	85	D1/P1	bec
LAM2	15,68	59,06	1,08	17,28	4,34	0,57	17,73	16,35	4,06	0,78	5,17	6,20	30	D1/P4	rond
LAM2	16,11	19,99	18,93	51,40	2,30	0,87	6,52	0,34	2,80	0,07	40,54	6,30	78	D1/P3	bec
LAM2	3,4	23,53	61,47	7,94	5,59	0,59	0,88	0,01	0,50	0,17	2,99	21,30	15	D1/P6	bec
LAM2	4,22	28,44	27,96	11,85	1,66	10,43	30,09	1,08	0,69	0,30	2,30	8,80	6	D1/P1	rond
LAM2	4,64	32,33	31,03	10,34	0,43	9,27	25,86	0,83	0,75	0,23	3,27	17,20	2	D1/P1	rond
LAM2	1,98	50,30	41,50	3,80	0,90	0,30	3,30	0,09	1,21	1,06	1,15	-6,80	5	D0/P0	ras
LAM2	97,96	61,39	1,74	28,42	0,12	1,88	6,45	3,72	10,97	0,02	477,20	14,90	95	D1/P4	bec
LAM2	0,64	41,80	38,10	6,70	0,60	1,20	11,70	0,29	1,00	0,64	1,57	2,80	3	D1/P0	imposs
LAM2	3,76	60,37	13,30	7,71	0,53	0,27	18,09	1,36	2,17	1,25	1,73	15,70	20	D1/P1	rond
LAM2	50,7	77,61	0,00	6,41	0,14	3,96	11,85	#DIV/0!	7,09	0,76	9,36	3,40	5	D1/P1+P4	rond
LAM2	2,86	60,14	20,98	5,59	3,15	1,05	9,09	0,43	2,19	2,36	0,93	-6,60	7	D0/P0	ras
LAM2	30,9	22,59	12,17	47,25	0,13	1,10	16,76	1,38	2,41	0,27	8,92	-9,50	47	D1/P1	bec
LAM2	2,59	12,30	50,20	15,20	1,20	0,30	20,80	0,42	0,39	0,03	12,39	7,70	17	D1/P0	bec
LAM2	5,2	4,42	27,88	15,77	0,19	0,38	51,35	1,84	0,25	0,75	0,34	12,60	20	D1/P1	rond

Annexe 2

Principales données recueillies pour les patients atteints de LAM de type 3, 4, 5, 6 ou 7 (FAB).

