

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**ANNEE : 2019**

**THESES 2019 TOU3 2012**

**THESE**

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

Présentée et soutenue publiquement  
par

GRIMON Noémie

**MICROSCOPES AUTOMATISES EN HEMATOLOGIE**

Validation des performances du DM1200 (CellaVision®) au CHU de Toulouse et état des lieux des pratiques d'utilisation en France en 2018

Le 05 Avril 2019

Directeur de thèse : Docteur DUBOIS Frédérique

**JURY**

Président : Pr DELABESSE Eric  
1<sup>er</sup> assesseur : Dr DUBOIS Frédérique  
2<sup>ème</sup> assesseur : Pr DE MAS Véronique  
3<sup>ème</sup> assesseur : Dr FIGARO Yohann

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**ANNEE : 2019**

**THESES 2019 TOU3 2012**

**THESE**

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

Présentée et soutenue publiquement  
par

GRIMON Noémie

**MICROSCOPES AUTOMATISES EN HEMATOLOGIE**

Validation des performances du DM1200 (CellaVision®) au CHU de Toulouse et état des lieux des pratiques d'utilisation en France en 2018

Le 05 Avril 2019

Directeur de thèse : Docteur DUBOIS Frédérique

**JURY**

Président : Pr DELABESSE Eric  
1<sup>er</sup> assesseur : Dr DUBOIS Frédérique  
2<sup>ème</sup> assesseur : Pr DE MAS Véronique  
3<sup>ème</sup> assesseur : Dr FIGARO Yohann

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
**de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> janvier 2019**

**Professeurs Emérites**

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAEEVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. Olichon A.	Biochimie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. Sainte-Marie Y.	Physiologie
		M. Stigliani J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Assistant Associé des Universités	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	Mme MARTINI H.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. METSU D.	Pharmacologie		
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S.	Biophysique		

## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur le Professeur Eric DELABESSE**

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de mon profond respect.

### **A Madame le Professeur Véronique DE MAS**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger au sein de ce jury et de juger mon travail. Merci de nous faire bénéficier de votre expertise en cyto-morphologie hématologique sur le sujet. Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de ma plus profonde estime.

### **A Monsieur le Docteur FIGARO Yohann**

Merci d'avoir accepté de juger mon travail, c'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi les membres de mon jury. Vous avez toujours été un modèle de réussite, depuis mes premières années de pharmacie à Dijon jusqu'à aujourd'hui. Merci pour votre aide, vos conseils, et de l'intérêt que vous portez à ce travail.

### **A Madame le Docteur DUBOIS Frédérique**

Merci de m'avoir fait confiance en me proposant ce travail de thèse. Grâce à votre soutien, votre enthousiasme et votre disponibilité, vous m'avez permis de mener à bien ce projet. J'espère qu'il sera à la hauteur de vos attentes.

A **Didier Tayac** et **Sarah Frittaion**, merci de m'avoir aidé pour la partie validation de méthode.

A **Céline PEPIOT** (SYSMEX) et **Sylvie BELOSEVIC** (CELLAVISION), merci d'avoir répondu rapidement à mes nombreux mails et merci pour votre disponibilité. Votre aide a été précieuse tout au long de ce travail.

Merci **aux associations, aux syndicats de biologistes ainsi qu'aux organismes d'évaluation externe de la qualité** d'avoir accepté de diffuser le questionnaire à leurs membres, merci à l'**ABMP-MP** (Association des Biologistes de Midi Pyrénées), l'**ABA** (Association des Biologistes d'Aquitaine), l'**ABBRA** (Association des Biologistes Bourgogne Rhône Alpes), au **SJBM** (Syndicat des Jeunes Biologistes Médicaux), **Biolam-PACA** (Syndicat des Directeurs de laboratoire de Biologie Médicale PACA), au **GFHC** (Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire), au **CTCB** (Centre Toulousain pour le Contrôle de Qualité en biologie clinique) et **Probioqual** (Association pour la Promotion du **Contrôle de Qualité en Biologie Médical**).

A **tous les biologistes qui ont répondu à mon questionnaire**, merci d'y avoir prêté de l'attention et du sérieux et merci pour vos nombreux messages d'encouragements pour ce travail.

**Merci à tous les biologistes** qui m'ont encadré pendant mes années d'internat. Merci à **Jean-Baptiste RIEU** et **Vincent MEMIER** d'avoir accepté de relire mon questionnaire et ainsi de l'améliorer. Merci au **Docteur Sophie VOISIN** pour sa bienveillance pendant ces 4 années d'internat.

Aux biologistes de l'EFS, **Valérie PORRA, Guillaume VIEU, Adeline CANAVELLI, Charlotte ROMA et Régine RICARD**. Merci de m'avoir donné le goût de l'immunohématologie et de m'enseigner chaque jour ce qui fera mon métier de demain. Merci pour votre soutien et votre bienveillance, je suis fière de pouvoir apprendre à vos côtés. Un grand merci également à tous les techniciens de l'EFS, vous m'avez accueillie avec bienveillance et vous m'avez beaucoup appris. Et merci à Emilie pour ton soutien et tes délicieux gâteaux.

**A tous les techniciens** qui m'ont soutenue et aidée pour ce travail de thèse, notamment Christophe, Céline, Karine, Virginie, Servann, Damien, Nicolas, Julien, Anaïs, Sandrine, Lucie, Fabienne, Emilie. Merci pour votre bonne humeur, c'était un plaisir pour moi de travailler avec vous.

### **Spéciale dédicace ...**

à **Chloé**, merci pour ta bonne humeur et ta bienveillance. Même si je suis sourde aujourd'hui, sans toi, mon internat n'aurait pas été le même.

à **Jenni**, merci de m'avoir redonné le sourire pendant cette dernière année difficile. Les potins avec toi me manquent déjà.

à **Mélanie**, merci d'avoir rendu bien plus chouettes mes nuits de garde à Ranguel. Tu es brillante et courageuse : ne change pas !

à **Amandine**, on a commencé l'hémato en même temps et je crois qu'on était aussi pommée l'une que l'autre. Aujourd'hui tu poursuis encore les Grimons...je sais qu'on est plutôt attachantes ;- ) J'espère que tu gardes ta bonne humeur et ta joie de vivre de l'autre côté de la planète !

à **Karim**, tu as été d'un grand soutien alors que je venais à peine d'arriver. Merci de m'avoir fait rire et d'avoir rendu les gazos de 6h00 un peu moins pénible.

**A mes parents**, merci du fond du cœur de nous avoir offert le meilleur cadre de vie possible et de nous avoir permis, à chacun, de réaliser nos projets professionnels.

A ma **Maman**,

Ma plus grande source d'inspiration, mon modèle depuis 31ans. Merci pour ton oreille attentive, ton soutien infailible, ta disponibilité malgré ton emploi du temps chargé et la distance qui nous sépare.

A mon **Papa**,

Tu as toujours réussi à trouver les mots pour me reconforter dans les moments difficiles. Tu m'as appris à aller de l'avant et à ne jamais renoncer.

A **Catherine**, merci d'être là et de contribuer à faire de la maison familiale un lieu si agréable et convivial.

A ma marraine **Agnès**, ta générosité et ta grande spiritualité sont un exemple pour moi.

A **Jacquotte**, ma deuxième Maman. Merci pour tout ce que tu m'as donné et appris.

A mes frères **Samuel, Joël, Jean** et à ma petite sœur **Marianne**.

A **Samuel**, merci pour le soutien que tu as su m'apporter ces dernières années. L'attention que tu portes jour après jour à chacun de tes petits frères et sœurs constitue indéniablement le pilier de notre fratrie et renforce les liens qui nous unissent.

Et à **Paulin** (parce que derrière chaque grand homme il y a une femme), merci pour ta patience, ton enthousiasme permanent et ta faculté d'adaptation à toute épreuve (Necker, Uber Eat...)

A **Joël**, merci pour ta patience, ta disponibilité et tes conseils qui m'ont été d'une aide précieuse. Ta détermination et ton expérience m'ont permis d'appréhender au mieux mes échéances professionnelles.

A **Marianne**, malgré les 17260 Km qui nous séparent, tu restes attentive à chaque étape de ma vie. Tes choix de vie ne sont certes pas les plus simples, mais ils t'ouvrent au monde et constituent pour toi une expérience forte de rencontre et d'humanité. Ta sensibilité, ta prévenance et ton soutien sont pour moi d'une grande force au quotidien.

Et à **Léo**, merci de la supporter ;-)

A « **BB Jean** », merci pour ta patience, tu sais t'adapter à chaque situation et le défi ne te fait pas peur. Ta générosité et ton immense bienveillance constituent un exemple pour chacun de tes grands frères et sœurs.

A toute **ma belle-famille**, Magalie, Fabien, Gaëlle, Clément, Aurore, Guillaume et aux enfants. Vous êtes des anges gardiens, merci pour toute l'attention que vous nous portez au quotidien.

A **Lucile**, ma meilleure amie d'enfance, qui est restée la même depuis 30 ans. Notre amitié est ma plus grande richesse. A Théo ma filleule.

A **Valérie** et **Lou-Anne**, merci d'avoir été là à chaque étape importante de ma vie et d'avoir fait, à chaque fois, des merveilles.

A **ma famille bisontine, mes éternels amis du lycée**, Virginie, Adrien, Manon, Pierre, Hervé. Je vous avais bien dit que je terminerai mes études un jour ☺. Merci d'avoir TOUJOURS répondu présent pour chacune des étapes importantes que j'ai traversées dans ma vie.

A **la team Pharma Dijon**, Jenn, Del, Flo, Laure, Estelle et Max , Alicia et Anthony. Ces années d'études à vos côtés resteront inoubliables. En 10 ans, vous n'avez pas changé. Vous restez les mêmes amis sincères, attentifs, et je suis fiè-ère, et je suis fiè-ère, et je suis fiè-ère de vous avoir à mes côtés (et d'être un peu bourguignon aussi).

**A la famille Dijonnaise**, Mina et Juan, Justine et Sery, à Vero et Camille. Merci d'être aussi formidables, ne changez pas !

Merci à **Amine**, pour ton accueil chaleureux aux Américains, merci pour ta grande loyauté et pour ton extrême générosité.

**A mes premières amies Toulousaines**,

A **Marion**, sans qui mon internat n'aurait pas été le même. Merci de m'avoir accueillie dans cette belle ville rose que je ne connaissais pas. Merci pour ta bienveillance, ta sincérité, tes soirées mémorables et merci d'avoir été présente pour chacun des événements qui ont marqué ma vie ces dernières années. Tu es une amie en or et tu vas beaucoup me manquer.

A **Hélène**, depuis le stage de bactériologie il y a 4 ans et demi, il s'en est passé des choses 😊. Pour le meilleur ! Merci pour ta générosité et de m'avoir soutenue jusqu'au bout.

Je n'oublierai jamais notre rencontre et j'ai partagé avec vous les meilleurs moments de mon internat.

A **Sarah**, grâce à toi je n'étais plus la seule bisontine ;-)) merci pour ta grande bienveillance.

A **Karen510**, je regrette de ne pas t'avoir rencontrée plus tôt. Merci pour ton soutien sans faille et pour « ta grande faculté d'adaptation » 😊. Tu vas me manquer.

A **Etienne** de m'avoir guidé à plusieurs reprises pendant mon internat, tu as toujours été de bons conseils.

A **Grégoire**, acteur de vocation, tu as préféré la biologie médicale; en tout cas tu excelles dans les deux domaines. Merci de m'avoir fait autant rire, tu vas me manquer !

A **Hadrien et Mehdi**, qui ont contribué à rendre ces années d'internat inoubliables.

A **Rapha** et **Elo**, merci votre aide et votre soutien dans mes projets professionnels.

A **Anaïs**, une belle rencontre, ton sens du détail et ta bonne humeur vont me manquer.

A la team DU Qualité, **Nicolas, Léa, Audrey, Charlotte**, je passe avec vous des moments incroyables, et j'ai hâte de devenir experte en métrologie.

A **Agnès**, merci pour ton enthousiasme permanent, à **Ali**, merci « bébé » pour ta bonne humeur au quotidien (quand tu n'es pas en vacances), à **Claudia** et à **Laurie**, merci d'avoir été présentes en cette fin d'internat difficile, merci pour votre aide et vos conseils (et de me confirmer que j'ai plutôt bon goût « what else ? » 😊), à **Sabine**, merci d'avoir contribué à rendre ce stage d'hématologie un peu meilleur. A Camille, Tiphaine, Hugo et Aude, merci pour votre accueil à mon retour de congé mat'.

---

### **Et pour finir, merci à ma petite famille**

A mon fils, **Jarod**,

Mon Trésor, ma plus belle rencontre et ma plus grande fierté. Tu as transformé ma vie, tu m'as fait grandir et chaque jour tu me rends un peu meilleure.

A Toi **Paul**, mon Amour,

Pendant ces dix dernières années tu as été ma plus grande force. Malgré les difficultés, tu es resté à mes côtés, tu m'as supportée et soutenue et sans toi je n'en serais pas là aujourd'hui. Tu es mon pilier le plus solide. Une page se tourne, une nouvelle vie s'offre à notre famille et j'ai hâte de la construire à vos côtés.

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	4
TABLE DES MATIERES .....	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	13
TABLE DES TABLEAUX .....	14
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	15
INTRODUCTION .....	16
PARTIE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET VALIDATION DE METHODE .....	18
<b>1 Présentation des microscopes automatisés DM CellaVision®</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Les différents types de DM</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 Etat des lieux du marché français des microscopes automatiques</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3 DM 1200 : Principes</b> .....	<b>22</b>
a) Description du DM1200 <sup>8</sup> .....	23
b) Fonctionnement technique du microscope automatisé <sup>8</sup> .....	25
c) Aspects morphologiques des leucocytes normaux circulants.....	26
d) Classification des leucocytes par l'automate.....	29
e) Caractérisation des globules rouges <sup>8</sup> .....	31
f) Estimation des plaquettes (PLT) <sup>8</sup> .....	35
<b>2 Réalisation du frottis sanguin, support de la lecture de la formule sanguine</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1 Frottis sanguin manuel</b> .....	<b>38</b>
a) Contexte de réalisation au CHU de Toulouse .....	38
b) Etapes techniques de réalisation d'un frottis sanguin manuel.....	38
<b>2.2 Frottis sanguin réalisé avec l'Hemaprep</b> .....	<b>39</b>
a) Contexte de réalisation au CHU de Toulouse .....	39
b) Description technique de l'Hemaprep .....	40
c) Etapes techniques de réalisation d'un frottis sanguin avec l'Hemaprep .....	40
<b>2.3 Frottis sanguin réalisé avec le SP-10</b> .....	<b>41</b>
a) Contexte de réalisation au CHU de Toulouse .....	41
b) Description du SP-10.....	41
c) Etapes de réalisation d'un frottis sanguin par le SP .....	42
<b>3 Validation de méthode du DM 1200</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 Vérification/Validation de méthode : définitions</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2 Guides COFRAC nécessaires pour une validation- vérification de méthode</b> .....	<b>43</b>

<b>3.3 Validation de méthode de la formule leucocytaire</b> .....	<b>44</b>
a) Répétabilité .....	46
b) Fidélité intermédiaire .....	48
c) Exactitude.....	50
d) Comparaison des méthodes .....	53
e) Conclusion.....	55
<b>PARTIE 2 : ETAT DES LIEUX DES PRATIQUES D'UTILISATION DU MICROSCOPE</b>	
<b>AUTOMATISE EN FRANCE EN 2018</b> .....	<b>56</b>
<b>1 <u>Introduction</u></b> .....	<b>56</b>
<b>2 <u>Matériel et méthode</u></b> .....	<b>57</b>
<b>3 <u>Résultats</u></b> .....	<b>58</b>
<b>4 <u>Discussion</u></b> .....	<b>73</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>87</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>89</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>93</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> DM96, en bas à droite l'insertion des cassettes de lames .....	19
<b>Figure 2</b> DI60 (encadré rouge) intégré sur la chaîne d'analyse .....	20
<b>Figure 3</b> DM1200.....	21
<b>Figure 4</b> DC-1 .....	22
<b>Figure 5</b> Description technique du DM1200 .....	23
<b>Figure 6</b> Polynucléaires neutrophiles.....	26
<b>Figure 7</b> Polynucléaires éosinophiles .....	26
<b>Figure 8</b> Polynucléaires basophiles .....	27
<b>Figure 9</b> Lymphocytes .....	27
<b>Figure 10</b> Lymphocytes polymorphes chez le nouveau-né et l'enfant <sup>10</sup> .....	28
<b>Figure 11</b> Monocytes.....	29
<b>Figure 12</b> Advanced RBC Application, affichage des résultats par catégories de GR .....	34
<b>Figure 13</b> Advanced RBC Application, surbrillance dans le champ des hématies attribuées à une caractéristique. ....	34
<b>Figure 14</b> Advanced RBC Application, classement des GR par caractéristique .....	35
<b>Figure 15</b> Module d'estimation des plaquettes .....	36
<b>Figure 16</b> Schéma des étapes techniques de la confection d'un frottis sanguin manuel .....	39
<b>Figure 17</b> Photos des étapes de réalisation d'un frottis sanguin en manuel .....	39
<b>Figure 18</b> Description technique de l'Hemaprep .....	40
<b>Figure 19</b> Etapes techniques de réalisation d'un frottis sanguin avec l'Hemaprep <sup>17</sup> .....	40
<b>Figure 20</b> Le SP-10 en routine au CHU de Toulouse .....	41
<b>Figure 21</b> Fonctionnement du SP .....	42
<b>Figure 22</b> Fonctionnement du SP .....	42
<b>Figure 23</b> Circuit des lames étalées au CHU de Toulouse. ....	45
<b>Figure 24</b> Répartition des participants par type d'établissement.....	58
<b>Figure 25</b> Répartition des microscopes automatisés par type .....	59
<b>Figure 26</b> Répartition des DM 1200, DM 96, DI 60 par type de laboratoire .....	59
<b>Figure 27</b> Répartition de la période de fonctionnement du MA des participants .....	60
<b>Figure 28</b> Nombre de frottis sanguins passés par jour sur le MA .....	61
<b>Figure 29</b> Caractérisation des opérateurs utilisant le MA.....	61
<b>Figure 30</b> Répartition du taux de reprise des lames au microscope manuel classique .....	62
<b>Figure 31</b> Répartition du nombre de cellule comptées sur le MA .....	63
<b>Figure 32</b> Connaissance de l'application de lecture de liquides biologiques.....	64
<b>Figure 33</b> Distribution du temps d'archivage des frottis sanguins .....	65
<b>Figure 34</b> Taux de reprise des lymphopathies sur microscope manuel .....	70
<b>Figure 35</b> Taux de reprise des leucémies aigües sur microscope manuel .....	70

## TABLE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> Exemple de taux de concordances, pour chaque type cellulaire, entre la pré-classification et la post-classification <sup>11</sup> .....	31
<b>Tableau 2</b> Description du sous processus .....	46
<b>Tableau 3</b> Répétabilité sur le site de Purpan .....	48
<b>Tableau 4</b> Répétabilité sur le site de Ranguail .....	48
<b>Tableau 5</b> Répétabilité sur le site de l'IUC-Oncopole .....	48
<b>Tableau 6</b> Fidélité intermédiaire sur le site de Purpan .....	49
<b>Tableau 7</b> Fidélité intermédiaire sur le site de Ranguail.....	49
<b>Tableau 8</b> Fidélité intermédiaire sur le site de l'Oncopole .....	50
<b>Tableau 9</b> Exactitude PNN : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017 .....	51
<b>Tableau 10</b> Exactitude PNE : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017 .....	51
<b>Tableau 11</b> Exactitude PNB : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017 .....	51
<b>Tableau 12</b> Exactitude lymphocytes: proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017.....	52
<b>Tableau 13</b> Exactitude monocytes : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017 .....	52
<b>Tableau 14</b> Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis à l'aide de l'Hemaprep lu sur le DM par rapport aux résultats obtenus avec l'automate d'hématologie (XN).....	54
<b>Tableau 15</b> Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis en technique manuelle lu sur le DM par rapport aux résultats obtenus avec l'automate d'hématologie (XN) .....	54
<b>Tableau 16</b> Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis par le SP lu sur le DM par rapport aux résultats obtenus avec l'automate d'hématologie (XN) .....	54
<b>Tableau 17</b> Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis avec le SP lu manuellement par rapport aux résultats obtenus avec l'automate (XN).....	55
<b>Tableau 18</b> Avantages du MA : taux d'accord ou de désaccord avec les avantages proposés dans le questionnaire .....	67
<b>Tableau 19</b> Inconvénients du MA : taux d'accord ou de désaccord avec les inconvénients proposés dans le questionnaire .....	69

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AP :</b>	Agrégats Plaquettaires
<b>CHU :</b>	Centre Hospitalier Universitaire
<b>COFRAC :</b>	Comité français d'accréditation
<b>CV :</b>	Coefficient de Variation
<b>CIQ :</b>	Contrôle Interne de Qualité
<b>GB :</b>	Globules Blancs
<b>GR :</b>	Globules Rouges
<b>EEQ :</b>	Evaluation Externe de la Qualité
<b>HPF :</b>	High Power Field
<b>LA :</b>	Leucémie Aigüe
<b>LBM :</b>	Laboratoire de Biologie Médicale
<b>LCR :</b>	Liquide Céphalo Rachidien
<b>LED :</b>	Light Emetting Diode
<b>LGL :</b>	Grands lymphocytes à grains
<b>LLC :</b>	Leucémie Lymphoïde Chronique
<b>MA :</b>	Microscope Automatisé
<b>MAT :</b>	Micro-Angiopathie Thrombotique
<b>MGG :</b>	May-Gründwald Giemsa
<b>PLT :</b>	Plaquettes
<b>PNB :</b>	Polynucléaires Basophiles
<b>PNE :</b>	Polynucléaires Eosinophiles
<b>PNN :</b>	Polynucléaires Neutrophiles
<b>SIL :</b>	Système d'Informatisation de Laboratoire

## INTRODUCTION

Dans la plupart des laboratoires, les biologistes s'appuient sur l'analyse microscopique des frottis sanguins pour classer avec précision les cellules, facilitant ainsi le diagnostic et la surveillance de diverses pathologies hématologiques ou non<sup>1</sup>. Les automates de routine d'hématologie ne fournissent qu'une information limitée sur la morphologie des cellules en utilisant des indicateurs d'anormalités (hyperbasophilie, hypogranulation, etc...) et sont souvent incapables de classer de manière fiable les cellules anormales et immatures.

L'examen microscopique des frottis sanguins reste une étape primordiale et est réalisé principalement en présence d'alarmes quantitatives ou qualitatives de l'automate. L'utilisation du microscope, bien que considérée comme la référence en matière de différenciation des globules blancs, présente des limites. L'examen des frottis sanguins prend non seulement beaucoup de temps et de travail, mais nécessite également un personnel hautement qualifié. Le défi consiste donc à réduire le nombre de frottis examinés sans manquer d'informations de diagnostic importantes. Les biologistes peuvent s'aider de recommandations nationales ou internationales pour déterminer dans quels cas il est utile de faire un frottis sanguin<sup>2, 3, 4</sup>. L'impact d'un mauvais diagnostic ou d'un diagnostic retardé nécessite que du personnel expérimenté soit présent continuellement aux heures d'ouverture du laboratoire. De plus la classification manuelle des cellules est subjective, et tout dénombrement est également sujet à une variation significative inter et intra observateurs<sup>5</sup>.

Des systèmes automatisés d'analyse morphologique ont été introduits dans le passé, le premier ayant été décrit en 1966<sup>6</sup>. Ces systèmes antérieurs étaient lents, n'offraient qu'un degré d'automatisation limité et n'amélioraient donc pas de manière significative les flux de travail et les statistiques de comptage<sup>7</sup>. Plus récemment, des microscopes automatisés développés par CellaVision® ont été introduits avec beaucoup plus de succès. Cette technologie CellaVision® est actuellement distribuée par de nombreux fournisseurs d'automates, elle est la plus répandue en hématologie cellulaire en France. Ces instruments s'appuient sur une technologie numérique qui repose sur l'analyse d'images pour localiser et classer les cellules circulantes du sang total et autres liquides biologiques. Les cellules sont présentées sur un écran d'ordinateur pour confirmation ou reclassification. Le système permet également de revoir la morphologie des globules rouges et des plaquettes et d'estimer le nombre de plaquettes. La technologie de l'image

numérique via les microscopes automatisés présente différents avantages, permettant par exemple d'envoyer des images de cellules à des collègues pour avis, d'améliorer la formation du personnel, de référencer une cellule anormale et d'utiliser les images archivées pour l'assurance de la qualité et l'évaluation des compétences.

Le laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse est actuellement équipé sur chaque site (Purpan, Rangueil, Oncopole) d'un DM1200. Après une première partie reprenant le principe de ces microscopes automatisés Cellavision®, et plus particulièrement celui du DM1200, je présenterai mon travail de thèse qui consiste tout d'abord à réaliser la validation des méthodes du DM1200. Par la suite, nous discuterons de l'utilisation du microscope automatisé et de la place qu'il occupe dans différents laboratoires en France grâce aux résultats d'une enquête que nous avons réalisée par l'intermédiaire d'un questionnaire diffusé à de nombreux laboratoires de secteurs publics ou privés.

# PARTIE 1 : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET VALIDATION DE METHODE

## 1 Présentation des microscopes automatisés DM CellaVision®

Le DM est un microscope conçu pour effectuer automatiquement la formule leucocytaire à partir de frottis sanguins. Il peut effectuer également une pré-caractérisation morphologique des globules rouges (GR) et une estimation du nombre de plaquettes.

Il existe actuellement 5 DM en France : le DM8, le DM96, le DM1200, le DM9600 et le DI60. Un 6ème microscope automatisé également commercialisé par CellaVision®, le DC-1, vient d'être marqué CE (05/02/2019) et les premières commercialisations apparaîtront début d'été 2019.

### 1.1 Les différents types de DM

-Le DM8

Système semi-automatique, les lames sont déposées manuellement sur un support. Il possède une cadence de lecture de 20 lames par heure et dispose de deux objectifs de grossissement :  $\times 50$  et  $\times 100$ . Actuellement, il n'en reste qu'une dizaine en France, il est amené à disparaître.

-Le DM96

Système automatique, les lames sont chargées dans des cassettes (12 lames par cassettes). Plusieurs cassettes peuvent être insérées simultanément sur l'appareil. Il possède une cadence de lecture de 30 lames par heure et dispose de trois objectifs de grossissement :  $\times 10$   $\times 50$  et  $\times 100$ . Ce microscope est adapté au traitement d'un volume élevé d'échantillons (Figure 1).

-Le DM9600

Système automatique, remplaçant du DM96, les lames sont chargées dans des cassettes (12 lames par cassettes). Plusieurs cassettes peuvent être insérées simultanément sur l'appareil. Il possède une cadence de lecture de 30 lames par heure et dispose de deux objectifs de grossissement : x10 et x100, les images au x50 sont obtenues grâce à une lentille relais en amont de l'objectif x 100. Ce microscope est adapté au traitement d'un volume élevé d'échantillons.

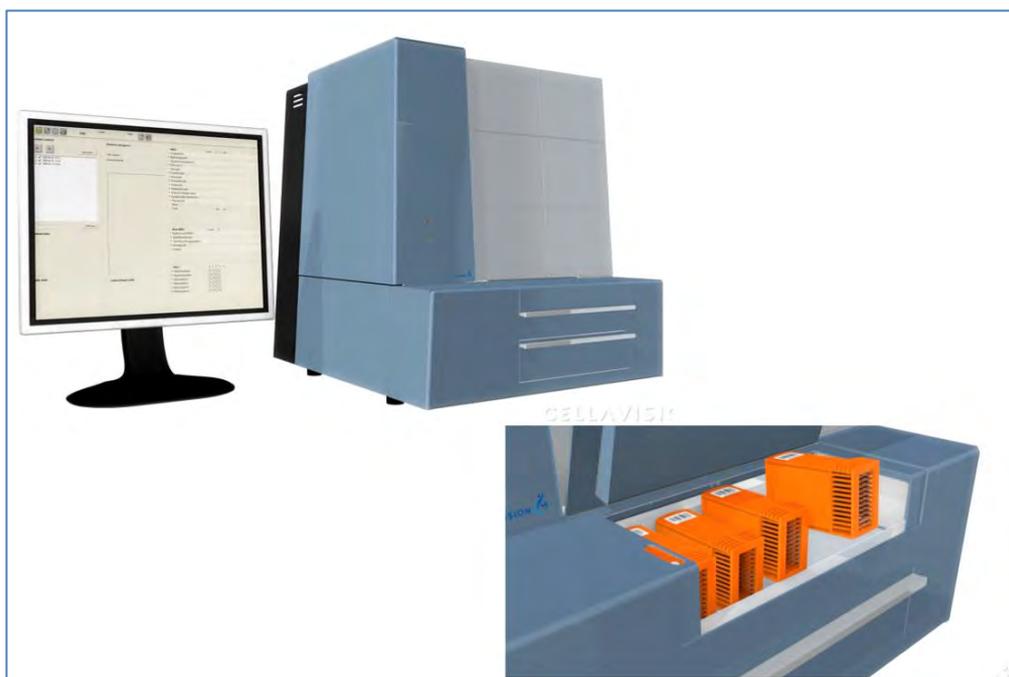


Figure 1 DM96, en bas à droite l'insertion des cassettes de lames

-Le DI60

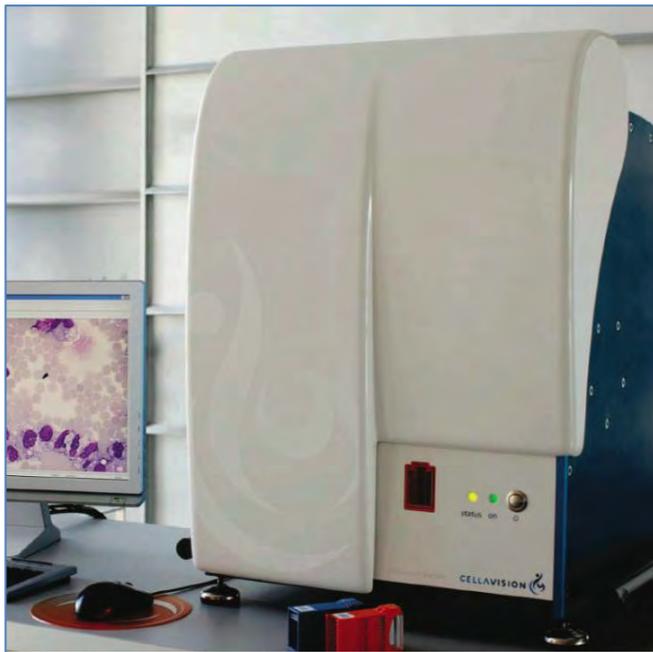
Il possède les mêmes caractéristiques que le DM9600, cependant, il est intégré sur la chaîne d'analyse : les lames qui sortent de l'étaleur automatisé (SP) sont transférées automatiquement sur le DI60.