Diagnostic	GB (G/L)	PN (%)	L (%)	M (%)	PE (%)	PB (%)	LUC (%)	LUC/Lympho	(Mono+PN)/(LUC+L)	PMN/MN	Quotient Q	MPXi	Blast manuel	PANDA	Aspect
LAM3	2,09	44,98	33,97	0,96	15,31	2,87	2,39	0,07	1,26	0,10	13,19	31,20	64	D1/P6	bec
LAM3	0,59	63,40	27,60	1,80	5,40	0,00	1,80	0,06	2,24	0,60	3,74	21,90	20	D1/P6	bec
LAM3	20	55,65	10,00	0,50	32,60	0,85	0,40	0,04	5,40	0,06	93,38	44,60	86	D1/P6	bec
LAM3v	24	83,83	6,75	3,46	2,83	0,83	2,33	0,35	9,61	0,22	44,34	15,20	64	D1/P4	bec
LAM3v	33,98	90,23	4,15	1,47	3,12	0,79	0,26	0,06	20,77	0,03	741,68	2,60	96	D1/P4	bec
LAM3	1,04	50,96	40,38	1,92	3,85	0,00	2,88	0,07	1,22	0,98	1,24	7,90	0	D0/P0	ras
LAM3	8,89	60,97	13,27	1,01	22,50	0,90	1,24	0,09	4,27	0,03	136,68	24,50	86	D1/P6	bec
LAM3v	3,29	64,74	16,11	9,42	0,61	0,91	7,90	0,49	3,09	1,33	2,32	2,20	9	D1/P4	bec
LAM3	0,67	59,70	19,40	1,49	16,42	1,49	1,49	0,08	2,93	0,22	13,54	29,80	58	D1/P6	bec
LAM3	0,68	22,06	72,06	1,47	1,47	0,00	2,94	0,04	0,31	0,14	2,21	18,60	8	D0/P0	ras
LAM3	2,3	68,70	21,74	4,35	2,17	0,43	2,61	0,12	3,00	2,32	1,29	5,20	0	D0/P0	ras
LAM3	1,55	58,30	33,20	3,40	1,80	0,60	2,90	0,08	1,73	1,41	1,22	-0,90	0	D0/P0	ras
LAM4	22,39	25,20	5,20	56,40	1,50	0,50	11,10	2,15	5,01	0,03	172,78	-2,00	91	D1/P3	bec
LAM4	6,05	14,21	31,74	20,50	0,50	0,66	32,40	1,02	0,54	0,17	3,26	-11,20	47	D1/P3	bec
LAM4	31,09	22,87	14,86	14,38	1,00	0,96	45,93	3,09	0,61	0,30	2,04	-8,20	25	D1/P4	rond
LAM4	7,3	13,42	30,68	36,85	0,41	0,55	18,08	0,59	1,03	0,07	13,79	-17,90	55	D1/P1+P3	bec
LAM4	31,52	10,47	16,09	24,02	0,38	0,70	48,35	3,01	0,54	0,06	9,49	8,80	30	D1/P2	rond
LAM4	18,6	18,44	36,72	9,35	3,01	3,23	29,30	0,80	0,42	0,25	1,69	12,00	69	D1/P1	rond
LAM4	23,76	18,10	22,70	10,80	1,20	1,20	46,00	2,03	0,42	0,10	4,08	-1,10	32	D1/P1	bec
LAM5a	113,38	1,85	27,82	4,01	0,39	3,00	62,92	2,26	0,06	0,04	1,81	-11,70	19	D1/P0	bec
LAM5a	3,85	15,06	28,57	9,35	0,00	0,78	45,97	1,61	0,33	0,09	3,81	-6,60	45	D1/P0	bec
LAM5b	14,28	33,12	17,23	34,52	4,62	0,70	9,73	0,57	2,51	0,47	5,37	11,90	8	D1/P2	bec
LAM5a	2,32	4,31	59,48	1,72	0,43	0,43	34,05	0,57	0,06	0,18	0,37	5,00	33	D1/P0	bec
LAM5b	4,13	11,62	41,89	34,62	0,97	0,24	10,65	0,25	0,88	0,07	13,29	-2,60	18	D1/P2	bec
LAM5b	317,3	16,50	4,01	17,23	0,33	7,78	61,94	15,46	0,51	0,10	5,16	-1,50	12	D1/P1+P4	bec
LAM5b	275,37	56,65	3,72	29,61	1,10	8,61	8,92	2,40	6,82	0,04	161,32	16,50	97	D1/P3+P5	bec
LAM5a	8,77	3,65	32,61	2,85	1,03	1,03	58,84	1,80	0,07	0,13	0,54	-12,30	57	D1/P0	bec
LAM5a	180,18	1,96	12,35	6,79	0,16	5,29	78,74	6,37	0,10	0,16	0,61	-10,10	8	D1/P0	bec
LAM5b	123,02	15,57	5,58	25,39	0,27	2,19	51,00	9,15	0,72	0,07	9,71	-1,80	61	D1/P2	bec
LAM5a	13,66	5,34	28,84	19,62	0,07	0,44	45,68	1,58	0,33	0,35	0,96	-10,50	11	D1+P1	rond
LAM5a	15,22	1,12	31,41	0,79	0,07	1,18	65,44	2,08	0,02	0,09	0,23	11,30	73	D1/P0	bec
LAM5a	152,51	39,20	4,50	20,14	0,16	3,65	35,99	7,99	1,47	0,10	14,72	15,40	18	D1/P1+P5	bec
LAM5b	112,98	51,21	2,09	10,97	0,23	2,70	32,80	15,70	1,78	0,08	23,14	-11,50	58	D1/P0+P4	bec
LAM5a	256,43	6,24	4,90	18,91	0,09	3,53	66,35	13,55	0,35	0,07	5,37	-8,70	93	D1/P0+P1	bec
LAM5a	3,3	6,67	4,24	1,82	2,12	0,30	85,15	20,07	0,09	0,08	1,17	10,50	84	D1/P0	bec
LAM6	7,23	20,61	26,28	31,67	0,41	10,65	21,02	0,80	1,11	0,15	7,20	4,10	20,00	D1/P2	rond
LAM7	25,3	7,08	40,36	1,30	0,67	2,65	47,91	1,19	0,09	0,15	0,63	-1,10	63,00	D1/P0	rond

Annexe 3

Principales données recueillies pour les patients atteints de LAbi, LAI et LAL.