Figure 2 DI60 (encadré rouge) intégré sur la chaîne d'analyse

## -Le DM1200

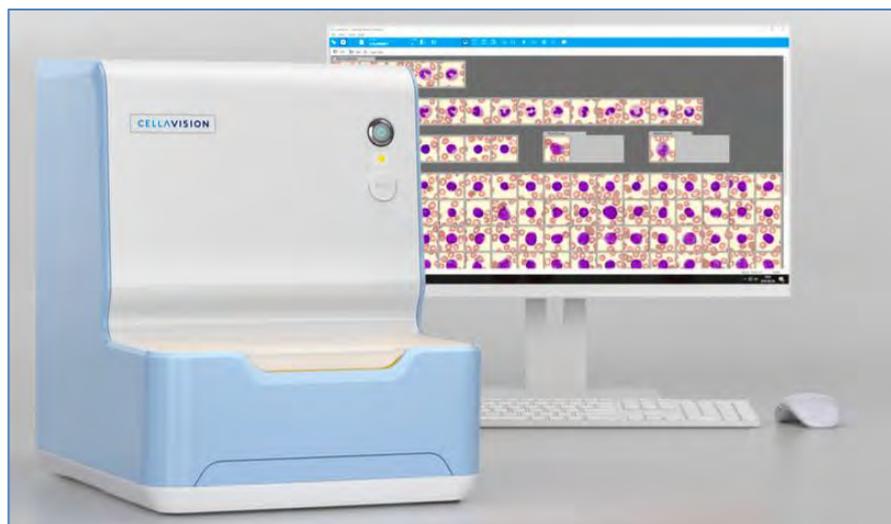
Système automatique, les lames sont chargées dans des cassettes (12 lames par cassettes). Il possède une cadence de lecture de 20 lames par heure et dispose de deux objectifs de grossissement : x10 et x100 (lentille relais pour images au x50). Il n'est possible de charger qu'une cassette à la fois sur ce microscope, il est adapté au traitement d'un volume moyen d'échantillons. Le CHU de Toulouse dispose de 3 DM1200 chacun répartis sur 3 sites : Purpan, Rangueil, Oncopole. La suite de cette première partie portera donc spécifiquement sur le DM1200.



**Figure 3** DM1200

-Le DC-1

Le DC-1 a été conçu pour des petits laboratoires. C'est un microscope semi-automatique qui est prévu pour du lame à lame. La distribution d'huile est manuelle. L'analyseur n'a plus qu'un objectif : le x100 et les images au x10 et x50 sont obtenues par des lentilles relais.



**Figure 4** DC-1

## 1.2 Etat des lieux du marché français des microscopes automatiques

Selon des chiffres donnés par le COFRAC, au 1<sup>er</sup> janvier 2019, il y aurait en France, DOM-TOM inclus, 800 Laboratoires de Biologie Médicale (LBM).

CellaVision® estime à 220 le nombre de microscopes automatisés de leur gamme en France tous modèles confondus. Il représente la plus grosse part du marché français. Un de ses concurrents, Menarini® commence à commercialiser des MA et 3 LBM en étaient équipés fin 2018.

## 1.3 DM 1200 : Principes

Le DM1200 interroge le SIL (Système d'Informatisation du Laboratoire) pour savoir l'ordre qu'il doit exécuter.

Il scanne une partie de la lame à analyser :

-il localise et numérise des cellules, produisant ainsi des images numériques de chaque cellule localisée ou élément trouvé. Il organise et propose une classification (pré-

classification) des images numériques des leucocytes. L'opérateur peut ensuite confirmer ou modifier cette classification (reclassification).

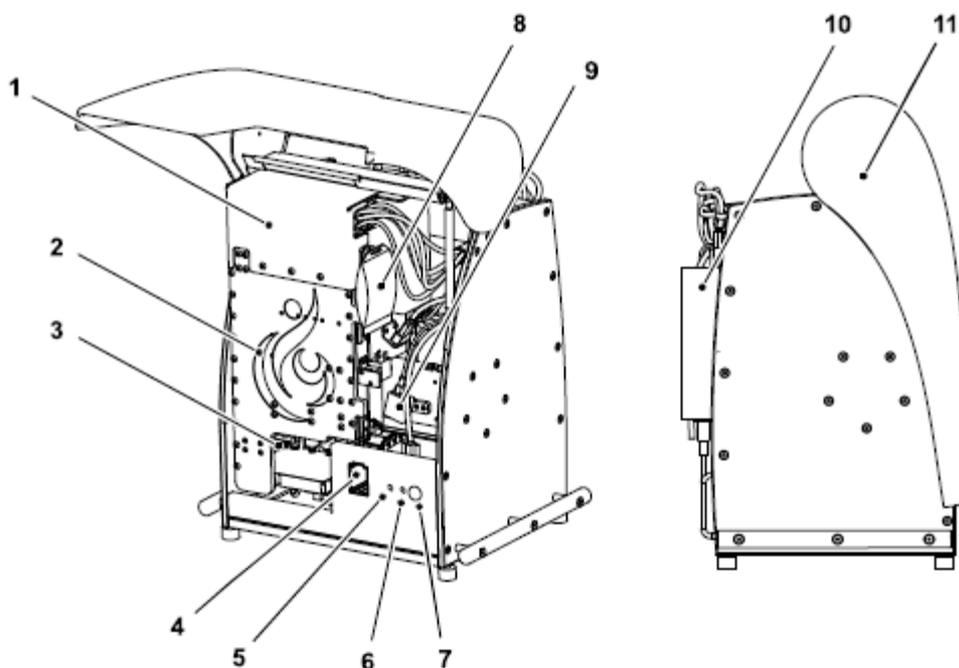
-il présente une image d'aperçu des GR et propose une pré-caractérisation.

-il facilite l'évaluation de la numération plaquettaire via la superposition d'une grille de dénombrement sur l'image d'aperçu.

-il enregistre les images et les résultats dans une base de données (disque dur externe).

Pour chaque lame passée sur le DM il est possible de déterminer par des règles informatiques ce que l'on veut faire (formule leucocytaire, étude érythrocytaire, numération plaquettaire). Il est également possible de faire varier le nombre d'éléments nucléés comptés pour la formule ou le laisser toujours fixe.

#### a) Description du DM1200<sup>8</sup>



**Figure 5** Description technique du DM1200

(1) Caméra numérique couleur

La caméra est une caméra à transfert de charge et à balayage progressif. Elle permet une production d'images d'excellente qualité ainsi qu'une acquisition d'images très rapide.

## (2) Microscope équipé d'un moteur

Il s'agit d'un microscope optique droit équipé d'un système d'illumination par LED (Light Emitting Diode). Il possède un objectif  $\times 10$  et un objectif  $\times 100$ , ainsi que des instruments optiques intermédiaires capables de passer de  $\times 1,0$  à  $\times 0,5$ . Ainsi, il est possible d'obtenir des agrandissements  $\times 5$ ,  $\times 10$ ,  $\times 50$  et  $\times 100$ .

## (3) Dispositif de préhension

Le dispositif de préhension permet une mise au point et un positionnement XY entièrement automatiques de la lame pendant le traitement. Il transporte la lame depuis le magasin et la range une fois le traitement terminé.

## (4) Support du magasin

## (6) Voyant de mise sous tension

## (7) Interrupteur principal

## (8) Réservoir d'huile à immersion

Le réservoir d'huile à immersion dépose automatiquement des gouttes d'huile sur la lame. Un compte-gouttes optique contrôle le processus.

## (9) Lecteur de code-barres

Le lecteur de code-barres scanne le code-barres de la lame et celui du magasin. Pour une sécurité optimale, le code-barres de la lame est scanné avant le traitement.

## (10) Unité de contrôle

L'unité de contrôle vérifie les moteurs, les capteurs, le dépôt d'huile sur les lames et l'éclairage. Elle fonctionne comme un ordinateur esclave via une connexion Ethernet non partagée.

## (11) Capot

## b) Fonctionnement technique du microscope automatisé <sup>8</sup>

Le magasin avec les lames à analyser est placé dans son support. Les lames dans le magasin doivent être orientées de sorte à ce que le code-barres se retrouve sur la face supérieure. Le traitement démarre automatiquement dès l'insertion d'un magasin dans le système.

Le code-barres est scanné, puis la lame est prise en charge par le dispositif de préhension directement dans le magasin. La pince déplace la lame selon les axes X et Y sous les objectifs qui eux, sont fixes. Les 2 objectifs ont des fonctions distinctes et complémentaires :

Objectif  $\times 10$  :

- recherche de la zone optimale de lecture pour les GR : le DM commence à un point fixe sur la lame à 33mm du bord supérieur (au centre du frottis). Il se déplace pas à pas vers la partie la plus fine du frottis en capturant continuellement des photos jusqu'à ce que les points de début et de fin de lecture soient déterminés.

- Une fois que les points finaux et initiaux sont définis, la couche monocellulaire de GB est scannée en créneau selon un trajet défini à la recherche de cellules pour la pré-classification. Leurs coordonnées des GB sont stockées.

Objectif  $\times 100$  :

- identification des GB (Globules Blancs) selon un algorithme de mise au point cellule par cellule.

- quand la mise au point est faite, la caractérisation des globules blancs est réalisée : plus de 300 paramètres différents sont mesurés pour chaque cellule et comparés à un système expert.

Objectif  $\times 100$  avec tube relais 0.5 ( $\times 50$ ) :

- recherche de la zone mono-couche pour la morphologie des GR

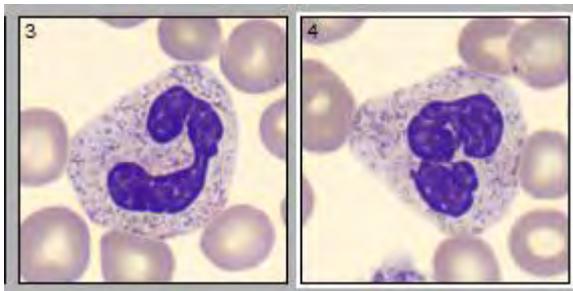
- caractérisation et morphologie

## c) Aspects morphologiques des leucocytes normaux circulants

### 1. Polynucléaires neutrophiles (PNN)

Taille : 12 à 15  $\mu\text{m}$  (deux fois la taille d'un GR).

Le noyau est segmenté en 2 à 5 lobes rattachés par des ponts chromatiniens, la chromatine est dense et « mottée », le cytoplasme contient de nombreuses granulations fines de couleur beige rosé.

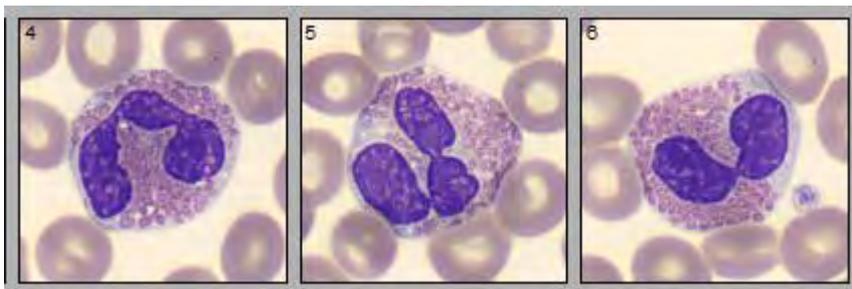


**Figure 6** Polynucléaires neutrophiles

### 2. Polynucléaires éosinophiles (PNE)

Taille : 12 à 15  $\mu\text{m}$ .

Le noyau est bilobé ("en bi-sac") le plus souvent. La chromatine est dense. Le cytoplasme est chargé de granulations sphériques, volumineuses et orange.

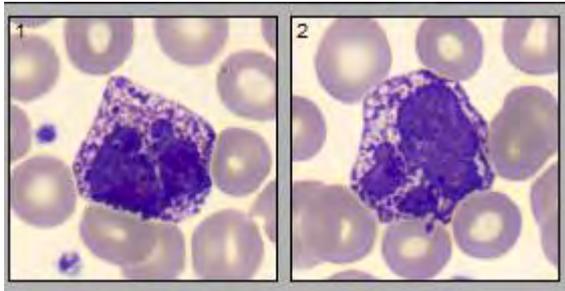


**Figure 7** Polynucléaires éosinophiles

### 3. Polynucléaires basophiles (PNB)

Taille : 12 à 15  $\mu\text{m}$ .

Le noyau est parfois peu visible car recouvert par les granulations secondaires volumineuses violet/noir en gros « grains de raisin »



**Figure 8** Polynucléaires basophiles

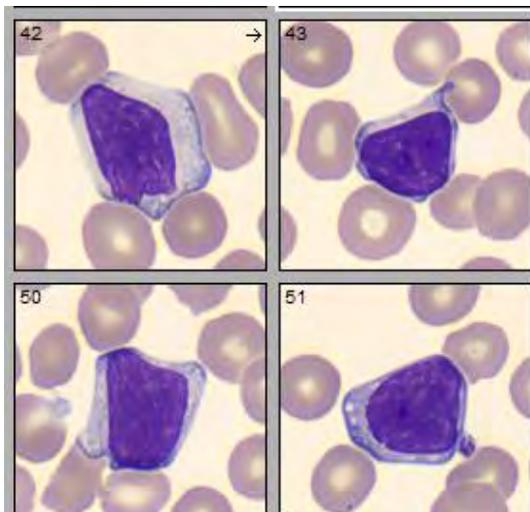
### 4. Lymphocytes

Taille : 9- 11  $\mu\text{m}$

Ils ont généralement une forme arrondie.

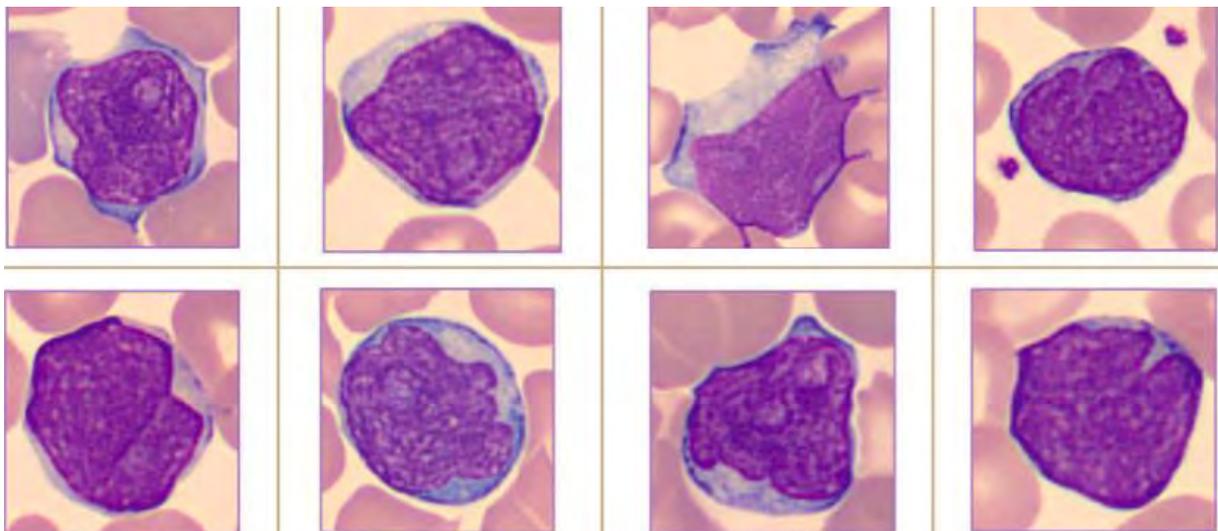
Il existe deux aspects cytomorphologiques différents :

- les lymphocytes de petite taille (taille équivalente à celle d'un GR) : rapport nucléocytoplasmique élevé, noyau rond, chromatine dense uniformément mottée.
- les grands lymphocytes (taille équivalente à celle de deux GR) : noyau assez dense, couleur violet foncé. Cytoplasme clair, hyalin ou légèrement basophile.



**Figure 9** Lymphocytes

Chez le nourrisson et l'enfant, il y a une hyperlymphocytose physiologique<sup>9</sup> avec une morphologie lymphocytaire très diversifiée<sup>10</sup>. Il existe une grande diversité à la fois de la taille cellulaire et de la texture de la chromatine témoignant d'une activation du système immunitaire plus intense que chez l'adulte. La chromatine est généralement plus fine, le contour du noyau peut être irrégulier. Cette lymphocytose physiologique persiste jusqu'à l'âge de 6 ans puis diminue progressivement pour atteindre des valeurs adultes vers l'âge de 10 ans.

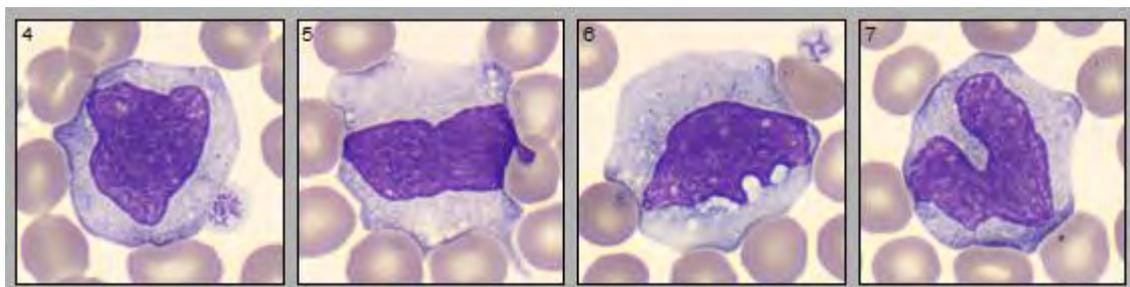


**Figure 10** Lymphocytes polymorphes chez le nouveau-né et l'enfant<sup>10</sup>

## 5. Monocytes

Taille : 18 - 21  $\mu\text{m}$ .

Le noyau est de forme variable (« en lettre de l'alphabet »), souvent encoché, chromatine assez fine et d'aspect « peignée ». Ils possèdent un cytoplasme gris-bleuté (aspect en « ciel d'orage »), dans lequel sont dispersés de fines granulations rosées souvent indiscernables. Le cytoplasme est souvent vacuolé.



**Figure 11** Monocytes

### d) Classification des leucocytes par l'automate

#### 1. Test de localisation cellulaire

CellaVision® préconise de passer tous les jours une lame afin de vérifier que le DM localise bien toutes les cellules (comme un contrôle interne de qualité).

Tout les matins, une lame de sang d'un patient qui présente une NFS normale est étalée par le SP puis passée sur le DM, lequel va localiser les cellules (200 cellules nucléées) en les marquant visuellement par un cadre. L'opérateur visualise les différents champs et vérifie que chaque cellule a bien été repérée par l'automate. Lorsque l'automate rate une cellule (absence de cadre), l'opérateur peut le notifier sur le champ visualisé.

## 2. Pré-classification des leucocytes

Les leucocytes sont présentés par classes et organisés en galeries.

Le DM classe automatiquement les leucocytes :

- Polynucléaires neutrophiles matures,
  - Polynucléaires éosinophiles,
  - Polynucléaires basophiles,
  - Lymphocytes,
  - Monocytes,
  - Promyélocytes,
  - Myélocytes,
  - Métamyélocytes,
  - Blastes
- } Précurseurs granuleux (= myélémie, non circulants chez le sujet sain)

-« Autres » (Correspondant à une catégorie de cellules et d'éléments que le système a pré-classé avec un faible niveau de précision. Il laisse donc le choix à l'utilisateur de la catégorie dans laquelle les mettre. Elles peuvent correspondre aux cellules basophiles, cellules de lymphomes, lymphocytes atypiques, cellules blastiques et cellules tumorales).

Le système ne reconnaît pas toutes les catégories cellulaires avec la même sensibilité. La littérature ([Tableau 1](#)) montre par exemple que le système reconnaît mieux les PNN matures (faible % de reclassification par l'opérateur) que la myélémie (% de reclassification par l'opérateur élevé pour les métamyélocytes et myélocytes) <sup>11</sup>.

Toutefois, cette capacité du MA à pré-classer les cellules dans la bonne catégorie a été largement étudiée et les concordances globales entre pré-classification et reclassification sont plutôt encourageantes (taux de concordance entre pré-classification et reclassification (82% Kratz *et al*<sup>12</sup>, 89,2% Briggs *et al.*<sup>11</sup>, 92% Ceelie *et al.*<sup>13</sup> et 88,4% Yamamoto T. *et al*<sup>14</sup>).

**Tableau 1** Exemple de taux de concordances, pour chaque type cellulaire, entre la pré-classification et la post-classification<sup>11</sup>.

Cell class	Preclassifying agreement (%)
Neutrophil (Neut)	99.5
Lymphocyte (Lymph)	94.9
Monocyte (Mono)	87.6
Eosinophil (Eos)	79.9
Basophil (Baso)	54.1
Metamyelocyte	32.6
Myelocyte	37.7
Promyelocyte	77.6
Blast	76.6
Nucleated red blood cell	89.6
Neut, Lymph and Mono	97.3
Neut, Lymphs, Mono, Eos and Baso	87.2
All cell classes	89.2
Abnormal cells called normal	0.9
Normal cells misclassified as other normal cells	9.1
Normal cells called abnormal cells	1.8

Le système effectue la pré-classification suivante des autres éléments : « cellules à corbeilles » (=cellules lysées) et « artéfacts ».

L'opérateur peut ensuite reclasser les cellules dans la bonne catégorie lorsque la pré-classification est erronée et peut également attribuer les catégories suivantes :

- Eosinophiles immatures
- Basophiles immatures,
- Promonocytes,
- Prolymphocytes,
- Grands lymphocytes granuleux,
- Tricholeucocytes,
- Cellules de Sézary,
- Mégacaryocytes,

ainsi que 15 catégories de cellules qu'il peut lui-même définir.

#### e) Caractérisation des globules rouges <sup>8</sup>

Le système pré-caractérise les GR selon les caractéristiques morphologiques suivantes :

## Couleur

- Hématies polychromatophiles,
- Hypochromie,

## Taille

- Anisocytose,
- Microcytose,
- Macrocytose

## Forme

- Poikilocytose.

Les résultats par catégorie morphologique sont rapportés de manière semi-quantitative, en utilisant quatre notes (absent (0), rare (1+), modéré (2+) et beaucoup (3+)), ([Figure 12](#)) et quantitativement en % des globules rouges. L'opérateur peut choisir de modifier, d'inclure ou d'exclure l'analyse érythrocytaire. En fonction du paramétrage du DM, la caractérisation pourra être transférée sur le SIL en cas de validation de la formule du DM.

Il existe une application facultative, l'« Advanced RBC Application », qui permet une pré-caractérisation plus complète des GR. Cette application détecte 21 caractéristiques morphologiques des GR.

Les 21 catégories morphologiques (comprenant celles déjà énumérées ci-dessus) :

## Forme

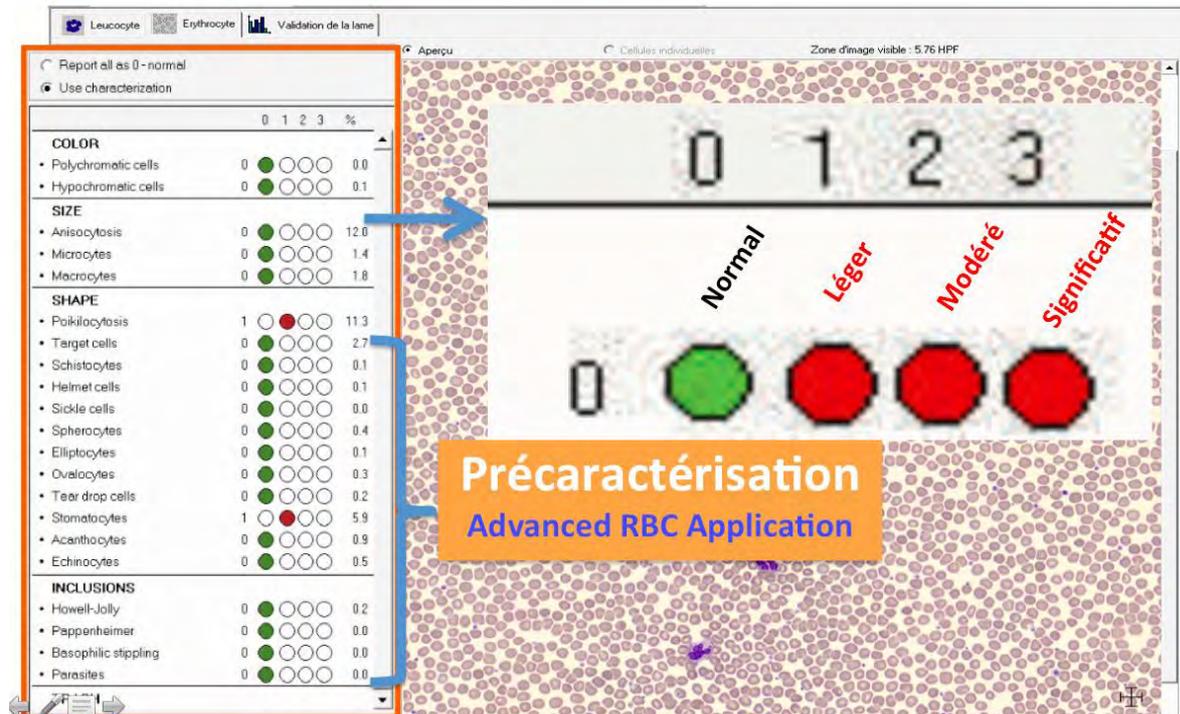
- Cellules cibles,
- Schizocytes,
- Cellules en casque (en France généralement additionné aux schizocytes)
- Drépanocytes,
- Sphérocytes,
- Elliptocytes,
- Ovalocytes,
- Dacryocytes,
- Stomatocytes,
- Acanthocytes,
- Echinocytes.

## Inclusions

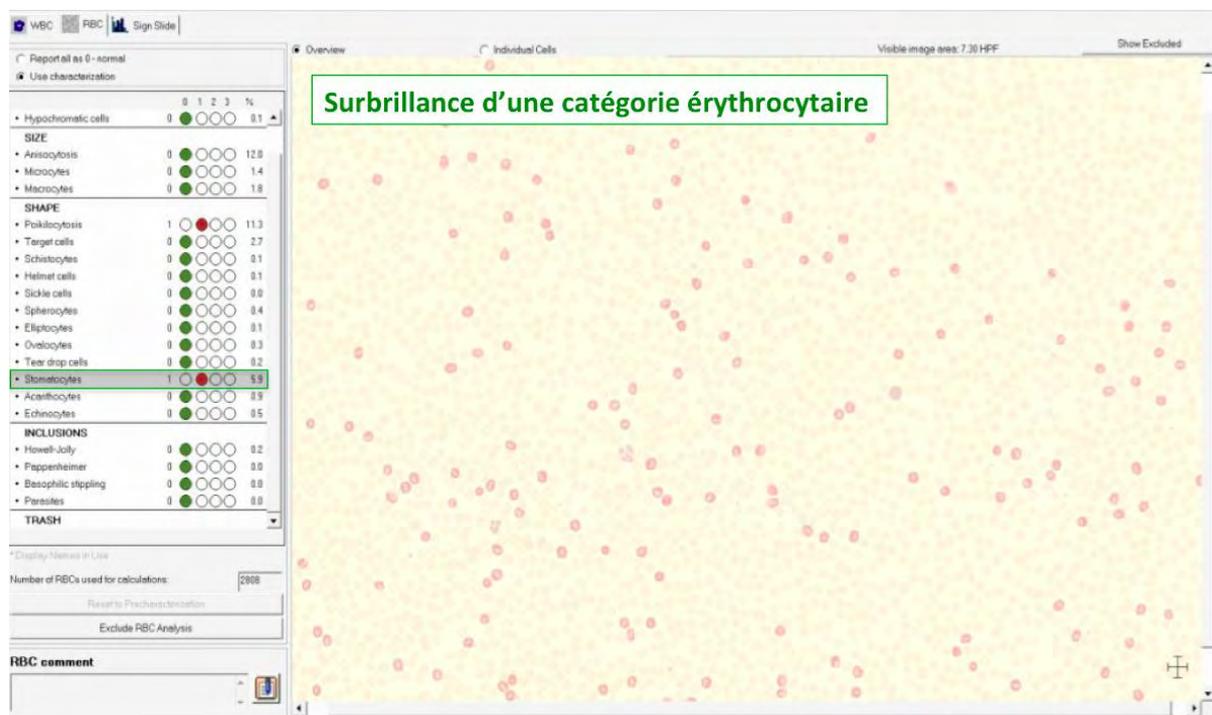
- Ponctuations basophiles,
- Corps de Howell-Jolly,
- Corps de Pappenheimer,
- Parasites.

Le système scanne une image correspondant à une zone de huit champs HPF (High Power Field : 1 HPF = 1 champ à l'objectif  $\times 100$ ). Sur cette image, il localise et classe automatiquement les GR dans l'une des 21 catégories ([Figure 12](#)) et affiche les résultats dans un aperçu haute résolution (= «pré-caractérisation»). L'opérateur vérifie ensuite et modifie manuellement, si nécessaire, les classifications de chaque globule rouge (= «post-caractérisation»). Le nombre de globules rouges analysés par lame a été fixé à environ 3000. Aucune différence significative dans le temps d'analyse entre le logiciel «actuel» (se concentrant principalement sur la pré-caractérisation WBC) et le nouveau logiciel RBC n'a été remarquée <sup>15</sup>.

Avec cette application, il est possible de visualiser les érythrocytes correspondant à une caractéristique qui apparaîtront alors en surbrillance dans le champ ([Figure 13](#)) et également de les visualiser classés par caractéristique ([Figure 14](#)).



**Figure 12** Advanced RBC Application, affichage des résultats par catégories de GR : les résultats par catégorie morphologique sont rapportés de manière semi-quantitative, en utilisant quatre notes (absent (0), rare (1+), modéré (2+) et beaucoup (3+)). En haut à gauche, les 6 caractéristiques morphologiques incluses dans le logiciel CellaVision® : hématies polychromatophiles, hypochromes, anisocytose, microcytes, macrocytes, poikilocytose. En accolade en bas : les 15 caractéristiques complémentaires qu'offre l' « Advanced RBC Application ».



**Figure 13** Advanced RBC Application, surbrillance dans le champ des hématies attribuées à une caractéristique.

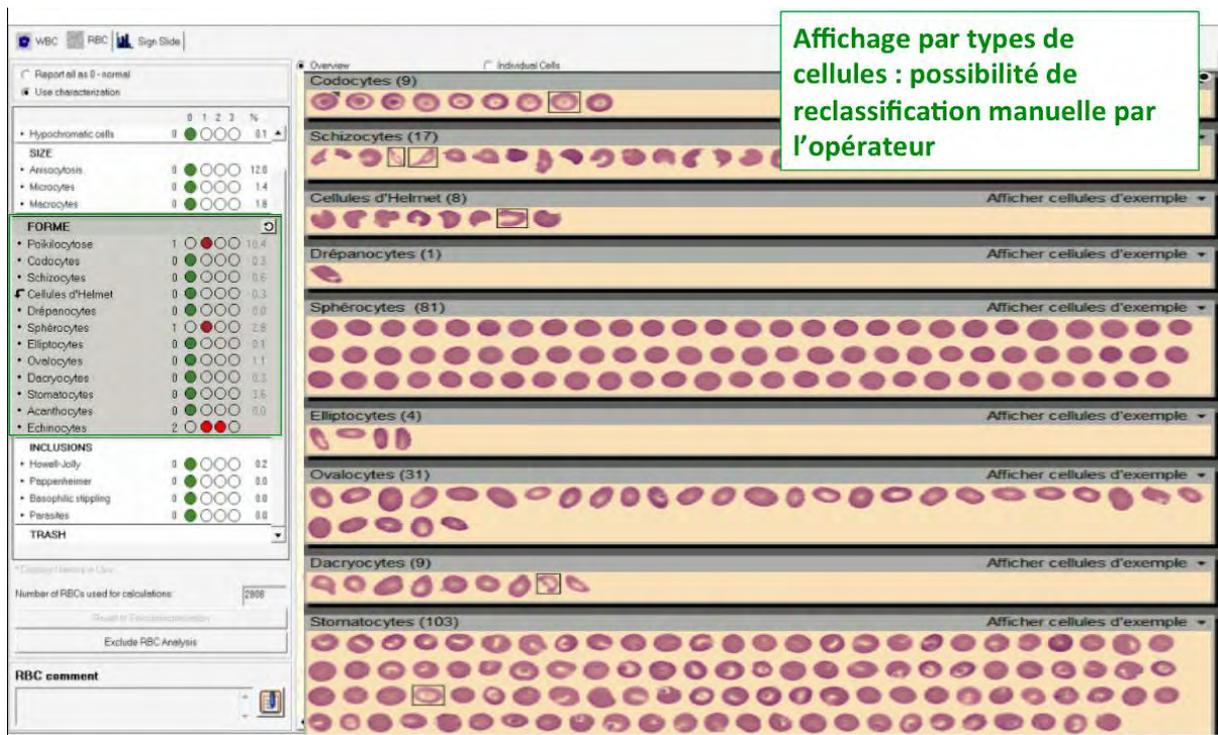


Figure 14 Advanced RBC Application, classement des GR par caractéristique

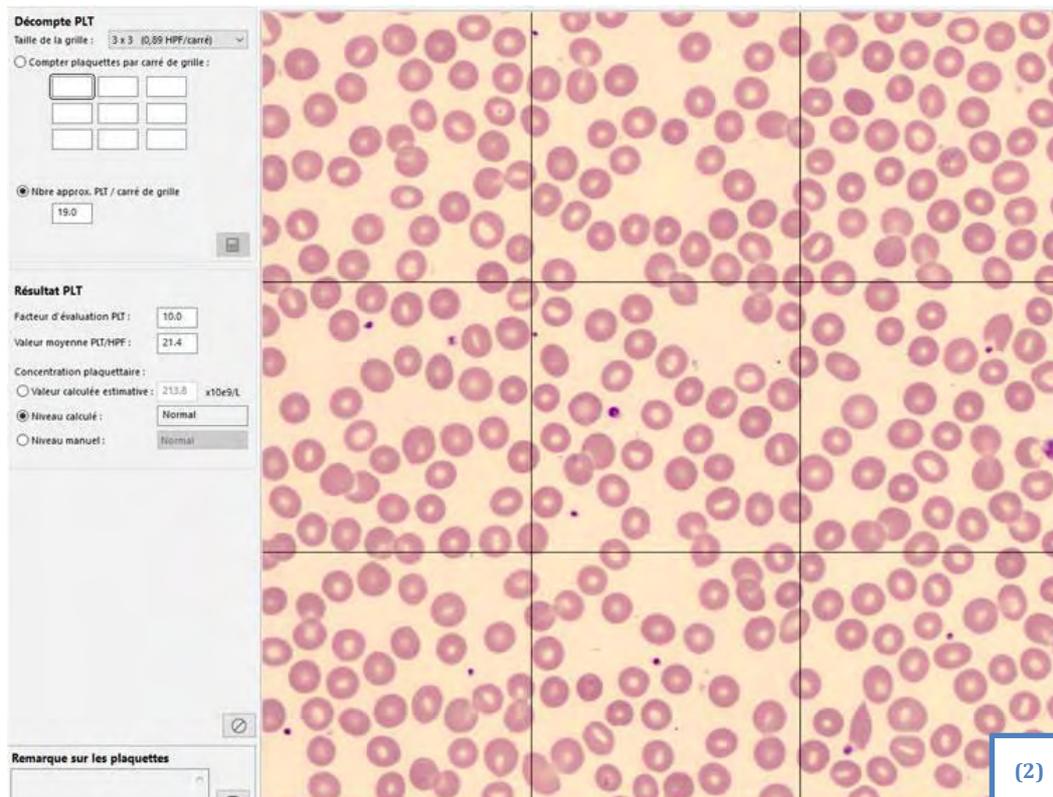
#### f) Estimation des plaquettes (PLT) <sup>8</sup>

L'image d'aperçu des plaquettes (même image que pour les érythrocytes) correspond à une zone de 8 champs HPF. L'image d'aperçu peut être divisée en 4, 9 ou 16 sous-images (carrés de grille) facilitant le décompte des plaquettes. Les options de taille de grille sont les suivantes : 2×2, 3×3 et 4×4. L'opérateur peut compter les plaquettes dans chaque carré de grilles et rentrer les valeurs ou estimer grossièrement le nombre de plaquettes/carré de grille (Figure 15).

L'estimation est calculée comme suit :

$$PLT = [Valeur\ moyenne\ PLT/HPF] \times [Facteur\ d'évaluation\ PLT]$$

Le facteur d'évaluation PLT est propre à chaque laboratoire et est défini par celui-ci en faisant plusieurs corrélations automate/DM sur différents frottis sanguins. Il est possible de sélectionner l'un des quatre niveaux d'estimation : « Significativement diminué », « Diminué », « Normal » ou « Augmenté ».



**Figure 15** Module d'estimation des plaquettes : ici, l'aperçu est divisé en 9 sous-images. La superposition d'une grille sur la sous-image permet de faciliter le décompte des plaquettes. (1) L'opérateur est ici en train de terminer son compte de plaquettes dans la dernière des sous images en bas à droite. (2) L'opérateur a choisi d'estimer grossièrement le nombre de plaquettes par sous-image.

Les agrégats plaquettaires (AP) qui peuvent être retrouvés dans certains échantillons sont susceptibles de sous-estimer, parfois de façon importante, la numération plaquettaire rendue par l'automate de routine. C'est pourquoi il est indispensable de les détecter.

En routine au CHU de Toulouse, les patients chez lesquels on retrouve une thrombopénie non connue font systématiquement l'objet d'une analyse microscopique manuelle sur lame pour détecter les AP, ce qui prend un temps non négligeable. Le DM peut également pré-classer les AP numérisés dans « agrégats plaquettaires ». Cependant, la littérature montre qu'il les identifie avec une faible sensibilité (40,4%)<sup>16</sup>. Toutefois, cette sensibilité peut être optimisée jusqu'à 82,8% si l'observateur analyse l'ensemble des images des globules blancs, ainsi que l'image des plaquettes. Cette faible sensibilité a été expliquée dans cette même étude, par le fait que les agrégats plaquettaires se trouvent préférentiellement dans les franges ou sur les bords du frottis, zones qui ne sont effectivement pas scannées par le microscope automatisé.

## **2 Réalisation du frottis sanguin, support de la lecture de la formule sanguine**

Les échantillons qui nécessitent un contrôle sur lame sont ceux qui présentent une ou plusieurs anomalies détectées par l'automate d'hématologie de routine (le XN). Ces anomalies sont en général signalées sous forme d'alarme sur le middleware MPL.

Au CHU de Toulouse, la quasi-totalité des frottis sanguins sont étalés et colorés de façon entièrement automatisée par le SP-10, étaleur automatisé qui est combiné au XN. Les frottis sanguins des nouveau-nés et des enfants sont souvent réalisés manuellement, car les échantillons sanguins pédiatriques sont souvent réalisés dans des microtainers, lesquels sont incompatibles avec le fonctionnement du SP-10. Par ailleurs, nous disposons sur chaque site d'un étaleur semi-automatisé, l'Hemaprep®, pouvant être utilisé en back-up en cas de panne du SP. Dans cette partie, nous allons présenter brièvement ces 3 modes d'étalement.

## 2.1 Frottis sanguin manuel

### a) Contexte de réalisation au CHU de Toulouse

Les frottis sanguins manuels sont réalisés :

- pour tous les échantillons pédiatriques prélevés dans des microtainers
- pour tous les échantillons sanguins de faible volume
- en cas de panne du SP-10

### b) Etapes techniques de réalisation d'un frottis sanguin manuel

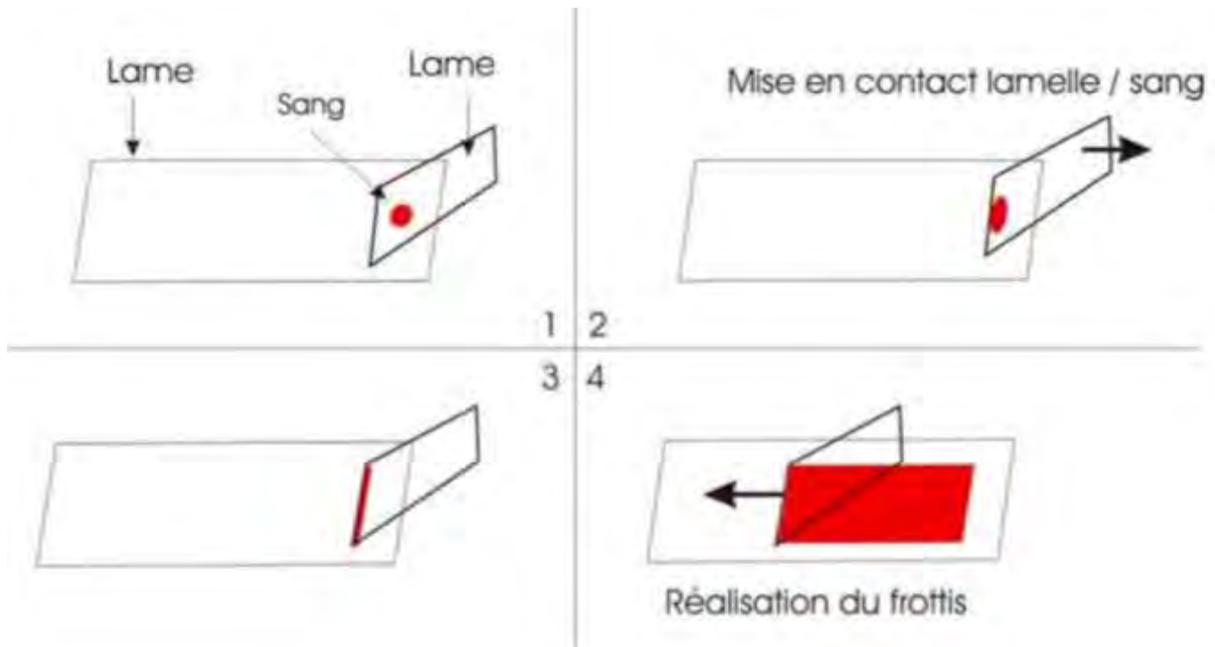
La réalisation manuelle d'un frottis sanguin nécessite un apprentissage et de l'entraînement. Elle se décompose en plusieurs étapes ([Figure 16](#), [Figure 17](#)) :

1 : déposer une goutte de sang à 1 cm de l'extrémité de la lame

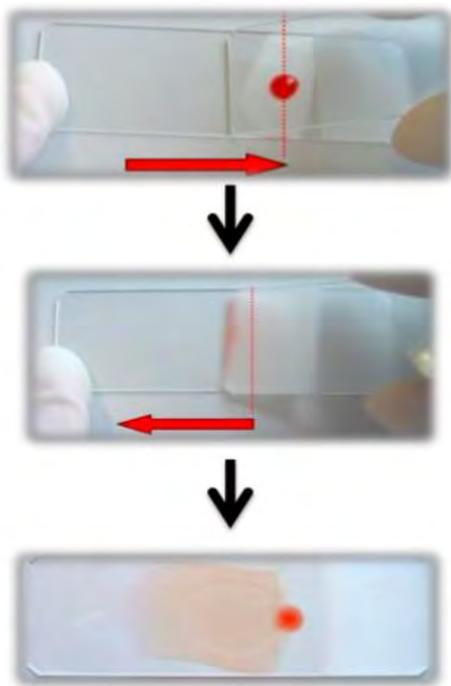
2 : faire glisser la seconde lame à étalement inclinée de 45° vers la goutte de sang jusqu'à la toucher

3 : laisser s'étaler la goutte de sang le long de l'arête de la lame à étalement

4 : glisser la lame en tirant ou en poussant : tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'autre extrémité de la lame. Le mouvement doit être rapide, régulier, sans trop appuyer, en maintenant la même inclinaison.



[Figure 16](#) Schéma des étapes techniques de la confection d'un frottis sanguin manuel



[Figure 17](#) Photos des étapes de réalisation d'un frottis sanguin en manuel

## 2.2 Frottis sanguin réalisé avec l'Hemaprep

### a) Contexte de réalisation au CHU de Toulouse

L'Hemaprep est essentiellement utilisé en back-up en cas de panne du SP.

## b) Description technique de l'Hemaprep

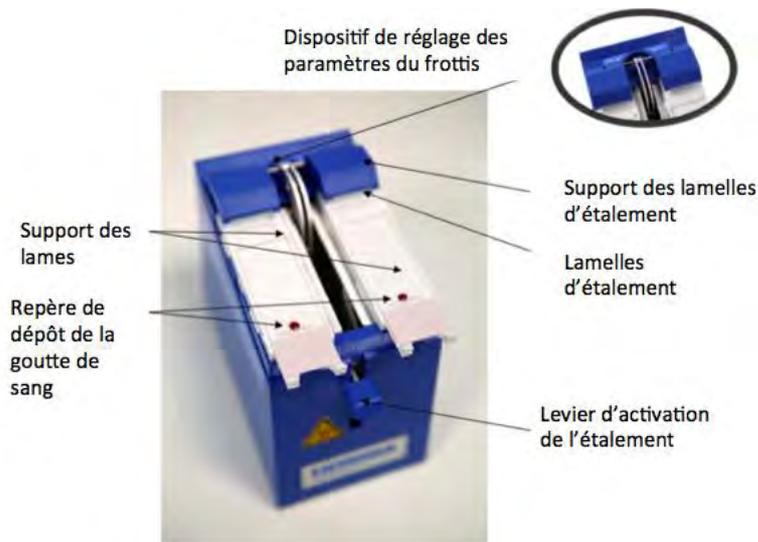


Figure 18 Description technique de l'Hemaprep

## c) Etapes techniques de réalisation d'un frottis sanguin avec l'Hemaprep

- 1 : placer la lame sur son support, puis déposer une goutte de sang sur le repère.
- 2 : appuyer sur le levier qui se trouve sur la face antérieure de l'appareil : les lamelles d'étalement glissent vers la goutte de sang.
- 3 : attendre 1 à 2 secondes que la goutte de sang imprègne l'arête de la lamelle, puis lâcher le levier : les lamelles reviennent à leur position initiale en étalant le frottis sanguin.
- 4 : obtention de frottis sanguins de façon standardisée.

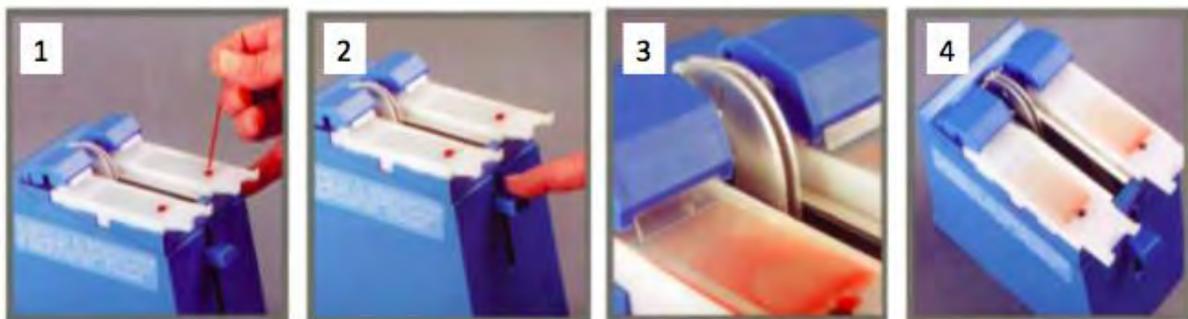


Figure 19 Etapes techniques de réalisation d'un frottis sanguin avec l'Hemaprep <sup>17</sup>

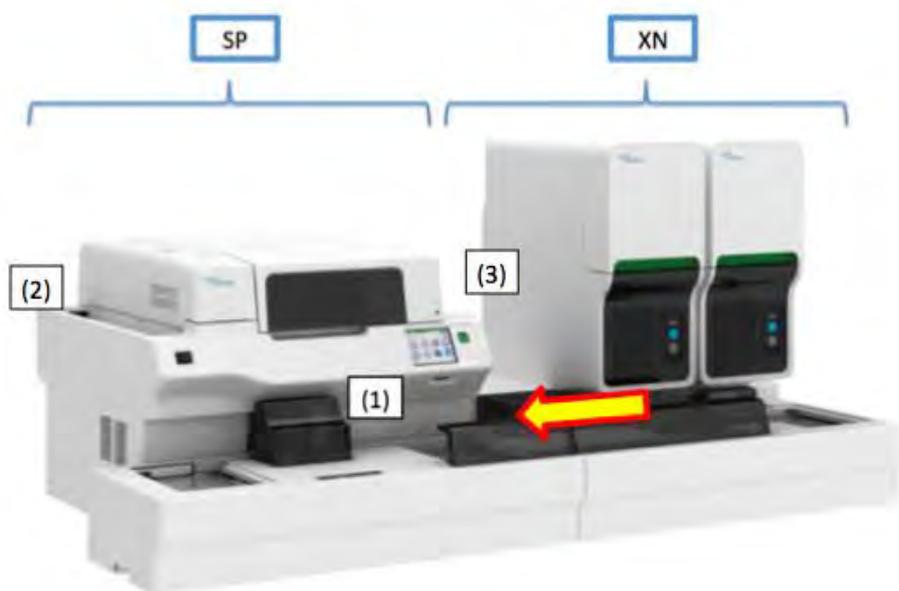
## 2.3 Frottis sanguin réalisé avec le SP-10

### a) Contexte de réalisation au CHU de Toulouse

Tous les échantillons patients nécessitant un contrôle des cellules au microscope peuvent être étalés par le SP-10 sauf s'ils ont un volume sanguin très faible ou s'ils sont prélevés dans des microtainers.

### b) Description du SP-10

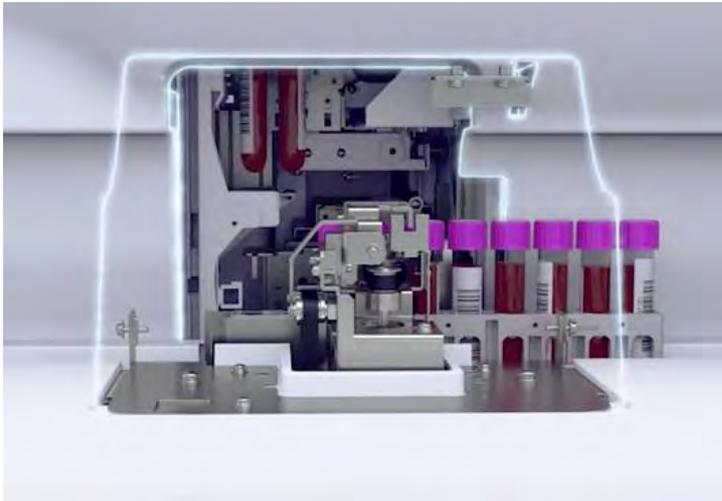
Le SP réalise de façon automatique l'étalement des frottis sanguins et leur coloration au MGG. Lorsqu'un frottis sanguin est demandé, les tubes provenant du XN transitent jusqu'au SP-10 par un rail automatisé (Figure 20). Ils sont alors pris en charge au niveau du capot avant de l'appareil. Une fois colorés, les frottis sanguins sortent sur des supports à gauche de l'appareil. Il est également possible de colorer des frottis sanguins préalablement étalés manuellement en utilisant le SP (échantillons pédiatriques). Dans ce cas, les frottis déjà étalés sont placés dans des supports à droite de l'appareil.



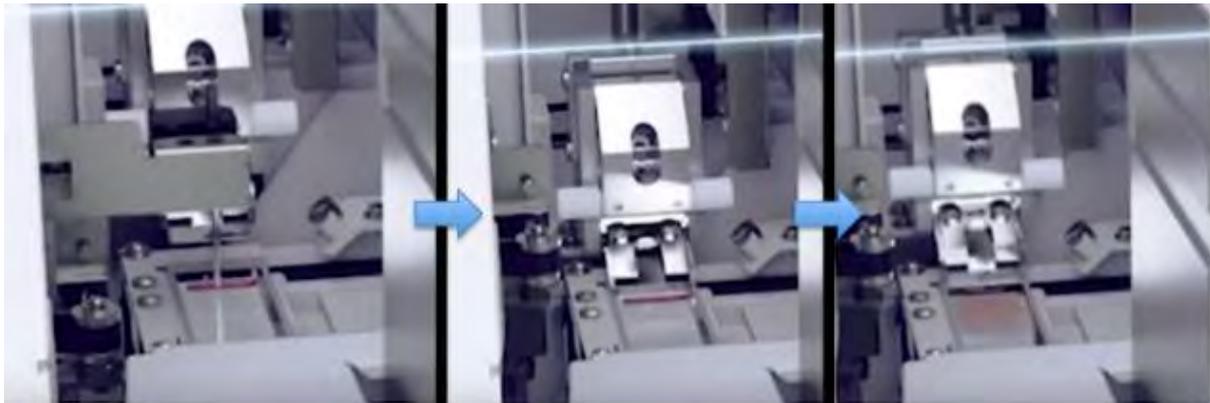
**Figure 20.** Le SP-10 en routine au CHU de Toulouse : le SP est à droite, les XN qui permettent la réalisation de la NFS (impédance, focalisation hydrodynamique, fluorocytométrie en flux<sup>18</sup>). Les tubes analysés par le XN transitent jusqu'au SP par un rail automatisé (flèche jaune et rouge). A gauche, le SP qui permet l'étalement des frottis sanguins ainsi que leur coloration. Les échantillons sont pris en charge par le SP au niveau du capot avant de l'appareil (1). Une fois colorés, les frottis sanguins sortent sur des supports à gauche de l'appareil (2). Les frottis sanguins déjà étalés peuvent être colorés par le SP, en les plaçant dans des supports par la droite de l'appareil (3).

### c) Etapes de réalisation d'un frottis sanguin par le SP

Pour la réalisation des frottis sanguins, les échantillons sont pris en charge au niveau du capot avant du SP (Figure 21). L'automate agite les tubes, puis le système automatisé prélève le sang du patient qu'il dépose de façon linéaire dans l'axe de la largeur de la lame, à une extrémité (Figure 22). La réalisation du frottis sanguin suit un algorithme permettant une standardisation de l'étalement : le volume de la prise d'essai, l'angle et la vitesse d'étalement sont automatiquement adaptés à l'hématocrite du patient.



**Figure 21** Fonctionnement du SP : prise en charge des tubes patients au niveau du capot avant du SP, agitation des tubes.



**Figure 22** Fonctionnement du SP : étapes d'étalement des frottis sanguins par le SP.

Une fois étalés, les frottis sanguins suivent un circuit automatisé dans le SP, au cours duquel les lames vont être, dans l'ordre chronologique : identifiées, puis colorées et séchées.

### **3 Validation de méthode du DM 1200**

#### **3.1 Vérification/Validation de méthode : définitions**

Vérification : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites<sup>19</sup>

Validation : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites<sup>19</sup>

Pour la plupart des analyses de routine, les LBM devront juste réaliser des vérifications de méthode. En effet, on utilise des méthodes reconnues ou normalisées qui sont considérées comme validées (DM-DIV marqué CE ou méthodes « fournisseur » utilisées dans leur domaine d'application), en suivant les recommandations du fournisseur. Il s'agit alors simplement de s'assurer que les performances attendues par le laboratoire et annoncées par le fournisseur sont atteintes.

Dans le cas d'une validation de méthode, le laboratoire utilise :

- soit une méthode normalisée ou reconnue mais employée hors de son domaine d'application (méthode adaptée par rapport aux recommandations du fournisseur) ;
- soit une méthode non reconnue développée ou mise en œuvre par l'équipe du LBM. Les recherches bibliographiques ainsi que les études expérimentales devront être plus approfondies.

#### **3.2 Guides COFRAC nécessaires pour une validation- vérification de méthode**

Les documents utiles à l'accréditation sont disponibles sur le site internet du COFRAC dans la section « santé humaine ». Il s'agit :

- des documents de référence (REF)
- des guides techniques d'accréditation (GTA)
- des formulaires (FORM)
- des documents d'information (INF)

Ces documents sont mis à jour régulièrement et seule leur version électronique fait foi.

Nous allons évoquer de façon succincte les documents nécessaires pour notre validation de méthode :

- SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale »<sup>20</sup> révisé en avril 2015
- SH REF 02 révision 05 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 »<sup>21</sup>

Ces deux documents sont primordiaux pour un LBM en démarche d'accréditation. Ils donnent une vision d'ensemble sur l'accréditation en biologie médicale.

- SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation »<sup>22</sup>
- SH INF 50 « Portée type d'accréditation »<sup>23</sup>
- SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) - validation (portée B) des méthodes en biologie médicale »<sup>24</sup>
- SH GTA 06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale »<sup>25</sup>
- SH GTA 14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médical »<sup>26</sup>

### 3.3 Validation de méthode de la formule leucocytaire

Au CHU de Toulouse, plusieurs sous-processus peuvent amener à réaliser une formule leucocytaire:

- Automate (XN, Sysmex®)
- **Lecture DM**
- Lecture microscope

L'algorithme de lecture des frottis sanguins au microscope au CHU de Toulouse est présenté en Figure 23.

Le type d'étalement réalisé conditionne le passage sur le DM1200 :

- étalement manuel (ex : échantillons pédiatriques) : lecture au microscope manuel.
- étalement automatisé (SP10 Sysmex) : lecture au DM1200 pour les formules, lecture au microscope manuel pour les thrombopénies.

Pour les lames lues par le DM1200, l'opérateur peut choisir

- de valider la formule de celui-ci,
- de reprendre le frottis au microscope manuel et de rendre une formule manuelle
- de rendre la formule du XN.

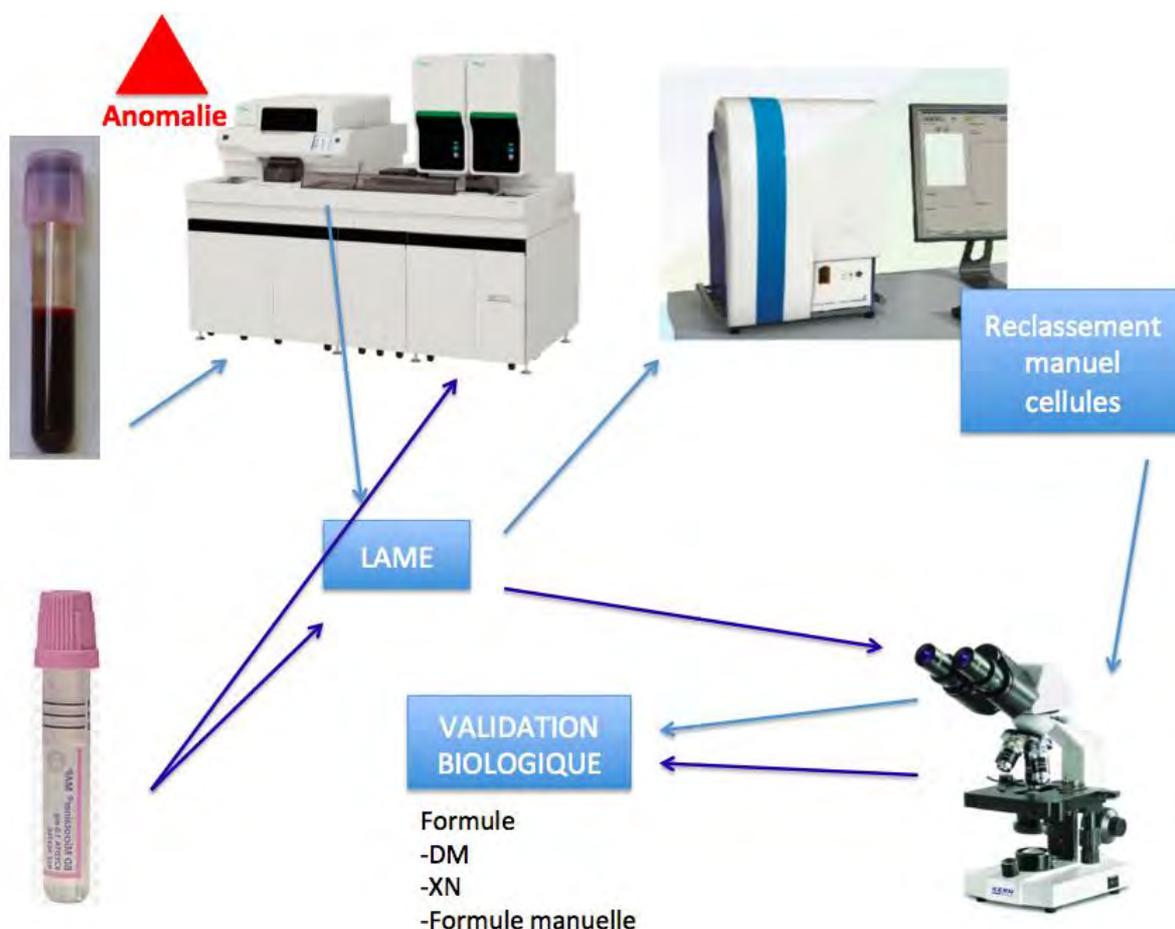


Figure 23 Circuit des lames étalées au CHU de Toulouse (en haut à gauche, tube EDTA classique, en bas à gauche, tube pédiatrique).