Diagnostic	GB (G/L)	PN (%)	L (%)	M (%)	PE (%)	PB (%)	LUC (%)	LUC/ Lympho x 100	(Mono+PN)/(LUC+L)	PMN/MN	Quotient Q	MPXi	Blast manuel	PANDA
LA bi	19,45	52,70	15,99	2,47	21,03	0,93	6,89	43,09	2,41	1,26	1,92	13,30	20	D1/P0+P4
LA bi	0,42	9,52	26,19	4,76	38,10	0,00	21,43	81,82	0,30	1,74	0,17	23,00	5	D1/P1
LAI	26,93	4,20	0,93	1,93	0,15	0,63	92,05	9916,00	0,07	0,19	0,83	9,10	87	D1/P0
LAL1	9,59	17,52	75,70	1,04	0,31	1,15	4,17	5,51	0,23	0,24	0,97	13,90	67	D0/P0
LAL1	236,11	2,63	70,44	1,25	0,06	9,92	25,62	36,37	0,04	0,05	0,79	-3,10	98	D0/P0
LAL1	18,96	6,65	44,15	1,05	0,26	4,48	43,35	98,21	0,09	0,14	0,64	5,70	73	D0/P0
LAL1	9,63	3,53	84,53	1,04	0,10	0,52	10,18	12,04	0,05	0,15	0,33	7,10	51	D0/P0
LAL1	88,58	5,50	78,25	0,99	0,44	6,36	14,82	18,94	0,07	0,74	0,09	4,60	91	D1/P0
LAL1	7,23	5,26	74,69	1,80	0,41	3,46	14,38	19,26	0,08	0,11	0,75	4,00	45	D0/P0
LAL1	4,59	12,42	81,92	1,74	0,22	0,44	3,27	3,99	0,17	0,19	0,87	17,00	17	D0/P0
LAL1	20,21	1,58	89,86	0,40	0,15	12,32	7,97	8,87	0,02	0,06	0,37	7,90	89	D0/P0
LAL1	2,42	30,17	63,22	3,31	0,83	0,41	2,07	3,27	0,51	0,52	0,99	4,40	5	D0/P0
LAL1	143,90	2,60	80,42	0,47	0,58	6,85	15,93	19,81	0,03	0,12	0,26	0,60	85	D0/P0
LAL1	227,82	3,59	71,67	1,25	0,05	6,89	23,44	32,70	0,05	0,07	0,77	-3,50	98	D1/P0
LAL1	3,36	12,80	81,25	0,89	0,89	0,00	3,87	4,76	0,16	0,23	0,69	2,50	5	D0/P0
LAL1	6,38	64,26	27,43	2,98	2,35	0,31	2,51	9,14	2,25	1,94	1,16	-5,80	7	D0/P0
LAL1	15,83	10,36	77,45	0,82	0,19	2,40	8,78	11,34	0,13	0,14	0,90	2,60	80	D0/P0
LAL1	48,19	5,29	78,44	0,44	0,19	2,45	13,22	16,85	0,06	0,08	0,80	5,50	78	D1/P0
LAL1	53,88	1,60	85,67	0,33	0,06	2,69	9,63	11,24	0,02	0,14	0,15	2,10	80	D0/P0
LAL1	245,20	1,11	66,82	0,41	0,03	24,92	31,62	47,32	0,02	0,05	0,34	2,50	82	D0/P0
LAL1	19,01	3,16	90,95	0,74	0,21	1,32	3,68	4,05	0,04	0,13	0,32	4,30	55	D0/P0
LAL1	19,37	5,52	84,46	0,62	0,31	1,03	8,05	9,54	0,07	0,13	0,49	7,50	83	D0/P0
LAL1	76,85	2,95	66,73	0,87	0,14	5,95	29,30	43,92	0,04	0,10	0,41	4,40	94	D0/P0
LAL2	7,00	20,29	66,43	0,71	1,71	2,14	8,71	13,12	0,28	0,32	0,86	11,10	54	D1/P0
LAL2	2,77	17,33	46,57	1,08	0,00	3,25	31,77	68,22	0,24	0,24	0,98	4,10	60	D1/P0
LAL2	10,73	29,73	48,93	2,70	0,75	0,93	17,05	34,86	0,49	0,47	1,04	1,00	30	D1/P0
LAL2	3,36	27,38	64,88	2,08	0,60	0,60	4,76	7,34	0,42	0,44	0,96	0,20	22	D0/P0
LAL2	2,54	35,04	48,43	5,12	0,79	2,36	8,66	17,89	0,70	0,62	1,13	9,30	25	D1/P0
LAL2	4,20	10,00	85,71	0,71	0,00	0,48	2,86	3,33	0,12	0,31	0,39	2,50	80	D1/P0
LAL2	6,64	41,87	41,27	5,72	0,45	2,56	8,28	20,07	0,96	0,50	1,92	6,90	11	D1/P0
LAL2	4,03	14,89	76,92	0,99	1,49	1,24	4,22	5,48	0,20	0,20	1,00	-4,20	50	D1/P0
LAL2	7,02	0,71	96,87	0,14	0,14	0,14	1,99	2,06	0,01	0,13	0,07	-7,40	100	D1/P0
LAL2	258,18	1,68	53,86	1,63	0,06	1,70	41,08	76,27	0,03	0,01	5,59	5,50	96	D1/P0
LAL2	3,41	17,01	70,09	1,47	0,59	0,88	10,26	14,64	0,23	0,20	1,15	0,40	10	D0/P0
LAL2	0,96	65,80	20,30	6,10	5,40	0,30	2,10	10,53	3,29	2,45	1,34	3,20	qques	D1/P0
LAL2	2,69	9,00	83,80	1,20	0,10	0,50	5,30	6,22	0,11	0,16	0,70	9,00	10	D0/P0
LAL2	134,76	1,23	56,88	1,49	0,04	10,70	40,35	70,95	0,03	0,03	1,04	13,10	97	D1/P0
LAL2	6,38	15,52	63,48	2,51	0,78	5,17	17,71	27,90	0,22	0,26	0,84	11,20	14	D0/P0
LAL2	213,16	1,74	57,56	0,68	0,04	6,47	39,97	69,44	0,02	0,04	0,56	2,80	88	D1/P0
LAL2	12,36	20,47	51,54	0,81	0,32	1,70	25,16	48,82	0,28	0,24	1,16	3,10	45	D1/P0
LAL2	17,23	23,62	59,37	1,86	1,04	2,03	12,01	20,23	0,36	0,39	0,92	3,70	60	D1/P0
LAL2	144,14	6,94	33,43	4,02	0,50	6,76	55,11	164,83	0,12	0,07	1,90	9,30	95	D0/P0

Annexe 4. Principales données recueillies pour les patients atteints de LLC et LNH.

Diagnostic	GB (G/L)	PN (%)	L (%)	M (%)	PE (%)	PB (%)	LUC (%)	LUC/ Lympho x 100	(Mono+PN)/(LUC+L)	PMN/MN	Quotient Q	MPXi	Blast manuel	PANDA
LLC	9,69	9,60	74,41	0,31	0,62	0,83	14,24	19,14	0,11	0,18	0,61	9,00	0	D0/P0
LLC	9,34	27,09	66,49	2,25	1,07	0,32	2,89	4,35	0,42	0,94	0,45	8,70	0	D0/P0
Richter	118,69	14,70	25,88	2,99	0,18	4,32	56,24	217,29	0,22	0,17	1,30	4,40	0	D1/P0
LLC	33,44	13,01	80,95	0,96	0,18	1,02	3,86	4,77	0,16	3,70	0,04	3,80	0	D0/P0
LLC	27,61	15,03	73,02	1,74	1,56	1,05	7,61	10,42	0,21	0,23	0,90	-4,30	0	D0/P0
LLC	16,87	42,21	42,74	4,92	0,41	0,53	9,19	21,50	0,91	0,86	1,06	-6,20	0	D0/P0
LLC	12,63	32,46	58,43	3,56	1,58	0,79	3,17	5,42	0,58	0,64	0,92	8,20	0	D0/P0
LLC	16,28	51,29	41,34	3,38	1,35	1,04	1,66	4,01	1,27	1,18	1,08	4,30	0	D0/P0
LLC	24,26	27,78	64,55	1,90	0,25	0,41	5,07	7,85	0,43	0,49	0,86	-0,80	0	D0/P0
LLC	18,27	21,78	72,19	2,19	1,04	0,71	2,13	2,96	0,32	0,32	1,00	-1,90	0	D0/P0
LLC	15,48	28,68	54,07	3,42	1,29	4,72	12,53	23,18	0,48	0,69	0,70	14,70	0	D0/P0
Richter	84,38	5,24	75,54	1,47	0,12	3,84	13,78	18,25	0,08	0,10	0,75	-2,70	0	D1/P0
LLC	75,22	5,82	79,85	1,18	0,17	0,65	12,32	15,43	0,08	0,21	0,36	13,80	0	D0/P0
LLC	43,48	2,41	88,87	1,10	0,23	0,99	6,39	7,19	0,04	0,24	0,15	18,50	0	D0/P0
LLC	304,49	4,97	70,11	0,77	0,09	6,36	24,06	34,32	0,06	1,79	0,03	-0,20	0	D0/P0
LLC	103,04	1,23	76,74	0,15	0,04	3,21	18,63	24,28	0,01	0,78	0,02	6,10	0	D0/P0
LLC	24,45	8,79	36,77	3,15	3,64	0,94	46,71	127,03	0,14	0,15	0,96	4,20	0	D0/P0
LLC	19,73	25,19	66,04	3,24	1,17	0,71	3,60	5,45	0,41	0,52	0,78	7,80	0	D0/P0
LLC	19,44	24,74	62,55	2,83	1,80	0,98	7,15	11,43	0,40	0,36	1,09	-5,60	0	D0/P0
LLC	16,59	16,40	65,28	3,01	1,39	0,60	13,32	20,41	0,25	0,21	1,16	12,90	0	D0/P0
LLC	41,66	71,46	20,88	3,79	0,67	1,61	1,56	7,47	3,35	2,68	1,25	-8,50	0	D0/P0
LLC	51,63	13,00	77,53	2,52	0,62	2,19	4,14	5,35	0,19	0,49	0,39	-4,70	0	D0/P0
LLC	12,14	31,47	55,52	0,91	0,66	0,33	11,04	19,88	0,49	0,52	0,93	7,10	0	D0/P0
LLC	114,86	8,69	80,85	0,22	0,13	1,32	8,78	10,86	0,10	0,25	0,40	4,60	0	D0/P0
LLC	18,44	29,72	60,20	3,42	0,49	1,08	5,10	8,47	0,51	3,00	0,17	-5,00	0	D0/P0
LLC	32,03	21,26	69,90	1,56	0,56	0,47	6,28	8,98	0,30	0,94	0,32	4,50	0	D0/P0
LLC	42,31	7,28	85,20	1,80	0,83	0,90	3,97	4,66	0,10	0,31	0,33	6,30	0	D0/P0
LLC	18,44	15,35	67,62	2,87	1,19	1,03	11,93	17,64	0,23	0,22	1,03	10,70	0	D0/P0
LLC	9,70	39,90	50,72	5,15	0,62	0,52	3,09	6,10	0,84	1,40	0,60	-14,00	0	D0/P0
LLC	21,44	12,27	70,90	2,66	0,47	0,84	12,83	18,09	0,18	0,23	0,77	-14,00	0	D0/P0
LNH manteau	6,87	4,51	74,38	4,08	0,44	2,33	14,12	18,98	0,1	0,1	0,99	2,7	0	D1/P0
LNH manteau	15,06	10,09	80,61	3,39	0,53	0,73	4,65	5,77	0,16	0,24	0,67	4,3	0	D1/P0
LNH manteau	3,31	64,65	22,05	8,46	3,02	0,6	1,21	5,48	3,14	2,11	1,49	-3,3	0	D0/P0
LNH Sezary	7,05	43,97	41,42	6,67	2,55	0,85	4,68	11,3	1,1	0,44	2,49	3,8	0	D0/P0
LNH folliculaire	0,56	21,4	27	0,7	0,5	32,9	50,5	186,67	0,28	0,36	0,78	25	0	D0/P0
LNH folliculaire	13,97	32,93	59,99	3,94	0,57	0,64	1,93	3,22	0,6	0,52	1,14	3,7	0	D0/P0
LNH B diffus	4,05	70,12	10,62	1,73	0,49	0,99	16,05	151,16	2,69	2,32	1,16	9,4	0	D0/P0
SLVL	7,97	35,38	48,56	4,52	1,38	0,75	9,41	19,38	0,69	0,78	0,88	3,4	0	D0/P0
LNH manteau	6,55	39,39	38,17	3,66	1,68	12,21	17,25	45,2	0,78	1,12	0,69	-11,4	0	D0/P0
LNH Sezary	7,13	31,98	59,75	4,63	1,4	0,42	1,82	3,05	0,59	0,46	1,31	3	0	D0/P0
SLVL	40,32	9,38	76,84	1,56	0,15	0,82	11,26	14,65	0,12	0,12	1	2,5	0	D0/P0
LNH B diffus	7,81	56,85	9,86	7,17	0,26	0,77	25,1	254,55	1,83	0,83	2,21	2,9	16	D1/P0
LNH manteau	106,31	17,9	65,37	1,29	0,23	6,39	15,22	23,28	0,24	0,25	0,95	-0,5	0	D0/P0
LNH folliculaire	10,46	70,55	9,08	7,65	0,76	7,55	11,95	131,58	3,72	4,15	0,9	-2,4	0	D0/P0
LNH manteau	7,62	24,93	27,3	1,71	0,13	34,38	45,93	168,27	0,36	0,85	0,43	-0,1	0	D0/P0
LNH B diffus	9,26	11,34	42,33	4,86	0,32	1,4	39,85	94,13	0,2	0,67	0,29	-14,5	1	D0/P0