Ma première partie de thèse a consisté à faire la validation du sous-processus de la lecture au DM. En nous basant sur les textes du COFRAC présentés ci-dessus, nous avons déterminé les éléments à vérifier cochés dans le Tableau 2.

**Tableau 2** Description du sous processus

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
	Eléments à vérifier	Modalités de vérification/validation <sup>1</sup> :
Sous-processus 1 : lecture au microscope automatique	Essai sur lame de sang patient normal, 10 passages	<input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité
	Essai sur lame de sang patient normal, 20 passages	<input checked="" type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 4. Justesse
	Réalisé avec les EEQ: Biologie Prospective	<input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude
	Bibliographie	<input checked="" type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique
	Calculé avec la fidélité et EEQ	<input checked="" type="checkbox"/> 7. Incertitudes
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure : limite de détection
	Essai sur 30 frottis sanguins patients	<input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 10. Interférences
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 11. Contamination
	Données fournisseur	<input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs
	Bibliographie	<input checked="" type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence

### a) Répétabilité

Ce critère consiste à répéter plusieurs fois l'analyse, d'un même échantillon dans un intervalle de temps, le plus court possible, et dans des conditions strictement identiques (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage)<sup>24</sup>. L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart type (s) et le coefficient de variation (CV) pour chaque série.

<sup>1</sup> Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

**Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.**

**L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.**

Dans notre validation de méthode nous avons effectué la répétabilité pour chacun des microscopes automatique sur les 3 sites : Purpan (Tableau 3), Ranguel (Tableau 4) IUC (Tableau 5), soit 10 passages d'une même lame sur chaque DM. Nous avons comparé le CV expérimental obtenu pour chaque série avec le CV fournisseur.

A défaut de recommandations nationales, nous avons également vérifié pour chacun des 10 passages que le pourcentage obtenu était conforme par rapport à la table de Rümke extrapolée (cf Annexe 1), qui permet de poser les limites d'acceptabilité de l'inexactitude. Les résultats sont représentés dans les tableaux ci-dessous. Le fournisseur donnait uniquement l'écart-type de la reproductibilité (cf Annexe 2).

Nous avons calculé, pour chaque moyenne obtenue pour chaque type cellulaire, les CV de reproductibilité avec la formule :

$$\text{CV reproductibilité} = \frac{\text{écart-type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

Le CV de répétabilité peut être ensuite calculé par la formule :

$$\text{CV répétabilité} = \frac{\text{CV reproductibilité}}{1.33}$$

**Tableau 3 Répétabilité sur le site de Purpan**

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (%)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur <sup>1</sup>	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>2</sup> )	Conclusion <sup>3</sup>
DM PURPAN							
Polynucléaires neutrophiles	10	54.95	1.63	2.97	5.2	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	10	4.86	1.01	20.74	15.47		Conforme Rümke
Polynucléaires basophiles	10	0.35	0.37	105.71	150.37		Conforme
Lymphocytes	10	31.76	0.89	2.81	8.05		Conforme
Monocytes	10	7.64	0.95	12.41	19.68		Conforme

**Tableau 4 Répétabilité sur le site de Rangueil**

DM RANGUEIL							
Polynucléaires neutrophiles	10	53.45	1.49	2.8	5.34	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	10	3.61	0.66	18.4	20.83		Conforme
Polynucléaires basophiles	10	0.14	0.3	214.3	375.9		Conforme
Lymphocytes	10	35.9	1.83	5.11	7.12		Conforme
Monocytes	10	6.93	0.82	11.8	21.7		Conforme

**Tableau 5 Répétabilité sur le site de l'IUC-Oncopole**

DM IUC							
Polynucléaires neutrophiles	10	58.33	4.32	7.41	4.9	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme Rümke
Polynucléaires éosinophiles	10	2.96	0.64	21.61	25.4		Conforme
Polynucléaires basophiles	10	0.67	0.71	106.0	78.55		Conforme Rümke
Lymphocytes	10	32.04	2.18	6.79	7.98		Conforme
Monocytes	10	6.0	1.65	27.43	25.06		Conforme Rümke

**Conclusion** : répétabilité conforme sur les 3 sites. A noter des CV peu pertinents pour les cellules de très faible pourcentage type polynucléaires basophiles.

#### b) Fidélité intermédiaire

Cet essai consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs (opérateurs, conditions ambiantes, lots de réactifs, etc.)<sup>24</sup>. L'exploitation des résultats est similaire à celle de la répétabilité avec le calcul de la moyenne (m), de l'écart type (s) et du coefficient de variation (CV) exprimé en pourcentage (%).

Dans notre validation de méthode nous avons effectué la fidélité intermédiaire pour chacun des microscopes automatiques sur les 3 sites : Purpan (Tableau 6), Rangueil (Tableau 7) IUC (

Tableau 8), soit 20 passages d'une même lame sur chaque DM à des jours différents et par des opérateurs différents.

Nous avons comparé le CV expérimental obtenu pour chaque série avec le CV fournisseur calculé comme précédemment décrit à partir de l'écart-type fournisseur. A défaut de recommandations nationales publiées, nous avons également vérifié que le pourcentage obtenu était conforme par rapport à la table de Rümke extrapolée (cf Annexe 1), qui permet de poser les limites d'acceptabilité de l'inexactitude. Les résultats sont représentés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 6** Fidélité intermédiaire sur le site de Purpan

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur <sup>3</sup>	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion
DM PURPAN							
Polynucléaires neutrophiles	20	73.42	2.16	2.94	5.18	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	20	5.41	1.08	19.91	18.48		Conforme Rümke
Polynucléaires basophiles	20	3.57	0.49	13.72	19.61		Conforme
Lymphocytes	20	9.64	1.64	17.06	35.27		Conforme
Monocytes	20	7.89	1.21	15.38	25.35		Conforme

**Tableau 7** Fidélité intermédiaire sur le site de Rangueil

DM RANGUEIL							
Polynucléaires neutrophiles	20	54.05	1.89	3.50	7.03	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	20	4.02	0.66	16.43	24.88		Conforme
Polynucléaires basophiles	20	0.24	0.40	166.6	291.67		Conforme
Lymphocytes	20	33.90	2.61	7.71	10.03		Conforme
Monocytes	20	7.77	1.29	16.67	25.74		Conforme

**Tableau 8 Fidélité intermédiaire sur le site de l'Oncopole**

DM IUC							
Polynucléaires neutrophiles	20	57.69	3.43	5.95	6.59	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	20	2.93	0.78	26.76	26.62		Conforme Rümke
Polynucléaires basophiles	20	0.57	0.66	122.81	115.79		Conforme Rümke
Lymphocytes	20	32.59	2.04	6.27	10.43		Conforme
Monocytes	20	6.23	1.25	20.06	32.11		Conforme

**Conclusion** : fidélité intermédiaire conforme sur les 3 sites. A noter ici également des CV peu pertinents, notamment pour les polynucléaires basophiles.

### c) Exactitude

L'exactitude d'une mesure correspond à « l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande »<sup>24,25</sup>. Une étude d'exactitude correspond à la comparaison du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle. L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude).

A ce jour, le laboratoire évalue l'inexactitude à partir des données des EEQ, avec le calcul du Z-score selon la formule suivante :

$$z = \frac{x - V_{cible}}{SD}$$

avec :

x = valeur obtenue sur l'automate

Vcible = valeur cible de l'EEQ

SD = écart-type

Interprétations du Z-score :

<2 : conforme

2-3 : à surveiller

>3 : non conforme

Les données d'exactitude ont été calculées à partir des EEQ de l'année 2017 : 6 exercices par an, 1 EEQ = 2 lames : A et B, soit 12 lames/an. Ces EEQ sont ceux de Biologie Prospective qui à chaque exercice envoie 2 tubes de sang frais pour passage sur les automates de numération formule ainsi que 2 frottis sanguins correspondant au sang frais. Sur chaque site, ces 2 lames sont passées sur le DM et triées par un technicien habilité au microscope. Les résultats de tous les EEQ sont présentés dans le SH-FORM en Annexe 3. Ci-dessous dans les tableaux 9 à 13, se trouve le résumé global de la conformité des EEQ interprétés avec le Z-score pour chaque catégorie cellulaire.

Résultats :

**Tableau 9** Exactitude PNN : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017

<b>Nb Total EEQ Z Score Conformes</b>	<b>36</b>
<b>Nb total EEQ</b>	<b>36</b>
<b>Taux EEQ Z Score Conforme - Tous Niveaux</b>	<b>100%</b>

**Tableau 10** Exactitude PNE : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017

<b>Nb Total EEQ Z Score Conformes</b>	<b>30</b>
<b>Nb total EEQ</b>	<b>30</b>
<b>Taux EEQ Z Score Conforme - Tous Niveaux</b>	<b>100%</b>

**Tableau 11** Exactitude PNB : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017

<b>Nb Total EEQ Z Score Conformes</b>	<b>33</b>
<b>Nb total EEQ</b>	<b>33</b>
<b>Taux EEQ Z Score Conforme - Tous Niveaux</b>	<b>100%</b>

Tableau 12 Exactitude lymphocytes: proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017

Nb Total EEQ Z Score Conformes	33
Nb total EEQ	36
Taux EEQ Z Score Conforme - Tous Niveaux	92%

Tableau 13 Exactitude monocytes : proportion d'EEQ conformes selon le Z-score en 2017

Nb Total EEQ Z Score Conformes	35
Nb total EEQ	36
Taux EEQ Z Score Conforme - Tous Niveaux	97%

Conclusion :

Résultats conformes pour la quasi-totalité des EEQ. Pour certains EEQ des polynucléaires basophiles et éosinophiles, le CV du groupe de pairs n'était pas interprétable en raison de trop faibles valeurs.

Seuls 4 résultats sur 171 n'étaient pas conformes (2 pour les lymphocytes sur le DM de Rangueil, 1 pour les lymphocytes sur le DM de l'IUC et 1 pour les monocytes sur le DM de Purpan). Nous n'avons pas observé d'anomalie spécifique d'un automate, ni de dérive avec une surévaluation ou sous-évaluation constante pour une catégorie cellulaire.

Quand le Z-score était limite, entre 2 et 3, nous avons vérifié si le résultat était conforme selon la table de Rümke extrapolée. Sur les 4 EEQ non conformes selon le Z-score, 3 étaient conformes selon la table de Rümke et le 4<sup>ème</sup> était juste à la limite de l'acceptabilité.

#### d) Comparaison des méthodes

Il s'agit du dernier paramètre que j'ai évalué, il concerne les méthodes quantitatives.

Le COFRAC conseille d'analyser au moins 30 échantillons de patients « couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré »<sup>24</sup>. Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés une fois pour chaque méthode et dans le délai le plus court possible.

Le but était de comparer la formule réalisée par le DM1200 sur les 3 types d'étalements (manuel, SP, Hémaprep) à la formule réalisée avec l'automate de routine.

Notre analyse comprend 40 prélèvements sanguins choisis de sorte que chaque paramètre de la formule soit compris dans les valeurs normales de références. Nous avons choisi comme méthode de référence la formule réalisée avec l'automate de routine (XN) puisqu'elle est réalisée en comptant sur bien plus d'éléments que la méthode de lecture au microscope manuel.

Pour chaque prélèvement, 3 frottis sanguins ont été réalisés : un manuellement, un au SP, un sur l'hémaprep. Cinq d'entre eux ont été abîmés par leur manipulation après coloration, rendant la lecture au microscope automatisé impossible et une lame a été brisée lors de la lecture. Notre comparaison est donc réalisée sur 34 frottis. Chacune de ces lames a été lue sur le microscope automatisé. De plus, chaque frottis étalé au SP a fait l'objet d'un compte manuel. Chaque compte sur chaque frottis a été comparé à celui de référence réalisé par le XN pour chaque échantillon.

Pour valider ou non l'acceptabilité de nos résultats nous avons rentré nos données sur un site internet <https://resources.psmile.org/resources/equipment/smile-validation-guidelines/hematology/rumke-differential-evaluation-tool/view>

Ce site permet de comparer 2 séries de résultats (un de l'automate et un de formule manuelle ou lue au DM) selon la table de Rümke et donne les limites d'acceptabilité en fonction du pourcentage de résultats conformes (>80%) à la table de Rümke.

A noter comme limite de ce site internet que dans le tableau excel, la formule automatisée peut prendre des décimales alors que la formule manuelle doit être systématiquement arrondie, ce qui n'est pas le cas des résultats du DM. A chaque fois nous avons décidé d'arrondir au chiffre le plus éloigné du résultat automate pour s'assurer de ne pas surestimer la proportion de résultats conformes.

## Résultats

**Tableau 14** Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis à l'aide de l'Hemaprep lu sur le DM par rapport aux résultats obtenus avec l'automate d'hématologie (XN)

Hemaprep	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte
% Acceptable	73,5	100	100	64,7	88,2
Statut	Non Acceptable	Acceptable	Acceptable	Non Acceptable	Acceptable

**Tableau 15** Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis en technique manuelle lu sur le DM par rapport aux résultats obtenus avec l'automate d'hématologie (XN)

Manuel	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte
% Acceptable	64,7	90,9	97,1	79,4	64,7
Statut	Non Acceptable	Acceptable	Acceptable	Non Acceptable	Non Acceptable

**Tableau 16** Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis par le SP lu sur le DM par rapport aux résultats obtenus avec l'automate d'hématologie (XN)

SP	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte
% Acceptable	82,4	96,9	100	85,3	82,4
Statut	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable

**Tableau 17** Comparaison de méthode des résultats obtenus avec l'étalement d'un frottis avec le SP lu manuellement par rapport aux résultats obtenus avec l'automate (XN)

SP/Lecture Manuelle	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte
% Acceptable	94,1	96,7	100	94,1	94,1
Statut	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable

Conclusion : les résultats des formules effectuées sur le DM sont acceptables pour les étalements réalisés par le SP mais pas pour ceux réalisés par l'hémaprep ou manuellement. Nous avons donc décidé de ne passer au laboratoire que des frottis étalés par le SP sur le DM.

#### e) Conclusion

Le dossier de validation des méthodes complet est présenté en Annexe 3. Les tests réalisés sont conformes. Ils montrent que les résultats des formules étalées au SP et lues par le DM peuvent être rendus au prescripteur.

## **PARTIE 2 : ETAT DES LIEUX DES PRATIQUES D'UTILISATION DU MICROSCOPE AUTOMATISE EN FRANCE EN 2018**

### **1 Introduction**

Dans les laboratoires d'hématologie, l'examen microscopique des frottis sanguins occupe une place centrale dans le diagnostic et le suivi des hémopathies. En effet, cet examen permet l'étude de la morphologie des cellules sanguines, nous donnant ainsi des renseignements cytologiques qui peuvent caractériser une pathologie. L'examen microscopique manuel est considéré comme le « Gold Standard » en cyto-hématologie, cependant, il présente de nombreuses limites dont les principales sont la variabilité inter individuelle, le temps consacré à l'examen et l'absence de traçabilité et d'éléments de preuve quant aux cellules classées pour effectuer la formule sanguine. L'utilisation de microscopes automatisés (MA) équipés de logiciels de traitement d'images numériques offre de nombreux avantages, dont les principaux sont la standardisation de la lecture des frottis sanguins, l'amélioration du rendement de lecture ainsi que de la formation continue du personnel via les images numériques.

La dynamique actuelle tend vers l'harmonisation et la standardisation des pratiques au sein des LBM<sup>4,3,2</sup>, notamment via l'automatisation des techniques. Malgré tout, la cytomorphologie numérique reste encore très dépendante de l'examen visuel d'un opérateur expérimenté. Nous avons donc entrepris, sur le modèle d'une étude réalisée en 2012 au Canada et aux USA<sup>1</sup>, d'enquêter sur la façon dont étaient utilisés les MA dans différents laboratoires en France par la diffusion d'un questionnaire que nous avons élaboré. Nous nous sommes également intéressés à la façon dont était perçue cette technologie par le personnel de laboratoire. La quasi-totalité des références citées sont des études réalisées avec des MA de la gamme CellaVision® (principalement le DM96), et l'imagerie numérique conduit à des résultats reproductibles lorsqu'on compare les résultats de 2 MA de cette même gamme<sup>13</sup>. Le logiciel de traitement des images numériques est le même quel que soit le type de MA de cette gamme.

## 2 Matériel et méthode

Nous avons réalisé un questionnaire pouvant être envoyé par mail sur Google Form, logiciel gratuit (Annexe 4). Ce format possède les avantages d'être facile et rapide d'utilisation pour les destinataires, facilement diffusable, et nous permet, en tant qu'auteurs, de consulter l'avancée des réponses à tout moment.

Le questionnaire a été élaboré entre le 1<sup>er</sup> Juillet et le 31 août 2018. Il comprend 66 questions dont 11 questions à choix multiple, 40 questions à choix simple, 8 réponses courtes et 7 réponses longues.

Le questionnaire est divisé en 5 parties : 24 questions portent sur l'utilisation du MA dans le laboratoire, 7 questions sur les contrôles de qualité passés sur le MA, 15 questions sur les avantages du MA, 13 questions sur les inconvénients. Une dernière partie de synthèse comporte 7 questions.

Il a été diffusé de septembre 2018 à novembre 2018 et clôturé le 31 décembre 2018.

Pour toucher le plus de laboratoires possibles sur le territoire français, privés et publics, nous avons contacté des associations et des syndicats de biologistes ainsi que des organismes d'évaluation externe de la qualité par mail et nous leur avons demandé de diffuser le questionnaire à leurs membres (ABMP-MP=Association des Biologistes de Midi Pyrénées, ABA=Association des Biologistes d'Aquitaine, ABBRA= Association des Biologistes Bourgogne Rhône Alpes, SJBM = Syndicat des Jeunes Biologistes Médicaux, Biolam-PACA = Syndicat des Directeurs de laboratoire de Biologie Médicale PACA, GFHC = Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire, CTCB = Centre Toulousain pour le Contrôle de Qualité en biologie clinique, Probioqual = Association pour la Promotion du Contrôle de Qualité en Biologie Médicale.) Nous avons ainsi obtenu 123 réponses. Parmi les réponses, un participant possédait un NOVA View®, microscope par immunofluorescence, qui ne rentrait pas dans le cadre de notre étude; nos critères d'inclusions (uniquement les laboratoires d'hématologie) n'ayant pas toujours été précisés lors de la diffusion de notre questionnaire. Afin d'éviter de créer un biais dans notre étude, nous ne tiendrons pas compte des réponses relatives à cet automate d'IFI.

Parmi les réponses, 4 doublons ont été détectés (pour 2 doublons : 2 personnes avaient répondu pour le même site et pour les 2 autres la même personne avait répondu 2 fois). Une réponse unique par site étant souhaitée, nous avons éliminé ces doublons pour être le plus représentatif possible.

### 3 Résultats

#### Généralités et pratiques d'utilisation du MA

##### Taux de participation au questionnaire par type d'établissements

Nous avons analysé 118 réponses réparties sur 23 CHU, 28 CH, 66 laboratoires privés et un CLCC = Centre de Lutte Contre le Cancer.

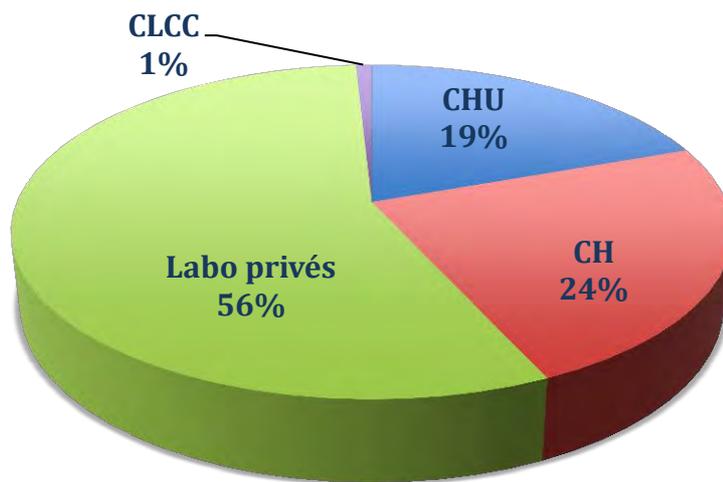


Figure 24 Répartition des participants par type d'établissement

##### Type de microscope étudié

La majorité des automates dans cette étude sont des DM1200 (53%), 62% sont retrouvés dans les laboratoires privés, 24% dans des CH et 12% dans des CHU.

Le DM96 représente presque un quart des MA de l'étude (23%). La moitié est retrouvée en CHU (48%) et l'autre moitié dans des laboratoires privés (45%).

Dix-huit pourcents des laboratoires possèdent un DI 60. Pour la plupart ce sont des laboratoires privés (65%).

Quatre pour cent des laboratoires possèdent un DM8, ce sont des laboratoires privés (2) et des CH (3). Le DM8 est aujourd'hui obsolète et il n'existe plus de support service ou pièces détachées.

Un CH possède un DM 9600 et 1 autre CH possède un Hema Vision®.

Plus de 90% des laboratoires possèdent un seul MA/site. Deux CHU et 3 laboratoires privés ont déclaré posséder sur leur site 2 automates, et 1 laboratoire privé a déclaré

posséder 3 automates. Plus de la moitié des laboratoires de l'étude sont équipés depuis plus de 3 ans (70/118 labos). Vingt laboratoires sont équipés depuis moins d'un an (8 CH et 12 laboratoires privés).

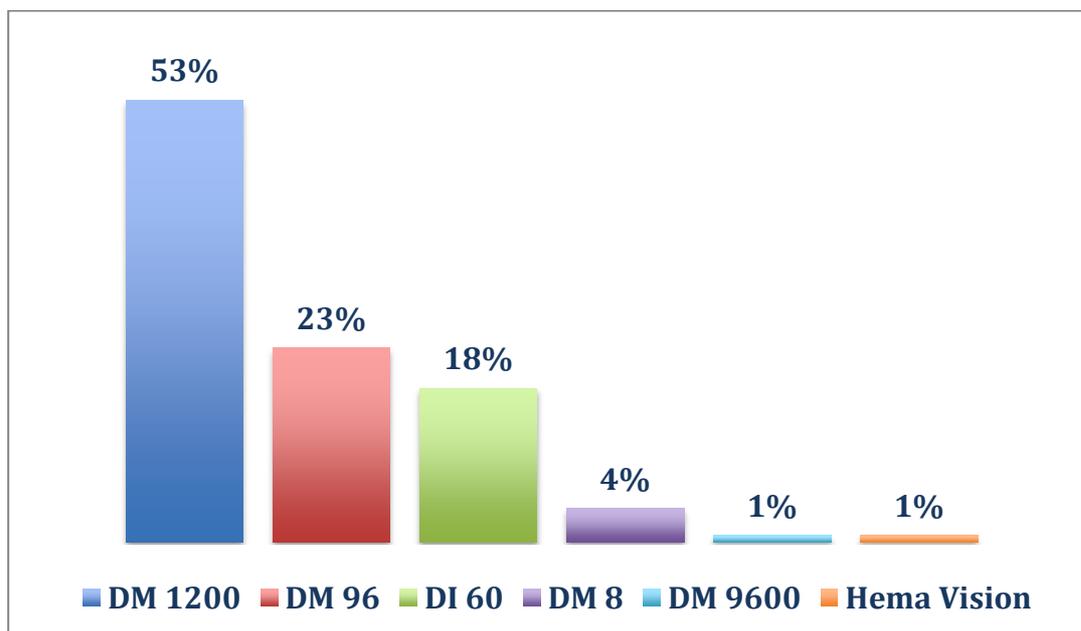


Figure 25 Répartition des microscopes automatisés par type

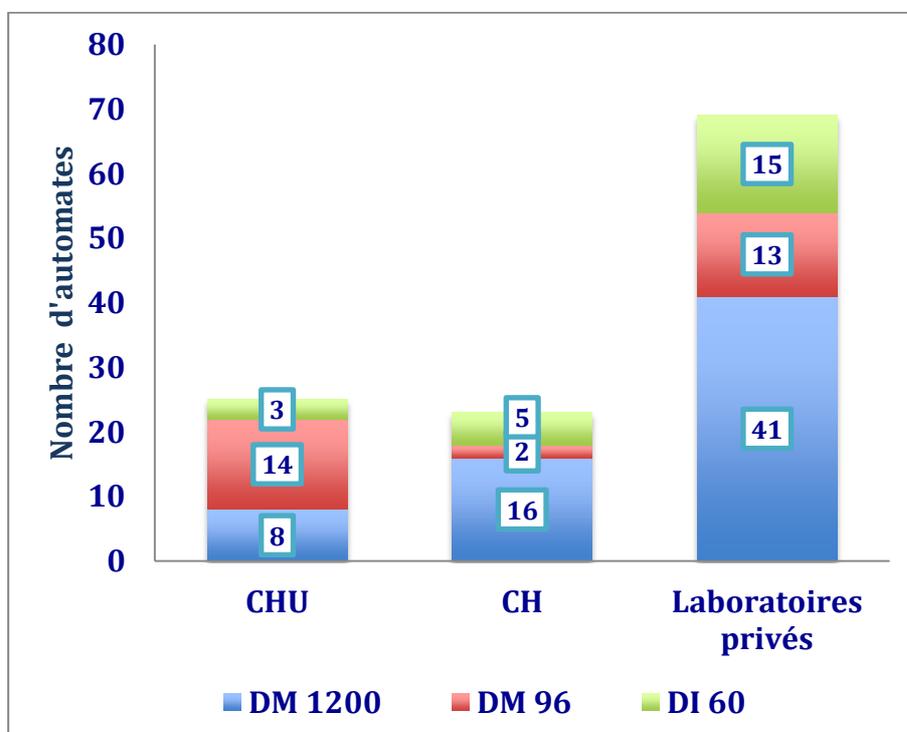


Figure 26 Répartition des DM 1200, DM 96, DI 60 par type de laboratoire

## Type d'étalements passés sur le MA

La majorité des laboratoires (95%) possède une technique automatisée pour réaliser les frottis sanguins destinés à être lus sur le MA. Seuls 5% des laboratoires affirment ne passer que des frottis sanguins étalés manuellement sur le MA.

Trente-deux pour cent des laboratoires passent la totalité de leurs frottis sanguins sur le MA. Pour les autres, les 3 principales raisons pour lesquelles les frottis sanguins ne sont pas lus par le MA sont :

- le contrôle des thrombopénies (71%)
- les étalements manuels (42%)
- le contrôle des anomalies des GR (19%)

## Période de fonctionnement du MA

24 laboratoires (20%) utilisent leur MA en continu, 7j/7j et 24h/24h.

Le MA est utilisé la plupart du temps en discontinu (éteint la nuit et/ou fonctionnement 5j/7j, 6j/7j).

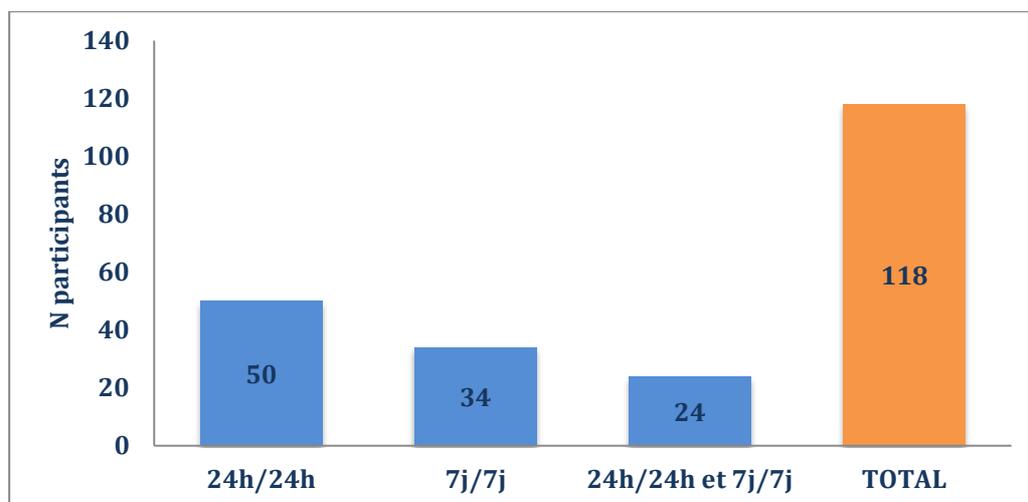


Figure 27 Répartition de la période de fonctionnement du MA des participants

## Nombre de frottis sanguins lus quotidiennement par le MA

La plupart des participants passent moins de 100 lames/jour sur leur MA. La majorité se situe dans la tranche 50 à 100 lames/jour.

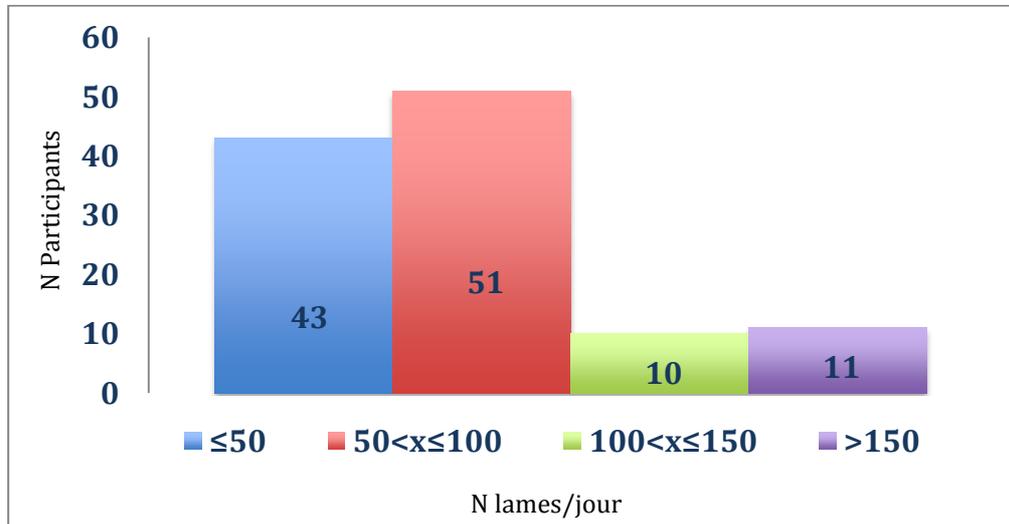


Figure 28 Nombre de frottis sanguins passés par jour sur le MA

## Opérateurs

Le poste le plus concerné par l'utilisation du MA pour la lecture des lames est le poste de technicien suivi de près par le poste de biologiste.