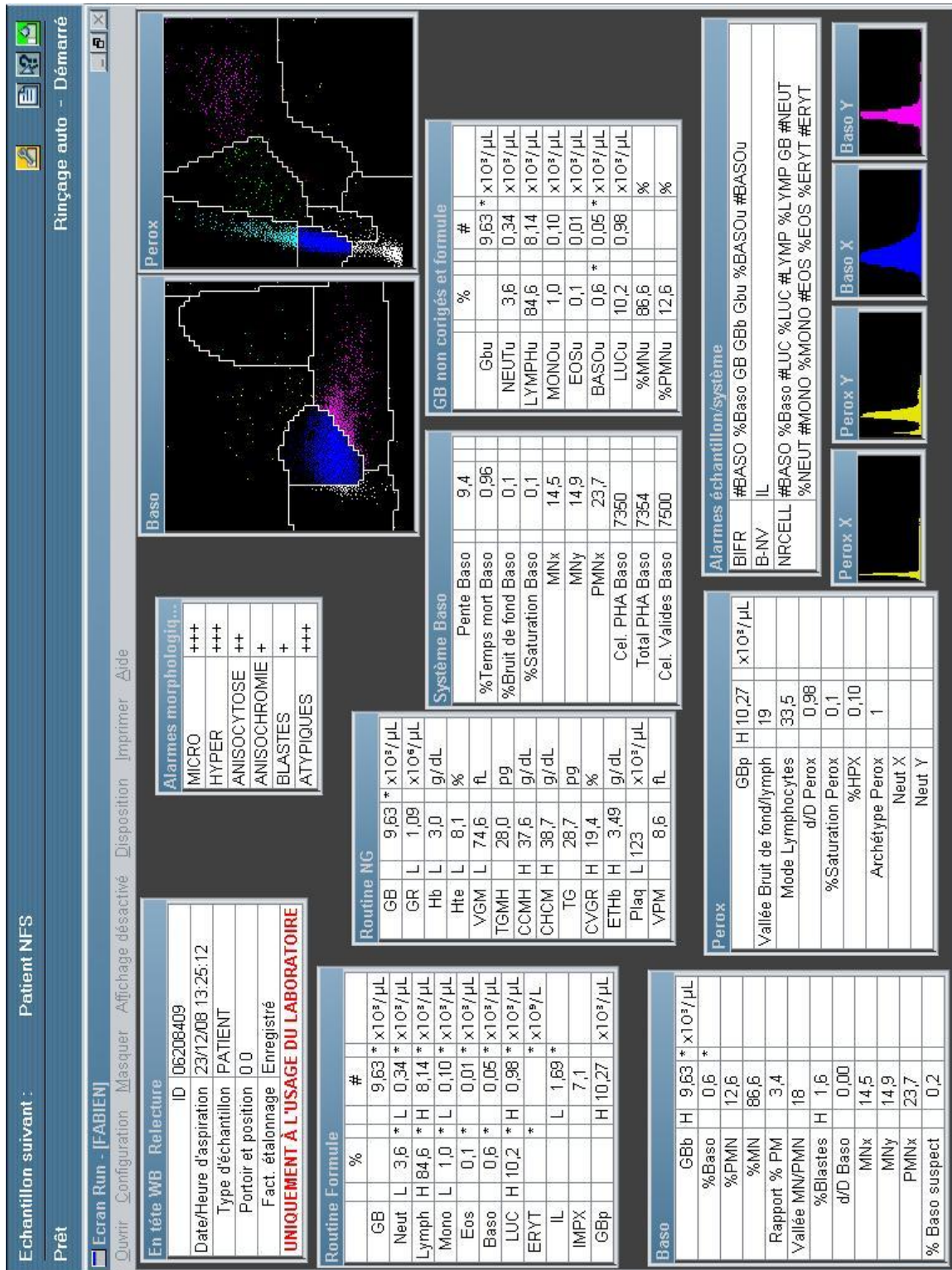
Annexe 5

Principales données recueillies pour les patients atteints de LP, MPC, SMP, SMD et SMN.

Diagnostic	GB (G/L)	PN (%)	L (%)	M (%)	PE (%)	PB (%)	LUC (%)	LUC/Lympho	(Mono+PN)/(LUC+L)	PMN/MN	Quotient Q	MPXi	Blast manuel	PANDA
LP	4,92	25,2	18,09	11,79	8,13	0,81	35,98	1,99	0,68	0,55	1,25	4,8	0	D1/P0
LP	5,23	21,41	42,64	8,03	2,49	1,15	24,09	0,57	0,44	0,32	1,4	3,4	0	D0/P0
LP	32,69	45,4	25,57	5,32	0,98	3,4	22,73	0,89	1,05	0,72	1,46	1,6	0	D0/P0
MPC	13,03	22,72	32,92	3,15	0,23	2,23	38,76	1,18	0,36	0,3	1,22	4,0	0	D1/P0
MPC	1,53	17,1	56,9	3,8	0,5	1,1	20,6	0,37	0,27	0,4	0,67	3,8	0	D0/P0
MPC	1,07	17,2	36,3	2	0,9	1,3	42,3	1,15	0,24	0,29	0,82	7,1	0	D1/P0
LPL	54,85	0,04	92,62	0,02	0	1,02	6,31	0,07	0	0,01	0,06	46,3	0	D1/P0
LPL	1,1	64,5	19,6	6	2,3	3,1	4,5	0,23	2,89	1,51	1,92	10,8	0	D0/P0
LPL	40,42	9,75	74,91	2,23	0,3	1,78	11,03	0,15	0,14	0,12	1,13	3,5	0	D0/P0
LPL	18,8	26,54	66,12	3,62	0,43	0,9	2,39	0,04	0,44	0,37	1,19	-12,6	0	D1/P0
LPL	74,17	18,53	65,38	2,52	1,28	3,98	12,28	0,19	0,27	0,32	0,85	6,6	0	D0/P0
LTL	1,82	37,00	58,50	0,40	0,60	0,10	3,50	0,06	0,61	0,60	1,00	4,3	0	D0/P0
LTL	3,04	47,70	45,72	1,32	1,64	0,33	3,62	0,08	0,99	0,90	1,10	-7,8	0	D0/P0
LTL	3,73	32,17	61,66	1,34	2,41	1,07	1,61	0,03	0,53	0,76	0,69	3,5	0	D0/P0
LTL	14,96	45,45	25,07	7,09	1,00	0,47	20,86	0,83	1,14	0,85	1,35	13,8	0	D0/P0
LTL	0,92	35,80	52,80	0,80	1,00	1,00	8,60	0,16	0,60	0,76	0,78	-6,2	0	D0/P0
LTL	38,96	3,95	48,13	1,08	0,26	1,21	45,35	0,94	0,05	0,06	0,97	-2,0	0	D1/P0
LTL	10,44	27,87	45,31	1,72	1,34	0,67	23,08	0,51	0,43	0,34	1,27	-7,4	0	D1/P0
LTL	3,08	65,91	26,62	0,97	1,30	0,32	5,19	0,2	2,10	2,04	1,03	16,3	0	D1/P0
LTL	41,82	2,73	68,24	0,62	0,14	1,05	27,19	0,4	0,04	0,05	0,72	6,9	0	D1/P0
LTL	2,03	23,15	73,40	0,99	0,49	0,00	1,97	0,03	0,32	0,38	0,85	-2,8	0	D0/P0
LTL	0,95	72,90	20,60	1,00	1,30	0,30	3,90	0,2	2,96	3,07	0,96	7,3	0	D0/P0
LTL	7,91	15,55	55,50	0,76	0,63	2,02	25,41	0,46	0,20	0,20	1,00	7,8	0	D1/P0
LTL	2,28	30,70	60,09	0,44	2,19	0,44	6,14	0,1	0,47	0,51	0,93	10,7	0	D0/P0