Les laboratoires où des internes utilisent le MA sont les établissements de type CHU.

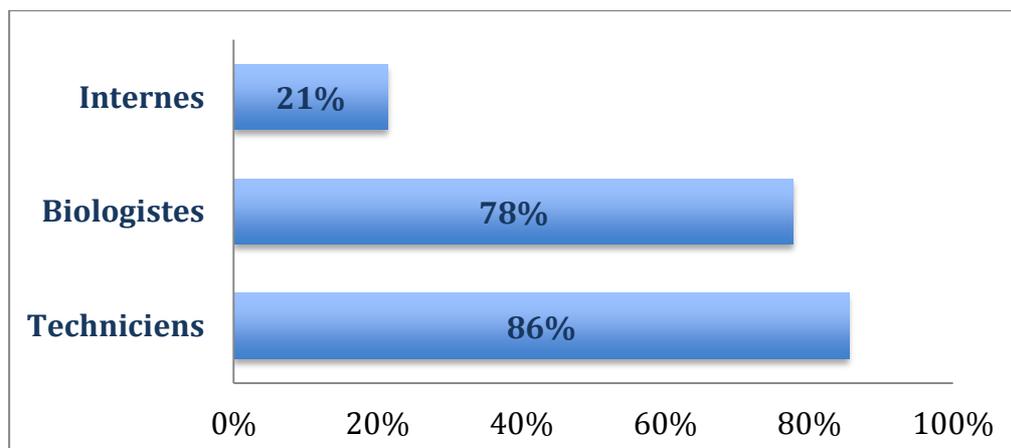


Figure 29 Caractérisation des opérateurs utilisant le MA

## Taux de formules réalisées par le MA rendue au prescripteur

Une fois la reclassification des GB terminée, l'opérateur vérifie la concordance de la formule obtenue avec celle de l'automate d'hématologie et peut choisir de rendre au prescripteur l'une ou l'autre des deux formules. Parmi les participants, 5,9% ont déclaré ne jamais rendre au prescripteur la formule effectuée par le MA. Pour les autres, nous voulions savoir quel taux de formule réalisée par le MA était rendu au prescripteur mais beaucoup de participants n'ont pas compris le sens de la question posée. Ainsi, nous n'avons pas pu exploiter les résultats.

## Taux de reprise au microscope manuel des frottis sanguins lus par le MA

Les frottis lus par le MA nécessitent parfois une relecture sur le microscope manuel. 94% des laboratoires estiment avoir un taux de reprise inférieur à 30% et 66% estiment avoir un taux de reprise inférieur à 15%. Un seul laboratoire (sur les 118 réponses) a déclaré reprendre au microscope manuel plus de 50% des lames passées sur le MA (CH avec étalements manuels uniquement).

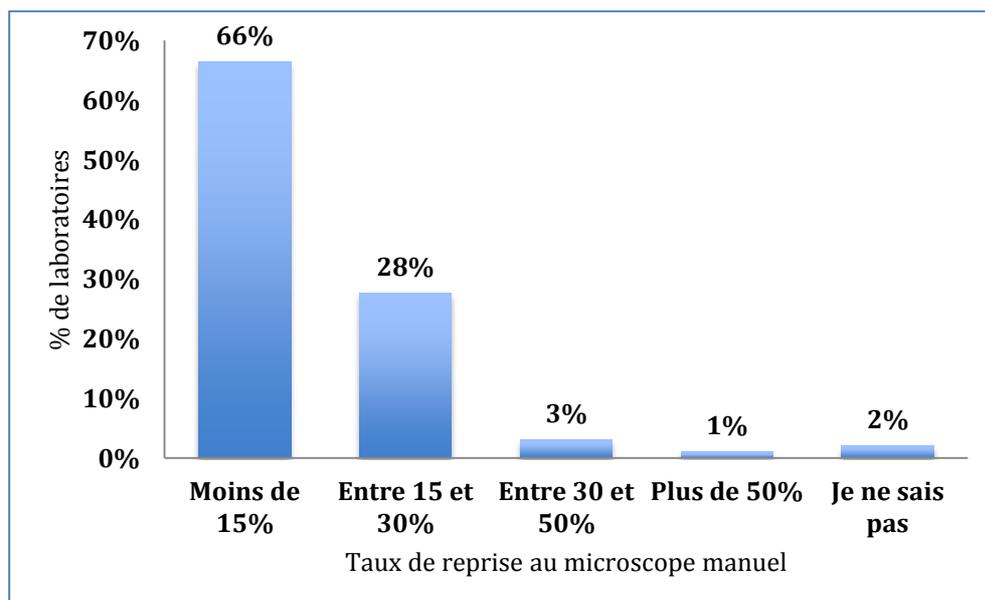


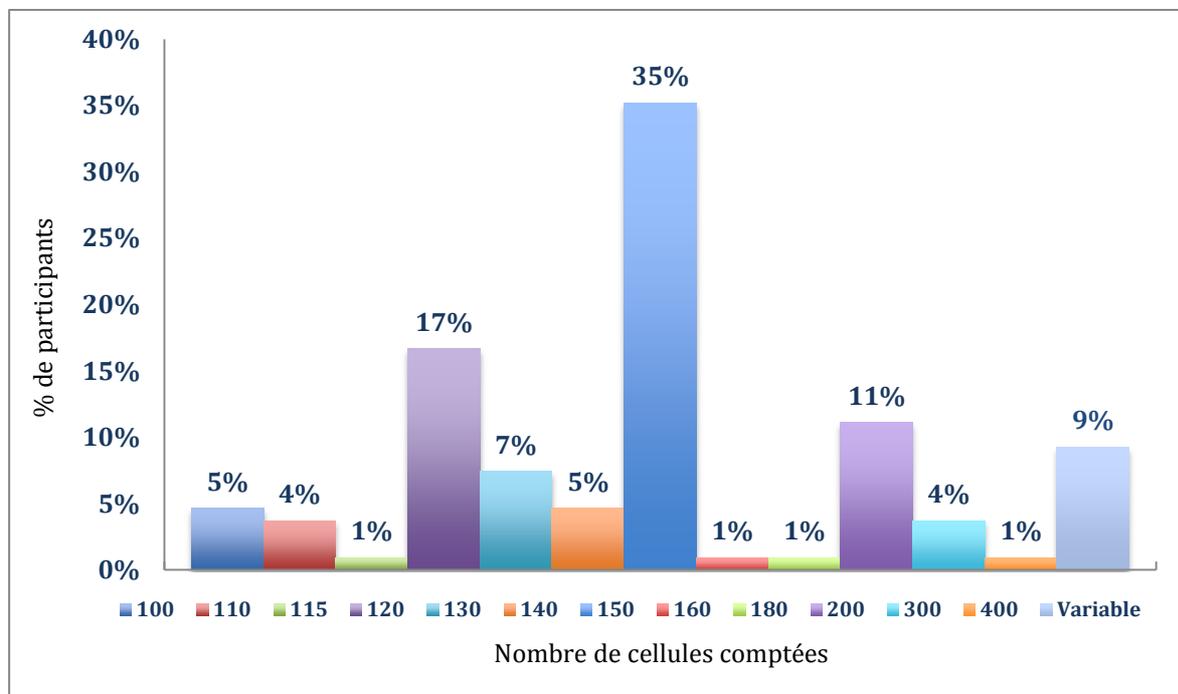
Figure 30 Répartition du taux de reprise des lames au microscope manuel classique

## Connaissance des fonctionnalités du MA

Nous nous sommes demandé si les biologistes connaissaient les différentes fonctionnalités qu'offraient leur MA.

### -Choix du nombre de GB comptés par le MA

La plupart des participants (92%) savaient qu'il est possible de choisir le nombre de cellules comptées par le MA. Un participant a répondu que ce nombre variait en fonction du nombre de GB rendus sur l'automate de la numération selon un algorithme programmé dans le middleware.



**Figure 31** Répartition du nombre de cellule comptées sur le MA parmi les participants ayant répondu (n=108)

### -Caractérisation des GR

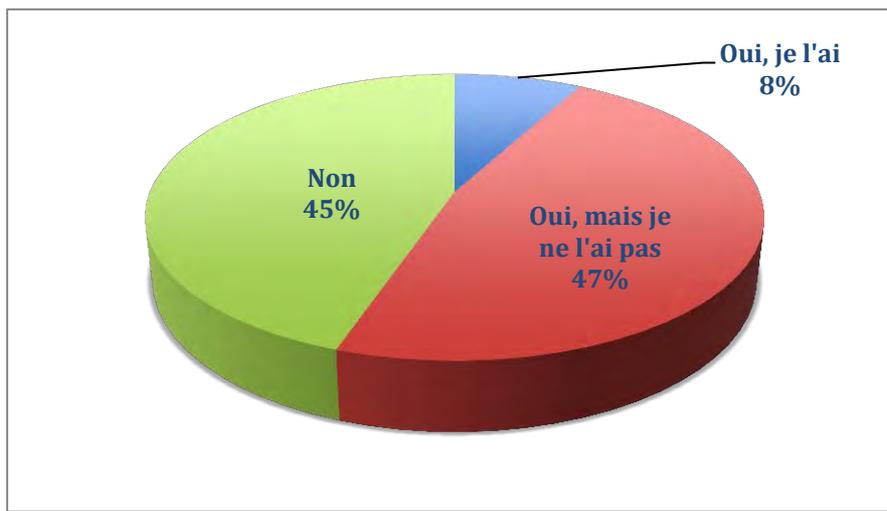
Il existe une option de caractérisation complète des érythrocytes que 35,6% ne connaissent pas mais que 26,3% possèdent (n= 31). Il est à noter d'ailleurs, que l'option de pré-caractérisation des érythrocytes (classique, fournie de base avec le MA ou complète) n'est jamais utilisée dans 62,1% des cas, contre 25,9% de participants qui l'utilisent systématiquement. Seuls 19,6% des participants envoient les résultats de la caractérisation des GR faite par le MA sur le SIL.

### -Estimation des plaquettes

Concernant le module de décompte des plaquettes, 77% des laboratoires ne l'utilisent pas. Trois participants l'utilisent pour compter les schizocytes, l'écran serait plus pratique pour le décompte.

### -Application pour la lecture des liquides biologiques

La possibilité de lecture des liquides biologiques est moins bien connue (non connue par 45% des participants) et très peu utilisée (8%).



**Figure 32** Connaissance de l'application de lecture de liquides biologiques

### Licences déportées

Parmi les participants, 41,4% n'ont pas de licence déportée et ne travaillent donc que directement sur le PC du MA. Un cinquième (20,7%) possèdent 3 à 8 licences déportées, 22,4% en possède 1 seule et 15,5% en possèdent 2.

Ces licences déportées permettent à plusieurs personnes de travailler sur les images du MA et est donc corrélé au nombre de lames lues par jour. Plus le nombre de lames lues est bas, moins il y aura d'intérêt aux licences déportées.

### Accès à distance au MA

Pour les laboratoires avec plusieurs sites, seulement 1/3 ont leurs microscopes connectés en réseau, et la moitié s'en sert pour consulter et valider des dossiers patients à distance.

## Archivage des lames

Le temps d'archivage des lames varie énormément d'un laboratoire à un autre, avec des valeurs extrêmes d'un seul jour à 30 ans. La conservation la plus fréquente est d'une semaine.

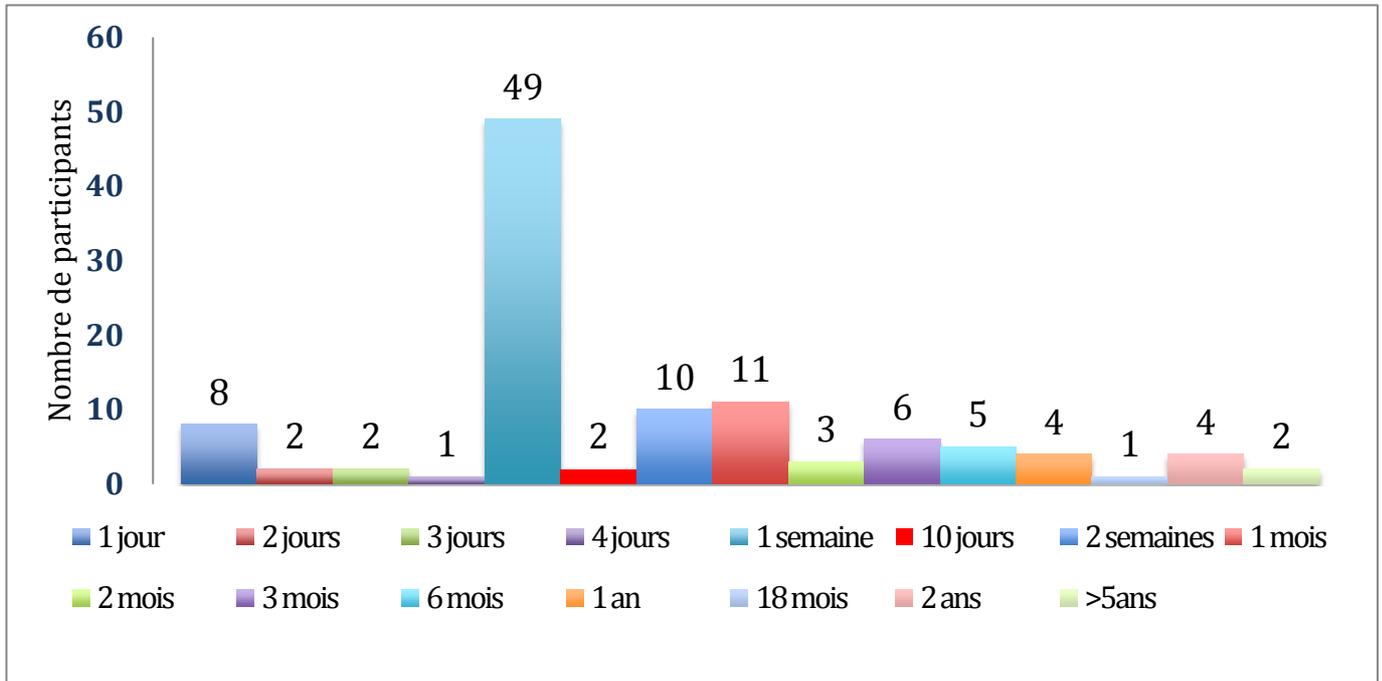


Figure 33 Distribution du temps d'archivage des frottis sanguins

## Contrôles qualités

### EEQ / CIQ / test de localisation cellulaire

La moitié (51,7%) des laboratoires ne passe pas d'EEQ sur leur MA. En revanche, 82,1% font des tests de localisation cellulaires journaliers comme recommandé par CellaVision®. Parfois, les tests de localisation sont juste hebdomadaires. Ce test permet de vérifier que le MA prend bien tous les éléments en photo.

Seulement 16,1% des laboratoires passent des CIQ sur leur MA. En l'absence de CIQ commerciaux et de recommandations nationales, les pratiques sont très variables. Ainsi, selon les participants, le nombre de lames de CIQ passées chaque jour varie de une à

quatre. Il peut s'agir de lames normales et/ou de lames pathologiques au choix là encore variable (leucopénie, hyperleucocytose, ou lame avec agrégats plaquettaires par exemple). La validation du CIQ peut se faire via la fidélité intermédiaire : estimation sur lames d'un sang de patient étalé plusieurs fois et passé plusieurs jours de suite (parfois juste pour les polynucléaires neutrophiles) ; sinon la formule du DM peut être comparée quotidiennement au résultat automate ou à une formule manuelle.

### **Accréditation de la formule sanguine**

Environ la moitié des laboratoires (53,4%) a accrédité la formule sanguine. Pour 31,4%, l'accréditation est en cours.

### **Dossier de validation de méthode spécifique du MA**

Un tiers des participants (33,3%) n'a pas encore réalisé de dossier de validation de méthode spécifique pour le MA, 39,3% en possèdent un. Il est en cours d'élaboration pour 27,4% des participants.

### **Ecart**

Sur 67 réponses à la question « Avez-vous déjà eu des écarts concernant votre microscope automatisé? Si oui, lesquels? », 4 participants ont indiqué qu'ils avaient eu un écart et 3 d'entre eux ont donné les raisons suivantes : « détailler la liste des cas où la reprise au microscope est nécessaire », « CQI supplémentaire pour la formule et données des GR », « pas de comparaison lecture manuelle et automatisée ».

Quatre participants indiquent que le COFRAC n'est pas encore passé. Les autres participants n'ayant pas eu d'écart ne précisent rien d'autre.

Un participant a déclaré ne pas avoir eu d'écart, par contre le dossier de validation de méthode du DM était clairement attendu.

## Avantages

**Tableau 18** Avantages du MA : taux d'accord ou de désaccord avec les avantages proposés dans le questionnaire

AVANTAGES	OUI (%)	NON (%)
L'utilisation du microscope automatisé engendre moins de fatigue oculaire	91,4	8,6
L'utilisation du microscope automatisé engendre moins de fatigue générale	81,2	18,8
Le microscope automatisé permet de se concentrer plus facilement sur des images numérisées	81,4	18,6
Les résultats sont rendus plus rapidement avec l'utilisation du microscope automatisé	83,6	16,4
Si oui, avez-vous évalué le gain de temps imputable à l'utilisation du microscope automatisé	20	80
Le microscope automatisé permet une meilleure comparaison des cellules entre elles	94	6
Les cellules anormales sont reconnues plus facilement avec le microscope automatisé	60,2	39,8
Le microscope automatisé permet d'améliorer la formation du personnel	94,1	5,9
-En formation initiale	84,7	15,3
-En formation continue	75,4	25,6
Vous servez-vous du microscope automatisé pour faire le maintien des compétences du personnel	40,2	59,8
Le microscope automatisé permet une standardisation des résultats (avec visualisation rapide des tris précédents par exemple)	78,3	21,7
Le microscope automatisé permet une traçabilité complète (nom du valideur, images sauvegardées)	95,7	4,3
Le microscope automatisé permet une diminution du risque d'erreur d'identité (connexion bidirectionnelle, lecture automatique de l'identité)	87,2	12,8
Le microscope automatisé permet un gain de temps lors de la validation biologique avec reprise rapide des images sur microscope automatisé	78,4	21,6

**Parmi les avantages rapportés en question libre figuraient :**

-le temps gagné : « lecture au fil de l'eau sans arrêt de lecture », « chargement de lames et pré-caractérisation des cellules sans présence immédiate d'un technicien pour la lecture »,

-l'archivage des images numériques des cellules : « archivage longue des images et facilité d'archivage (pas encombrant) », « antécédents des patients facilement retrouvés (très pratique pour le suivi des LA ou LNH) », « consultation rapide des antécédents de lames », « la possibilité lors du suivi d'hémopathie de reprendre les lames numérisées du patient », « consulter les blastes de diagnostic pour les éventuelles rechutes »,

-l'échange autour d'images d'un patient : « discussion autour de cas à l'instant t », « possibilité de regarder à plusieurs biologistes sur l'écran les cas plus difficiles », « facilite la lecture en doublon lors de reprise de lame par le biologiste », « lecture à distance permettant une souplesse d'organisation et l'aide de biologiste expert en intra ou extra labo », « l'envoi par mail de quelques photos permet au biologiste référent de donner son avis sur la classification », « Les techniciens peuvent marquer une cellule pour la faire voir au biologiste. Le biologiste lit les mêmes cellules que le technicien en cas de contrôle »,

-l'identification des cellules : « Permet de repérer plus facilement une population homogène anormale, lymphocytaire notamment, en regroupant et comparant les éléments atypiques : lymphomes, Sézary par ex », « visualisation de l'homogénéité ou hétérogénéité des éléments »).

## **Inconvénients**

**Tableau 19 Inconvénients du MA : taux d'accord ou de désaccord avec les inconvénients proposés dans le questionnaire**

<b>INCONVENIENTS</b>	<b>OUI (%)</b>	<b>NON (%)</b>
<b>La pré-classification des cellules par le microscope automatisé est-elle source d'erreur pour la reclassification</b>	<b>27,1</b>	<b>72,9</b>
<b>Il n'est pas toujours facile de s'adapter aux images numériques</b>	<b>61,2</b>	<b>38,8</b>
<b>La couleur peut être source d'erreur</b>	<b>15,2</b>	<b>84,8</b>
<b>Certaines personnes refusent de se servir du microscope automatisé au laboratoire</b>	<b>20,5</b>	<b>79,5</b>
<b>Les personnes formées initialement sur le microscope automatisé sont moins efficaces sur le microscope manuel</b>	<b>32,1</b>	<b>68,9</b>
<b>La morphologie des érythrocytes est plus difficile à évaluer sur le microscope automatisé que sur microscope manuel</b>	<b>49,6</b>	<b>50,4</b>
<b>Les microscopes automatisés sont moins bien adaptés aux recherches d'amas plaquettaires</b>	<b>93,2</b>	<b>7,8</b>
<b>Les microscopes automatisés sous-estiment les monocytes et autres grosses cellules type blaste</b>	<b>61,9</b>	<b>38,1</b>
<b>On voit moins bien les villosités des cellules lymphoïdes (tricholeucocytes/lymphocytes villeux) avec le microscope automatisé qu'avec le microscope manuel</b>	<b>49,6</b>	<b>50,4</b>

### **Qualité des images numériques**

Concernant la qualité des photos des cellules prises par le microscope automatisé, elle a été jugée bonne à très bonne (88,2% des réponses). 15,2% des laboratoires ont estimé que la couleur pouvait être source d'erreur.

## Taux de reprise des hémopathies au microscope manuel

La découverte d'une hémopathie via les images numériques du MA peut entraîner, en fonction du type de pathologie, une reprise de la lame au microscope manuel. Les LA ont un taux de reprise au microscope manuel globalement supérieur aux lymphopathies.

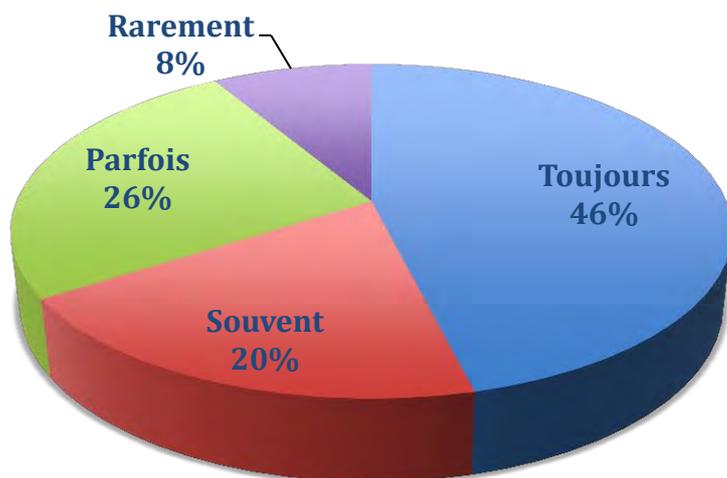


Figure 34 Taux de reprise des lymphopathies sur microscope manuel

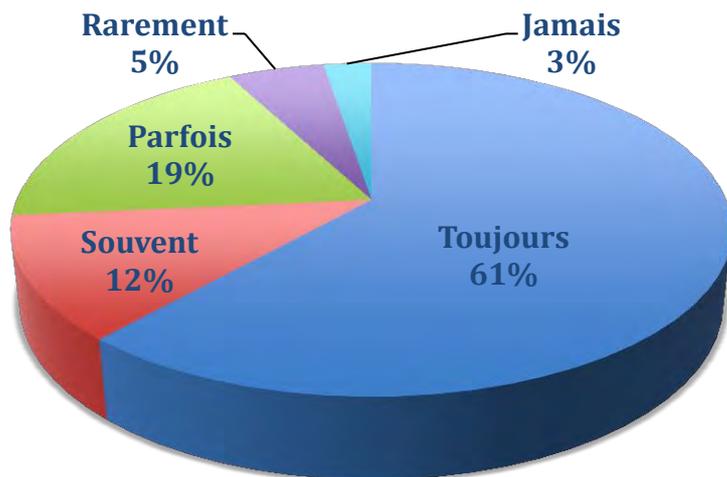


Figure 35 Taux de reprise des leucémies aigües sur microscope manuel

## Fréquence des pannes du MA

La plupart des participants (91,5%) ont déclaré avoir moins de 5 pannes par an sur leur MA. Seulement 2 participants ont déclaré avoir plus de 10 pannes par an.

### **Parmi les inconvénients rapportés en question libre figuraient :**

-Inconvénients liés à la zone de lecture : « Pas de numérisation du bout de frottis », « zones limitées et les zones ne peuvent être changées par l'utilisateur », « impossibilité de choisir les champs d'observation entraînant une non utilisation pour les recherches d'amas plaquettaires et/ou de cellules pathologiques et /ou anomalies érythrocytaires », « les champs retenus ne sont parfois pas représentatifs et il est nécessaire de reprendre la lame au microscope », « champ des rouges/plaquettes trop restreint, -franges et bout de frottis non visualisés (pour dépister des tricholeucocytes, blastes type M3 par ex.) », « lecture du frottis au microscope manuel pour les thrombopénies, oblige à faire des tris », « Pas de possibilité de se promener sur la lame pour voir plusieurs cellules quand on a un doute »

-Inconvénients liés à la formule comptée et pré-classifiée par l'automate : « % basophiles surestimés, % monocytes sous-estimés », « non détection de population fragile, car dans la corbeille », « reclassification obligatoire inhérent au mode de reconnaissance des cellules et des erreurs grossières de reconnaissance de cellules inexplicables », « lymphocytes atypiques paraissent parfois "normaux" sur le DM », « Monocytes : pas de différence significative, blastes non évalué », « Surestime les PNN, sous-estime la myélémie », « très mauvaise classification pour les PN basophiles et les érythroblastes », « distinction parfois difficile entre monocyte et lignée granuleuse dégranulée », « Mauvaise évaluation globale de la richesse cellulaire de la lame »

-Inconvénients liés à la technologie : « Impossibilité de passer tous types de lames (bouts carrés) et lames lutées », « pas de variation possible de la lumière, casse de lames, nettoyage fastidieux », « Evaluation de la morphologie des plaquettes imprécise », « mise de la goutte d'huile manuelle pour le DM8 », « Amélioration du soft nécessaire », « Manque de profondeur de champs », « moins bonne résolution qu'un microscope manuel », « essentiellement défaut de résolution des images », « pas de possibilité d'intégrer des lames sans code à barres », « adapter le nombre de cellules aux différents services », « problème inhérent à l'automatisme et donc problème de connexion avec le PC ou plantage avec la pince », « Impossibilité d'ajuster et/ou d'enrichir la base de données », « difficulté à apprécier la globalité des

éléments et la richesse cellulaire », « pas de mode manuel pour visualiser un frottis avec la caméra (platine 100% automatisée), pas de champ large ».

-Inconvénients liés aux contrôles de qualité: « Pas de possibilité de comparaison de reclassement d'une même lame par plusieurs opérateurs, ce qui permettrait une comparaison inter opérateur simplifiée », « CQ localisation cellulaire perfectible (temps passé trop long, coupure des champs) mais peut-être lié à notre modèle d'automate »,

-Inconvénients liés à la formation sur le microscope manuel: « Perte de l'habitude d'utilisation du microscope manuel par les techniciens », « maintien obligatoire du microscope optique », « il ne doit pas se substituer à la lecture au microscope manuel », « nos techniciens sont toujours formés en manuel avant de passer en microscopie automatique ».

### **Satisfaction générale du système de MA**

Sur les 118 réponses obtenues, 115 ne regrettent pas leur investissement. Pour les 3 autres :

#### **-2 participants regrettent leur investissement**

« Absence de gain de temps, contrainte surajoutée pour l'accréditation, difficulté de lui trouver une place adaptée en utilisation de routine, qualité moyenne des images, le logiciel contraint à la visualisation de toutes les images et à leur validation pour l'archivage, ce qui fait perdre beaucoup de temps, alors qu'une simple visualisation rapide des cellules permettrait de valider rapidement les formules de l'automate ou d'orienter vers le microscope manuel. »

« Techniciennes très performantes à la lecture microscopique (lecture de myélogramme), qualité des images moyenne (analyse fine des cellules impossible), problème de détection des monocytes, blastoses faibles, etc. »

#### **-1 n'a pas d'avis sur la question**

« La réponse concernant l'investissement est ni oui ni non: en fait, le DM n'est pas rentable compte tenu des remarques faites ci-dessus car le temps gagné technicien n'est pas très important. »

## 4 Discussion

### **Représentativité de l'échantillon**

Nous avons obtenu 123 réponses. Un participant ne rentrait pas dans l'étude (automate IFI). Une réponse par site étant souhaitée, nous avons dû éliminer 4 doublons. Cependant, plusieurs participants n'ont pas renseigné leurs coordonnées et il n'est pas exclu que certaines réponses puissent correspondre à des doublons, pouvant ainsi créer un biais notamment pour l'interprétation démographique de certaines questions. Ce biais a moins d'impact dans la perception des avantages et des limites du MA, le maximum d'avis étant favorable à notre étude. En l'absence de précisions disponibles sur cette éventualité, nous avons considéré chaque réponse comme correspondant à un site. Nous avons donc exclu 5 réponses et analysés 118 questionnaires.

En France, il y avait 800 LBM au 1<sup>er</sup> janvier 2019. Avec les regroupements de laboratoire il est difficile de connaître le nombre exact de plateaux techniques susceptibles d'être pourvus de MA, ce qui rend l'estimation de représentativité de notre échantillon difficile. CellaVision® représente la grande majorité des MA en France et a estimé à 220 le nombre de MA sur le territoire français. Menarini® est actuellement en cours de déploiement et nous a dit avoir seulement 3 laboratoires équipés en France. Le nombre de réponses obtenues est donc très satisfaisant.

Soixante pourcents des participants étaient équipés d'un MA depuis plus de 3 ans.

### **Connaissance et utilisation des différents modules du MA**

Globalement, les biologistes connaissent bien les différentes possibilités de leur MA : changement possible du nombre de cellules comptées (92,3%) et présence d'un module de classification avancée des anomalies des érythrocytes (64,4%). Seule la possibilité de lire des liquides biologiques est moins bien connue (seulement par 54.7% des participants). Cela s'explique probablement par le fait qu'elle ne leur a pas été proposée car tous les laboratoires ne lisent pas des liquides biologiques comme les LCR, et parce que la lecture d'une lame est longue (4min/lame pour une analyse de 100 cellules au  $\times 10$  et 20 min/lame pour une analyse de 100 cellules au  $\times 50$ ) et ralentirait trop la routine de lecture des frottis sanguins. De plus, ce module ne reconnaît ni les cellules mésothéliales ni les

cellules tumorales. Néanmoins, une étude montre que le MA identifie bien les cellules dans les liquides biologiques notamment dans le LCR avec un pourcentage global de cellules correctement pré-classées de 90%<sup>27</sup>. Ce taux est plus faible pour les autres liquides biologiques (83%).

La caractérisation des érythrocytes n'est jamais utilisée par 62,1% des participants. Pourtant, l'étude même rapide de cette lignée devrait être systématique pour chaque lame car elle peut apporter des éléments très utiles à certains diagnostics comme par exemple les schizocytes dans les microangiopathies thrombotiques (MAT), les dacryocytes dans les myélofibroses, le paludisme, les corps de Jolly dans les asplénismes ou les dysérythropoïèses pour ne citer qu'eux. Différentes raisons à cette faible utilisation peuvent être avancées. La cadence se ralentit quand le MA fait une caractérisation des érythrocytes. De plus, la moitié des participants (49,6%) trouvent que la caractérisation des érythrocytes est plus difficile à réaliser sur les MA. D'ailleurs, 19% ne passent pas sur le MA les lames sur lesquelles il faut rechercher des anomalies des globules rouges et les regardent directement au microscope manuel. Sur le DM CellaVision®, il est possible d'exclure la pré-caractérisation des GR. Certains préfèrent réaliser une caractérisation « personnelle » sans l'aide du logiciel, soit sur l'écran des GR, soit en reprenant manuellement la lame. La pré-caractérisation des GR porte sur 6 anomalies (21 si le laboratoire possède la RBC Advanced Application).

Parmi ces 6 paramètres la pré-caractérisation des GR ne se fait pas avec la même sensibilité et la même spécificité. Dans les MAT, la présence de schizocytes sur le frottis sanguin est un critère majeur pour le diagnostic. La littérature montre que l'Advanced RBC Application reconnaît les schizocytes avec une très bonne sensibilité mais une faible spécificité, entraînant nécessairement la présence d'un opérateur expérimenté pour la reclassification<sup>28,29</sup>. Après reclassement, la corrélation avec la méthode de référence est bonne. Cependant, quelle que soit la technique utilisée (manuelle ou automatisée), il existe une variabilité inter individuelle importante. Une étude montre que l'anisocytose et la macrocytose sont souvent attribuées à des échantillons qui ne présentent aucune de ces anomalies<sup>11</sup>. Toutefois dans cette étude, des paramètres de pré-caractérisation globulaires par défaut ont été utilisés. Un ajustement préalable de ces paramètres en fonction de chaque anomalie afin d'optimiser la sensibilité et la spécificité de chaque anomalie.

Une étude qui porte sur l'Advanced RBC Application<sup>15</sup> (26,3% des participants ont déclaré posséder l'Advanced RBC Application, laquelle permet une pré-caractérisation plus

complète des GR, soit 21 anomalies au lieu de 6 ) repose sur la recherche du seuil optimal pour chaque caractéristique morphologique. Ce seuil correspond au nombre de GR à partir duquel l'anomalie passe de « négatif » à « positif ». Les auteurs proposent un modèle de paramétrage selon un seuil dit « seuil clinique ». Ce modèle consiste à séparer les anomalies des GR en anomalies « critiques », lesquelles sont des anomalies qui ne doivent pas être manquées car contribuant à un diagnostic rapide de pathologies spécifiques (cellules cibles, dacryocytes, schizocytes, sphérocytes, cellules drépanocytes et parasites) des anomalies « non critiques » qui peuvent évoquer une multitude de pathologies. L'ajustement des paramètres de pré caractérisation permet de détecter, de manière sensible et spécifique, la plupart des anomalies morphologiques des GR sans augmenter la charge de travail (par rapport à l'utilisation d'un microscope manuel).

Le module de décompte des plaquettes est également peu utilisé (seulement par 22,9% des participants). Plusieurs raisons peuvent l'expliquer. La numération des plaquettes par impédance sur les analyseurs d'hématologie peut en effet être mise en défaut en cas de grosses plaquettes ou petits érythrocytes par exemple et nécessiter de faire une estimation des plaquettes sur frottis sanguins. Mais l'évolution technique de nombreux automates a permis de pouvoir quantifier les plaquettes par d'autres méthodes plus fiables comme les plaquettes optiques ou par fluorescence. De plus, l'utilisation de ce module n'est pas immédiatement accessible, il nécessite de faire d'abord une étude en passant plusieurs lames pour déterminer un coefficient permettant d'estimer les plaquettes. Finalement, là aussi, la cadence sera ralentie en cas d'utilisation de ce module ce qui peut être un frein à son utilisation. Malgré tout, une étude a montré que l'estimation du nombre de plaquettes obtenues via le MA se comparait très bien aux résultats de l'analyseur d'hématologie (ainsi qu'aux estimations manuelles)<sup>30</sup>. Par ailleurs, ce module offre la possibilité de « découper » l'image (la même que celle des GR, équivalente à 8 champs HPF) en 2×2, 3×3 ou 4×4 sous-images. Ainsi, l'opérateur a la possibilité d'observer chaque sous-image l'une après l'autre à fort grossissement (4×4 correspondant à l'agrandissement maximal de l'image) sans craindre de manquer un champ. Il est également possible de faire apparaître une grille de décompte sur chaque sous-image. Ainsi l'estimation des plaquettes est plus facile et plus reproductible par rapport à une estimation manuelle. Un article a cependant montré que la sensibilité de détection des amas plaquettaires à l'aide de ce module restait faible (Se=40,4%) car le MA de CellaVision® ne va pas actuellement dans les franges et bords de frottis là où se trouvent préférentiellement les amas plaquettaires<sup>16</sup>. Au contraire, les MA de Menarini®

peuvent aller numériser dans les franges pour chercher ces amas, mais son évaluation reste à faire. De façon inattendue et remarquable, nous révélons que certains participants ont « détourné » la finalité de ce module et s'en servent pour la recherche de schizocytes.

Selon notre validation des méthodes, les frottis sanguins préparés manuellement seraient de qualité insuffisante pour permettre une classification correcte et reproductible. Pourtant, 5% des participants de notre étude déclarent étaler exclusivement manuellement leur frottis sanguin. La très grande majorité utilise un étaleur/colorateur entièrement automatisé.

### **Avantages perçus de l'utilisation du microscope automatisé**

Parmi les avantages les plus unanimement reconnus (>90% d'accord), on en retrouve 4 : la traçabilité complète<sup>31</sup> (nom du valideur, images sauvegardées) 95,7%, la formation du personnel 94,1%, une meilleure comparaison des cellules entre elles 94% et moins de fatigue oculaire 91,4%.

Les images numériques sont perçues comme ayant un rôle important dans la formation du personnel. Cet avantage a été largement décrit dans la littérature<sup>32-34</sup>. Selon les résultats de notre questionnaire, 84,7% des laboratoires estiment que le MA joue un rôle important dans la formation initiale et 75,4% dans la formation continue<sup>35</sup>, autant pour les hémopathies myéloïdes que lymphoïdes (et pour 50% des participants le MA permet également la formation sur les pathologies des GR).

Cela s'explique par :

- une capacité d'archivage importante et peu encombrante des images numériques
- une facilité d'accès pour les techniciens, biologistes et internes ou tout membre habilité au MA au laboratoire
- la possibilité de télécharger les images des cellules au format jpeg ou de faire des copies d'écran et donc de se constituer une base de données numériques.

Les avantages qui en découlent en formation initiale ou continue sont le large choix des images dans la base de données, la possibilité d'échanger directement sur une morphologie cellulaire que ce soit avec le formateur, d'autres personnes en formation ou le personnel du laboratoire et une durée de la formation potentiellement plus courte par rapport à une formation sur un microscope manuel.

En formation continue, les images numériques permettent de « discuter autour de cas à l'instant t », d'échanger avec des collègues d'une part et avec le biologiste d'autre part en cas de doutes sur des cellules qui peuvent poser problèmes (facilité de reprise de la lame en doublon pour les laboratoires ne disposant pas de bicéphale); par exemple lorsque l'opérateur rencontre des cellules qui peuvent poser problème ou des hémopathies rares avec une cytologie très atypique. Les biologistes peuvent « regarder à plusieurs sur l'écran les cas plus difficiles ». La formation des nouveaux employés sur les hémopathies rares serait plus facile avec les images numériques<sup>1</sup>. Le biologiste peut commenter la cytologie problématique et ainsi former son personnel sur une pathologie rare. Seuls 7 laboratoires (5,9%) ont déclaré que le MA ne permettait pas d'améliorer la formation du personnel. De façon paradoxale à ces résultats suggérant un engouement de la formation du personnel via les images numériques, seuls 40,2% des participants les utilisent pour le maintien des compétences de son personnel. La difficulté pouvant être le temps nécessaire à la mise en place et correction d'évaluations ainsi que l'absence de possibilité de faire trier le même dossier à différentes personnes, puisque chaque modification/reclassement est immédiatement sauvegardée.

CellaVision® a mis en place un outil avec cette possibilité (CellaVision® Proficiency Software) pour un coût de 6000 euros pour 3 ans. Cet outil permet à un examinateur de créer des tests sous forme de cas cliniques soit à partir de sa propre base de données d'images numériques soit à partir de d'une bibliothèque fournie par CellaVision®<sup>36</sup>. Les participants sont automatiquement avertis qu'un nouveau test est disponible : ils doivent classer les leucocytes et faire une caractérisation des GR. Une fois le test terminé, les participants peuvent consulter leurs résultats et comparer leurs réponses à celles de l'examineur et des autres participants. L'examineur reçoit un rapport de performance qui permet de mettre en évidence les lacunes afin d'orienter et d'adapter les formations à venir. A tout moment il est possible de consulter les tests antérieurs effectués par un participant et de suivre ainsi sa progression.

L'archivage des images numériques constitue un autre avantage important du système. Tout d'abord parce que les frottis sanguins vieillissent mal. Les lames de collection au bout de quelques années subiront une altération cellulaire et de la couleur importante pouvant engendrer une difficulté à repérer les anomalies cytologiques caractéristiques d'une pathologie. Ensuite parce que l'archivage des lames nécessite l'aménagement d'un emplacement dédié. La majorité des laboratoires a décidé de ne conserver que 7 jours leurs lames alors que le DM permet un archivage illimité sur disque dur externe, tant que

le logiciel pour lire les images est disponible. Le MA offre la possibilité de consulter les antécédents d'un compte cellulaire qui a déjà été classé et validé antérieurement, et ce, de façon rapide et facile ; les images numériques restent en l'état au cours du temps. Par exemple, ce système offre « la possibilité lors du suivi d'hémopathie, de reprendre les lames numérisées du patient en cherchant par le nom tout simplement», pour, par exemple, consulter les blastes de diagnostic lors d'éventuelles rechutes. De plus, il permet à un biologiste non présent physiquement sur le site de prendre la main ou de visualiser les images numériques à distance (licence déportée, images jpeg sur dossier partagé ou envoi de captures d'écran par mail), permettant ainsi une souplesse d'organisation.

L'archivage des images présente également un avantage en termes de traçabilité. C'est ce qu'estiment 95,7% des participants. En effet, à tout moment il est possible de savoir qui a validé une lame donnée et de quelle façon les cellules ont été classées.

De façon parallèle à la traçabilité, 87,2% des participants pensent que la lecture des lames par MA diminue le risque d'erreur d'identité. En effet, le MA possède un système de lecture automatique du code-barres patient ce qui permet de certifier la concordance entre le nom du patient et les images qui lui sont associées. La connexion du MA avec le logiciel d'interface (concentrateur) ou SIL est bidirectionnelle : la validation technique des images correspondant à la formule d'un patient sur le MA entraîne le basculement de celle-ci sur le logiciel de validation technique. Dans l'autre sens, le MA reçoit du SIL ou concentrateur la valeur absolue des globules blancs et recalcule ainsi les valeurs absolues de chaque élément de la formule. Ce système de connexion bidirectionnelle contribue à diminuer de façon certaine le risque d'erreur d'identité lors de la lecture microscopique de la formule sanguine et le rendu de la formule. Les seuls risques d'erreur peuvent être en cas de problème pré-analytique (mauvais étiquetage initial du tube) ou si le code-barres doit être mis manuellement sur la lame comme c'est le cas pour les frottis manuels.

Le MA présente également l'avantage de présenter les cellules côte à côte et ainsi permettre une meilleure comparaison des cellules entre elles. La plupart des participants ont répondu être d'accord avec cette affirmation (94% de « Oui »). La littérature a montré que ce paramètre était un avantage important<sup>1,37</sup>. Des participants ont évoqué en réponse libre que le MA permettait une « visualisation de l'homogénéité ou hétérogénéité des éléments » et « de repérer plus facilement une population homogène anormale, lymphocytaire notamment en regroupant et comparant les éléments atypiques ».

Effectivement, l'écran affiche les cellules les unes à côté des autres, ce qui permet d'apprécier plus facilement :

- la taille d'une cellule par rapport à une autre

- la clonalité ou au contraire la polymorphie, paramètres particulièrement importants dans les hyperlymphocytoses. Une population lymphocytaire polymorphe évoque plutôt un contexte réactionnel tandis qu'une lymphocytose monomorphe évoque un syndrome lymphoprolifératif malin. Dans certains cas plus difficiles, une sous population monomorphe maligne peut être masquée au sein d'une hyperlymphocytose d'allure polymorphe au premier abord. Avec le MA, il est possible d'isoler ces lymphocytes atypiques pour en révéler visuellement la clonalité.

Malgré ces données, seulement 60,2% des participants pensent que le MA permet de reconnaître plus facilement les cellules anormales. Parmi les raisons qui peuvent l'expliquer, la résolution insuffisante des images numériques décrite à plusieurs reprises par les participants de notre étude avec l'impossibilité de faire la mise au point sur les cellules. Ainsi, certaines particularités cellulaires peuvent ne pas se voir facilement (villosité des tricholeucocytes, corps d'Auer, granulation,...). De plus, la mise en évidence d'une petite sous-population monomorphe dans un contingent lymphocytaire peut ne pas être aisée et au contraire rassurer faussement l'opérateur vers une pathologie réactionnelle, cependant, c'est aussi le cas en microscopie manuelle.

Globalement, l'ensemble des participants considère que l'utilisation du MA apporte un confort, en comparaison à l'utilisation du microscope manuel classique avec une diminution de la fatigue oculaire pour 91,4% et une diminution de la fatigue générale pour 81,2%. Ce ressenti est en accord avec la littérature qui décrit cette fatigue liée à l'utilisation du microscope classique<sup>38</sup> et indique que l'utilisation du MA permet de diminuer les étourdissements et la fatigue physique<sup>1</sup>. Parmi les participants, 81,4% ont estimé qu'il était plus facile de se concentrer sur des images numériques. La diminution de la fatigue et l'augmentation de concentration avec l'utilisation du MA sont des avantages liés à cette technique qui vont probablement de pair. En effet, il est probable qu'un opérateur fatigué ait un niveau de concentration moins élevé sur les tâches qu'il doit accomplir.

De façon conjointe à la diminution de la fatigue, le gain de temps est un avantage majeur.

D'une part parce que le MA possède une cadence de lecture élevée. En effet, le MA peut compter plusieurs centaines de cellules en peu de temps, permettant ainsi une

représentativité optimale de l'ensemble des cellules. La plupart des participants ont réglé leur MA sur 150 cellules. Ce système de grande cadence est particulièrement intéressant dans le cadre de la surveillance d'aplasie ( $GB < 1G/L$ ) chez des patients dont le nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) conditionne la vulnérabilité aux infections bactériennes. En microscopie manuelle, ces lames d'aplasies nécessitent du temps pour rechercher le maximum de globules blancs afin d'avoir une bonne représentativité du nombre de PNN. L'utilisation du MA pour ces patients est décrit comme un avantage en terme de rapidité de lecture et donc en terme de facilité du suivi quotidien de l'aplasie<sup>31</sup>.

D'autre part parce qu'il est doté d'un logiciel de pré-classification permettant à l'opérateur d'être plus rapide dans la lecture et la validation des lames. Parmi les participants, 83,6% estiment que le MA permet de rendre plus rapidement les résultats. Dans une étude, il est décrit que le personnel inexpérimenté est plus rapide sur le MA que sur le microscope manuel tandis que pour le personnel expérimenté, aucun gain de temps n'est observé avec l'utilisation du MA<sup>12</sup>. La littérature montre un gain de temps avec l'utilisation de MA quel que soit le niveau d'expérience du personnel<sup>11</sup>, avec une réduction quasiment de moitié du temps d'analyse total par frottis sanguin<sup>13</sup>. Ce temps gagné permettait de consacrer plus de temps aux frottis sanguins pathologiques. Dans une question libre relative aux avantages, les participants se sont exprimés sur le gain de temps. On retrouve notamment la « lecture au fil de l'eau sans arrêt de lecture » entre chaque lame, sans perte de temps pour aller chercher les lames entre chaque série de lecture. Cependant, cet avantage n'a pas été réellement estimé quantitativement, seulement 20% ont évalué le gain de temps dans leur laboratoire.

Ce gain de temps concerne aussi la validation biologique. C'est ce que pensent 78,5% des participants. Lors de la validation, le biologiste ou l'interne a la possibilité, en cas de doute, de contrôler les images numériques de la formule cellulaire du patient en accédant au logiciel d'archivage du MA. Il peut s'agir de vérifier la polymorphie d'une lymphocytose, l'aspect des blastes au cours d'un suivi d'hémopathie (les diagnostics étant souvent relus systématiquement au microscope manuel),... Ce processus est plus rapide que de devoir relire une lame sur un microscope manuel, auquel cas il faut, au temps de la relecture, rajouter le temps de recherche de la lame concernée.

Le MA permettrait une meilleure standardisation des résultats. C'est ce que pensent 78,3% des participants de notre étude. Cette standardisation peut s'expliquer par la possibilité de consulter les tris cellulaires d'une formule d'un patient faite à une date antérieure. Par exemple dans le cas d'un lymphome traité, il n'est pas toujours évident de

différencier les cellules lymphomateuses des autres cellules. La possibilité de pouvoir consulter les images archivées par le système permet à l'opérateur d'avoir une référence pour la reconnaissance de la morphologie des cellules lymphomateuses d'un patient, de standardiser sa classification en fonction de la précédente et de rendre cohérent les résultats dans le temps. D'autres études montrent que les images numériques contribuent à une uniformisation des résultats que ce soit en routine ou en pathologie<sup>1,39</sup>. Cette standardisation des résultats constitue un avantage majeur et un atout qualité de cette technique. Elle est évaluée par la répétabilité et la reproductibilité et représente un élément important de la validation de méthode du MA (cf Partie 1). La lecture des frottis sanguins par le MA permettrait en partie de surmonter la variabilité inter-observateurs décrite dans la lecture au microscope manuel<sup>7,13,40</sup> car les cellules visualisées sont identiques. La variabilité inter et intra-opérateur de cette méthode ne peut toutefois pas être évaluée, la reclassification faite par un opérateur étant enregistrée de façon automatique.

### **Limites perçues de l'utilisation du microscope automatisé**

L'un des inconvénients indéniable du MA est celui qui concerne la recherche d'amas plaquettaires. 93,2% des participants estiment que le MA n'est pas adapté à cette recherche et conduit à une évaluation de la morphologie des plaquettes imprécise. D'ailleurs 71% ne passent pas les lames avec thrombopénie sur le MA. Cet inconvénient a été décrit dans la littérature. Une sensibilité de détection des agrégats plaquettaires par le MA égale à 40,4% a été reportée dans une étude<sup>16</sup> (vrais positifs = détection et identification des images numériques « agrégats plaquettaires ») ; l'observation combinée de plusieurs écrans (images des GB, écran des plaquettes et écran des GR) permettait d'augmenter cette sensibilité à 82,8%. Cette même étude montre également que la distribution des agrégats plaquettaires sur le frottis sanguin n'est pas homogène. En effet, lors de l'étalement du sang, les éléments les plus volumineux sont repoussés vers l'extérieur du frottis expliquant pourquoi les agrégats plaquettaires sont davantage retrouvés sur les bords latéraux du frottis sanguin et dans les franges. Le MA ne lit le frottis sanguin que dans une zone située au centre du frottis. Cet inconvénient concernant la zone de lecture a été cité de nombreuses fois en commentaire libre par les participants, comme indiqué dans la partie résultat. Un des concurrents de CellaVision®, Menarini®, a développé un logiciel qui permet la recherche des amas plaquettaires dans les franges mais il n'y a à ce jour pas encore d'évaluation publiée. CellaVision® travaille également

sur cette possibilité. La zone de lecture du MA peut avoir un impact sur la formule sanguine. D'ailleurs, 61.9% des participants estime que le MA sous-estime les grosses cellules. Les commentaires étaient précisément les suivants : « % monocytes sous-estimés », « Surestime les PNN, sous-estime la myélémie ». Pour certaines cellules, une hétérogénéité de distribution sur lame est observée<sup>39,41</sup> : le monocyte, cellule la plus volumineuse de la formule sanguine du sujet sain, et le blaste, cellule sanguine immature retrouvée en grande quantité dans le sang périphérique en cas de leucémie aiguë (LA), peuvent également être repoussés sur les bords et dans les franges du frottis par le même phénomène. De ce fait, ils peuvent être sous-estimés par le MA.

Le diagnostic d'hémopathies est en général multidisciplinaire et comprend la clinique du patient, la cytologie, la cytométrie en flux, et parfois la cytogénétique et la biologie moléculaire. L'examen cytologique est primordial car il constitue la première étape du diagnostic biologique et permet d'orienter vers les examens complémentaires appropriés. Dans les diagnostics d'hémopathies, les lames sont en général reprises au microscope manuel notamment dans les diagnostics de LA (46% sont « toujours » reprises dans les lymphopathies vs 61% dans les LA). Cela s'explique par deux raisons :

- Comme nous venons de le voir, les blastes dans les LA peuvent être sous-estimés avec le MA du fait de leur volume important qui les repousse en bord de frottis. Le taux de blastes circulants au diagnostic est un élément important car il permet, d'une part, de classer la LA et d'autre part de suivre cytologiquement la réponse ou la résistance au traitement.
- L'examen morphologique du frottis sanguin dans les LA constitue une étape primordiale pour classer la LA, l'enjeu étant notamment d'affirmer ou d'exclure rapidement une LAM3 (Leucémie aigüe myéloïde de type 3), de bon pronostic à condition que la prise en charge soit précoce. Les éléments recherchés sont des corps d'Auer « en fagots » à l'intérieur des blastes pathognomoniques de la maladie. Ces fagots peuvent être difficile à repérer sur le MA du fait de la résolution des images et de leur faible quantité. On peut également généralement mieux les voir dans les franges, là où les blastes hypergranuleux sont lysés.

Un article récent<sup>42</sup>, portant sur la capacité du MA à détecter les blastes en comparaison avec la méthode de référence (microscope manuel classique, considéré comme étant le Gold Standard) pour des échantillons présentant une alarme suggestive sur l'automate de d'hématologie, suggère que la pré-classification par le MA est suffisante pour vérifier l'absence de blastes (VPN=97%) et que la présence de blastes à la pré-classification nécessite une reclassification par un opérateur expérimenté. Cette configuration

permettrait de gagner du temps en routine pour suivre les alarmes sur l'automate de numération formule. De plus, la sensibilité du MA à reconnaître les blastes numérisés est très bonne, elle a été évaluée à 100% dans une étude récente<sup>41</sup>. Cependant, la spécificité a été évaluée à 67% dans cette étude : le MA a tendance à classer d'autres leucocytes dans cette catégorie ; la corrélation après reclassification avec la méthode de référence était correcte mais souvent, les blastes étaient sous-estimés par le MA. Cependant, lorsque les quantités de cellules sont minimales, le MA peut ne pas les numériser tout comme un opérateur peut ne pas les détecter en microscopie manuelle<sup>40,43</sup>. Ainsi, dans une étude<sup>42</sup>, le MA n'a pas détecté de blastes pour 30% des échantillons classés « présence de blastes » par la méthode de référence tandis que des blastes ont été détectés par le MA dans 6% des échantillons pour lesquels la microscopie manuelle n'en avait pas identifié. Cette dernière étude suggère une nécessité de disposer d'une méthode plus fiable que la microscopie manuelle ou automatisée, dans laquelle la présence ou l'absence de blaste puisse être certifiée.

Par ailleurs, le MA identifie mieux les blastes myéloïdes que les blastes lymphoïdes dans la catégorie « blastes »<sup>39</sup>. Ainsi, le MA pourrait être utilisé dans le suivi des LAM mais reste inapproprié dans le suivi des LAL<sup>39,44</sup>.

Contrairement aux LA, les syndromes lymphoprolifératifs sont plus facilement repérables sur le MA, notamment dans la LLC (leucémie lymphoïde chronique), qui constitue la leucémie la plus répandue dans les pays occidentaux<sup>45</sup>. Classiquement, on observe sur le MA une hyperlymphocytose d'allure monomorphe (plus facilement objectivée par la disposition des cellules côte à côte) et la présence de nombreuses ombres nucléaires classées dans « cellules à corbeille ». Ces deux éléments permettent en général assez facilement d'évoquer une LLC (à confronter aux résultats de l'immunophénotypage lymphocytaire) et la reprise au microscope manuel est moins systématique. Néanmoins, lorsque la majorité des lymphocytes sont lysés et classés en « cellules à corbeille » par le MA (ombres nucléaires, lié à la fragilité des cellules clonales), la formule est fautive et peut être reprise au microscope manuel afin d'observer l'intérieur du frottis (plus proche de la goutte) pour étudier la morphologie et dénombrer les cellules intactes (non soumises aux forces de frottements lors de l'étalement), et ainsi d'affirmer ou non la clonalité. Il n'est pas rare d'observer également de nombreuses cellules lysées au cours d'un syndrome viral, dans ce cas, la population lymphocytaire est polymorphe.

En revanche, certaines anomalies lymphocytaires comme les villosités peuvent être plus difficiles à repérer sur les images numériques. C'est ce qu'ont déclaré 49,6% des

participants. Ces villosités correspondent à des lymphopathies plus rares telles que la leucémie à tricholeucocytes ou le lymphome à lymphocytes villeux de la zone marginale. A noter que selon le type d'étaleur-colorateur notamment en changeant les temps de séchage, la morphologie peut beaucoup varier. Nous avons ainsi testé le SP-50 comparé au SP-10 et observé que les villosités des tricholeucocytes se voyaient au DM avec la coloration du SP-50 et pas avec celle du SP-10 où ils prenaient un aspect « œuf sur le plat » (données non publiées). Cela peut expliquer ainsi pourquoi les avis divergent autant. Les « lymphocytes atypiques paraissent parfois "normaux" sur le DM », en cas de suspicion, une reprise au microscope manuel à la recherche de ces anomalies est souvent nécessaire. Cependant un article<sup>39</sup> évoque au contraire une facilité de détection d'anomalies lymphocytaires (villosités, LGL, lymphocytes binucléés).

A l'heure actuelle, aucun système de MA ne permet une distinction automatique de cellules lymphoïdes pathologiques, et l'habileté et l'expérience d'un opérateur expérimenté reste nécessaire. Une étude<sup>46</sup> travaille sur une nouvelle méthodologie de reconnaissance des lymphocytes permettant la «classification automatique» des cellules lymphoïdes anormales circulante dans le sang périphérique notamment pour la LLC et la leucémie à tricholeucocytes. Cette méthodologie repose sur des algorithmes de segmentation du noyau, d'extraction de caractéristiques cellulaires (cytoplasme, granulation, basophilie) et de classification et pourrait constituer une aide importante dans le diagnostic des lymphopathies.

Seulement 27,1% des participants estiment que la pré-classification des cellules par le MA peut être source d'erreur pour la reclassification. Malgré un taux de concordance global entre la pré-classification et la reclassification encourageant (taux de concordance entre la pré-classification et la reclassification : 82% Kratz *et al*<sup>12</sup>, 89% Briggs *et al.*<sup>11</sup>, 92% Ceelie *et al.*<sup>13</sup> et 88,4% Yamamoto T. *et al*<sup>14</sup>), la littérature montre que le MA ne reconnaît pas toutes les catégories cellulaires avec la même sensibilité et peut commettre des erreurs dans la pré-classification d'où la nécessité d'une relecture obligatoire de toutes les catégories de cellules imposée par le logiciel. Ainsi, les PNN, les lymphocytes et les monocytes sont les cellules les mieux reconnues. Pour les PNN et les lymphocytes, la corrélation après reclassification avec la méthode de référence (microscopie manuelle) est excellente<sup>11-14</sup>. Elle est moins bonne pour les monocytes, lesquels sont décrits comme étant sous-estimés par le MA du fait de leur distribution hétérogène sur la lame<sup>39</sup>. Les PNE sont plutôt bien reconnus par le MA, mais la corrélation après reclassification avec la méthode de référence est moins bonne ; cela peut s'expliquer par la qualité de la couleur

du MA : en effet, les éosinophiles apparaissent plus roses sur l'écran du DM96<sup>11</sup> que sous le microscope classique, pouvant induire en erreur l'opérateur lors de la reclassification. Les PNB sont les cellules de la formule sanguine les moins bien reconnues par le MA et la corrélation avec la méthode de référence même après reclassification est mauvaise<sup>11</sup>. Ces résultats peuvent être expliqués par la faible quantité de ces cellules dans le sang périphérique (% PNB : 0-1%<sup>47</sup>). Parmi les réponses libres des participants, la pré-classification a été qualifiée de « très mauvaise pour les PNB et les érythroblastes ». Cependant, une étude récente de plus grande envergure a montré que la corrélation entre les cellules pré-classées (donc sans interférence avec la reclassification de l'opérateur) et la méthode de référence était très bonne pour les 5 types cellulaires de la formule sanguine y compris pour les PNB et les PNE<sup>41</sup>.

Concernant la myélémie, le MA identifie mal les cellules immatures dans les catégories de maturité appropriées. La corrélation avec la méthode de référence est bonne pour la myélémie totale<sup>11</sup> (tout stade de maturité confondus) avant et après reclassification, mais elle est mauvaise quand les stades cellulaires sont pris isolément, suggérant une erreur humaine liée à la subjectivité de la caractérisation d'un stade de maturité par rapport à un autre<sup>37</sup>. La VPP est faible pour les plasmocytes mais le MA les reconnaît avec une sensibilité de l'ordre de 100%. Une autre remarque a été mentionnée concernant un défaut de reconnaissance des cellules en cas de myélodysplasie « distinction parfois difficile entre monocytes et lignée granuleuse dégranulée ». Les myélodysplasies sont des hémopathies dans lesquelles les cellules sont difficiles à identifier, nécessitant souvent une reprise au microscope manuel mais cela peut également être compliqué à lire. Malgré tout, une étude évoque une facilité à évaluer et à quantifier la dysplasie avec le MA<sup>39</sup>.

Il en est de même pour la pré-caractérisation des GR : les différentes anomalies ne sont pas toutes identifiées avec la même sensibilité.

61,2% des participants estiment qu'il n'est pas toujours facile de s'adapter aux images numériques. En cause, le manque de profondeur du champ et une résolution des images plus faible qu'avec l'utilisation du microscope manuel. Il peut être également difficile de s'adapter aux couleurs des images numériques<sup>1</sup>.

32,1% des participants pensent que les personnes formées initialement sur le microscope automatisé sont moins efficaces sur le microscope manuel. On retrouve cette notion dans une étude qui suggère que cette limite peut être surmontée par une formation adaptée et équivalente sur les deux techniques<sup>1</sup>. Plusieurs participants de notre étude ont mentionné

qu'il était indispensable de maintenir le microscope manuel classique tant en formation qu'en routine, afin d'éviter de perdre «l'habitude d'utilisation du microscope manuel par les techniciens ».

Un taux non négligeable de participants (20.5%) déclarent que certaines personnes refusent de se servir du MA au laboratoire : l'introduction d'un MA au sein d'un laboratoire nécessite un changement des habitudes de travail. Il est probable que d'une part, le personnel en fin de carrière expérimenté, habitué à la microscopie manuelle se sente moins à l'aise et moins efficace avec l'utilisation des images numériques. D'autre part, la méconnaissance des avantages et des inconvénients de ce système peut entraîner une restriction à son utilisation.

## CONCLUSION

Le MA est une technologie qui commence à être bien installée en France, notamment dans les laboratoires avec un grand nombre de lecture de frottis sanguins et qui suscite énormément d'intérêt, certainement principalement en raison d'un potentiel gain de temps technique et donc un gain financier. C'est le cas au CHU de Toulouse où la mise en place des microscopes automatisés a en contrepartie très fortement diminué le nombre de postes de techniciens affectés à la lecture microscopique. Cependant, cette technologie numérique nécessite un investissement financier important à l'achat : à titre d'exemple, un DM1200 coûte 92000 euros HT.

Dans le cadre de l'accréditation obligatoire des laboratoires, cette méthode automatisée nécessite bien entendu d'être validée. C'est l'objet de la première partie de ce travail de thèse. La lecture d'une lame sur 100 à 150 éléments dont certains en très faible pourcentage peut donner des résultats très variables (que ce soit fait par le microscope automatisé ou manuellement) et il n'est pas toujours facile de déterminer quand les résultats sont acceptables ou pas. L'existence de recommandations nationales fait actuellement défaut.

Notre validation de méthode a notamment montré que les résultats de la formule obtenus avec nos MA étaient conformes et pouvaient donc être rendus au clinicien, mais uniquement pour les frottis étalés par nos étaleurs automatisés.

Grâce à la diffusion de notre questionnaire, nous avons ensuite pu faire un état des lieux de l'utilisation des MA en France et du ressenti qu'en avaient leurs utilisateurs. Puis nous avons comparé ces résultats aux données de la littérature. Nous avons voulu par cette étude recueillir des informations directement auprès des personnes concernées pour évaluer la transition du microscope traditionnel vers la technologie d'image numérique et permettre de proposer des améliorations pour l'avenir. Là également des recommandations nationales pourraient être utiles. Notre étude sera publiée très prochainement et sera présentée oralement au prochain congrès de la Société Française d'Hématologie en mars 2019.

La majorité des participants s'accorde sur les avantages : la traçabilité complète, l'amélioration de la formation du personnel et le confort de travail représentent les 3

points clefs qui remportent le plus fort taux d'accord. Les participants s'accordent également pour dire que la MA permet un gain de temps par rapport à la microscopie manuelle mais qu'il n'est pas adapté à la recherche des agrégats plaquettaires. Cependant les avis sur les autres inconvénients sont plus partagés, notamment sur la faculté d'adaptation aux images numériques et la difficulté d'évaluer les morphologies cellulaires atypiques telle que celles des lymphocytes villeux ou celles des GR. De plus, l'étude révèle une grande hétérogénéité des pratiques d'utilisation du MA, notamment sur le passage de CIQ.

A l'heure actuelle dans les laboratoires, le microscope manuel reste nécessaire pour observer les frottis sanguins. Avec l'amélioration de la technologie des instruments et, éventuellement, une fonctionnalité plus complète de numérisation des lames, l'utilisation des microscopes manuels pourrait être de plus en plus réduite dans le laboratoire d'hématologie. Il reste encore des progrès à faire comme l'ont commenté de nombreux participants, principalement avec la technologie CellaVision® qui actuellement ne permet pas de visualiser les franges et bords des frottis. Au plan technique, la possibilité de faire varier la mise au point sur certaines cellules contribuerait également à une meilleure qualité d'image (réglages en « z »). Un plus grand écran de visualisation des différentes classes cellulaires, comme il en existe pour certains systèmes d'imagerie en anatomopathologie permettrait un meilleur confort d'utilisation en limitant le recours aux « ascenseurs » d'image. Ajoutons que la lecture du myélogramme n'est pas réalisable sur MA car les frottis sont généralement épais et/ou trop riches pour le repérage des cellules. Cependant, certaines entreprises tentent déjà de réaliser une analyse numérique automatisée des échantillons de moelle osseuse à l'aide de l'imagerie numérique<sup>48</sup>.

Aujourd'hui, le MA occupe une place importante au cœur de l'hématologie de routine et constitue une aide indéniable pour le contrôle des formules sanguines. A l'heure où le statut de « Gold Standard » de la microscopie manuelle est remis en cause, l'intégration du MA sur la chaîne d'hématologie de routine, avec le DI60, tend à annoncer une évolution progressive dans le sens de l'imagerie numérique<sup>14</sup>. La possibilité de combiner les résultats de la numération et l'analyse cytomorphologique à un module de diagnostic clinique constituerait la prochaine étape de l'imagerie numérique en hématocytologie<sup>44</sup>.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Vanvranken, S., Patterson, E., V Rudmann, S. & Waller, K. A survey study of benefits and limitations of using CellaVision DM96 for peripheral blood differentials. *Clin. Lab. Sci. J. Am. Soc. Med. Technol.* **27**, 32–9 (2014).
2. Keng, T. B. *et al.* Standardization of haematology critical results management in adults: an International Council for Standardization in Haematology, ICSH, survey and recommendations. *Int. J. Lab. Hematol.* **38**, 457–471 (2016).
3. Palmer, L. *et al.* ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, 287–303 (2015).
4. Trimoreau, F. *et al.* Harmonisation of full blood count reports, recommendations of the French-speaking cellular haematology group (GFHC). *J. Clin. Pathol.* **70**, 395–402 (2017).
5. Koepke, J. A., Dotson, M. A. & Shifman, M. A. A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method. *Blood Cells* **11**, 173–186 (1985).
6. Prewitt, J. M. S. & Mendelsohn, M. L. THE ANALYSIS OF CELL IMAGES\*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **128**, 1035–1053 (2006).
7. Bentley, S. A. Automated differential white cell counts: a critical appraisal. *Baillieres Clin. Haematol.* **3**, 851–869 (1990).
8. DM 1200 Manuel d'utilisation.pdf.
9. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers. Available at: <http://www.hematocell.fr/index.php/les-cellules-du-sang/15-les-cellules-du-sang-et-de-la-moelle-osseuse/valeurs-normales-de-lhemogramme-selon-lage/129-hemogramme-selon-lage>. (Accessed: 8th December 2018)
10. Lainey, E., Boirie, M. & Fenneteau, O. Hémogramme en pédiatrie : variations physiologiques. *Rev. Francoph. Lab.* **2009**, 49–59 (2009).
11. Briggs, C. *et al.* Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system. *Int. J. Lab. Hematol.* **31**, 48–60 (2009).
12. Bissell, M. G. Performance Evaluation of the CellaVision DM96 System: WBC Differentials by Automated Digital Image Analysis Supported by an Artificial Neural Network. *Yearb. Pathol. Lab. Med.* **2007**, 362 (2007).

13. Ceelie, H., Dinkelaar, R. B. & van Gelder, W. Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J. Clin. Pathol.* **60**, 72–79 (2007).
14. Tabe, Y. *et al.* Performance evaluation of the digital cell imaging analyzer DI-60 integrated into the fully automated Sysmex XN hematology analyzer system. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* **53**, (2015).
15. Criel, M. *et al.* Evaluation of the Red Blood Cell Advanced Software Application on the CellaVision DM96. *Int. J. Lab. Hematol.* **38**, 366–374 (2016).
16. Gulati, G., Uppal, G., Florea, A. D. & Gong, J. Detection of Platelet Clumps on Peripheral Blood Smears by CellaVision DM96 System and Microscopic Review. *Lab. Med.* **45**, 368–371 (2014).
17. Jan, J. F. Yu&Mi SOLUTION HEMAPREP. 6
18. Technologie - Sysmex France. Available at:  
<http://www.sysmex.fr/academie/technologie.html>. (Accessed: 7th January 2019)
19. PRNFENISO9000.pdf.
20. SH-GTA-01.pdf.
21. SH-REF-02.pdf.
22. SH-REF-08.pdf.
23. SH INF 50 REV 01.pdf.
24. SH-GTA-04.pdf.
25. SH-GTA-06.pdf.
26. SH-GTA-14.pdf.
27. Riedl, J. A., Dinkelaar, R. B. & van Gelder, W. Automated morphological analysis of cells in body fluids by the digital microscopy system DM96. *J. Clin. Pathol.* **63**, 538–543 (2010).
28. Hervent, A.-S., Godefroid, M., Cauwelier, B., Billiet, J. & Emmerechts, J. Evaluation of schistocyte analysis by a novel automated digital cell morphology application. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, 588–596 (2015).
29. Egele, A., Gelder, W. van & Riedl, J. Automated Detection and Classification of Schistocytes by a Novel Red Blood Cell Module Using Digital Imaging/Microscopy. *J. Hematol.* **4**, 184-186–186 (2015).
30. Naugler, C. *et al.* Platelet count estimation using the CellaVision DM96 system. *J. Pathol. Inform.* **4**, 16 (2013).
31. Surcouf, C., Delaune, D., Samson, T. & Foissaud, V. Analyse d'image en cytologie hématologique: automate CellaVision DM96TM. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 419–424 (2009).

doi:10.1684/abc.2009.0349

32. Brueggeman, M. S., Swinehart, C., Yue, M. J., Conway-Klaassen, J. M. & Wiesner, S. M. Implementing Virtual Microscopy Improves Outcomes in a Hematology Morphology Course. 8
33. Lee, S.-H. Virtual microscopy: Applications to hematology education and training. *Hematology* **10**, 151–153 (2005).
34. Kraemer, D. *et al.* Evaluation of a novel case-based training program (d3web.Train) in hematology. *Ann. Hematol.* **84**, 823–829 (2005).
35. Brereton, M. L. *et al.* Review of the UK NEQAS (H) digital morphology pilot scheme for continuing professional development accessed via the internet. *Int. J. Lab. Hematol.* **30**, 365–371 (2008).
36. CellaVision® Proficiency Software. Available at: <https://www.cellavision.com/en/our-products/products/cellavision-proficiency-software>. (Accessed: 11th February 2019)
37. Contis, L., Rollins-Raval, M. & Raval, J. Experience with CellaVision DM96 for peripheral blood differentials in a large multi-center academic hospital system. *J. Pathol. Inform.* **3**, 29 (2012).
38. Chen, X., Zheng, B. & Liu, H. Optical and Digital Microscopic Imaging Techniques and Applications in Pathology. *Anal. Cell. Pathol.* **34**, 5–18 (2011).
39. Cornet, E., Perol, J.-P. & Troussard, X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases: CELLAVISION™ DM96 SYSTEM IN ROUTINE ANALYSIS. *Int. J. Lab. Hematol.* **30**, 536–542 (2007).
40. Rümke, C. L. Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. *Blood Cells* **11**, 311–314, 315 (1985).
41. Stouten, K., Riedl, J. A., Levin, M.-D. & van Gelder, W. Examination of peripheral blood smears: performance evaluation of a digital microscope system using a large-scale leukocyte database. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, e137–e140 (2015).
42. Eilertsen, H., Henriksson, C. E. & Hagve, T.-A. The use of CellaVision™ DM96 in the verification of the presence of blasts in samples flagged by the Sysmex XE-5000. *Int. J. Lab. Hematol.* **39**, 423–428 (2017).
43. Stiene-Martin, E. A. Causes for poor leukocyte distribution in manual spreader-slide blood films. *Am. J. Med. Technol.* **46**, 624–632 (1980).
44. Riedl, J. Digital imaging/morphology is the next chapter in hematology. *MLO* (2018). Available at: <https://www.mlo-online.com/digital-imagingmorphology-next->

chapter-hematology. (Accessed: 26th February 2019)

45. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment: HALLEK. *Am. J. Hematol.* **92**, 946–965 (2017).
46. Alférez, S. *et al.* Automatic classification of atypical lymphoid B cells using digital blood image processing. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 472–480 (2014).
47. Constantes\_biologiques\_adultes\_2009.pdf.
48. Vision Hema Bone Marrow. Available at: <http://bm.wm-vision.com/fr/>. (Accessed: 3rd March 2019)

## ANNEXES

### Annexe 1 : Table de Rümke extrapolée

Table de Rümke extrapolée, adaptée à tous les pourcentages cellulaires pour une formule effectuée sur 100 éléments. Par exemple, pour un % cellulaire réel à 53%, il est possible de dénombrer sans commettre d'erreur entre 43,8% et 64,1% de ces cellules.

% vrai	cellules comptées (%)		% vrai	cellules comptées		% vrai	cellules comptées		% vrai	cellules comptées	
	limite basse	limite haute		limite basse	limite haute		limite basse	limite haute		limite basse	limite haute
0	0	5.3	26	17.6	35.4	51	41.7	62	76	68.6	88.1
1	0	5.3	27	18.5	36.5	52	42.8	63.1	77	69.7	89.1
2	0.3	7.1	28	19.4	37.6	53	43.8	64.1	78	70.8	90.2
3	0.7	8.6	29	20.3	38.6	54	44.8	65.2	79	72	91.2
4	1.1	10	30	21.2	39.7	55	45.9	66.2	80	73.1	92.3
5	1.6	11.4	31	22.1	40.8	56	46.9	67.3	81	72.2	93.3
6	2.2	12.6	32	23	41.9	57	48	68.3	82	75.3	94.3
7	2.8	13.9	33	24	42.9	58	49	69.4	83	76.5	95.4
8	3.4	15.1	34	24.9	44	59	50.1	70.4	84	77.6	96.4
9	4.1	16.3	35	25.9	45.1	60	51.2	71.5	85	78.7	97.4
10	4.7	17.5	36	26.8	46.1	61	52.2	72.5	86	79.9	98.5
11	5.4	18.7	37	27.8	47.2	62	53.3	73.5	87	81	99.5
12	6.1	19.8	38	28.7	48.3	63	54.4	74.6	88	82.2	100
13	6.9	21	39	29.7	49.3	64	55.5	75.6	89	8.3	100
14	7.6	22.1	40	30.7	50.4	65	56.5	76.7	90	84.5	100
15	8.4	23.2	41	31.7	51.5	66	57.6	77.7	91	85.6	100
16	9.2	24.4	42	32.6	52.5	67	58.7	78.8	92	86.8	100
17	10	25.5	43	33.6	53.6	68	59.8	79.8	93	87.9	100
18	10.8	26.6	44	34.6	54.6	69	60.9	80.8	94	89.1	100
19	11.6	27.7	45	35.6	55.7	70	62	81.9	95	90.2	100
20	12.4	28.8	46	36.6	56.8	71	63.1	82.9	96	91.4	100
21	13.2	29.9	47	37.7	57.8	72	64.2	84	97	92.6	100
22	14.1	31	48	38.7	58.9	73	65.3	85	98	93.7	100
23	14.9	32.1	49	39.7	59.9	74	66.4	86	99	94.9	100
24	15.8	33.2	50	40.7	61	75	67.5	87.4	100	96.1	100
25	16.7	34.3									

### Annexe 2 : Spécifications fournisseur (Cellavision®) concernant les performances du DM

#### Spécifications de performances de l'application de sang périphérique

Moyenne de localisation cellulaire et d'affichage des leucocytes de 97 % minimum avec un écart-type inférieur à 2 %.

Débit\* : environ 20 lames/heure pour les ordres complets comprenant érythrocytes, plaquettes et leucocytes (centaine de cellules).

Résultats d'une imprécision passagère détectée dans une évaluation clinique effectuée sur 230 échantillons patient et basée sur la norme NCCLS H-20 :

Catégorie cellulaire	SD (%)	Catégorie cellulaire	SD (%)
Neutrophiles matures	3,8	Basophiles	0,7
Neutrophiles précurseurs	1,6	Lymphocytes	3,4
Éosinophiles	1,0	Monocytes	2,0

Limitations : Les distinctions entre neutrophiles précurseurs et neutrophiles matures, métamyélocytes et myélocytes, myélocytes et promyélocytes, lymphocytes et variantes de lymphocytes sont susceptibles de différer d'un opérateur individuel à l'autre.

Annexe 3 : SH-FORM, validation de la formule manuelle, sous-processus lecture au microscope automatisé

<b>EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE</b>
<b>Identification du paramètre : Formule sanguine, examen microscopique de frottis colorés au MGG</b>
<b>Portée A <input checked="" type="checkbox"/> ; Portée B <input type="checkbox"/></b>
<b>Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/> (nombre de sous-processus : 2)</b>

<b>DESCRIPTION DU PROCESSUS</b>		
	Eléments à vérifier	Modalités de vérification/validation <sup>2</sup> :
Sous-processus 1 : lecture au microscope automatique	Essai sur lame de sang patient normal, 10 passages	<input checked="" type="checkbox"/> 14. Répétabilité
	Essai sur lame de sang patient normal, 20 passages	<input checked="" type="checkbox"/> 15. Fidélité intermédiaire
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 16. Variabilité inter-opérateurs
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 17. Justesse
	Réalisé avec les EEQ: Biologie Prospective	<input checked="" type="checkbox"/> 18. Exactitude
	Bibliographie	<input checked="" type="checkbox"/> 19. Sensibilité et spécificité analytique
	Calculé avec la fidélité et EEQ	<input checked="" type="checkbox"/> 20. Incertitudes
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 21. Etendue de mesure : limite de détection
	Essai sur 30 frottis sanguins patients	<input checked="" type="checkbox"/> 22. Comparaison de méthodes
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 23. Interférences
	Non applicable	<input type="checkbox"/> 24. Contamination
	Données fournisseur	<input checked="" type="checkbox"/> 25. Robustesse et fiabilité des réactifs
	Bibliographie	<input checked="" type="checkbox"/> 26. Intervalle de référence

<sup>2</sup> Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

**Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.**

**L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.**

## DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Formule sanguine
<b>Principe de la Méthode :</b>	Comptage au microscope des éléments figurés du sang et commentaires si nécessaire
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Sang total
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Tube avec anticoagulant EDTA
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Homogénéisation de l'échantillon Etalement sur lame Coloration au MGG
<b>Unités :</b>	% Fractions relatives
<b>Intervalles de référence :</b>	Identiques à ceux de la formule automatisée pour les cellules normales du sang (polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, lymphocytes, monocytes) Absence pour les autres cellules
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Oui (réactifs de coloration)
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	HEM2
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	<p>SYSMEX SP-10 (automate étaleur-colorateur) N° série : Purpan 11595 – Ranguel 11781 – IUC 11594</p> <p>Hemaprep (étaleur semi-manuel) : N° série : Purpan 4048 – Ranguel 3672</p> <p>Colorateur automatique : Purpan : Smartcolor 10-FR-2094 Ranguel : Colorateur IUL / ATC 1036 IUC : Smartcolor 10-FR-2086</p> <p>SYSMEX CellaVision DM 1200 (microscopes automatiques) N° série : Purpan 33212 – Ranguel 33283 - IUC 33219</p> <p>Microscopes manuels :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Purpan : LEICA MISC 258, Nikon ECLIPSE 50i MISC 283, Nikon ECLIPSE 50i MISC 270, bicéphale MIC1169, LEICA MIC 1223</li> <li>- IUC : LEICA DSC450 GBM-33460, Nikon ECLIPSE 50i MISC303, Nikon ECLIPSE 50i MISC282, Nikon ECLIPSE 50i MISC 269, Nikon ECLIPSE E400 MISC 262</li> <li>- Ranguel : Nikon GBM-059518, , Nikon ECLIPSE 50i MIC 1244, WILD-HEERNRUGG MIC 1006</li> </ul> <p>Lames de verre: Lames Superfrost, ref 630-2017</p>
<b>Référence du réactif :</b>	<p>Giemsa: ref 75030SX1000 May Grünwald: ref 75010SX2500 Solution tampon pH 7,0: ref 75050SX5000 CELLPACK DCL: ref CT-661-628 Immersion Oil CellaVision: ref MA-10073 Immersol 518 N: ref 0000001111809</p>
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	NA
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	NA

## MISE EN ŒUVRE

<b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b>	Techniciens du secteur microscope Hématologie + internes du secteur + Biologistes du secteur
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	<i>PG-BIO-MS-QUAL-019 « Validation de méthodes »</i>
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	<i>PG-BIO-MS-QUAL-018 « Gestion de la portée flexible »</i>
<b>Période d'étude :</b>	Méthodes utilisées dans le LBM depuis des années. Etude rétrospective avec exploitation des EEQ + étude sur site
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	Plus de 10 ans

## MAITRISE DES RISQUES

Voir le document <http://srv-kalilab/DE-PTAP-MS-QUAL-066>  
SH FORM 43 PTA Hématocytologie : Maîtrise des risques 5M

## SOUS-PROCESSUS 1 : Lecture au microscope automatique

Portée A  ; Portée B

**Utilisation d'un réactif commercial selon les recommandations du fournisseur**

### EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Type et référence d'échantillon: lame de sang total EDTA (sang normal patient) étalée par le SP  
Sur chaque DM : une même lame passée 10 fois de suite, triée par le même opérateur.

REPETABILITE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne (%)	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur <sup>1</sup>	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>3</sup> )	Conclusion <sup>4</sup>
DM PURPAN							
Polynucléaires neutrophiles	10	54.95	1.63	2.97	5.2	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	10	4.86	1.01	20.74	15.47		Conforme Rümke
Polynucléaires basophiles	10	0.35	0.37	105.71	150.37		Conforme
Lymphocytes	10	31.76	0.89	2.81	8.05		Conforme
Monocytes	10	7.64	0.95	12.41	19.68		Conforme
DM RANGUEIL							
Polynucléaires neutrophiles	10	53.45	1.49	2.8	5.34	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	10	3.61	0.66	18.4	20.83		Conforme
Polynucléaires basophiles	10	0.14	0.3	214.3	375.9		Conforme
Lymphocytes	10	35.9	1.83	5.11	7.12		Conforme
Monocytes	10	6.93	0.82	11.8	21.7		Conforme
DM IUC							
Polynucléaires neutrophiles	10	58.33	4.32	7.41	4.9	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme Rümke
Polynucléaires éosinophiles	10	2.96	0.64	21.61	25.4		Conforme
Polynucléaires basophiles	10	0.67	0.71	106.0	78.55		Conforme Rümke
Lymphocytes	10	32.04	2.18	6.79	7.98		Conforme
Monocytes	10	6.0	1.65	27.43	25.06		Conforme Rümke

Argumentaire de la conclusion : **Résultats conformes. CV des valeurs basses peu pertinents (ex : polynucléaires basophiles), car une variation dans le compte de 0 à 2 cellules pour cents fait varier énormément le CV.**

Type et référence d'échantillon: lame de sang total EDTA (sang normal patient) étalée par le SP  
Sur chaque DM, une même lame passée plusieurs jours de suite, triée par des opérateurs différents.

<sup>1</sup> Fournisseur : CV= (écart-type de reproductibilité/moyenne\*100) / 1.33

<sup>3</sup> Table de Rümke extrapolée.

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur <sup>3</sup>	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion
DM PURPAN							
Polynucléaires neutrophiles	20	73.42	2.16	2.94	5.18	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	20	5.41	1.08	19.91	18.48		Conforme Rümke
Polynucléaires basophiles	20	3.57	0.49	13.72	19.61		Conforme
Lymphocytes	20	9.64	1.64	17.06	35.27		Conforme
Monocytes	20	7.89	1.21	15.38	25.35		Conforme
DM RANGUEIL							
Polynucléaires neutrophiles	20	54.05	1.89	3.50	7.03	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	20	4.02	0.66	16.43	24.88		Conforme
Polynucléaires basophiles	20	0.24	0.40	166.6	291.67		Conforme
Lymphocytes	20	33.90	2.61	7.71	10.03		Conforme
Monocytes	20	7.77	1.29	16.67	25.74		Conforme
DM IUC							
Polynucléaires neutrophiles	20	57.69	3.43	5.95	6.59	Vérification que toutes les valeurs obtenues lors du test sont conformes à la table de Rümke extrapolée	Conforme
Polynucléaires éosinophiles	20	2.93	0.78	26.76	26.62		Conforme Rümke
Polynucléaires basophiles	20	0.57	0.66	122.81	115.79		Conforme Rümke
Lymphocytes	20	32.59	2.04	6.27	10.43		Conforme
Monocytes	20	6.23	1.25	20.06	32.11		Conforme

Argumentaire de la conclusion : Résultats conformes. CV des valeurs basses peu pertinents (ex : polynucléaires basophiles), car une variation dans le compte de 0 à 2 cellules pour cents fait varier énormément le CV.

<sup>3</sup> Fournisseur : CV= (écart-type de reproductibilité/moyenne\*100)

<sup>4</sup> Table de Rümke extrapolée.

<b>VARIABILITE INTER-OPERATEURS</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; Non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	

Argumentaire de la conclusion : Pour comparer la variabilité inter-opérateurs, il faudrait que nous puissions avoir le même résultat issu du DM à trier par plusieurs personnes. Ce n'est pas possible avec le logiciel actuel (existe en option payante). Si quelqu'un commence à trier, ce tri se garde automatiquement, même sans sauvegarde.

Les techniciens et internes laissent souvent des lames posant souci en relecture aux biologistes qui vérifient alors les tris sur le microscope automatique et les corrigent éventuellement si besoin avec eux. L'homogénéité des lectures des frottis sanguins au microscope manuel est également évaluée régulièrement lors du maintien des performances du personnel habilité à la lecture au microscope.

<b>JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>

Argumentaire de la conclusion : Absence de CIQ externalisés

<b>EXACTITUDE</b> <b>Cas des contrôles externes</b> Contrôles quantitatifs <input checked="" type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input type="checkbox"/>							
Echantillons*	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite	Conclusion
<b>PURPAN - Polynucléaires Neutrophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	60,8	58,4	-	4,11%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0,35
NUM SANG 2017 1-B DM	48,3	56,6	-	-14,66%	-		CONFORME -1,25
NUM SANG 2017 2-A DM	66,2	64,2	-	3,12%	-		CONFORME 0,27
NUM SANG 2017 2-B DM	53,6	55,5	-	-3,42%	-		CONFORME -0,29
NUM SANG 2017 3-A DM	61,9	64,6	-	-4,18%	-		CONFORME -0,36
NUM SANG 2017 3-B DM	47,2	50,9	-	-7,27%	-		CONFORME -0,62
NUM SANG 2017 4-A DM	57,8	60,4	-	-4,30%	-		CONFORME -0,37
NUM SANG 2017 4-B DM	63,7	57,2	-	11,36%	-		CONFORME 0,97
NUM SANG 2017 5-A DM	59,9	57,7	-	3,81%	-		CONFORME 0,33
NUM SANG 2017 5-B DM	51,5	50,3	-	2,39%	-		CONFORME 0,2
NUM SANG 2017 6-A DM	53,1	55,3	-	-3,98%	-		CONFORME -0,34
NUM SANG 2017 6-B DM	61,5	59,7	-	3,02%	-		CONFORME 0,26
<b>RANGUEIL - Polynucléaires Neutrophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	59,7	58,4	-	2,23%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné	CONFORME 0,19
NUM SANG 2017 1-B DM	56,3	56,6	-	-0,53%	-		CONFORME -0,05
NUM SANG 2017 2-A DM	55,7	64,2	-	-13,24%	-		CONFORME -1,13
NUM SANG 2017 2-B DM	45,9	55,5	-	-17,30%	-		CONFORME -1,48

NUM SANG 2017 3-A DM	61	64,6	-	-5,57%	-	sous la conformité ou non conformité	CONFORME -0.48
NUM SANG 2017 3-B DM	46,8	50,9	-	-8,06%	-		CONFORME -0.69
NUM SANG 2017 4-A DM	50,3	60,4	-	-16,72%	-		CONFORME -1.44
NUM SANG 2017 4-B DM	44	57,2	-	-23,08%	-		CONFORME -1.97
NUM SANG 2017 5-A DM	57,1	57,7	-	-1,04%	-		CONFORME -0.09
NUM SANG 2017 5-B DM	45,1	50,3	-	-10,34%	-		CONFORME -0.8
NUM SANG 2017 6-A DM	44,7	55,3	-	-19,17%	-		CONFORME -1.63
NUM SANG 2017 6-B DM	53,8	59,7	-	-9,88%	-		CONFORME -0.84
<b>IUC - Polynucléaires neutrophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	54,1	58,4	-	-7,36%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME -0.63
NUM SANG 2017 1-B DM	55,1	56,6	-	-2,65%	-		CONFORME -0.23
NUM SANG 2017 2-A DM	52,7	64,2	-	-17,91%	-		CONFORME -1.53
NUM SANG 2017 2-B DM	60,6	55,5	-	9,19%	-		CONFORME 0.78
NUM SANG 2017 3-A DM	60,7	64,6	-	-6,04%	-		CONFORME -0.52
NUM SANG 2017 3-B DM	52,1	50,9	-	2,36%	-		CONFORME 0.2
NUM SANG 2017 4-A DM	56,8	60,4	-	-5,96%	-		CONFORME -0.51
NUM SANG 2017 4-B DM	54,8	57,2	-	-4,20%	-		CONFORME -0.36
NUM SANG 2017 5-A DM	58,2	57,7	-	0,87%	-		CONFORME 0.07
NUM SANG 2017 5-B DM	44,4	50,3	-	-11,73%	-		CONFORME -0.91
NUM SANG 2017 6-A DM	52	55,3	-	-5,97%	-		CONFORME -0.51
NUM SANG 2017 6-B DM	59,3	59,7	-	-0,67%	-		CONFORME -0.06
<b>PURPAN- Polynucléaires éosinophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	4,2	4,5	-	-6,67%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME -0.17
NUM SANG 2017 1-B DM	3,4	2,1	-	61,90%	-		CONFORME 0.93
NUM SANG 2017 2-A DM	3,4	3,3	-	3,03%	-		CONFORME 0.06
NUM SANG 2017 2-B DM	4	2,8	-	42,86%	-		CONFORME 1.2
NUM SANG 2017 3-A DM	2,7	2,2	-	22,73%	-		CONFORME 0.38
NUM SANG 2017 3-B DM	4	3,2	-	25,00%	-		CONFORME 0.57
NUM SANG 2017 4-A DM	4,1	3,1	-	32,26%	-		CONFORME 0.71
NUM SANG 2017 5-A DM	2	3	-	-33,33%	-		CONFORME -0.59
NUM SANG 2017 5-B DM	3,1	3,3	-	-6,06%	-		CONFORME -0.13
NUM SANG 2017 6-A DM	0	2,6	-	-100,00%	-		CONFORME -1.86
<b>RANGUEIL - Polynucléaires basophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	4	4,5	-	-11,11%	-		CONFORME -0.28
NUM SANG 2017 1-B DM	1,4	2,1	-	-33,33%	-		CONFORME -0.5
NUM SANG 2017	5,4	3,3	-	63,64%	-		CONFORME

2-A DM						Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	1.24
NUM SANG 2017 2-B DM	2,5	2,8	-	-10,71%	-		CONFORME -0.3
NUM SANG 2017 3-A DM	3,5	2,2	-	59,09%	-		CONFORME 1.0
NUM SANG 2017 3-B DM	4	3,2	-	25,00%	-		CONFORME 0.57
NUM SANG 2017 4-A DM	3,4	3,1	-	9,68%	-		CONFORME 0.21
NUM SANG 2017 5-A DM	2,1	3	-	-30,00%	-		CONFORME -0.53
NUM SANG 2017 5-B DM	3,5	3,3	-	6,06%	-		CONFORME 0.13
NUM SANG 2017 6-A DM	4	2,6	-	53,85%	-		CONFORME 1.0
<b>IUC- Polynucléaires éosinophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	5,4	4,5	-	20,00%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0.5
NUM SANG 2017 1-B DM	2,9	2,1	-	38,10%	-		CONFORME 0.57
NUM SANG 2017 2-A DM	6	3,3	-	81,82%	-		CONFORME 1.59
NUM SANG 2017 2-B DM	2,6	2,8	-	-7,14%	-		CONFORME -0.2
NUM SANG 2017 3-A DM	2	2,2	-	-9,09%	-		CONFORME -0.15
NUM SANG 2017 3-B DM	4,2	3,2	-	31,25%	-		CONFORME 0.71
NUM SANG 2017 4-A DM	2,6	3,1	-	-16,13%	-		CONFORME -0.36
NUM SANG 2017 5-A DM	4,9	3	-	63,33%	-		CONFORME 1.12
NUM SANG 2017 5-B DM	1,3	3,3	-	-60,61%	-		CONFORME -1.25
NUM SANG 2017 6-A DM	2,6	2,6	-	0,00%	-		CONFORME 0.0
<b>PURPAN- Polynucléaires basophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	0	0,37	-	-100,00%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 1-B DM	2,7	0,63	-	328,57%	-		CONFORME 0.03
NUM SANG 2017 2-A DM	0	0,79	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 2-B DM	0,7	0,71	-	-1,41%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 3-A DM	0	0,73	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 3-B DM	0,8	0,57	-	40,35%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 4-A DM	1,4	0,6	-	133,33%	-		CONFORME 0.01
NUM SANG 2017 4-B DM	0	0,53	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 5-A DM	0,7	0,8	-	-12,50%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 5-B DM	0	1,14	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 6-B DM	1,7	0,55	-	209,09%	-		CONFORME 0.02
<b>RANGUEIL - Polynucléaires basophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	0	0,37	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 1-B DM	1,4	0,63	-	122,22%	-		CONFORME 0.01
NUM SANG 2017 2-A DM	0,7	0,79	-	-11,39%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 2-B DM	0,8	0,71	-	12,68%	-		CONFORME 0.0

NUM SANG 2017 3-A DM	0,7	0,73	-	-4,11%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 3-B DM	2,4	0,57	-	321,05%	-		CONFORME 0.03
NUM SANG 2017 4-A DM	0,7	0,6	-	16,67%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 4-B DM	1,3	0,53	-	145,28%	-		CONFORME 0.01
NUM SANG 2017 5-A DM	0,7	0,8	-	-12,50%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 5-B DM	2,8	1,14	-	145,61%	-		CONFORME 0.02
NUM SANG 2017 6-B DM	0	0,55	-	-100,00%	-		CONFORME 0.01
<b>IUC - Polynucléaires basophiles</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	0,7	0,37	-	89,19%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0.01
NUM SANG 2017 1-B DM	0	0,63	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 2-A DM	1,3	0,79	-	64,56%	-		CONFORME 0.01
NUM SANG 2017 2-B DM	0	0,71	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 3-A DM	2,7	0,73	-	269,86%	-		CONFORME 0.02
NUM SANG 2017 3-B DM	0	0,57	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 4-A DM	0	0,6	-	-100,00%	-		CONFORME -0.01
NUM SANG 2017 4-B DM	0,7	0,53	-	32,08%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 5-A DM	0,8	0,8	-	0,00%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 5-B DM	0,7	1,14	-	-38,60%	-		CONFORME 0.0
NUM SANG 2017 6-B DM	0,7	0,55	-	27,27%	-		CONFORME 0.0
<b>PURPAN - Lymphocytes</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	28	31	-	-9,68%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0.71
NUM SANG 2017 1-B DM	36,1	34	-	6,18%	-		CONFORME 0.46
NUM SANG 2017 2-A DM	26,3	26,5	-	-0,75%	-		CONFORME -0.05
NUM SANG 2017 2-B DM	38,4	33,8	-	13,61%	-		CONFORME 0.88
NUM SANG 2017 3-A DM	29,3	26,3	-	11,41%	-		CONFORME 0.79
NUM SANG 2017 3-B DM	40	37,5	-	6,67%	-		CONFORME 0.61
NUM SANG 2017 4-A DM	29,3	31,5	-	-6,98%	-		CONFORME -0.65
NUM SANG 2017 4-B DM	31,5	36	-	-12,50%	-		CONFORME -0.96
NUM SANG 2017 5-A DM	32,7	33,4	-	-2,10%	-		CONFORME -0.14
NUM SANG 2017 5-B DM	41,5	39,5	-	5,06%	-		CONFORME 0.33
NUM SANG 2017 6-A DM	41,4	34,4	-	20,35%	-		CONFORME 1.84
NUM SANG 2017 6-B DM	30,8	29,2	-	5,48%	-		CONFORME 0.41
<b>RANGUEIL - Lymphocytes</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	29,5	31	-	-4,84%	-		CONFORME -0.36
NUM SANG 2017 1-B DM	33,8	34	-	-0,59%	-		CONFORME -0.04
NUM SANG 2017	33,6	26,5	-	26,79%	-		CONFORME

2-A DM						Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	1.69
NUM SANG 2017 2-B DM	41,8	33,8	-	23,67%	-		CONFORME 1.54
NUM SANG 2017 3-A DM	30,5	26,3	-	15,97%	-		CONFORME 1.11
NUM SANG 2017 3-B DM	40,5	37,5	-	8,00%	-		CONFORME 0.73
NUM SANG 2017 4-A DM	37,4	31,5	-	18,73%	-		CONFORME 1.74
NUM SANG 2017 4-B DM	47,3	36	-	31,39%	-		NON CONFORME 2.4
NUM SANG 2017 5-A DM	37,1	33,4	-	11,08%	-		CONFORME 0.74
NUM SANG 2017 5-B DM	43,7	39,5	-	10,63%	-		CONFORME 0.70
NUM SANG 2017 6-A DM	44	34,4	-	27,91%	-		NON CONFORME 2.5 Conforme Rümke
NUM SANG 2017 6-B DM	32,2	29,2	-	10,27%	-		CONFORME 0.77
<b>IUC - Lymphocytes</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	35,1	31	-	13,23%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0.98
NUM SANG 2017 1-B DM	34,1	34	-	0,29%	-		CONFORME 0.02
NUM SANG 2017 2-A DM	36	26,5	-	35,85%	-		NON CONFORME 2.3 Conforme Rümke
NUM SANG 2017 2-B DM	28,4	33,8	-	-15,98%	-		CONFORME -1.04
NUM SANG 2017 3-A DM	28	26,3	-	6,46%	-		CONFORME 0.45
NUM SANG 2017 3-B DM	39,5	37,5	-	5,33%	-		CONFORME 0.49
NUM SANG 2017 4-A DM	36,1	31,5	-	14,60%	-		CONFORME 1.35
NUM SANG 2017 4-B DM	37,8	36	-	5,00%	-		CONFORME 0.38
NUM SANG 2017 5-A DM	32	33,4	-	-4,19%	-		CONFORME -0.28
NUM SANG 2017 5-B DM	46,4	39,5	-	17,47%	-		CONFORME 1.15
NUM SANG 2017 6-A DM	36,4	34,4	-	5,81%	-		CONFORME 0.53
NUM SANG 2017 6-B DM	31	29,2	-	6,16%	-		CONFORME 0.46
<b>PURPAN - Monocytes</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	7	6	-	16,67%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0.59
NUM SANG 2017 1-B DM	9,5	6,1	-	55,74%	-		CONFORME 1.55
NUM SANG 2017 2-A DM	4,1	5,6	-	-26,79%	-		CONFORME -0.94
NUM SANG 2017 2-B DM	3,3	7,3	-	-54,79%	-		NON CONFORME - 2.9 Conforme Rümke
NUM SANG 2017 3-A DM	6,1	5,7	-	7,02%	-		CONFORME 0.2
NUM SANG 2017 3-B DM	8	7,7	-	3,90%	-		CONFORME 0.11
NUM SANG 2017 4-A DM	7,5	4,3	-	74,42%	-		CONFORME 1.6
NUM SANG 2017 4-B DM	2,7	4,8	-	-43,75%	-		CONFORME -0.88
NUM SANG 2017 5-A DM	4,8	5	-	-4,00%	-		CONFORME -0.11
NUM SANG 2017 5-B DM	3,8	4,8	-	-20,83%	-		CONFORME -0.71

NUM SANG 2017 6-A DM	5,5	6,1	-	-9,84%	-		CONFORME -0.33
NUM SANG 2017 6-B DM	6	8,8	-	-31,82%	-		CONFORME -0.9
<b>RANGUEIL - Monocytes</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	6,7	6	-	11,67%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME 0.41
NUM SANG 2017 1-B DM	7	6,1	-	14,75%	-		CONFORME 0.41
NUM SANG 2017 2-A DM	4,7	5,6	-	-16,07%	-		CONFORME -0.56
NUM SANG 2017 2-B DM	9	7,3	-	23,29%	-		CONFORME 1.21
NUM SANG 2017 3-A DM	4,3	5,7	-	-24,56%	-		CONFORME -0.7
NUM SANG 2017 3-B DM	6,3	7,7	-	-18,18%	-		CONFORME -0.5
NUM SANG 2017 4-A DM	8,2	4,3	-	90,70%	-		CONFORME 1.95
NUM SANG 2017 4-B DM	4,7	4,8	-	-2,08%	-		CONFORME -0.04
NUM SANG 2017 5-A DM	2,9	5	-	-42,00%	-		CONFORME -1.11
NUM SANG 2017 5-B DM	4,9	4,8	-	2,08%	-		CONFORME 0.07
NUM SANG 2017 6-A DM	7,3	6,1	-	19,67%	-		CONFORME 0.67
NUM SANG 2017 6-B DM	10,5	8,8	-	19,32%	-		CONFORME 0.55
<b>IUC - Monocytes</b>							
NUM SANG 2017 1-A DM	4,7	6	-	-21,67%	-	Résultat de conformité au groupe de pairs évalué par le z-score mentionné sous la conformité ou non conformité	CONFORME -0.76
NUM SANG 2017 1-B DM	8	6,1	-	31,15%	-		CONFORME 0.86
NUM SANG 2017 2-A DM	4	5,6	-	-28,57%	-		CONFORME -1.0
NUM SANG 2017 2-B DM	8,4	7,3	-	15,07%	-		CONFORME 0.79
NUM SANG 2017 3-A DM	6,7	5,7	-	17,54%	-		CONFORME 0.5
NUM SANG 2017 3-B DM	4,2	7,7	-	-45,45%	-		CONFORME -1.25
NUM SANG 2017 4-A DM	4,5	4,3	-	4,65%	-		CONFORME 0.1
NUM SANG 2017 4-B DM	5,9	4,8	-	22,92%	-		CONFORME 0.46
NUM SANG 2017 5-A DM	4,1	5	-	-18,00%	-		CONFORME -0.47
NUM SANG 2017 5-B DM	7,2	4,8	-	50,00%	-		CONFORME 1.71
NUM SANG 2017 6-A DM	7,1	6,1	-	16,39%	-		CONFORME 0.56
NUM SANG 2017 6-B DM	6,2	8,8	-	-29,55%	-		CONFORME -0.84

Argumentaire de la conclusion : Résultats satisfaisants, quasiment tous conformes au z-score du groupe de pairs. Pour les polynucléaires éosinophiles et basophiles, parfois valeurs trop basses pour être exploitables, et CV souvent peu pertinents.

**SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE**  
**(étude expérimentale indispensable en portée B)**  
**(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)**  
 Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Etude bibliographique**

Bonne sensibilité et spécificité

Argumentaire de la conclusion : **Etude bibliographique montrant une bonne sensibilité et spécificité pour les cellules anormales et les anomalies morphologiques lors de l'utilisation du microscope automatisé.**

Ex :

-Hervent, A.-S., Godefroid, M., Cauwelier, B., Billiet, J. & Emmerechts, J. Evaluation of schistocyte analysis by a novel automated digital cell morphology application. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, 588–596 (2015)

-Surcouf, C., Delaune, D., Samson, T. & Foissaud, V. Analyse d'image en cytologie hématologique: automate CellaVision DM96TM. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 419–424 (2009).

-Contis, L., Rollins-Raval, M. & Raval, J. Experience with CellaVision DM96 for peripheral blood differentials in a large multi-center academic hospital system. *J. Pathol. Inform.* **3**, 29 (2012)

-Cornet, E., Perol, J.-P. & Troussard, X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Int. J. Lab. Hematol.* **30**, 536–542 (2008)

-Eilertsen, H., Henriksson, C. E. & Hagve, T.-A. The use of CellaVision™ DM96 in the verification of the presence of blasts in samples flagged by the Sysmex XE-5000. *Int. J. Lab. Hematol.* **39**, 423–428 (2017)

-Eilertsen, H., Saether, PC., Henriksson, CE., Petersen, AS., Hagve, TA. Evaluation of the detection of blasts by Sysmex hematology instruments, Cellavision DM96, and manual microscopy using flow cytometry as the confirmatory method. *Int. J. Lab. Hematol.* **11** (2019)

**INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :**

Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	
$u(C) = \sqrt{u^2(CIQ) + u^2(EEQ)}$	$u(C) = \sqrt{\left(\frac{CV \times m}{100}\right)^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$
Quantification de l'incertitude (polynucléaires neutrophiles) :	61.7 % ± <b>15.93%</b>
Quantification de l'incertitude (polynucléaires éosinophiles) :	4.12 % ± <b>59.93%</b>
Quantification de l'incertitude (polynucléaires basophiles) :	1.46 % ± <b>116,32%</b>
Quantification de l'incertitude (lymphocytes) :	25.38 % ± <b>32.58%</b>
Quantification de l'incertitude (monocytes) :	7.30 % ± <b>51.43%</b>

Argumentaire de la conclusion : **Il n'y pas de limites d'acceptabilité pour l'incertitude de mesure dans la littérature à notre connaissance. Elle est calculée à titre informatif et pour servir de base de comparaison pour les prochaines évaluations.**

**LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
**(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)**  
 Applicable  ; non applicable

**Limite de détection :**

0%

Argumentaire de la conclusion : **Non applicable, pourcentages rendus entre 0 et 100%**

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>					
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>		Méthode automatisée			
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en back-up :</b>		Automate XN versus opérateur au microscope manuel versus microscope automatique Frottis manuel versus frottis fait par Hemaprep versus frottis fait par SP-10			
<b>Nombre de mesures :</b>		34 frottis sanguins			
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>		Frottis sanguins normaux pour pouvoir comparer avec la formule automatisée			
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>		Analyse des discordances avec la table de Rümke extrapolée			
<b>Equation de la droite de régression :</b>		NA			
<b>Exploitation des résultats de comparaison (diagramme de différences, concordance catégorielle) :</b>		Absence de discordances significatives sur lames normales (plus de 80% de conformité pour chaque catégorie cellulaire) pour les frottis étalés au SP passés au DM			
<b>Hemaprep/DM</b>	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte
% Acceptable	73,5	100	100	64,7	88,2
	Non Acceptable	Acceptable	Acceptable	Non Acceptable	Acceptable
<b>Manuel/DM</b>	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte
% Acceptable	64,7	90,9	97,1	79,4	64,7
	Non Acceptable	Acceptable	Acceptable	Non Acceptable	Non Acceptable
<b>SP/DM</b>	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte
% Acceptable	82,4	96,9	100	85,3	82,4
	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable

Argumentaire de la conclusion : Conformité des résultats du microscope automatique pour les frottis étalés par le SP-10. Décision de ne pas passer sur le microscope automatique des frottis manuels ou étalés par l'Hemaprep.

<b>ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>		
<b>Limite de détection :</b>		-
<b>Limite de quantification :</b>		-
<b>Limite supérieure de linéarité :</b>		-

Argumentaire de la conclusion : Non applicable, pourcentages rendus entre 0 et 100%

<b>INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Hémolyse</b>	-
<b>Turbidité</b>	
<b>Bilirubine, ictère</b>	
<b>Médicaments</b>	
<b>...</b>	

Argumentaire de la conclusion : Non applicable pour cette technique

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par</b>	-

<b>exemple Ag HBS, <math>\beta</math>HCG, ...)</b> :	
<b>Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...)</b> :	-

Argumentaire de la conclusion : Etalement avec automate utilisé en portée A ; Réactifs de coloration utilisés en portée A selon les recommandations fournisseur ; Lecture automatique du nom par code-barre, connexion bidirectionnelle avec transmission automatique entre le microscope automatisé et le logiciel informatique. Pas de risque de contamination avec cette méthode automatisée.

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> <b>(étude expérimentale indispensable en portée B)</b> <b>(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)</b> <b>Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/></b>	
<b>Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)</b>	-
<b>Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...</b>	-

Argumentaire de la conclusion : Réactifs utilisés en portée A selon les recommandations fournisseur. Etude non pertinente. En cas de problème exceptionnel de réactif, cela se verra immédiatement sur les premiers frottis et lors du test de localisation cellulaire réalisé journalièrement.

<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> <b>Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/></b>	
<b>Valeurs de référence</b>	Cf. DE-PTH-MS-HEMA-001 « Valeurs de référence hématologie automatisée »

Argumentaire de la conclusion : Pour les cellules normales du sang, normes de référence identiques à celles de la formule automatisée. Concernant les cellules anormales, quelle que soit la pathologie potentiellement associée, le laboratoire n'indique pas d'intervalle de référence sur les comptes rendus en regard des valeurs rendues. L'interprétation et la signification clinico-biologique sont établies sous forme de commentaires et de prestation de conseil post-analytique.

<b>DECLARATION d'APTITUDE</b>	
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du 01/04/2014	
Autorisée par : Dubois Frédérique	

**Copie de Formulaire Final**

QUESTIONS RÉPONSES

Rubrique 1 sur 5

## Microscope automatisé

Etat des lieux des pratiques d'utilisation des microscopes automatisés en France, durée du questionnaire ~ 5 min.  
Merci !

1) Quel type de microscope automatisé utilisez-vous :

- DM8 Cellavision
- DM96 Cellavision
- DM1200 Cellavision
- DI60 Cellavision
- Pro 8 Menarini

---

2) Depuis combien de temps utilisez-vous un microscope automatisé ?

- <1 an
- 1-3 ans
- 3-5 ans
- >5 ans

3) Comment sont étalés les frottis que vous passez sur le microscope automatisé ?

- Frottis automatisés
- Frottis manuels
- Les deux

4) Si étalement automatisé : quel est le nom de l'étaleur utilisé ?

Réponse courte

5) Les frottis sanguins réalisés passent-ils tous sur le microscope automatisé ?

- Oui
- Non

6) Sinon, lesquels ne sont pas passés ?

- Thrombopénie
- Alarme « blastes »
- Neutropénie non connue
- Etalements manuels
- Autre...

7) Votre microscope automatisé fonctionne :

- 24h/24h
- 7j/7j
- 5j/7j
- En journée uniquement (éteint la nuit )
- Autre...

---

8) Environ combien de lames/jour sont lues par le microscope automatisé ?

Réponse courte

9) Qui lit les lames sur microscope automatisé :

- Techniciens
- Biologistes
- Internes

10) Une fois que vous avez reclassé manuellement les cellules, vous arrive-t-il de rendre au prescripteur la formule du microscope automatisé ?

Oui

Non

11) Si oui, pour les lames passées au microscope automatisé, environ quel pourcentage rendez-vous la formule automatisée?

Réponse courte

12) Pour les lames passées sur le microscope automatisé, quel est le taux de reprise au microscope ?

Moins de 15%

Entre 15 et 30%

Entre 30 et 50%

Plus de 50%

Je ne sais pas

13) Saviez-vous qu'il était possible de régler le nombre de globules blancs comptés sur le microscope automatisé ?

Oui

Non

14) Sur combien de globules blancs est habituellement réglé votre microscope automatisé ?

Nombre fixe quelle que soit la lame

Nombre variable selon l'alarme

100

150

300

400

Autre...

15) Si le compte est variable selon l'alarme, merci de préciser selon quel algorithme :

Réponse longue

16) Savez-vous qu'il existe une application pour une caractérisation plus complète des érythrocytes (RBC Advanced Application) ?

Oui, je l'ai

Oui, mais je ne l'ai pas

Non

17) Utilisez-vous le module de pré-caractérisation des érythrocytes (simple ou Advanced) ?

- Oui tout le temps
- Oui parfois (préciser en "autre" dans quels cas)
- Non
- Autre...

18) Envoyez-vous la caractérisation des érythrocytes faite par le microscope automatisé sur votre SIL ?

- Oui tout le temps
- Oui parfois
- Non

19) Utilisez-vous le module d'estimation des plaquettes ?

- Oui tout le temps
- Oui parfois (préciser en "autre" dans quels cas)
- Non
- Autre...

20) Savez-vous qu'il existe une application pour la lecture des liquides biologiques ?

- Oui, je l'ai
- Oui, mais je ne l'ai pas
- Non

21) Sur votre site, combien de licences déportées (en plus du PC du microscope automatisé) avez-vous pour prendre la main sur les images du DM ?

Réponse courte

22) Sur votre site, combien avez-vous de microscopes automatisés ?

Réponse courte

23) Vos microscopes automatisés sont-ils connectés en réseau permettant ainsi de prendre la main à distance sur les photos des cellules d'un patient ?

- Oui
- Non
- Je travaille sur un site unique

24) Si oui, vous arrive-t-il de consulter des patients et/ou de valider des dossiers à distance?

- Oui, souvent
- Oui, parfois
- Rarement
- Jamais
- Je ne suis pas concerné par cette question
- Autre...

## Contrôles de qualité

1) Passez vous des EEQ sur le microscope automatisé?

Oui

Non

2) Faites vous un test de localisation cellulaire journalier ?

Oui

Non

3) Passez vous d'autres CIQ sur le microscope automatisé ?

Oui

Non

4) Si oui, quels CIQ passez-vous et comment les validez-vous?

Réponse longue

5) Avez-vous accrédité la formule sanguine dans votre laboratoire ?

- Oui
- Non
- En cours

6) Avez-vous fait un dossier de validation des méthodes spécifique (ou sous-processus) pour votre microscope automatisé ?

- Oui
- Non
- En cours

7) Avez-vous déjà eu des écarts concernant votre microscope automatisé? Si oui, lesquels?

Réponse longue

Rubrique 3 sur 5



Avantages du microscope automatisé, amélioration des conditions de travail : êtes vous d'accord avec les affirmations suivantes ?

1) L'utilisation du microscope automatisé engendre moins de fatigue oculaire :

- Oui
- Non

2) L'utilisation du microscope automatisé engendre moins de fatigue générale :

Oui

Non

3) Le microscope automatisé permet de se concentrer plus facilement sur des images numérisées :

Oui

Non

4) Les résultats sont rendus plus rapidement avec l'utilisation du microscope automatisé :

Oui

Non

5) Si oui, avez-vous évalué le gain de temps imputable à l'utilisation du microscope automatisé ?

Oui, précisez dans "autre"

Non

Autre...

6) Le microscope automatisé permet une meilleure comparaison des cellules entre elles :

Oui

Non

7) Les cellules anormales sont reconnues plus facilement avec le microscope automatisé :

Oui

Non

8) Le microscope automatisé permet d' améliorer la formation du personnel :

Oui pour la formation initiale

Oui pour la formation continue

Non

9) Si oui, l'amélioration de la formation concerne plutôt :

Les hémopathies lymphoïdes

Les hémopathies myéloïdes

Les anomalies des rouges

Autre...

10) Vous servez-vous du microscope automatisé pour faire le maintien des compétences du personnel?

Oui

Non

11) Le microscope automatisé permet une standardisation des résultats (avec visualisation rapide des tris précédents par exemple) :

Oui

Non

12) Le microscope automatisé permet une traçabilité complète (nom du valideur, images sauvegardées) :

Oui

Non

13) Le microscope automatisé permet une diminution du risque d'erreur d'identité (connexion bidirectionnelle, lecture automatique de l'identité) :

Oui

Non

14) Le microscope automatisé permet un gain de temps lors de la validation biologique avec reprise rapide des images sur microscope automatisé :

Oui

Non

15) Voyez vous d'autres avantages au microscope automatique ?

Réponse longue

## Inconvénients

1) La pré-classification des cellules par le microscope automatisé est-elle source d'erreur pour la reclassification ?

Oui

Non

2) Concernant les photos des cellules prises par le microscope automatisé, vous les trouvez :

De très bonne qualité

De bonne qualité

De qualité moyenne

De mauvaise qualité

Les couleurs peuvent être source d'erreur

Autre...

3) Il n'est pas toujours facile de s'adapter aux images numériques :

Oui

Non

4) Certaines personnes refusent de se servir du microscope automatisé au laboratoire :

Oui

Non

5) Les personnes formées initialement sur le microscope automatisé sont moins efficaces sur le microscope manuel :

Oui

Non

6) La morphologie des érythrocytes est plus difficile à évaluer sur le microscope automatisé que sur microscope manuel :

Oui

Non

7) Les microscopes automatisés sont moins bien adaptés aux recherches d'amas plaquettaires :

Oui

Non

8) Les microscopes automatisés sous-estiment les monocytes et autres grosses cellules type blaste :

Oui

Non

9) On voit moins bien les villosités des cellules lymphoïdes (tricholeucocytes/lymphocytes villeux) avec le microscope automatisé qu'avec le microscope manuel :

Oui

Non

10) Les lymphopathies au diagnostic sont reprises sur lame :

- Toujours
- Souvent
- Parfois
- Rarement
- Jamais

11) Les leucémies aigües au diagnostic sont reprises sur lame :

- Toujours
- Souvent
- Parfois
- Rarement
- Jamais

12) Votre microscope automatisé tombe en panne :

- < 5 fois/an
- Entre 5 et 10 fois/an
- >10 fois/an

13) Voyez vous d'autres inconvénients au microscope automatique ?

Réponse longue

## Conclusion

Description (facultative)

1) Actuellement combien de temps gardez-vous vos frottis sanguins ?

Réponse courte

2) Combien de temps gardez-vous les images du DM ?

Réponse courte

3) Regrettez-vous votre investissement ?

Oui

Non

4) Si oui, pour quelles raisons :

Réponse courte

5) Votre laboratoire fait partie de:

- CHU
- CH
- EFS
- Laboratoire privé
- Autre...

6) Si vous désirez recevoir un compte-rendu de cette enquête, merci de donner vos coordonnées (nom, prénom, téléphone, mail...)

Réponse longue

7) Merci de votre participation! Avez-vous des compléments à apporter, des questions?

Réponse longue

## MICROSCOPES AUTOMATISES EN HEMATOLOGIE :

Validation des performances du DM1200 (CellaVision®) au CHU de Toulouse et état des lieux des pratiques d'utilisation en France en 2018.

---

Les microscopes automatisés sont de plus en plus répandus dans les laboratoires d'hématologie

**Objectif :** enquête sur les pratiques d'utilisation, les avantages et inconvénients du microscope automatisé en France.

**Méthode :** diffusion d'un questionnaire auprès des laboratoires publics et privés.

**Résultats :** sur 118 réponses, l'étude montre un fort taux d'accord sur les avantages : traçabilité (95.7%), formation du personnel (94.1%), diminution de la fatigue oculaire (91.4%) et du risque d'erreur (87,2%), gain de temps (83,6%). Parmi les inconvénients, les taux d'accord sont plus faibles : adaptation aux images numériques (61.2%), évaluation difficile des morphologies atypiques (49.6%) ou de la morphologie des GR (49.6%).

**Conclusion :** malgré des avantages bien établis, une standardisation des pratiques et une amélioration technique restent encore nécessaires.

---

Automated microscopes are becoming more prevalent in hematology laboratories

**Aims:** to investigate the practices of use, advantages and limits of digital automated microscopes in France.

**Methods:** questionnaire sent by mail to public and private laboratories.

**Results:** out of 118 responses, the study reports a high rate of agreement for these benefits: traceability (95.7%), staff training (94.1%), eye strain (91.4%), risk of error (87.2%), time saving (83.6%). Among the disadvantages, the agreement rates are lower: adaptation to digital images (61.2%), difficult assessment of atypical morphologies (49.6%) or RBC morphology (49.6%).

**Conclusion:** despite well-established benefits, standardization of practices and technical improvement are still needed.

---

**DISCIPLINE administrative :** Pharmacie

---

**MOTS-CLES :** Hématologie / Microscopes automatisés / Images numériques / Formule sanguine

---

Université Toulouse III - Paul Sabatier - Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
35 chemin des maraîchers  
31062 Toulouse Cedex 4

**Directeur de thèse :** DUBOIS Frédérique