LMC	18,99	50,82	15,96	7,79	2,11	4,37	18,9	1,18	1,68	0,21	7,96	-7,1	12	D1/P3
LMC	12,74	66,56	4,95	4,79	5,1	5,65	18,6	3,76	3,03	1,33	2,28	-2,5	11	D1/P0
PE	32,16	86,26	2,99	3,45	2,61	0,44	4,29	1,44	12,33	2,76	4,46	3,2	4	D1/P0+P5
TE	5,04	55,36	31,35	2,58	0,99	0,99	8,73	0,28	1,45	2,01	0,72	-13,3	0	D0/P0
AREB	5,78	56,57	25,95	9,17	0,52	0,87	6,92	0,27	2,00	1,31	1,52	-22,7	4	D0/P0
AREB	17,16	23,66	22,03	25,82	3,85	0,35	24,36	1,11	1,07	0,26	4,04	15,3	28	D1/P2+P5
LMMC	272,83	28,37	1,40	26,77	0,23	2,31	40,91	29,14	1,30	0,10	13,09	12,3	10	D1/P4
LMMC	10,84	37,64	12,18	35,52	2,31	0,46	11,99	0,98	3,03	0,62	4,85	4,9	0	D0/P2
SMN	10,87	34,41	51,24	4,23	0,00	1,29	8,83	0,17	0,64	0,62	1,03	2,7	0	D0/P0
SMN	5,76	59,70	18,10	10,60	0,20	7,30	11,30	0,63	2,40	1,72	1,40	1,9	0	D0/P0
SMN	3,47	25,07	54,76	10,66	2,31	1,15	6,05	0,11	0,59	0,31	1,87	-5,0	0	D0/P0
SMN	24,30	11,89	64,86	3,99	1,07	2,26	15,97	0,25	0,20	0,23	0,85	-4,4	0	D1/P0
SMN	5,39	30,06	38,22	10,39	0,37	2,23	18,74	0,49	0,71	0,51	1,40	14,6	0	D2/P0
SMN	9,72	71,40	13,17	2,26	0,72	2,06	10,29	0,78	3,14	2,22	1,42	-8,6	0	D2/P0
SMN	5,68	18,31	32,57	0,88	2,64	3,35	42,43	1,3	0,26	0,26	0,99	7,8	0	D2/P0
SMN	4,35	22,76	50,80	5,75	1,15	2,76	16,78	0,33	0,42	0,47	0,89	7,8	0	D2/P0
SMN	4,19	6,68	67,54	5,49	0,24	3,58	16,47	0,24	0,14	0,21	0,68	7,9	0	D2/P0
SMN	0,75	14,80	34,90	4,40	0,50	5,50	45,30	1,31	0,23	0,21	1,14	1,8	0	D2/P0
SMN	22,90	15,85	65,50	3,76	0,13	1,27	13,49	0,21	0,25	0,32	0,78	-7,4	0	D2/P0
SMN	5,75	20,00	56,00	3,13	0,17	2,78	18,26	0,33	0,31	0,43	0,72	-0,7	0	D2/P0
SMN	8,74	20,71	46,68	4,58	0,23	3,43	24,49	0,52	0,36	0,44	0,81	7,7	0	D2/P0
SMN	8,31	37,30	47,89	5,90	1,08	0,96	6,86	0,14	0,79	1,60	0,49	0,5	0	D2/P0
SMN	34,38	32,20	36,68	5,32	0,00	1,19	24,58	0,67	0,61	0,42	1,45	-12,8	0	D0/P0
SMN	12,32	17,94	58,36	2,68	0,16	3,08	17,78	0,3	0,27	0,29	0,93	-2,1	0	D2/P0

Annexe 6

Exemple de « raw data » de l'ADVIA® 2120 (paramétrage personnalisé pour notre étude)



DEMANDE D'IMPRIMATUR / 3448

Date de soutenance : 25 octobre 2010

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par Fabien Lacroix

Sujet : Utilisation et apports de l'ADVIA 2120 dans la
caractérisation des hémopathies malignesJury :Président : Pr. Thomas Lecompte
Directeur : Dr. Sylvain SalignacJuges : Pr. Claude Vigneron
Dr. Dana Ranta

Vu,

Nancy, le 30 sept 2010

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse


M. Lecompte

M. Salignac

Vu et approuvé,

Nancy, le

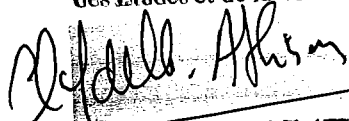
04 OCT. 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,
Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire.
Jean-Pierre CARDEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement :

N° d'identification :

TITRE

Utilisation et apports de l'ADVIA 2120 dans la caractérisation des hémopathies malignes

Thèse soutenue le 25 octobre 2010

Par Fabien LACROIX

RESUME :

La société Siemens Diagnostic® commercialise depuis 2001 un appareil de cytologie hématologique, l'ADVIA® 2120, qui permet la réalisation d'héмограмmes dans les laboratoires de biologie médicale. Il effectue la différenciation et le comptage des leucocytes sanguins en flux à l'aide de deux canaux : le canal PEROX (cytochimie) et le canal BASO (analyse de la densité nucléaire). Parmi les multiples informations recueillies lors de l'analyse des leucocytes, certaines sont particulièrement pertinentes pour orienter la discrimination des hémopathies malignes entre elles, voire les caractériser.

Grâce aux études réalisées durant les trente dernières années, des modèles graphiques et des conjectures numériques ont été établis. Nous avons tenté de vérifier celles-ci en étudiant 213 héмограмmes avec anomalies leucocytaires au CHU de Nancy. Nous avons pu notamment éprouver les performances des alarmes morphologiques de l'ADVIA® 2120 (la sensibilité de l'alarme « BLASTES » est de 93,2 % dans les LAM contre 71,8 % dans les LAL) ou encore la pré-classification graphique PANDA (Peroxydase Activity and Nuclear Density Analysis) avec des résultats inférieurs à ceux escomptés (concordance globale de 70 %). Nous avons également étudié et affiné d'autres critères distinctifs (pourcentage de monocytes supérieur à 9 %, rapport entre grandes cellules sans activité peroxydasique (« LUC ») et lymphocytes) et calculé un paramètre original, le quotient Q, dont une valeur supérieure à 2 est fortement présomptive d'une hémopathie myéloïde (spécificité de 97 %). Enfin, nous avons décrit des profils d'analyse « type » dans certaines pathologies.

En conclusion, il paraît envisageable d'obtenir de précieuses orientations diagnostiques à partir des paramètres déterminés par l'ADVIA® 2120. Seul manque pour l'instant l'outil informatique qui permettrait d'assimiler la multitude d'informations recueillies. L'idéal serait le développement d'un système proche de ceux utilisés en bactériologie dans les identifications phénotypiques, afin d'aboutir à une ou plusieurs propositions diagnostiques assortie(s) d'un score de probabilité.

MOTS CLES : ADVIA® 2120, hémopathies malignes, cytochimie en flux, alarmes, PANDA.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Dr. Sylvain Salignac	Service d'hématologie biologique, Pôle Laboratoires Hôpitaux de Brabois CHU de Nancy	Expérimentale Bibliographique Thème	OUI OUI 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle