

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉ DE SANTÉ

ANNÉE 2024

2024 TOU3 1532

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Sami ZOUITINA

le 22 avril 2024

Comparaison de méthodes pour le compte des schizocytes sur frottis sanguin entre le module érythrocytaire du logiciel CellaVision®, le protocole de Rodez par utilisation du module des plaquettes du logiciel CellaVision® et la méthode de référence par microscopie optique

Directrice de thèse : Dr Frédérique DUBOIS

JURY

Monsieur le Professeur Dominique CHAUVEAU

Président

Monsieur le Professeur Éric DELABESSE

Assesseur

Madame le Docteur Frédérique DUBOIS

Assesseur

Madame le Docteur Sophie VOISIN

Assesseur

Madame le Docteur Agnès RIBES

Suppléant

Département Médecine, Maïeutique et Paramédical
Tableau du personnel hospitalo-universitaire de médecine
2022-2023
Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. GHISOLFI Jacques
Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. GLOCK Yves
Doyen Honoraire	M. VINEL Jean-Pierre	Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis M.
Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel	Professeur Honoraire	GRAND Alain
Professeur Honoraire	M. ADER Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. ADOUE Daniel	Professeur Honoraire	M. JOFFRE Francis
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe	Professeur Honoraire	M. LANG Thierry
Professeur Honoraire	M. ARLET-SUAU Elisabeth	Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche
Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. LAROCHE Michel
Professeur Honoraire	M. ATTAL Michel	Professeur Honoraire	M. LAUQUE Dominique
Professeur Honoraire	M. BARRET André	Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul
Professeur Honoraire	M. BLANCHER Antoine	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. BOCCALON Henri	Professeur Honoraire	M. MALECAZE François
Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. MANELFE Claude
Professeur Honoraire	M. BONEU Bernard	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. BONNEVIALLE Paul	Professeur Honoraire	M. MARCHOU Bruno
Professeur Honoraire	M. BOSSAVY Jean-Pierre	Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. BOUTAULT Franck	Professeur Honoraire	M. MAZIERES Bernard
Professeur Honoraire Associé	M. BROS Bernard	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland	Professeur Honoraire	M. MONTASTRUC Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BUJAN Louis	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe	Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire	M. CALVAS Patrick	Professeur Honoraire associé	M. NICODEME Robert
Professeur Honoraire	M. CARATERO Claude	Professeur Honoraire	M. OLIVES Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre	Professeur Honoraire	M. PARINAUD Jean
Professeur Honoraire	M. CARON Philippe	Professeur Honoraire	M. PASCAL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PERRET Bertrand
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. CHABANON Gérard	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER Georges
Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. CHIRON Philippe	Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques
Professeur Honoraire	M. CLANET Michel	Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline
Professeur Honoraire	M. CONTE Jean	Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA Michel	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. RAILHAC Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. DABERNAT Henri	Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude
Professeur Honoraire	M. DAHAN Marcel	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. RISCHMANN Pascal
Professeur Honoraire	M. DALY-SCHWEITZER Nicolas	Professeur Honoraire	M. RIVIERE Daniel
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. ROCHE Henri
Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges	Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre
Professeur Honoraire	Mme DELISLE Marie-Bernadette	Professeur Honoraire	M. ROLLAND Michel
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique	Professeur Honoraire	M. SARRAMON Jean-Pierre
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. SCHMITT Laurent
Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean	Professeur Honoraire	M. SERRE Guy
Professeur Honoraire	M. ESQUERRE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. SIMON Jacques
Professeur Honoraire	M. FABÍÉ Michel	Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard	Professeur Honoraire	M. TREMOULET Michel
Professeur Honoraire	M. FOURNIE Bernard	Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre
Professeur Honoraire	M. FORTANIER Gilles	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques	Professeur Honoraire	M. VOIGT Jean-Jacques

Professeurs Emérites

Professeur BUJAN Louis	Professeur MAGNAVAL Jean-François	Professeur VINEL Jean-Pierre
Professeur CHAP Hugues	Professeur MARCHOU Bruno	
Professeur FRAYSSE Bernard	Professeur MONTASTRUC Jean-Louis	
Professeur LANG Thierry	Professeur PERRET Bertrand	
Professeur LAROCHE Michel	Professeur ROQUES LATRILLE Christian	
Professeur LAUQUE Dominique	Professeur SERRE Guy	

M. ACAR Philippe	Pédiatrie	M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. ACCADBLE Franck (C.E)	Chirurgie Infantile	M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine d'Urgence
M. ALRIC Laurent (C.E)	Médecine Interne	Mme LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. AMAR Jacques (C.E)	Thérapeutique	M. LAUWERS Frédéric	Chirurgie maxillo-faciale
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie, Santé publique	M. LE CAIGNEC Cédric	Génétique
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie	M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. ARNAL Jean-François (C.E)	Physiologie	M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. AUSSEIL Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire	M. MALAUDAUD Bernard (C.E)	Urologie
M. AVET-LOISEAU Hervé (C.E)	Hématologie, transfusion	M. MANSAT Pierre (C.E)	Chirurgie Orthopédique
M. BERRY Antoine	Parasitologie	M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique	M. MARQUE Philippe (C.E)	Médecine Physique et Réadaptation
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. BONNEVILLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique	M. MAURY Jean-Philippe (C.E)	Cardiologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie	Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul	M. MAZIERES Julien (C.E)	Pneumologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
Mme BURA-RIVIERE Alessandra (C.E)	Médecine Vasculaire	M. MOLINIER Laurent (C.E)	Epidémiologie, Santé Publique
M. BUREAU Christophe	Hépatogastro-Entérologie	Mme MOYAL Elisabeth (C.E)	Cancérologie
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépatogastro-Entérologie	M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie	Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. OSWALD Eric (C.E)	Bactériologie-Virologie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie	M. PAGES Jean-Christophe	Biologie cellulaire
Mme CHANTALAT Elodie	Anatomie	M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
Mme CHARPENTIER Sandrine (C.E)	Médecine d'urgence	M. PAUL Carle (C.E)	Dermatologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire	M. PAYOUX Pierre (C.E)	Biophysique
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. PAYRASTRE Bernard (C.E)	Hématologie
M. CHAYNES Patrick	Anatomie	M. PERON Jean-Marie (C.E)	Hépatogastro-Entérologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	Mme PERROT Aurore	Physiologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie	M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie
M. COURBON Frédéric (C.E)	Biophysique	Mme RAUZY Odile	Médecine Interne
Mme COURTADE SAIDI Monique (C.E)	Histologie Embryologie	M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. DAMBRIN Camille	Chir. Thoracique et Cardiovasculaire	M. RECHER Christian(C.E)	Hématologie
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.	M. RITZ Patrick (C.E)	Nutrition
M. DEGUINE Olivier (C.E)	Oto-rhino-laryngologie	M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. DELABESSE Eric	Hématologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses	M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. DELORD Jean-Pierre (C.E)	Cancérologie	M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie	M. SAILLER Laurent (C.E)	Médecine Interne
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. SALES DE GAUZY Jérôme (C.E)	Chirurgie Infantile
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice (C.E)	Thérapeutique	M. SALLES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie	M. SANS Nicolas	Radiologie
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie	Mme SELVES Janick (C.E)	Anatomie et cytologie pathologiques
M. FERRIERES Jean (C.E)	Epidémiologie, Santé Publique	M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. FOURCADE Olivier (C.E)	Anesthésiologie	M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophtalmologie	M. SIZUN Jacques (C.E)	Pédiatrie
M. GALINIER Michel (C.E)	Cardiologie	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. GAME Xavier (C.E)	Urologie	M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie, Santé publique	Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation	M. SOULAT Jean-Marc (C.E)	Médecine du Travail
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel (C.E)	Anatomie Pathologique	M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. GOURDY Pierre (C.E)	Endocrinologie	M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis (C.E)	Chirurgie plastique	Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie	M. TELMON Norbert (C.E)	Médecine Légale
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie	Mme TREMOLLIÈRES Florence	Biologie du développement
M. HUYGHE Eric	Urologie	Mme URO-COSTE Emmanuelle (C.E)	Anatomie Pathologique
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. VAYSSIERE Christophe (C.E)	Gynécologie Obstétrique
M. KAMAR Nassim (C.E)	Néphrologie	M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie
Mme LAMANT Laurence (C.E)	Anatomie Pathologique	M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. LANGIN Dominique (C.E)	Nutrition		
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie		

P.U. Médecine générale

Mme DUPOUY Julie
M. OUSTRIC Stéphane (C.E)
Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve

M. ABBO Olivier
 Mme BONGARD Vanina
 M. BOUNES Vincent
 Mme BOURNET Barbara
 Mme CASPER Charlotte
 M. CAVAIAGNAC Etienne
 M. CHAPUT Benoit
 M. COGNARD Christophe
 Mme CORRE Jill
 Mme DALENC Florence
 M. DE BONNECAZE Guillaume
 M. DECRAMER Stéphane
 Mme DUPRET-BORIES Agnès
 M. EDOUARD Thomas
 M. FAGUER Stanislas
 Mme FARUCH BILFELD Marie
 M. FRANCHITTO Nicolas
 M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio
 Mme GASCOIN Géraldine
 M. GUIBERT Nicolas
 M. GUILLEMINAULT Laurent
 M. HERIN Fabrice
 M. LAIREZ Olivier
 M. LEANDRI Roger
 M. LOPEZ Raphael
 M. MARTIN-BLONDEL Guillaume
 Mme MARTINEZ Alejandra
 M. MARX Mathieu
 M. MEYER Nicolas
 Mme MOKRANE Fatima
 Mme PASQUET Marlène
 M. PIAU Antoine
 M. PORTIER Guillaume
 M. PUGNET Grégory
 M. REINA Nicolas
 M. RENAUDINEAU Yves
 Mme RUYSSSEN-WITRAND Adeline
 Mme SAVAGNER Frédérique
 M. SAVALL Frédéric
 M. SILVA SIFONTES Stein
 Mme SOMMET Agnès
 M. TACK Ivan
 Mme VAYSSE Charlotte
 Mme VEZZOSI Delphine
 M. YRONDI Antoine
 M. YSEBAERT Loic

Chirurgie infantile
 Epidémiologie, Santé publique
 Médecine d'urgence
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Chirurgie orthopédique et traumatologie
 Chirurgie plastique
 Radiologie
 Hématologie
 Cancérologie
 Anatomie
 Pédiatrie
 Oto-rhino-laryngologie
 Pédiatrie
 Néphrologie
 Radiologie et imagerie médicale
 Addictologie
 Chirurgie Plastique
 Pédiatrie
 Pneumologie
 Pneumologie
 Médecine et santé au travail
 Biophysique et médecine nucléaire
 Biologie du dével. et de la reproduction
 Anatomie
 Maladies infectieuses, maladies tropicales
 Gynécologie
 Oto-rhino-laryngologie
 Dermatologie
 Radiologie et imagerie médicale
 Pédiatrie
 Médecine interne
 Chirurgie Digestive
 Médecine interne
 Chirurgie orthopédique et traumatologique
 Immunologie
 Rhumatologie
 Biochimie et biologie moléculaire
 Médecine légale
 Réanimation
 Pharmacologie
 Physiologie
 Cancérologie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Hématologie

Professeur Associé de Médecine Générale

M. ABITTEBOUL Yves
 M. BIREBENT Jordan
 M. BOYER Pierre
 Mme FREYENS Anne
 Mme IRI-DELAHAYE Motoko
 M. POUTRAIN Jean-Christophe
 M. STILLMUNKES André

Mme ABRAVANEL Florence
 M. APOIL Pol Andre
 Mme ARNAUD Catherine
 Mme AUSSEIL-TRUDEL Stéphanie
 Mme BASSET Céline
 Mme BELLIERES-FABRE Julie
 Mme BERTOLI Sarah
 M. BIETH Eric
 Mme BOUNES Fanny
 Mme BREHIN Camille
 M. BUSCAIL Etienne
 Mme CAMARE Caroline
 Mme CANTERO Anne-Valérie
 Mme CARFAGNA Luana

Bactériologie Virologie Hygiène
 Immunologie
 Epidémiologie
 Biochimie
 Cytologie et histologie
 Néphrologie
 Hématologie, transfusion
 Génétique
 Anesthésie-Réanimation
 Pneumologie
 Chirurgie viscérale et digestive
 Biochimie et biologie moléculaire
 Biochimie
 Pédiatrie

Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie
 Mme CASSAGNE Myriam
 Mme CASSAING Sophie
 Mme CASSOL Emmanuelle
 M. CHASSAING Nicolas
 M. CLAVEL Cyril
 Mme COLOMBAT Magali
 M. COMONT Thibault
 M. CONGY Nicolas
 Mme COURBON Christine
 M. CUROT Jonathan
 Mme DAMASE Christine
 Mme DE GLISEZINSKY Isabelle
 M. DEDOUIT Fabrice
 M. DEGBOE Yannick
 M. DELMAS Clément
 M. DELPLA Pierre-André
 M. DESPAS Fabien
 M. DUBOIS Damien
 Mme ESQUIROL Yolande
 Mme FILLAUX Judith
 Mme FLOCH Pauline
 Mme GALINIER Anne
 M. GANDET Pierre
 M. GASQ David
 M. GATIMEL Nicolas

Nutrition
 Ophtalmologie
 Parasitologie
 Biophysique
 Génétique
 Biologie Cellulaire
 Anatomie et cytologie pathologiques
 Médecine interne
 Immunologie
 Pharmacologie
 Neurologie
 Pharmacologie
 Physiologie
 Médecine Légale
 Rhumatologie
 Cardiologie
 Médecine Légale
 Pharmacologie
 Bactériologie Virologie Hygiène
 Médecine du travail
 Parasitologie
 Bactériologie-Virologie
 Nutrition
 Biophysique
 Physiologie
 Médecine de la reproduction

Mme GENNERO Isabelle
 Mme GENOUX Annelise
 Mme GRARE Marion
 M. GUERBY Paul
 Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline
 Mme GUYONNET Sophie
 M. HAMDY Safouane
 Mme HITZEL Anne
 M. IRIART Xavier
 Mme JONCA Nathalie
 M. LAPEBIE François-Xavier
 Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse
 M. LEPAGE Benoit
 M. LHERMUSIER Thibault

M. LHOMME Sébastien
 Mme MASSIP Clémence
 Mme MAUPAS SCHWALM Française
 Mme MONTASTIER Emilie
 M. MONTASTRUC François
 Mme MOREAU Jessika
 Mme MOREAU Marion
 M. MOULIS Guillaume
 Mme NOGUEIRA Maria Léonor
 Mme PERICART Sarah
 M. PILLARD Fabien
 Mme PLAISANCIE Julie
 Mme PUISSANT Bénédicte
 Mme QUELVEN Isabelle
 Mme RAYMOND Stéphanie
 M. REVET Alexis
 Mme RIBES-MAUREL Agnès
 Mme SABOURDY Frédérique
 Mme SALLES Juliette
 Mme SAUNE Karine
 Mme SIEGFRIED Aurore
 M. TREINER Emmanuel
 Mme VALLET Marion
 M. VERGEZ François
 Mme VIJA Lavinia

Biochimie
 Biochimie et biologie moléculaire
 Bactériologie Virologie Hygiène
 Gynécologie-Obstétrique
 Anatomie Pathologique
 Nutrition
 Biochimie
 Biophysique
 Parasitologie et mycologie
 Biologie cellulaire
 Chirurgie vasculaire
 Pharmacologie
 Biostatistiques et Informatique
 médicale
 Cardiologie
 Bactériologie-virologie
 Bactériologie-virologie
 Biochimie
 Nutrition
 Pharmacologie
 Biologie du dév. Et de la reproduction
 Physiologie
 Médecine interne
 Biologie Cellulaire
 Anatomie et cytologie pathologiques
 Physiologie
 Génétique
 Immunologie
 Biophysique et médecine nucléaire
 Bactériologie Virologie Hygiène
 Pédo-psychiatrie
 Hématologie
 Biochimie
 Psychiatrie adultes/Addictologie
 Bactériologie Virologie
 Anatomie et cytologie pathologiques
 Immunologie
 Physiologie
 Hématologie
 Biophysique et médecine nucléaire

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
 M. CHICOULAA Bruno
 M. ESCOURROU Emile

Maîtres de Conférence Associés

M.C.A. Médecine Générale

Mme BOURGEOIS Odile
 Mme BOUSSIER Nathalie
 Mme DURRIEU Florence M. GACHIES Hervé Mme LATROUS Leila
 M. PIPONNIER David
 Mme PUECH Marielle

Serment d'Hippocrate

« Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences.

Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque. »

Remerciements

À Monsieur le **Professeur Dominique CHAUVEAU**, président du jury, je suis honoré que vous présidiez cette thèse. Vous avez toute ma gratitude pour votre présence en ce jour si important pour moi.

À ma directrice de thèse, Madame le **Docteur Frédérique DUBOIS**, merci infiniment pour m'avoir accompagné tout au long de cette thèse, merci d'avoir été disponible pour répondre à mes nombreuses questions et de m'avoir permis de participer au congrès de la SFH.

À Monsieur le **Professeur Éric DELABESSE**, merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury.

À Madame le **Docteur Sophie VOISIN**, merci pour tes conseils précieux concernant la préparation de cette soutenance, ainsi que pour ta formation à l'hémostase lors de mon niveau 1 et lors de mes gardes.

À Madame le **Docteur Agnès RIBES**, c'est un honneur pour moi que tu sièges dans mon jury de thèse. Merci pour ta bienveillance tout au long de mon stage d'hématologie et par la suite. Je suis reconnaissant pour ta présence et pour l'intérêt que tu portes à mon travail.

À **mes parents** Madame **Monique ZOUITINA** et Monsieur **Mohamed ZOUITINA**, merci de m'avoir aidé, encouragé et supporté tout au long de mon cursus. Il est clair que sans vous je n'aurais jamais pu réussir dans mes études.

À **ma compagne** Madame **Laure LAFOREST**, tu a su m'encourager et m'aider énormément, on partage tout ; passions et rêves futurs. J'ai hâte que l'on parte ensemble, vers de nouveaux horizons à Millau. Ça va être le début d'une nouvelle vie, qui s'annonce incroyable !

À Monsieur **Benjamin TROUCHE-ÉSTIVALE**, merci pour tous ces enseignements en hématologie. Merci de m'avoir pris sous ton aile lors de mon arrivée en Biologie Médicale après mon droit au remord. Merci pour ton aide concernant les statistiques. Tu es quelqu'un de vraiment génial.

À Monsieur **Dorian LOUBET**, merci pour tes enseignements, ce coup-ci en Bactériologie mais aussi au baby-foot. Toujours de bonne humeur, t'es vraiment TOP.

À Monsieur **Nicolas LAFFONT**, merci pour ta gentillesse et ton calme. Toujours détendu même en niveau 1 de bactériologie. Si je ne peux pas rester à Millau, ça serait un honneur d'être ton interne à Rodez.

À Monsieur **Louis CARRÉ**, merci de m'avoir fait passer les moments les plus drôle de mon internat au laboratoire. Change rien t'es parfait.

À Monsieur **Angelo FAGET**, merci pour tes conseils avisés quant aux statistiques ainsi que tes conseils de numéro 1 au congrès des internes pour améliorer mes capacités oratoires.

À Madame **Ondine PEREZ**, merci d'avoir étudié le SHU avec moi, je te souhaite une bonne continuation dans ton internat de Biologie Médicale.

À mes chefs en Bactériologie, plus précisément à **Professeur Damien DUBOIS**, **Docteur Pauline FLOCH**, **Docteur Camille CHAGNEAU** et **Docteur Clémence MASSIP**, merci pour ce dernier stage au CHU, merci de m'avoir octroyé du temps et d'avoir facilité mon travail de thèse.

À mes autres co-internes **Émilie THÈNE**, **Yoann FLUHR**, **Guillaume LABARTHE**, **Pauline NEGRE**, **Vallauris MESLE**, **Rima CHATILLA**, **Clément BURGY**, **Ophélie VIENET**, **Alexandre STAMBOULI**, **Marion GARCIA**, **Justine MADAULE**, **Aurore GUILLEBASTRE**, **Emma JONCOUR**, **Julien LEMAITRE** et **Pauline SOTTIL**, merci à vous tous pour m'avoir fait passer de supers moments en Biologie Médicale.

Comparaison de méthodes pour le compte des schizocytes sur frottis sanguin entre le module érythrocytaire du logiciel CellaVision®, le protocole de Rodez par utilisation du module des plaquettes du logiciel CellaVision® et la méthode de référence par microscopie optique

Sommaire

1. Introduction	3
2. Intérêt de la recherche des schizocytes	5
2.1. Etiologie des schizocytes	5
2.2. Microangiopathies thrombotiques.....	8
2.3. Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)	9
2.3.1. Le purpura thrombotique thrombocytopénique auto-immun (PTTi)	12
2.3.2. Le Purpura thrombotique thrombocytopénique congénital (PTTc).....	16
2.4. Les syndromes hémolytiques et urémiques	18
2.4.1. Le SHU dit typique à <i>Escherichia coli</i> producteur de Shiga-toxine	20
2.4.2. Le syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa).....	27
3. Matériel et méthode	33
3.1. Étaleur et colorateur SP-50® de marque Sysmex®.....	33
3.2. Microscope automatisé DM-1200® de marque CellaVision®	34
3.3. Compte des schizocytes par microscopie optique	34
3.4. Compte des schizocytes par utilisation du module érythrocytaire du logiciel CellaVision®..	37
3.5. Compte des schizocytes par utilisation du module des plaquettes du logiciel CellaVision® via le protocole du laboratoire du centre hospitalier de Rodez	40
3.6. Méthodes	41
4. Résultats.....	44
4.1. Evaluation du module érythrocytaire et erreurs de l'intelligence artificielle	44
4.1.1. Comparaison des valeurs obtenues par le module érythrocytaire entre la pré- classification et la post classification	44
4.1.2. Comparaison du nombre de modifications effectuées entre la pré-classification et la post classification.	47
4.1.3. Analyse de l'impact des erreurs de classement du module érythrocytaire sur les comptes des schizocytes (plaquettes mal classées, schizocytes artéfactuel).....	48
4.1.4. Analyse du nombre d'érythrocytes exclus du compte des érythrocytes totaux par le module érythrocytaire	50
4.1.5. Analyse de la sensibilité et spécificité du compte obtenu par le module érythrocytaire en pré classification et en post classification.....	53
4.2. Comparaison des différentes méthodes de compte des schizocytes	55
4.2.1. Comparaison des temps d'analyses entre les différentes méthodes	55
4.2.2. Analyse de la reproductibilité des comptes pour le module érythrocytaire en post- classification et pour le protocole de Rodez	57
4.2.3. Comparaison des valeurs obtenues via les différentes méthodes	58
5. Discussion	61
6. Conclusion.....	66
Bibliographie	69
ANNEXE	72

1. Introduction

Les **schizocytes** sont des **hématies fragmentées** circulantes[1] présentant des formes variées dont la détection repose sur l'analyse d'un frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa (MGG).

La recherche et le décompte des schizocytes sur un frottis sanguin est un examen **fréquent** en laboratoire d'hématologie.

Ils peuvent avoir la forme de fragments aux angles vifs et aux bordures droites, de petits croissants, de cellules en casque, ou de microsphérocytes et sont toujours **plus petits que les globules rouges normaux**. [2].

Ils sont une des conséquences d'une **hémolyse mécanique** et ils peuvent être retrouvés lors des **microangiopathies thrombotiques** (MAT), pathologies graves pouvant engager le pronostic vital. La recherche de schizocytes est un examen clé pour affirmer un diagnostic de MAT. Ils peuvent être augmentés dans d'autres situations, parfois même de manière physiologique. Nous aborderons ces situations dans le prochain chapitre.

Que ce soit une découverte fortuite ou un examen prescrit, le rendu des résultats est donc une **urgence**, en journée, comme en période de garde.

La **microscopie optique** est la méthode de **référence** pour la recherche des schizocytes et leur présence au-delà d'un **seuil de 1%** est considérée comme significative.

Leur décompte peut s'avérer long et complexe du fait de la **diversité des formes** que peuvent prendre les schizocytes (forme en casque, en triangle, en croissant, fragment indéterminé, microsphérocytes ou cellules mordues).

Ceci peut expliquer le **manque de reproductibilité** inter et intra-opérateur avec un **coefficient de variation** aux alentours de **50%** en microscopie optique décrit dans la littérature[3].

Actuellement au CHU de Toulouse, nous utilisons la microscopie optique pour le compte des schizocytes.

Il nous a été proposé de tester le **module érythrocytaire payant** du logiciel **CellaVision®** du microscope automatique **DM1200®**. Ce module propose via une **intelligence artificielle** un classement automatisé des éventuelles différentes formes des globules rouges d'un frottis sanguin et permet entre autres de **calculer la proportion des schizocytes**.

Le laboratoire de biologie médicale du Centre Hospitalier de **Rodez** a mis en place un **protocole** de compte des schizocytes basé quant à lui sur le **module gratuit de compte des plaquettes** du logiciel CellaVision®.

Ces deux méthodes permettraient potentiellement un compte **rapide** et **harmonisé** des schizocytes. De plus, cela devrait faciliter la **formation continue** des différents opérateurs (techniciens et internes) de par la possibilité de revenir facilement sur les comptes et classements effectués.

Les automates du laboratoire devant être changés d'ici 2026, nous nous sommes demandés s'il était intéressant d'acheter ce module érythrocytaire. Mon travail de thèse a donc porté sur l'évaluation et la comparaison des trois méthodes :

- La microscopie optique ;
- Le module érythrocytaire du logiciel CellaVision® ;
- Le protocole du laboratoire de Rodez pour le compte des schizocytes utilisant le module des plaquettes du logiciel CellaVision®.

Un article portant sur l'analyse du module érythrocytaire est en cours de soumission, l'abstract est disponible en annexe 1.

2. Intérêt de la recherche des schizocytes

2.1. Etiologie des schizocytes

Du fait des différentes **contraintes mécaniques, physiologiques**, auxquelles sont exposés les globules rouges, la présence de **schizocytes en faible** quantité sur frottis sanguin peut être retrouvée chez le **sujet sain**.

Des valeurs **<0.5%** sont considérées comme **normales** et des valeurs **≥1%** sont considérées comme **pathologiques**[2].

Leur nombre peut être augmenté dans différentes pathologies, plus particulièrement les MAT que nous aborderons spécifiquement plus tard.

Nous allons tout d'abord examiner les **diverses situations** en dehors des syndromes de MAT où l'on peut observer une augmentation de la **présence de schizocytes** :

- Pendant la **période néonatale**, surtout chez les nourrissons prématurés, il est établi qu'il existe une **fragilité accrue** des globules rouges, probablement due à la présence d'**hémoglobine F**. Ceci explique que la durée de vie des globules rouges chez les prématurés est raccourcie, passant de 100 à 120 jours chez l'adulte à 60 à 80 jours. Par conséquent, un **seuil de schizocytes à 5%** est généralement considéré acceptable jusqu'à l'âge de trois mois.[5] ;

- Chez les patients porteurs de **valves cardiaques mécaniques** : l'anémie hémolytique était une complication fréquente des valves mécaniques d'ancienne génération. Cependant, l'incidence de cette anémie a considérablement diminué, passant à moins de 1% avec l'utilisation des valves mécaniques modernes. Néanmoins, il n'est pas rare d'observer une hémolyse dite subclinique, caractérisée par la **présence de schizocytes** et un nombre accru de réticulocytes, chez les patients porteurs de valves mitrales mécaniques de nouvelle génération, avec une incidence pouvant atteindre **jusqu'à 51%**[6]. Dans des contextes similaires, la présence de schizocytes peut indiquer une **désinsertion d'une valve biologique** ou être attribuable à un circuit de **dialyse** ou à une **circulation extracorporelle**[5] ;
- Chez les patients **grands brûlés** : on note la présence d'une anémie précoce avec plusieurs origines[7]. Tout d'abord, une consommation d'érythrocytes dans les zones thrombotiques profondément brûlées. Ensuite, une **hémolyse mécanique** est constatée, accompagnée de la présence de schizocytes. Le mécanisme exact de cette hémolyse n'est pas clairement défini, mais il pourrait résulter d'une **altération thermique de la membrane des érythrocytes** présents dans les vaisseaux de la zone brûlée ;
- Chez les patients **splénectomisés** : des valeurs de schizocytes supérieures à la normale ont été décrites. En effet, en l'absence de la fonction de filtration et d'épuration de la rate, on peut noter une augmentation des globules rouges anormaux au sein de la circulation sanguine, y compris des schizocytes[8] ;
- Chez les patients atteints de **coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)** : la présence de schizocytes a été décrite [9]. Initialement leur présence était

expliquée par une lyse mécanique des globules rouges lors de leur passage au sein des capillaires atteints par la CIVD[10]. Cette hypothèse physiopathologique est actuellement remise en question. La présence de schizocytes au-dessus des valeurs seuils lors des CIVD pourrait être, quand elle est avérée, le **reflet de pathologies sous-jacentes** (MAT, infection sévère, cancer, HELLP syndrome, greffe d'organes)[10] ;

- Chez les patients atteints de **pathologies érythrocytaires** avec **poïkilocytose** (présence de différentes formes) au frottis sanguin : la présence de schizocytes peut être observée du fait d'un nombre important de globules rouges anormaux[13]. On peut différencier :
 - Des causes **héréditaires** : drépanocytose, thalassémie, sphérocytose héréditaire, déficit en pyruvate kinase, elliptocytose héréditaire.
 - Des causes **acquises** : anémie ferriprive, anémie mégalo-blastique par carence en folates ou en vitamine B12, insuffisance hépatique, intoxication au plomb.

2.2. Microangiopathies thrombotiques

Les microangiopathies thrombotiques (MAT) sont des affections caractérisées par une combinaison[14] :

- D'une **anémie hémolytique mécanique** ;
- D'une **thrombopénie périphérique** ;
- De **dysfonctionnements d'organes** de sévérité variable, pouvant toucher entre autres les reins, le cerveau, et le cœur.

Les **manifestations cliniques** des MAT résultent de la formation de **microthrombi** qui obstruent la lumière des petits vaisseaux sanguins, entraînant une hypoxie tissulaire et une souffrance viscérale.

Un **diagnostic précoce** est crucial pour une prise en charge spécialisée en urgence comme présenté en figure 5 page 32.

Les deux principaux types de MAT incluent :

- Le **purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)** ;
- Les **syndromes hémolytiques et urémiques (SHU)**.

Ces deux grands types de MAT seront détaillés dans les prochains chapitres.

D'autres situations sont pourvoyeuses de MAT telles que :

- Le syndrome **HELLP** chez les femmes enceintes, le **post-partum**, les **cancers**, certaines **chimiothérapies**, certains médicaments comme les **anticalcineurines**, certaines maladies **auto-immunes**, les **greffes** d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques et certaines **infections** comme le VIH. Cependant, en raison de la diversité des mécanismes physiopathologiques qui les expliquent, ces différents types de MAT ne seront pas détaillés davantage dans cette thèse.

2.3. Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

Le **PTT** est une pathologie caractérisée par une **thrombocytopénie importante**, une **anémie hémolytique mécanique** ainsi que par une atteinte d'un ou plusieurs **organes**, notamment le cerveau, le cœur et le rein.

Il résulte d'un déficit sévère de l'enzyme **ADAMTS13** (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin-1 motifs, 13th member), responsable de la régulation de la taille des multimères du **Facteur de Von-Willebrand** (VWF) dans le plasma.

Le **VWF** est une glycoprotéine sécrétée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes.

Il a la capacité de se **lier au sous-endothélium** via son interaction avec le collagène ainsi qu'aux **plaquettes** via une liaison entre son domaine A1 et le récepteur plaquettaire **Gplba**.

Il est essentiel à **l'adhésion des plaquettes** à la paroi interne des vaisseaux sanguins et à leur **agrégation** lorsqu'une lésion vasculaire se produit[15], comme présenté dans la figure

1.

En situation physiologique, l'enzyme **ADAMTS13** contrôle la taille des multimères de **VWF** en les clivant en fragment de poids moléculaire plus léger, ce qui **réduit leur capacité à se lier aux plaquettes**.

Dans les vaisseaux sanguins de petite taille, les conditions de circulation et les **forces de cisaillement** favorisent le VWF à se lier aux plaquettes, en particulier les **méga-multimères**, qui présentent une capacité d'adhérence plus importante.

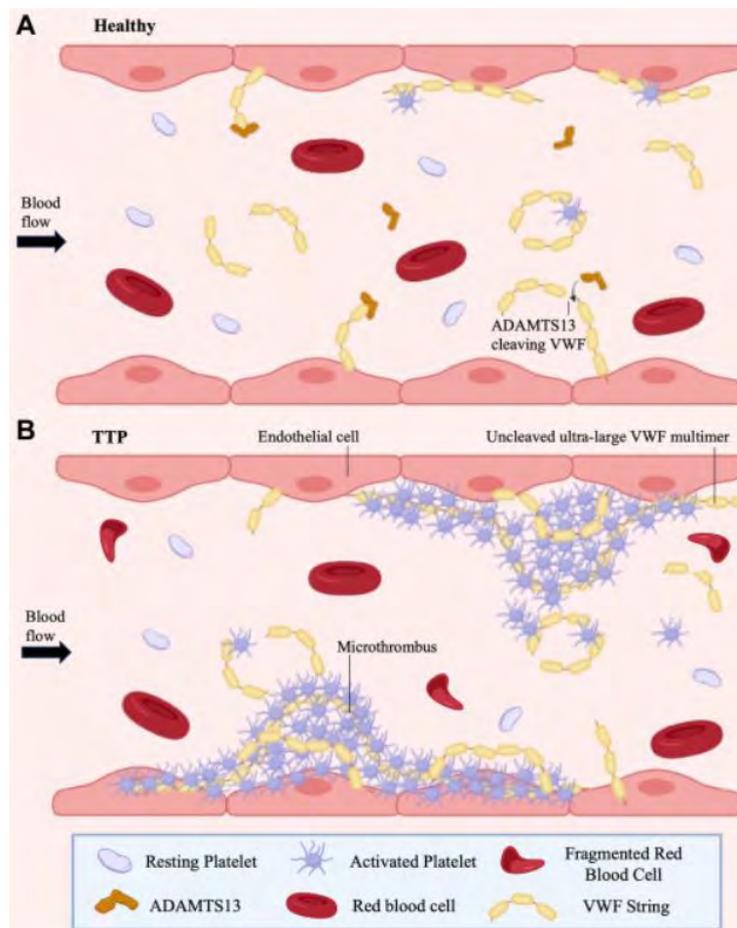
L'endothélium a la capacité de **s'activer** suite à des **stimulations non spécifiques**, comme parfois lors d'infections mineures. L'endothélium va alors libérer des méga-multimères de VWF. En cas de déficit en ADAMTS13 ces méga-multimères non fragmentés vont participer à la **formation de microthrombi** au sein de la circulation.

Comme présenté dans la figure 1 ces microthrombi vont entraîner une **consommation accrue de plaquettes** en leur sein expliquant la thrombocytopénie. Les érythrocytes vont se **fragmenter** à leur contact ce qui engendre une **hémolyse mécanique** et explique la présence de schizocytes sur les frottis sanguin.

Pour finir, ces microthrombi provoquent une **ischémie** et des dommages aux organes, conduisant aux symptômes du PTT.

Figure 1 : A : Schématisation de l'action d'ADAMTS 13 en situation physiologique. B : Schématisation de la formation de microthrombi et de schizocytes en cas de déficit en ADAMTS13

Image tirée de : Jonathan J. et al.[13]



Deux étiologies principales expliquent les déficits sévères en ADAMTS13 [14] :

- Des **déficits acquis** touchant plutôt l'**adulte** dont 75% sont expliqués par la présence d'autoanticorps dirigés contre l'ADAMTS13.
- Des **déficits congénitaux** touchant plutôt l'**enfant** et causés par des mutations bi-allélique du gène de l'ADAMTS13.

2.3.1. Le purpura thrombotique thrombocytopénique auto-immun (PTTi)

Concernant l'épidémiologie du **PTTi**, on peut dire que[14] :

- Il représente environ **95% des PTT** et 25% de l'ensemble des MAT ;
- Il survient préférentiellement chez la femme avec un rapport de **3/1** ;
- C'est une **maladie rare**, son incidence est évaluée à 1 à 2 cas par million d'habitant et par an, et sa prévalence à 13 cas par million d'habitants ;
- Il a une **mortalité d'environ 20%**.

Cliniquement le **début de la maladie est bruyant** avec asthénie, arthralgies, myalgies, douleurs abdominales et lombaires précédant la survenue du PTT à proprement parler.

Il est décrit dans 20 à 30% des cas la présence d'une **fièvre modérée**[14].

Puis survient le PTT dans sa forme **typique** avec thrombopénie, anémie hémolytique mécanique et potentiellement atteinte viscérale (cérébrale, cardiaque, digestive...).

Il est important de noter que l'atteinte viscérale n'apparaît pas systématiquement conjointement avec la thrombopénie et l'anémie mais peut se présenter de manière **retardée**.

Biologiquement on retrouve une **thrombopénie périphérique** constante, et dans environ 90% des cas la numération plaquettaire est <30 G/L[16].

Concernant l'hémogramme on note une **anémie hémolytique régénérative** avec une hémoglobine autour de 8g/dL au moment du diagnostic[17].

Les **marqueurs biochimiques** sont modifiés avec une augmentation des taux de bilirubine libre et de LDH, ainsi qu'un effondrement de l'haptoglobine.

Il est important de noter que la présence des **schizocytes** sur frottis sanguin lors du diagnostic n'est retrouvé que dans moins de **deux tiers des cas**[17].

Le **diagnostic de certitude** repose sur le dosage de **l'activité d'ADAMTS13**, avec présence d'un déficit sévère ce qui confirmera la suspicion de PTTi. Malheureusement la plupart des centres ne peuvent actuellement rendre un dosage de l'activité ADAMTS13 que sous un **délai de 24 à 72h**[16].

En attente de la confirmation biologique d'un déficit en ADAMTS13, il est possible d'utiliser des **scores prédictifs** d'un déficit sévère en ADAMTS13 tel que le **French score** ou le **PLASMIC score**[11].

Concernant les diagnostics différentiels il est décrit dans la littérature que 20% des PTTi sont initialement mal diagnostiqués[17].

Des **confusions** peuvent facilement avoir lieu entre le PTTi et les **cytopénies auto-immunes** telles que le purpura thrombopénique immunologique ou l'anémie hémolytique auto-immune.

Ces erreurs diagnostiques sont probablement dues à la conséquence de **plusieurs facteurs** :

- **l'absence** fréquente à la phase initiale de **défaillances viscérales** ;
- d'une **absence** ou d'un nombre faible de **schizocytes** au frottis sanguin ;
- de la présence d'un **test de Coombs direct positif** chez certains patients ;
- du **délai** parfois important pour le dosage de l'activité **ADAMTS13**.

En dehors des autres types de MAT on note comme **diagnostics différentiels** :

- la thrombopénie induite par l'héparine ;
- les lymphomes et les syndromes myélodysplasiques ;
- le syndrome catastrophique des antiphospholipides.

Le **traitement** implique la réalisation **d'échanges plasmatiques** (EP) qui facilitent l'apport de volumes significatifs de plasma, et par conséquent d'ADAMTS13.

Les EP pourraient aussi potentiellement éliminer les **multimères de VWF** de poids moléculaire élevé, ainsi que les **anticorps** dirigés contre l'ADAMTS13 et les **cytokines** inflammatoires. Les EP doivent être poursuivis jusqu'à disparition des atteintes viscérales, et jusqu'à la normalisation du taux de plaquettes[16].

Conjointement aux EP, l'administration de **caplacizumab** a montré son efficacité dans le PTTi[18,19]. C'est une immunoglobuline qui se lie au **domaine A1** du VWF et inhibe ainsi l'interaction entre le VWF et son récepteur plaquettaire la **glycoprotéine Gplba**. Il prévient ainsi la formation de microthrombi induits par les multimères de VWF de haut poids moléculaire.

Le **rituximab** est un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène **CD20** des lymphocytes B. Il entraîne une **diminution** de la lignée lymphocytaire B et avec eux des **lymphocytes B anti-ADAMTS13**. Il était initialement utilisé chez les mauvais répondeurs aux échanges plasmatiques et devant une diminution importante du nombre de rechutes chez les patients traités, il est devenu **un traitement de première ligne**[16].

Concernant le **suivi** des patients en rémission il est recommandé un suivi tous les 3 mois la première année puis tous les 6 mois la deuxième année, puis uniquement annuel.

Ce suivi comportera[16] :

- Une recherche de **rechute** clinique et biologique (activité ADAMTS13 devant rester dans des seuils protecteurs $\geq 20\%$) ;
- Un **bilan biologique** avec : NFS, plaquettes, créatininémie, DFG, LDH et rapport protéinurie/créatininurie ;
- Une recherche de potentielles **maladies auto-immunes** ou de **pathologies cancéreuses** ;
- Une **évaluation cardiovasculaire** (cette population étant plus à risque de développer des pathologies cardiovasculaires).
- Une évaluation des **séquelles neurocognitives**.

2.3.2. Le Purpura thrombotique thrombocytopénique congénital (PTTc)

Le **PTTc** (anciennement appelé syndrome d'Upshaw-Schulman), est une **pathologie rare** avec une prévalence incertaine, estimée entre 0.5 à 2 cas par million d'habitants[20]. Il représente **moins de 5% des formes de PTT**.

C'est une pathologie **autosomique récessive**, conséquence de mutations bi-allélique du gène codant pour l'ADMTS13. Près de **200 mutations** du gène d'ADAMTS13 ont été rapportées[16].

Cette pathologie **évolue par poussées** avec comme facteur déclenchant toute **stimulation activant l'endothélium**, en particulier les infections, les interventions chirurgicales ou les vaccinations.

La première poussée a lieu **généralement avant l'âge de 10 ans** et dans plus de 50% des cas à la naissance. Mais il est important de noter que certaines formes restent **asymptomatiques** pendant des décennies, et que deux périodes sont associées à un risque important de poussée, à savoir la **naissance** et la **grossesse**[20].

Concernant les **PTT associés à la grossesse** on peut dire qu'ils représentent un nombre non négligeable des PTT de l'adulte : entre 10 et 30%.

Un premier épisode de PTT dans un contexte obstétrical est congénital dans environ **50%** des cas, alors que le PTTc chez l'adulte en dehors d'un contexte obstétrical représente moins de **5%** des PTT.

La grossesse déclenche presque **systématiquement** un PTTc latent ne s'étant pas encore exprimé jusque-là, et dans **75%** des cas il survient au **troisième trimestre** .

Cliniquement, les atteintes du PTTc sont les mêmes que lors d'un PTTi, on peut noter la présence fréquente d'une hyperbilirubinémie importante chez le nouveau-né, nécessitant souvent la réalisation d'une exsanguino-transfusion devant le risque d'ictère nucléaire[14].

On notera, en plus des **diagnostics différentiels** déjà évoqués pour le PTTi la confusion possible avec **l'hémolyse allo-immune** chez le nouveau-né et une **éclampsie** chez la femme enceinte.

Le traitement du PTTc repose sur l'apport d'ADAMTS13 exogène via la **plasmathérapie** qui sera mise en place lors des poussées et en prophylaxie toutes les deux à trois semaines.

Le développement d'une protéine ADAMTS13 recombinante est en cours et devrait dans un avenir proche améliorer significativement la prise en charge du PTTc[14]

Le suivi des patients est centré sur la surveillance de la **numération plaquettaire** de **l'activité ADAMTS13** . Il doit être rapproché lors d'épisodes infectieux même mineurs. Le **rapport bénéfice/risque** des vaccinations doit être évalué par un spécialiste. Tout comme les gestes chirurgicaux qui doivent potentiellement être encadrés par une plasmathérapie prophylactique[14].

2.4. Les syndromes hémolytiques et urémiques

Les syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) sont des formes de MAT caractérisées de l'association d'une **anémie hémolytique mécanique**, d'une **thrombocytopénie périphérique** souvent moins importante que dans le PTT et par une **insuffisance rénale aiguë** généralement sévère[21].

Comme dans les autres formes de MAT, des défaillances d'autres organes tels que le cerveau ou le foie sont possibles.

On peut distinguer plusieurs formes :

- Le **SHU dit typique** à *Escherichia coli* producteur de Shiga-toxine (STEC) qui touche généralement la population pédiatrique lors des infections digestives à ***Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC)**, pourvoyeuse d'épidémie.
- Le **SHU dit atypique** ou primitif se déclarant chez l'enfant comme chez l'adulte. La classification en tant que SHU atypique vient du fait que ces SHU ne sont pas issus d'une autre pathologie sous-jacente. Il est en rapport avec une **hyperactivation de la voie alterne du complément** ou, plus récemment décrit, non lié au complément avec une mutation du gène DGKE (diacyl glycerol Kinase epsilon) voir un déficit en plasminogène[22]

- Les **SHU secondaires** peuvent être induits par la prise de médicaments, ou caractérisé par la présence de pathologies sous-jacente tel que des infections (grippe, VIH, pneumocoque...), pathologie auto-immune, cancéreuse ou hématologiques.

- Les **SHU d'origines métaboliques** par déficit en cobalamine

Contrairement au PTT dans le SHU il n'y a **pas de déficit en ADAMTS13** et le dénominateur commun entre ces différentes formes de SHU serait, un cercle vicieux d'activation du complément, des lésions des cellules endothéliales et d'activation des plaquettes[22]. Nous discuterons dans les prochains chapitres uniquement du SHU typique et atypique.

2.4.1. Le SHU dit typique à *Escherichia coli* producteur de Shiga-toxine

Le **SHU typique** est généralement précédé par une **colite hémorragique à EHEC**. Il se distingue principalement par une **atteinte rénale** classiquement sévère, souvent accompagnée d'une **hypertension artérielle**. Cependant, il peut également se manifester initialement par une atteinte multi-organique, notamment au niveau neurologique.

***Escherichia coli* (E. coli)** est un bacille à coloration de Gram négative, aéro-anaérobie facultatif. C'est une bactérie présente en situation physiologique dans la **flore digestive** de l'Homme. Elle peut, via l'acquisition de **facteurs de pathogénicités**, devenir une souche pathogène, appelée pathovars. Ces pathovars sont nombreux et possèdent des mécanismes infectieux variés.

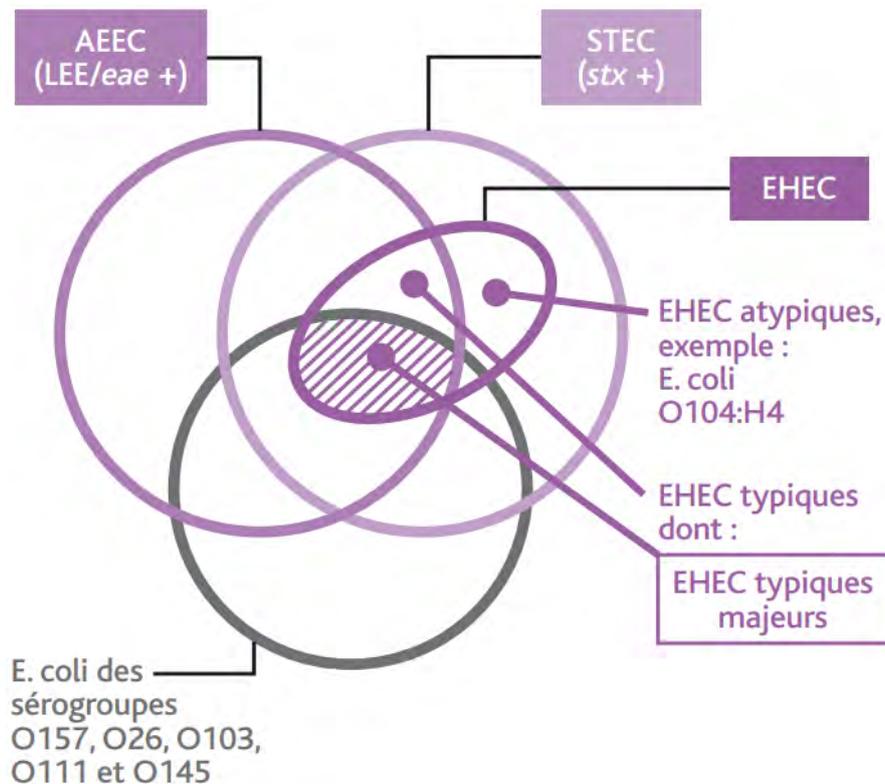
Dans le cas des **SHU typique** le pathovars de *E. Coli* impliqué est un **EHEC**, il possède **deux facteurs de pathogénicités** indispensables à la physiopathologie de la maladie. Ces facteurs sont acquis par l'incorporation de génomes de bactériophages, il s'agit de [23,24] :

- **La shiga-toxine (stx)**, également connue sous le nom de vérotoxine, elle circule dans le sang et cible principalement **l'endothélium**, en particulier celui des **reins**, entraînant ainsi les manifestations cliniques du SHU typique. Il en existe deux classes, **Stx1** moins pathogène et **Stx2** plus pathogène, ainsi que plusieurs sous types. Les *E. coli* producteurs de ces toxines sont appelés **STEC**.

- Un **facteur d'adhésion** qui résulte de l'action combinée de différentes protéines, dont classiquement de **l'intimine**, codée par le gène **eae**. Cette capacité d'adhésion permet à la souche de provoquer des lésions dites « **d'attachement et d'effacement** » au niveau de l'entérocyte et de proliférer au sein du système digestif. Lorsque la souche exprime l'intimine elle est classifiée en tant que **AEEC** (pour Attaching and effacing E. coli), mais d'autres facteurs d'adhésion existent. Les souches exprimant l'intimine en plus de la toxine stx sont appelées **EHEC typique**. Les souches exprimant d'autres facteurs d'adhésions sont appelées **EHEC atypique**. Ces différents types d'EHEC sont schématisés dans la figure 2.

Figure 2 : Classification des différents pathovars d'E. Coli mis en cause dans le SHU typique.

Image tirée de : Brugère H.[22]



Concernant l'**épidémiologie** du **SHU typique**, on peut dire qu'il touche les âges extrêmes de la vie, plus particulièrement les jeunes enfants.

Il est responsable d'environ **90 % des cas de SHU chez l'enfant**[25]

La **mortalité** est estimée entre **1 et 5%**[26]. Des **atteintes neurologiques** de sévérités variables ont été décrites dans 30% des cas et jusqu'à **25 % des patients développent une maladie rénale chronique**, une hypertension ou une protéinurie.

Il est difficile d'évaluer l'incidence annuelle du SHU associé à l'EHEC, mais des taux globaux correspondant à deux pour 100 000 pour tous les groupes d'âge ont été rapportés et jusqu'à six pour 100 000 chez les enfants de moins de 5 ans[25].

Environ **les deux tiers** des patients ayant été atteints d'un **SHU typique** pendant l'enfance développeront une protéinurie, une hypertension artérielle ou une insuffisance rénale dans les **20 ans** qui suivent. [27].

Les patients peuvent être infectés par la **consommation d'aliments contaminés**, notamment de viande crue, ou insuffisamment cuite, par **contamination croisée** de produits alimentaires et d'ustensiles et par la consommation d'eau contaminée ou par **transmission interhumaine**.

La transmission se produit plus souvent en été, nécessite un très faible nombre d'organismes bactériens et se produit par foyers épidémiques ou de manière sporadique. Les **réservoirs bactériens** sont constitués majoritairement par les **élevages de bovins**.

Après une **période d'incubation de 4 à 7 jours**, la plupart des enfants infectés par l'EHEC développent une diarrhée et au cours d'une période 2 à 10 jours supplémentaires environ **15 % développeront un SHU typique**[25].

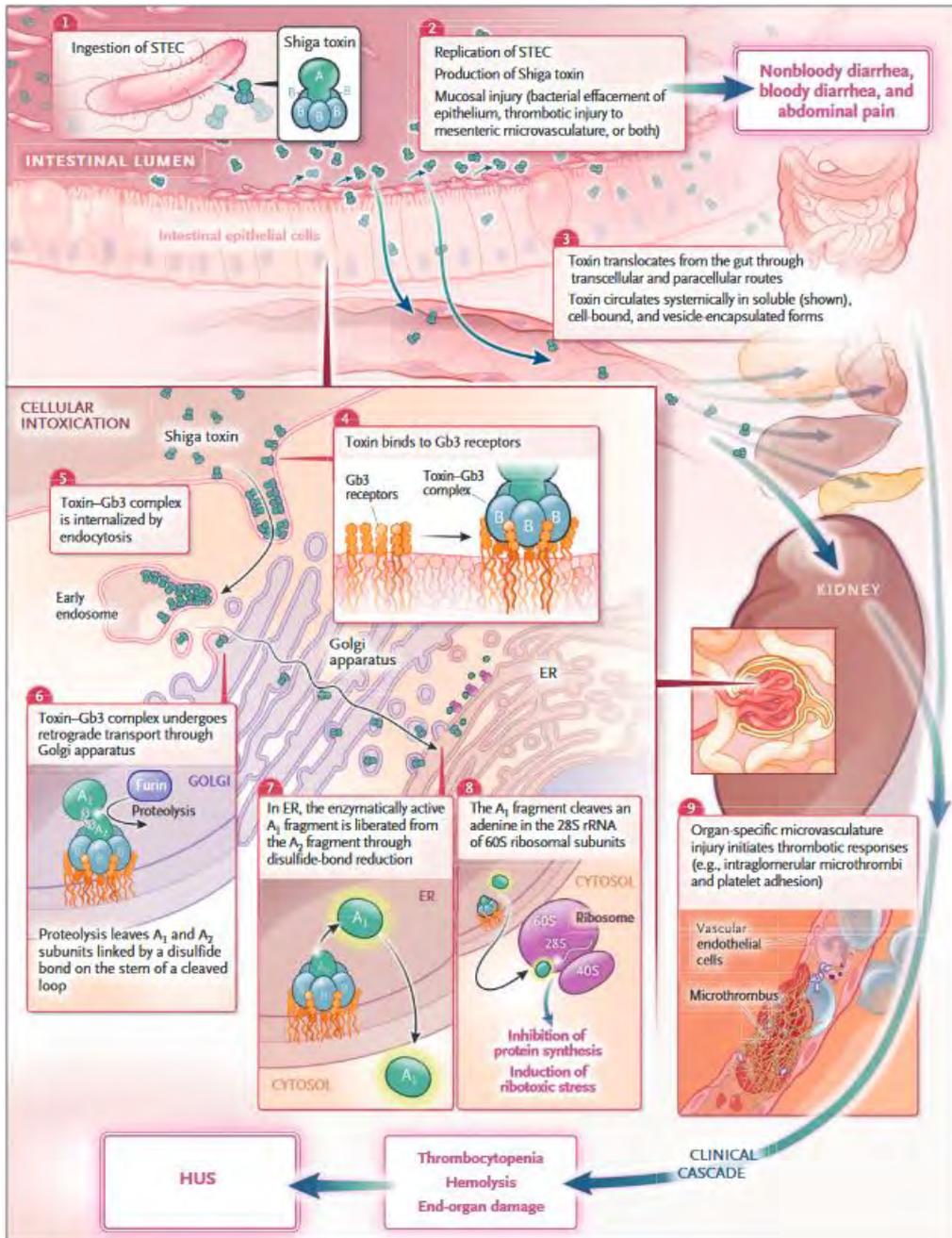
La **physiopathologie** du SHU typique peut se décrire en plusieurs étapes[28] comme présenté dans la figure 3 :

- Les **EHEC** via leur capacité d'adhésion **se répliquent** dans les intestins et expriment la toxine Shiga (1, 2 ou les deux) ;
- Les **toxines** sécrétées accèdent à la **circulation** et sont transportées sous forme libre ou liée aux leucocytes ;
- Les **shiga toxines dites AB5** car constituées d'une sous-unité A et d'une sous-unité pentamérique B se lient au **globotriaosylcéramide** (Gb3) de la surface cellulaire **endothéliale** par l'intermédiaire de leur sous-unité B ;
- Les toxines Shiga (AB5) liées à Gb3 pénètrent par **endocytose** dans la cellule endothéliale ;
- **La sous unité A** après passage dans l'appareil de golgi puis dans le réticulum endoplasmique se voit **dissociée** de Gb3 et des sous unités B. Puis elle est clivée en sous-unités **A1 et A2** ;
- La **sous-unité A1** qui est enzymatiquement active une fois libérée dans le cytosol, va éliminer une **adénine de l'ARN ribosomal** interrompant ainsi la synthèse protéique ;
- La cellule du fait du blocage de sa synthèse protéique va alors entrer en **apoptose**.
- Il s'ensuit des **lésions vasculaires** et une activation des **médiateurs de l'inflammation** tels que Il-6, Il-8, TNF α , Il-1 β .
- De plus il a été démontré in vitro que la **toxine stx2** a la capacité d'activer la **voie alterne du complément** et de retarder l'action du **facteur H**, principal régulateur négatif de cette voie[29].

- S'ensuit la **génération de microthrombi** et une **hémolyse mécanique** par ses derniers conduisant à une thrombocytopénie, une anémie et à des lésions des organes cibles.

Figure 3 : Physiopathologie du SHU typique

Image tirée de : Freedman SB et al.[26]



A ce jour, aucun des **traitements spécifiques** du **SHU typique**, tels que les anticorps anti-Stx, les antiagrégants plaquettaires, l'héparine ou les thrombolytiques n'ont fait preuve de leur efficacité.

L'éculizumab dans le SHU typique pour son action de blocage de la **fraction C5** et ainsi son blocage de la **voie terminale** du complément est recommandé par la société française de pédiatrie uniquement dans les **formes sévères** avec atteinte extra rénale[26]. Mais son utilisation tend à s'élargir du fait d'une **amélioration probable du pronostic rénal à long terme**[30].

L'antibiothérapie bactéricides est **déconseillée** en raison du risque d'aggravation du SHU typique en particulier en cas d'utilisation de **quinolones et d'aminosides** du fait de l'activation du système SOS de la bactérie qui engendre une augmentation de la production des toxines stx et un relargage massif lors de la lyse bactérienne.

L'utilisation de **l'azithromycine**, antibiotique **bactériostatique et anti-toxinique** tend à se généraliser devant des études de **non innocuités** et devant la diminution significative de la **durée du portage**, ainsi qu'une amélioration clinique notable chez le modèle animal [31].

Classiquement la prise en charge est donc **symptomatique** avec[26] :

- Evaluation de la volémie et gestion de l'**hydratation** des patients ;
- Prise en charge des **troubles métaboliques** ;
- **Épuration extra-rénale** : plus de la moitié des patients nécessitent le recours à une épuration extra-rénale ;
- Prise en charge de l'anémie hémolytique avec des **transfusions** de culots de globules rouges ;
- Prise en charge de l'**hypertension artérielle** ;
- Prise en charge des complications digestive avec recours à une **nutrition parentérale** pour mettre au repos le système digestif ;

- Prise en charge des **atteintes neurologiques** avec un traitement anti-comitial en cas de convulsion.

Concernant **le suivi**, il faut noter que les patients ayant eu un épisode de SHU typique même après **récupération** ad integrum de la fonction rénale sont à considérer comme ayant une **maladie rénale chronique**. Ils devront donc avoir un **suivi néphrologique au long cours**.

2.4.2. Le syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa)

Le syndrome hémolytique et urémique atypique est une forme de MAT causée majoritairement par des anomalies de **la voie alterne du complément** entraînant un dysfonctionnement des cellules endothéliales et la formation de microthrombi.

Le SHUa est un **diagnostic d'élimination**. Il correspond à un SHU idiopathique qui n'est ni associé à une infection à EHEC et ni rattaché à une cause secondaire.

L'incidence du SHUa est estimée entre **0,23 et 0,42 cas par million**. C'est une maladie rare avec une morbidité et une mortalité qui sont plus élevées que lors du SHU typique. Le SHU atypique a un taux de **mortalité de 25 %** et environ 50 % des patients présentent une insuffisance rénale terminale. [32]

Le **SHUa** peut survenir aussi fréquemment à **l'âge adulte** (58,4 %) que pendant **l'enfance** (41,6 %). La mortalité est plus élevée chez les enfants que chez les adultes, mais la progression vers l'IRT après le premier épisode de SHUa est plus fréquente chez les adultes[33].

Concernant la **physiopathologie** du SHUa, on retrouve dans **40 à 60 %** des cas une dérégulation de la voie alterne du complément expliquée par **deux principaux mécanismes**[32] comme présenté en figure 4 :

- Premièrement par une **atteinte génétique** sur des gènes impliqués dans la régulation du complément :

- Par perte de fonction : facteur H, facteur I, MCP (protéine cofacteur de membrane)
- Par gain de fonction concernant les gènes codant pour C3 ou le facteur B
- Secondairement par la présence **d'autoanticorps anti-facteur H**

Ces deux mécanismes vont provoquer un dysfonctionnement de la cascade du complément conduisant à un **dépôt de complément (C3b)** sur les cellules endothéliales.

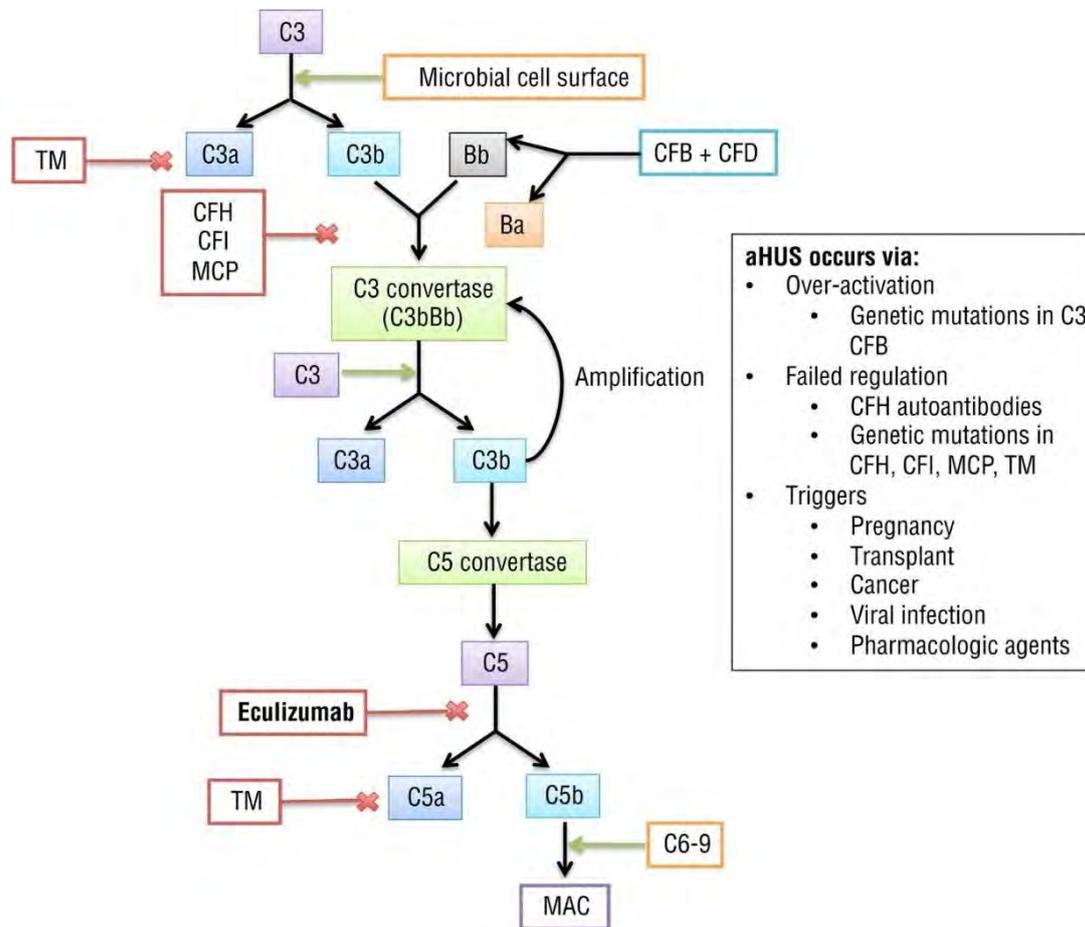
Par conséquent un **afflux cellulaire** composé de polynucléaires neutrophiles et de macrophages va se produire. Ceci conduit à la **destruction des cellules endothéliales** ainsi qu'à un **état pro-thrombotique**.

S'ensuit la **formation de microthrombi** dans la lumière des vaisseaux entraînant le cisaillement des globules rouges et la **production de schizocytes**.

Pour finalement aboutir à la triade : anémie hémolytique mécanique, insuffisance rénale et thrombocytopenie.

Figure 4 : Schématisation de la voie alterne et terminale du complément avec les différents activateurs et régulateurs pouvant entrer en jeu lors de SHUa.

Image tirée de : Raina R et al.[30]



Le SHUa est une **maladie hétérogène** avec différentes présentations cliniques[34] :

- SHUa aigu avec insuffisance rénale terminale d'emblée ;
- SHUa aigu avec récupération de la fonction rénale et évolution de la maladie par poussées ;
- SHUa chronique, plus rare.

Le **bilan biologique** comporte :

- Un bilan sanguin standard avec : NFS, plaquettes, réticulocytes Ionogramme sanguin (Na⁺, K⁺, réserve alcaline), protidémie, albuminémie, urée, créatinine plasmatique ;
- Un bilan urinaire avec : Protéinurie, créatininurie, albuminurie sur échantillon et calcul du rapport protéinurie/créatinine urinaire.

Le SHUa étant un **diagnostic d'élimination** il convient de rechercher et d'éliminer les différents **diagnostics différentiels**, à savoir :

- **Le PTT** avec dosage de l'activité ADAMTS 13 ;
- Un **déficit congénital en cobalamine C** grâce dosage de l'homocystéine, de la méthionine sanguine et urinaire ainsi qu'avec une chromatographie des acides aminés urinaires ou un taux d'acide méthylmalonique plasmatique chez l'enfant et l'adulte de moins de 40 ans ;
- Une anémie par **carence** majeure en **folates ou en vitamine B12** ;
- Une anémie **hémolytique auto-immune** et un **PTI** ;
- **Une CIVD** avec un bilan de coagulation : TP, TCA, Fibrinogène, D-Dimères ;
- Un **SHU typique** avec un prélèvement de selles.

Pour le **diagnostic étiologique** il faudra rechercher un stigmate de l'activation de la voie alterne du complément avec le dosage de : CH50, C3, C4.

Il faudra aussi doser le facteur B, H et I ainsi que l'expression membranaire de MCP et faire une recherche d'anticorps anti Facteur H[26].

Enfin, en fonction des résultats précédents, il conviendra de rechercher les différentes **mutations génétiques** impliquées dans le SHUa[26].

Chez l'enfant, le traitement de première intention est l'**éculizumab**.

C'est un **anticorps inhibiteur de la voie terminale du complément**. Il se lie de manière spécifique à la protéine C5, inhibant son clivage en C5a et C5b et empêchant ainsi la formation du **complexe d'attaque membranaire**.

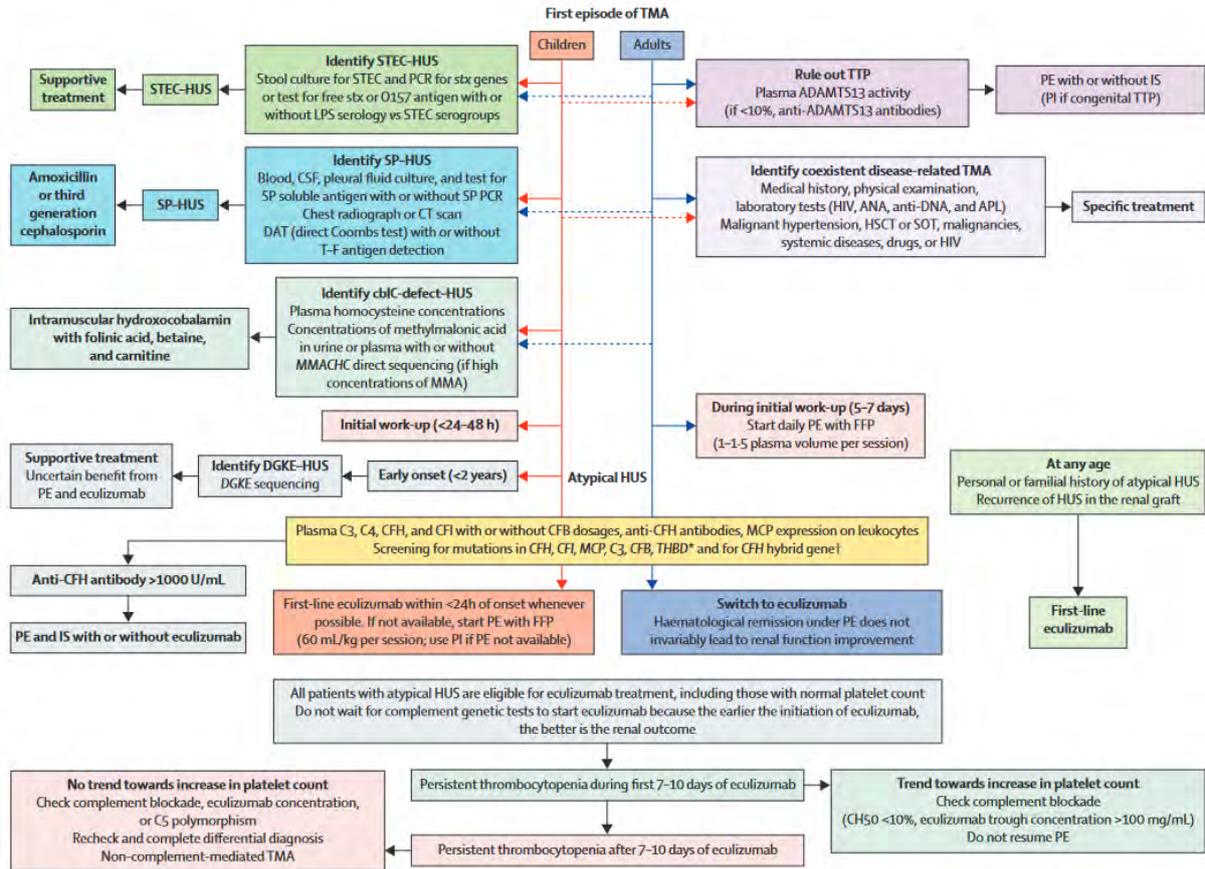
Les **échanges plasmatiques** ne sont pas indiqués en première intention mais peuvent avoir leurs places dans les traitements du SHUa lié à la présence d'un **anticorps anti-facteur H**.

Chez les adultes en revanche les **échanges plasmatiques** sont généralement utilisés en **première intention** devant la prévalence plus importante des autres MAT.

Le traitement par l'**éculizumab** est mis en place généralement dans un **second temps** après le bilan étiologique ou d'emblée si forte suspicion clinique de SHUa[26].

Figure 5 Tableau récapitulatif des différentes MAT : diagnostics et traitements

Image tirée de : Fakhouri F. et al.[19]



3. Matériel et méthode

Pour cette comparaison de méthodes, concernant l'analyse des schizocytes, différents automates, logiciels et protocoles d'analyse ont été utilisés. Les prochains chapitres feront la description de ces différents outils.

3.1. Étaleur et colorateur SP-50® de marque Sysmex®

Les frottis de l'étude ont été réalisés par un SP-50®.

Il s'agit d'un étaleur colorateur automatisé permettant l'étalement de frottis sanguin ainsi que leur coloration en milieu fermé. Il accepte des échantillons de sang total sur tube EDTA ou citraté. Il a un débit maximum de 75 frottis par heure.

Concernant l'étalement, il permet un étalement régulier, adapté à l'hématocrite et s'adapte ainsi à des échantillons de différentes densité et viscosité.

La coloration utilisée est une coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG).

3.2. Microscope automatisé DM-1200® de marque CellaVision®

Le DM-1200® est un microscope automatisé de marque CellaVision® conçu pour automatiser la réalisation de formules sanguines. Il s'appuie sur une robotique permettant la gestion de rack de 12 lames et une imagerie numérique de haute qualité.

Il a une cadence d'environ 20 lames par heure et permet la numérisation d'une zone prédéfinie, il ne s'adapte donc pas à la densité cellulaire.

3.3. Compte des schizocytes par microscopie optique

La microscopie optique est la **méthode de référence** pour le compte des schizocytes[2]. C'est cette méthode qui est utilisée en routine au sein du laboratoire d'hématologie de Toulouse.

Le protocole de compte des schizocytes par microscopie optique se base sur les **recommandations de 2012** du conseil international de standardisation en hématologie (ICSH)[35] **mises à jour en 2021**[2].

Les **schizocytes** sont définis comme étant des **fragments d'hématies**, circulants, de forme variée, toujours plus petites que des hématies normales.

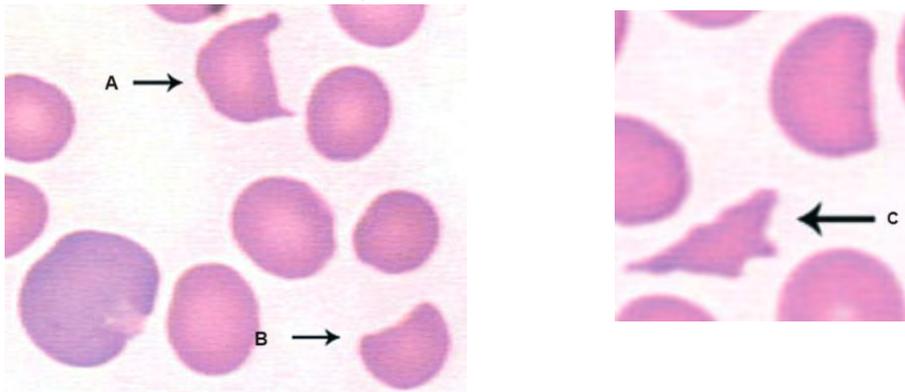
On différencie :

- Les **formes dites classiques** qui correspondent aux formes en casque, en triangle et en croissant comme représenté dans les figures 6 et 7 ci-dessous.

Figure 6 : avec A représentant un schizocyte en casque; B représentant un schizocytes en croissant.

Figure 7 : avec C représentant un schizocyte en triangle.

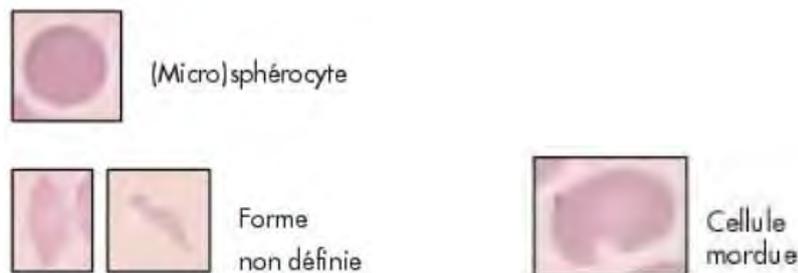
Images tirées de : Zini G. et al.[33]



- Les **formes dites rapportées** : Les microsphérocytes, les fragments de forme non définie et les cellules mordues. Ils ne sont comptés que s'il y a présence de formes classiques et s'il y a absence de poïkilocytose. Ces formes sont représentées dans la figure 8 ci-dessous.

Figure 8 : Schizocytes de formes rapportées

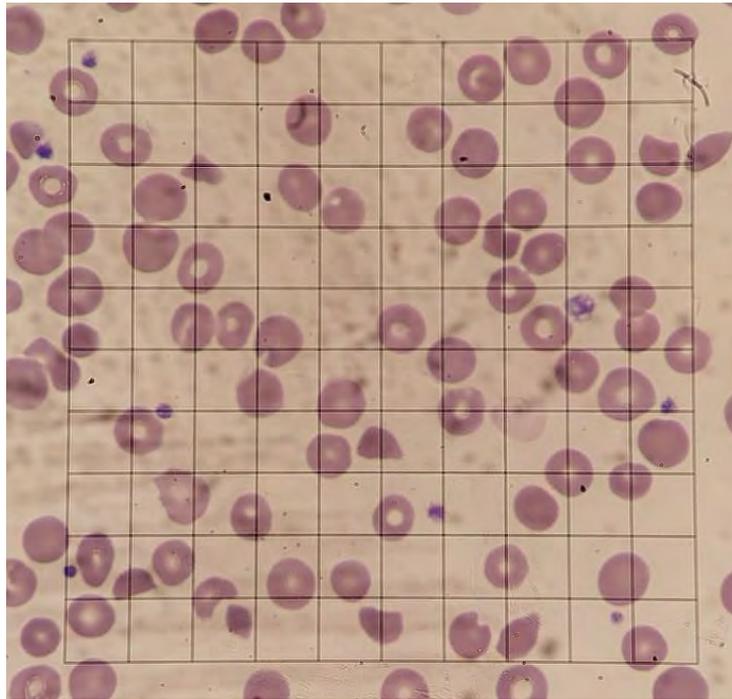
Images tirées de : Lesesve JF. et al.[3]



La recherche doit s'effectuer à un **grossissement x1000** avec un objectif x100 à immersion. En cas de présence de schizocytes, un **oculaire quadrillé** sera réalisé et le

compte réalisé dans des champs de **densités optimales** comme représenté dans la figure 9 ci-dessous.

Figure 9 : Champs érythrocytaire avec présence de schizocytes, grossissement x 1000 et oculaire quadrillé



Pour **calculer la proportion de schizocytes**, rendus pour 1000 hématies au laboratoire (schz‰), il faudra compter le nombre d'érythrocytes pour un champ (éry/champ) quadrillé ainsi que le nombre de schizocytes dans 10 champs de même densité.

Puis, calculer le **nombre de schizocytes moyen par champs** (schz moy) en divisant le nombre de schizocytes totaux par le nombre de champs.

Et enfin, calculer la **proportion de schizocytes pour 1000 érythrocytes** via la formule :

- $$\frac{\text{schz moy} \times 1000}{\text{éry/champ}} = \text{schz} \text{‰}$$

3.4. Compte des schizocytes par utilisation du module érythrocytaire du logiciel CellaVision®

Le comptes des schizocytes via le module érythrocytaire s'effectue en **deux temps** :

- Une **pré-classification** par l'intelligence artificielle du logiciel CellaVision® Remote Review Software version 7.0.2. Cette pré-classification n'est pas réalisée pour tous les érythrocytes du champ érythrocytaire numérisé par le DM-1200®. En effet, le module érythrocytaire va compter le nombre d'érythrocytes totaux qu'il peut évaluer et ainsi pouvoir calculer une proportion des différentes formes érythrocytaires. Un nombre non négligeable d'érythrocytes est exclu. Il s'agit pour la plupart d'érythrocytes se chevauchant, reconnus comme non analysables par l'intelligence artificielle ;
- Un **reclassement par l'opérateur** des érythrocytes pré-classifié par le logiciel dans les différentes formes érythrocytaire proposées.

Pour les différentes formes érythrocytaire (dont les schizocytes), le logiciel en donne une **proportion en pourcentage** basé sur leur nombre et sur le **nombre d'érythrocytes totaux**.

Il est possible de **revenir à la pré-classification** effectuée par le logiciel à tout moment, ce qui nous a permis d'effectuer plusieurs comptes sur les mêmes frottis.

Un exemple de **champs érythrocytaire complet** avec les schizocytes déterminés par l'intelligences artificielle mis en surbrillance est présenté en figure 10.

Un exemple de **pré-classement des érythrocytes** est disponible en figure 11. Ceux-ci sont rangés dans des **encarts** correspondant aux différentes formes érythrocytaires.

Figure 10 exemple de champs érythrocytaire complet

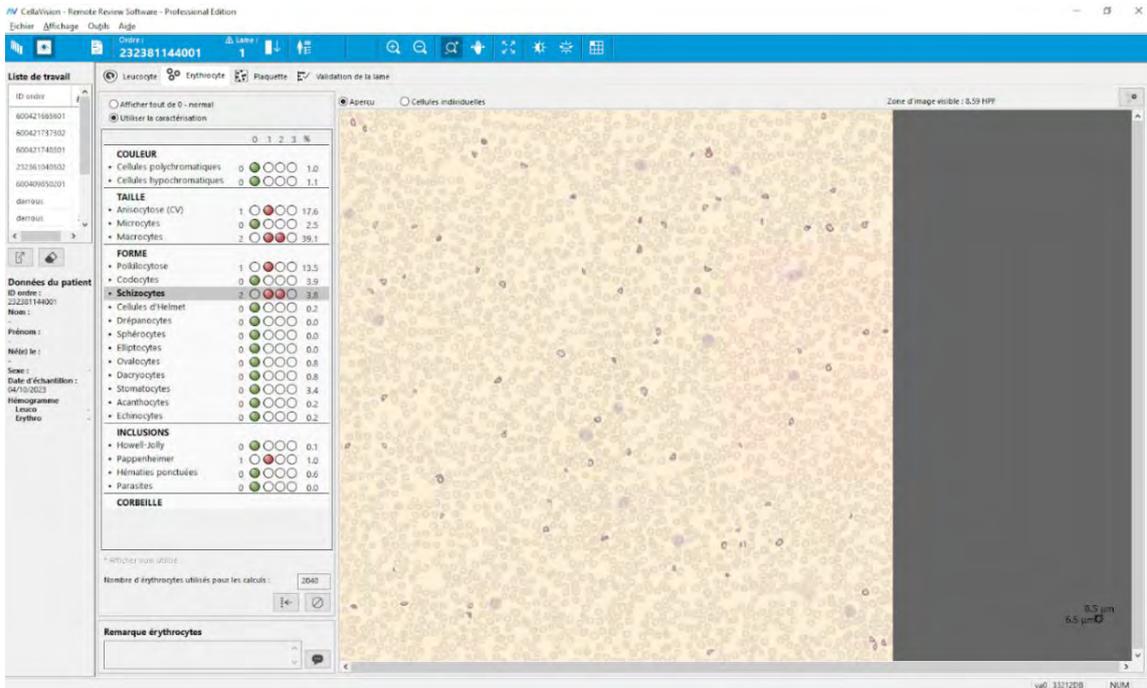
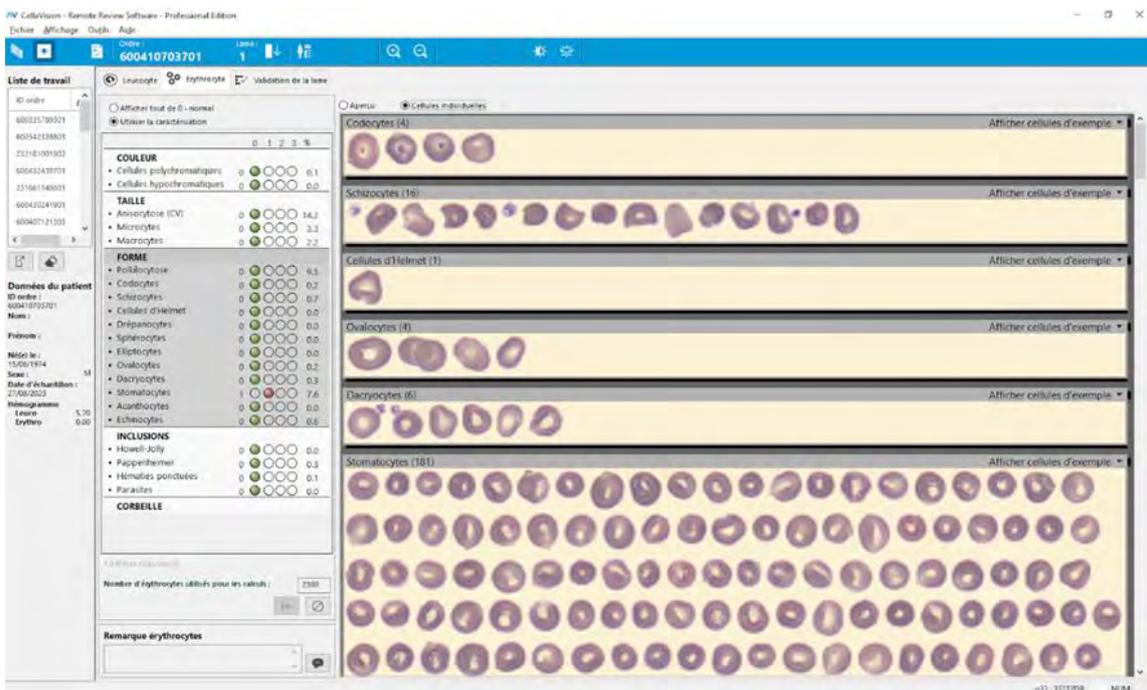


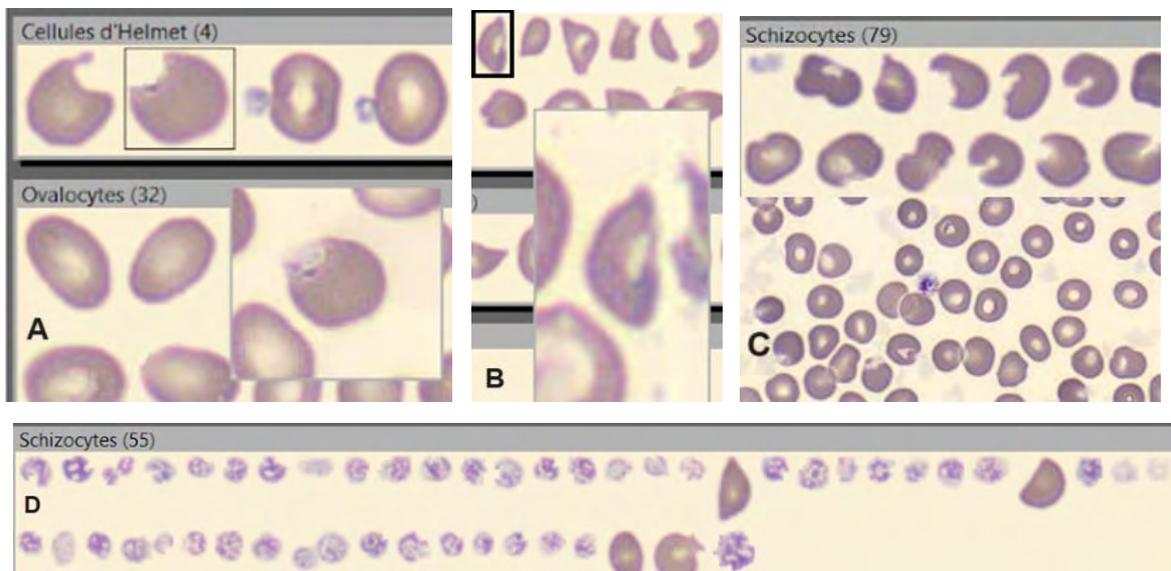
Figure 11 : exemple de pré-classement des érythrocytes



Comme on peut le voir sur la figure 11 dans les **encarts de classification**, les érythrocytes n'apparaissent pas dans leur **environnement**. Ils sont en effet **découpés** par l'intelligence artificielle. Cette découpe lui permet d'analyser les contours des érythrocytes, et dans le cas des schizocytes, de reconnaître les érythrocytes fragmentés.

Il est toutefois possible en cliquant sur les érythrocytes d'effectuer un zoom et de les observer dans leur environnement. Ceci permet de voir plus facilement **les erreurs de l'intelligence artificielle**. En effet, elle va parfois effectuer des mauvais découpages ou ne pas prendre en compte les rayures sur le frottis, créant ainsi de **faux schizocytes**. Ces cas sont présentés dans les figures 12 ci-dessous.

Figure 12 : Exemple d'erreurs de classification. A : Faux schizocyte par mauvais d' découpage de l'intelligence artificielle ; B : Faux schizocyte issu d'une rayure ; C : Faux schizocytes issus d'amas de cryoglobulines ; D : Plaquettes mal classées.



Concernant le prix de ce logiciel, il est de **9 270 €** par licence, soit près de **29 000 €** s'il est déployé sur les trois sites du CHU de Toulouse.

3.5. Compte des schizocytes par utilisation du module des plaquettes du logiciel CellaVision® via le protocole du laboratoire du centre hospitalier de Rodez

Le module des plaquettes est un module **gratuit** inclus dans le logiciel CellaVision® du microscope automatisé DM-1200®. Il a été développé pour la réalisation de formules plaquettaires. Il permet de visualiser **neuf champs**, correspondants lorsqu'ils sont mis bout à bout, au champ érythrocytaire complet.

Le compte des plaquettes dans chacun de ces neuf champs est à effectuer par l'opérateur et permet au logiciel de calculer la numération plaquettaire.

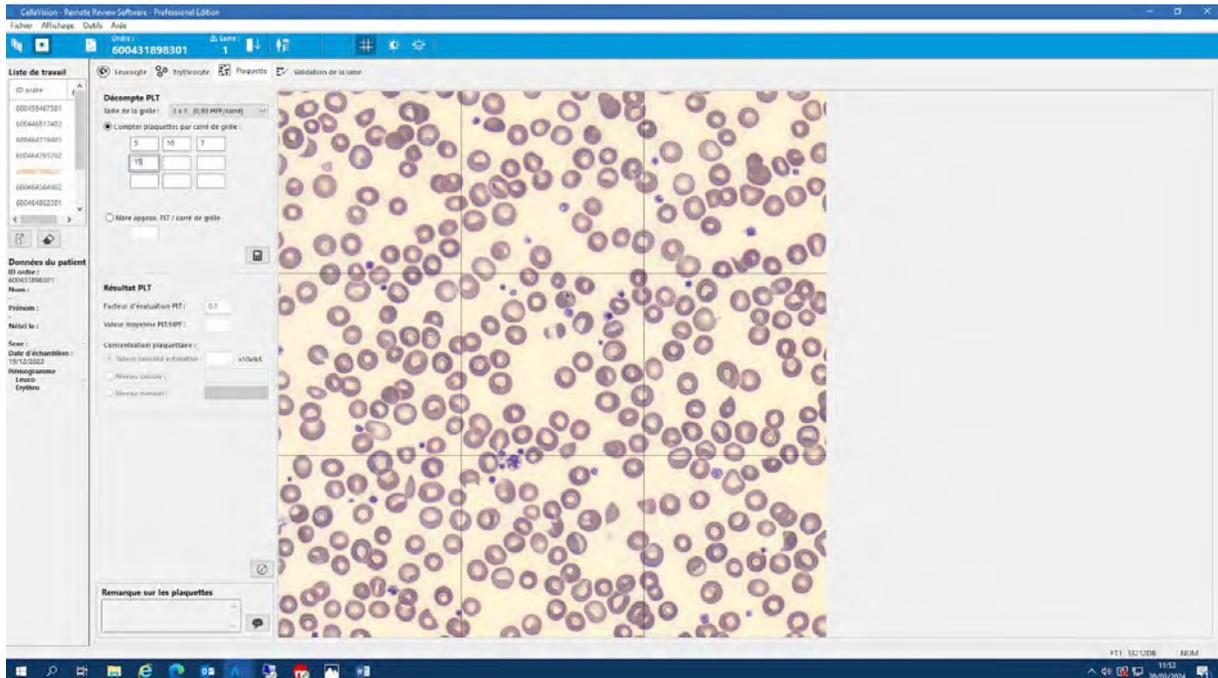
Le **laboratoire de Rodez**, a créé un **protocole de compte des schizocytes** avec utilisation de ce module.

Il permet, après le **compte par un opérateur**, du nombre d'érythrocytes totaux sur un champ et du nombre de schizocytes sur tous les champs, de calculer la **proportion de schizocytes** de l'échantillon.

Pour ce faire, l'opérateur doit entrer le nombre de schizocytes qu'il a comptés sur chaque champ dans l'encart réservé habituellement aux plaquettes. Ceci permet en cas de discordance de **vérifier plus aisément les erreurs**.

Ce protocole a pour objectif, une **harmonisation des comptes** et une meilleure **formation des opérateurs**. Un exemple d'un champ visualisé grâce au module des plaquettes est disponible en figure 13.

Figure 13 : Champ visualisé grâce au module des plaquettes



3.6. Méthodes

Au total, **165 échantillons** étalés et colorés au SP50 (Sysmex) dont 63 présentant un nombre de schizocytes supérieur à 1% en microscopie optique ont été inclus.

Les **échantillons** proviennent des différents sites du laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse. Ils ont été prélevés et analysés sur une période allant de juillet 2023 jusqu'à février 2024. Certains frottis ont été analysés plusieurs fois.

Une **épidémie de SHU**, ayant eu lieu en novembre 2023, les pools des frottis positifs en schizocytes ont été augmentés de manière non négligeable. Certains échantillons sont issus des mêmes patients à des temps différents de la maladie.

La présence de schizocytes avant et après classement via le module érythrocytaire a été comparée aux résultats obtenus par microscopie manuelle et par utilisation du protocole de Rodez via le module des plaquettes.

Un frottis positif a été lu par **21 opérateurs** différents pour analyse de la **reproductibilité** du module érythrocytaire en post-classification ainsi que du protocole de Rodez.

Nous avons voulu analyser :

- **Pour le module érythrocytaire :**
 - Le nombre total d'érythrocytes analysé par le logiciel ;
 - Le nombre et le pourcentage de schizocytes en pré-classification ;
 - Le nombre de plaquettes classées en schizocytes lors de la pré-classification ;
 - Le nombre et le pourcentage de schizocytes en post-classification
 - Le nombre de schizocytes ajoutés et retirés entre la pré-classification et la post-classification ;
 - Le temps de classification par un opérateur ;
 - Le nombre d'érythrocytes mal classés issus de rayures sur le frottis ainsi que celui issu d'un mauvais découpage de l'intelligence artificielle.

- **Pour le protocole de Rodez :**
 - Le nombre et le pourcentage de schizocytes ;
 - Le temps d'analyse ;

- La densité du champ érythrocytaire complet de manière binaire en séparant les champs trop denses des champs avec une bonne densité ;
 - Le nombre total d'érythrocytes estimés par compte manuel sur un des neuf champs.
-
- **Pour la microscopie optique :**
 - Le nombre et le pourcentage de schizocytes ;
 - Le temps d'analyse.

Du fait de certaines contraintes (durée d'essai limitée du module érythrocytaire et disponibilité des opérateurs), tous les échantillons n'ont malheureusement pas été analysés via ces trois méthodes. Pour chaque analyse, le nombre d'échantillons analysés sera spécifié.

Les comptes des schizocytes ont été effectués par des biologistes, des internes en biologie médicale et des techniciens de laboratoire.

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel GraphPad Prism 8.4.3®.

4. Résultats

4.1. Evaluation du module érythrocytaire et erreurs de l'intelligence artificielle

4.1.1. Comparaison des valeurs obtenues par le module érythrocytaire entre la pré-classification et la post classification

Sur l'ensemble de nos échantillons (n=180), et pour les échantillons avec une **proportion de schizocytes $\geq 1\%$** (n=130) en microscopie optique, après un test de comparaison apparié de Wilcoxon, nous n'avons **pas retrouvé de différences significatives** entre les proportions moyennes de schizocytes **avant et après classification** avec respectivement $p= 0,1621$ et $p= 0,2225$. Ces résultats sont représentés dans les figures 14 et 15

Figure 14

Comparaison des moyennes des proportions de schizocytes sur l'ensemble des données (n=180)

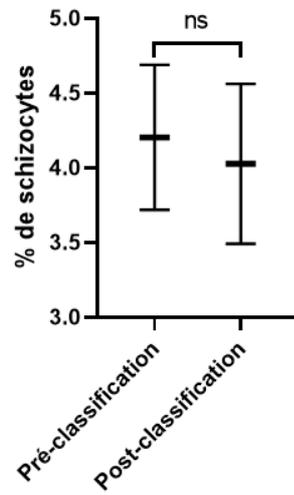
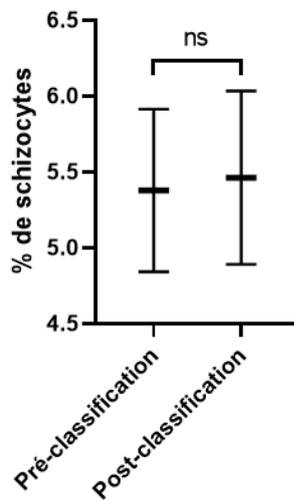


Figure 15

Comparaison des moyennes des proportions de schizocytes pour les frottis $\geq 1\%$ (n=130)



En revanche, comme présenté sur la figure 16 et sur le graphique de Bland-Altman de la figure 17 une **différence significative** a été observée pour les échantillons avec une **proportion de schizocytes <1%** (n=50) en microscopie optique avec une **surestimation de 292%** et $p < 0,0001$.

Figure 16

Comparaison des moyennes des proportions de schizocytes pour les frottis <1% (n=50)

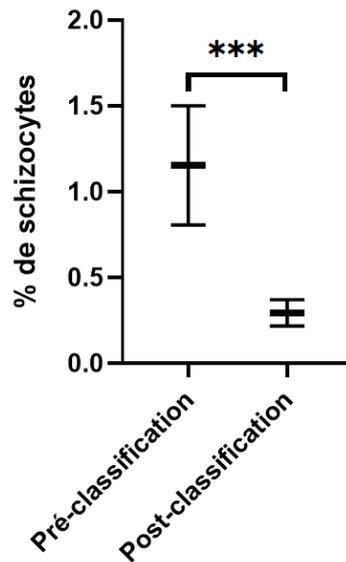
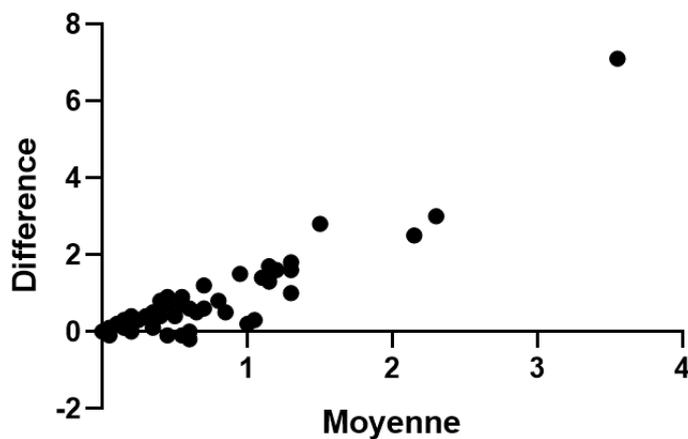


Figure 17

Graphique de Bland-Altman : Différence entre les proportion de schizocytes pré-classification - post-classification vs Moyenne



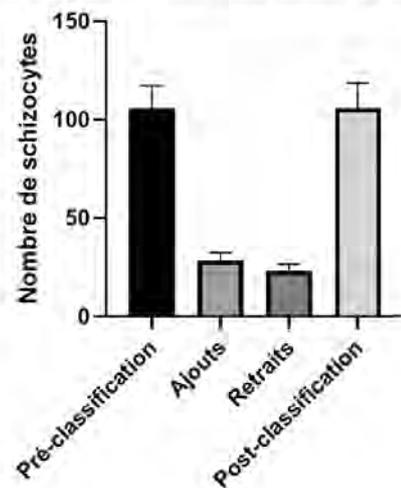
4.1.2. Comparaison du nombre de modifications effectuées entre la pré-classification et la post classification.

Pour moduler les bons résultats du module érythrocytaire en pré-classification obtenus pour les échantillons $\geq 1\%$ en schizocytes, le nombre d'ajouts et de retraits de schizocytes entre la pré-classification et la post-classification a été quantifié (n=111).

Un nombre important d'ajouts et de retraits a été retrouvé, comme présenté dans la figure 18 ci-dessous, à savoir 26.9% d'ajouts et 21.8% de retraits.

Figure 18

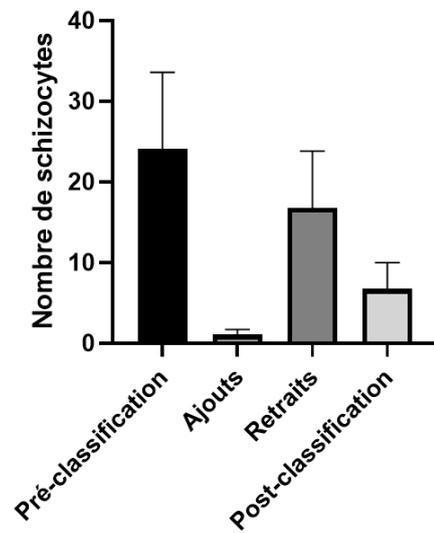
Nombre de schizocytes et nombre de modifications pour les frottis $\geq 1\%$ en microscopie optique (n=111)



Comme vu précédemment, les résultats obtenus pour les échantillons avec un pourcentage de schizocytes $< 1\%$ sont mauvais. Quand on les compare au nombre de modifications (n=29) comme présenté dans la figure 19 on observe **69,6% de retraits** et 4,3% d'ajouts par rapport à la pré-classification.

Figure 19

Nombre de schizocytes et nombre de modifications pour les frottis <1% en microscopie optique (n=29)



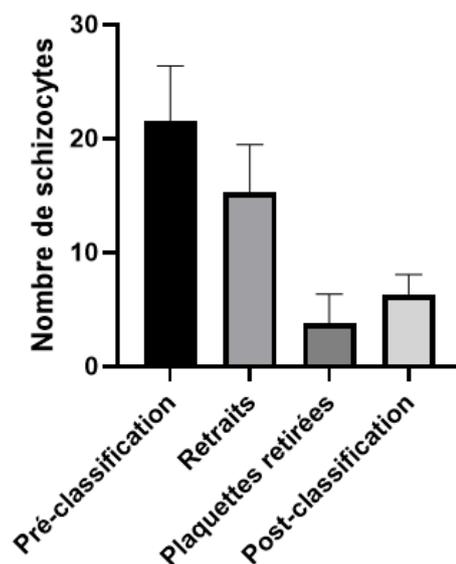
4.1.3. Analyse de l'impact des erreurs de classement du module érythrocytaire sur les comptes des schizocytes (plaquettes mal classées, schizocytes artéfactuel)

Lors de cette étude, il a été observé une erreur récurrente concernant le **mauvais classement des plaquettes** en tant que schizocytes lors de la pré-classification du module érythrocytaire.

Comme présenté dans la figure 20 l'impact, de ces erreurs a été analysé pour les échantillons avec une proportion de schizocytes <1% en microscopie optique (n=41).

Figure 20

Impact des plaquettes classées en schizocytes lors de la pré-classification pour les échantillons <1% de schizocytes (n=41)



Nous avons calculé que :

- Les plaquettes représentent en moyenne 24,9% des retraits ;
- Pour un seuil à 1%, sur ce pool d'échantillons nous avons retrouvé 50% de faux positifs ;
- En reclassant uniquement les plaquettes, nous constatons une diminution importante du nombre de faux positifs avec un passage de 50% à 35%

Pour les échantillons ayant un pourcentage de schizocytes $\geq 1\%$, nous avons estimé que l'impact des plaquettes mal classées en schizocytes serait négligeable proportionnellement au nombre de schizocytes.

Nous avons aussi analysé l'impact des schizocytes « artificiels » (schizocytes issus de rayures sur le frottis et faux schizocytes par mauvais découpage de l'intelligence artificielle) en pré-classification pour n=29 échantillons.

Malgré un impact possiblement important de manière ponctuelle sur de rares échantillons,

leur impact a été négligeable sur notre pool, en effet ils représentaient :

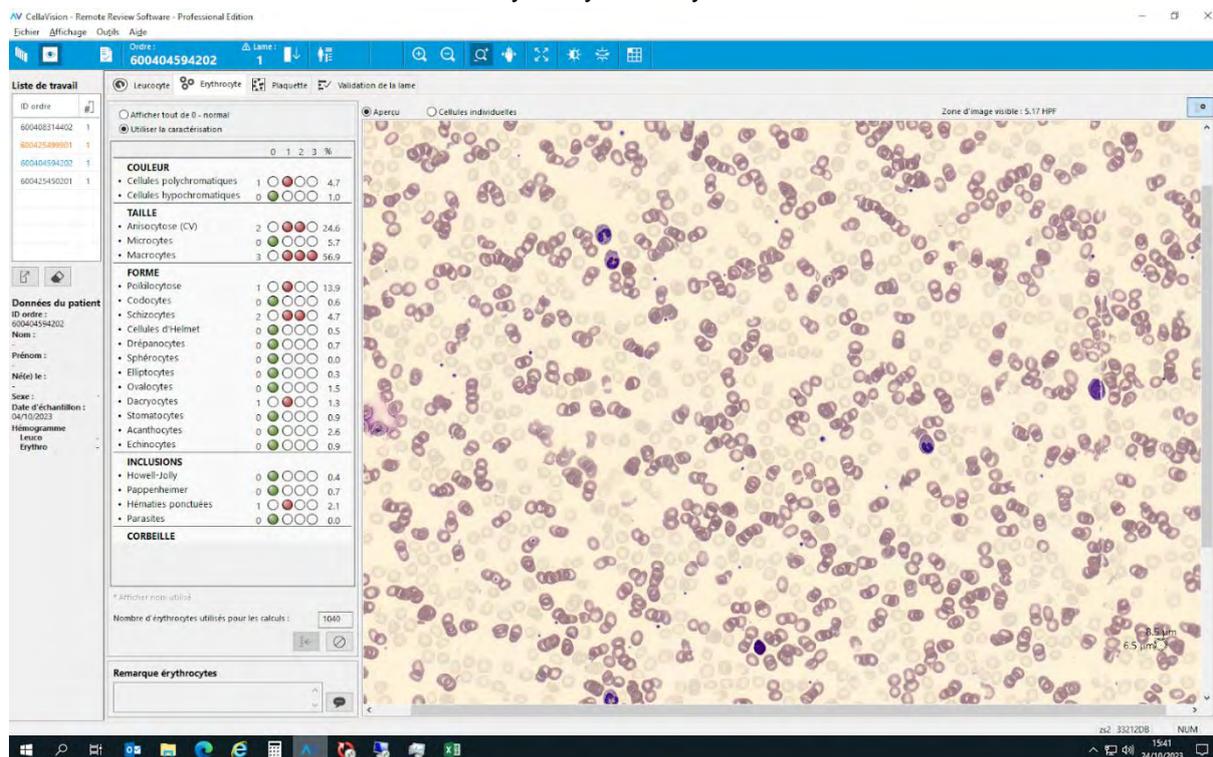
- Pour les faux schizocytes issus de rayures, **2.6%** des schizocytes totaux ;
- pour les faux schizocytes par mauvais découpage de l'intelligence artificielle, **3.2%** des schizocytes totaux.

4.1.4. Analyse du nombre d'érythrocytes exclus du compte des érythrocytes totaux par le module érythrocytaire

Pendant l'utilisation du module érythrocytaire lors de cette étude, nous nous sommes rendus compte qu'un **nombre important d'érythrocytes étaient exclus** des analyses. Ce nombre d'érythrocytes exclus impacte par conséquent le nombre **d'érythrocytes totaux** utile au logiciel, pour calculer les proportions des différentes formes érythrocytaires.

Une option permet de visualiser sur le champ érythrocytaire complet les érythrocytes exclus comme présenté dans la figure 21.

Figure 21 : Champs érythrocytaire complet : avec en surbrillance les érythrocyte exclus et en gris les érythrocytes analysés



La différence entre les valeurs moyennes du nombre d'érythrocytes totaux calculé par l'intelligence artificielle et les valeurs moyennes d'érythrocytes totaux estimés par compte manuel via le module des plaquettes a été analysée pour les champs de bonne densité érythrocytaire et pour les champs de trop forte densité érythrocytaire.

Pour estimer le nombre d'érythrocytes totaux via le module des plaquettes, le nombre d'érythrocytes présents sur un des neufs champs proposés par le module des plaquettes a été comptés manuellement, puis multiplié par neuf. Pour rappel, les neuf champs érythrocytaires présents sur le module des plaquettes, correspondent mis bout à bout, au champ érythrocytaire complet.

Une **différence significative** est retrouvée dans les deux types de champs avec :

- Pour les **champs de bonne densité** (n=46), une **sous-estimation** significative (test de Student) de **13,9%** est retrouvée et présentée dans la figure 22 ;

- Pour les **champs de trop forte densité** (n=19), une **sous-estimation** significative (test de Wilcoxon) de 46,8% est retrouvée et présentée en figure 23.

Figure 22

Comparaison entre la moyenne des érythrocytes totaux calculée par le module érythrocytaire et estimée manuellement dans les champs de bonne densité (n=46)

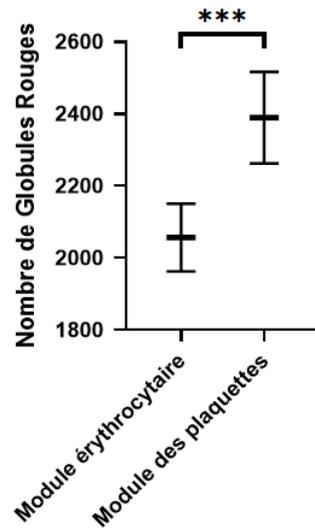
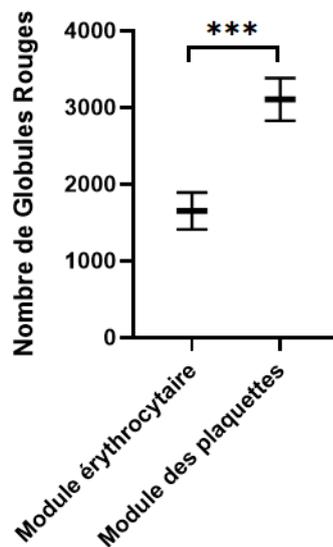


Figure 23

Comparaison entre la moyenne des érythrocytes totaux calculée par le module érythrocytaire et estimée manuellement dans les champs de trop forte densité (n=19)



4.1.5. Analyse de la sensibilité et spécificité du compte obtenu par le module érythrocytaire en pré classification et en post classification

La **sensibilité et la spécificité** du module érythrocytaire ont été analysées en **pré-classification** ainsi qu'en **post-classification**.

Pour ce faire il a été considéré comme positif les échantillons avec un pourcentage de schizocytes $\geq 1\%$ en microscopie optique (méthode de référence).

Notre pool d'échantillons se compose de n=63 échantillons positifs et n=94 échantillons négatifs.

La **sensibilité et spécificité** pour un seuil $\geq 1\%$ sont de :

- **En pré-classification :**
 - **Sensibilité=100%** avec intervalle de confiance 95% (IC95%)= [94,25% à 100,0%] ;
 - **Spécificité=62.77%** avec IC95%=[52,67% à 71,86%].

- **En post-classification :**
 - **Sensibilité=98,41%** avec IC95%=[91,54% à 99,92%] ;
 - **Spécificité=96.84%** avec IC95%=[91,12% à 99,14%].

Les tableaux complets des sensibilités/spécificités pour la pré-classification et la post-classification à différentes valeurs seuils sont disponibles respectivement en annexe 2 et 3

Les courbes ROC ainsi que les aires sous la courbe de la pré-classification et de la post-classification sont disponibles ci-dessous respectivement en figure 24 et 25.

Figure 24

Courbe ROC : Module érythrocytaire, sensibilité et spécificité en pré-classification. (frottis positif n=63; frottis négatif n=94)

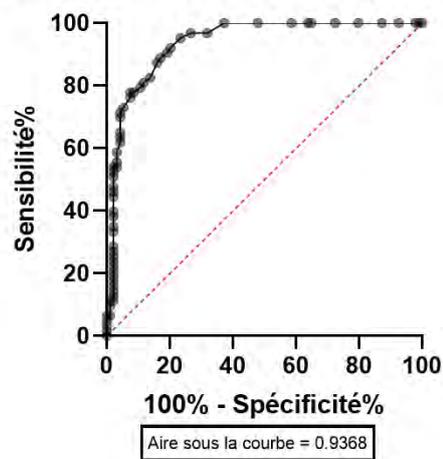
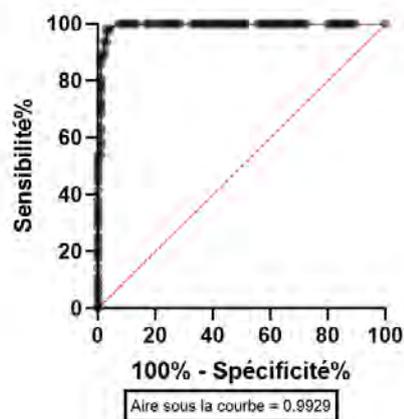


Figure 25

Courbe ROC : Module érythrocytaire, sensibilité et spécificité en post-classification. (frottis positif n=63; frottis négatif n=94)



4.2. Comparaison des différentes méthodes de compte des schizocytes

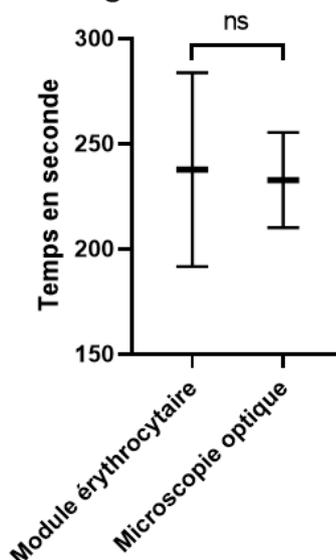
4.2.1. Comparaison des temps d'analyses entre les différentes méthodes

Les différences entre les **temps** moyens de compte, via le **module érythrocytaire** et via la **microscopie optique** ont été analysés (n=29) et sont disponibles en figure 26.

Par test de Wilcoxon apparié, il n'a **pas été retrouvé de différences significatives entre les temps** de lecture moyen de ces deux méthodes.

Figure 26

**Comparaison des temps de lectures :
Module des Rouges vs Microscopie optique (n=29)**

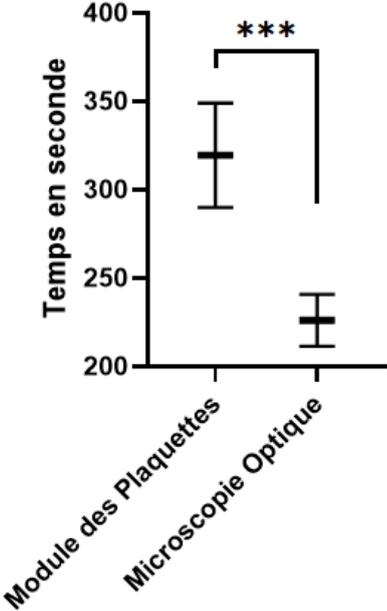


Les différences entre les **temps** moyens de compte, via le **protocole de Rodez** et via la **microscopie optique** ont été analysés (n=36) et sont disponibles en figure 27.

Par test de Wilcoxon apparié, **une différence significative** entre les temps de lecture moyen de ces deux méthodes a été retrouvé avec une **augmentation** des temps d'analyses de **41,3%** lors des comptes via le protocole de Rodez.

Figure 27

**Comparaison des temps de lectures :
Module des Plaquettes vs Microscopie Optique (n=36)**



4.2.2. Analyse de la reproductibilité des comptes pour le module érythrocytaire en post-classification et pour le protocole de Rodez

Dans la littérature, une **mauvaise reproductibilité** du compte des schizocytes en **microscopie optique** avec des coefficients de variation approchant les **50 %** a été décrite[36]. Les évaluations externes de la qualité (EEQ) de 2023 concernant le compte des schizocytes en microscopie optique retrouvaient un coefficient de variation de **47.9%** pour n=918 réponses.

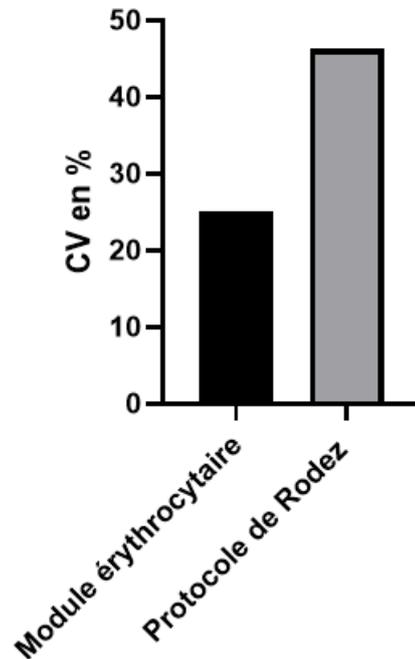
Nous avons fait lire à **21 opérateurs** différents un même frottis sanguin évalué à 7% de schizocytes en microscopie optique. Les lectures ont été effectuées via le **module érythrocytaire et le protocole de Rodez**.

Les **coefficients de variation** retrouvés sont présentés en figure 28 et sont de **25.2%** pour le module érythrocytaire et de **42.78%** pour le protocole de Rodez.

Après un test de Fisher, nous n'avons malheureusement pas pu prouver une différence significative entre ces deux coefficients de variations ($p=0.09$).

Figure 28

Reproductibilité : Coefficients de variation (n=21)



4.2.3. Comparaison des valeurs obtenues via les différentes méthodes

Nous avons analysé les différences entre les résultats obtenus pour la **quantification des schizocytes entre les différentes méthodes** pour un pool de 50 échantillons dont 42 positifs en microscopie optique par test de Wilcoxon apparié :

- **Entre la pré-classification et la microscopie optique**, nous n'avons pas retrouvé de différence significative comme présenté en figure 29 ;
- **Entre la post-classification et la microscopie optique**, nous n'avons pas retrouvé de différence significative comme présenté en figure 30 ;

- **Entre le compte via le protocole de Rodez et la microscopie optique**, nous avons observé une différence significative comme présenté en figure 31 avec une sous-estimation de 11.6% lors du compte via le protocole de Rodez ($p= 0,0312$).

Figure 29

**Comparaison entre le compte des schizocytes :
pré-classification vs microscopie optique (n=50)**

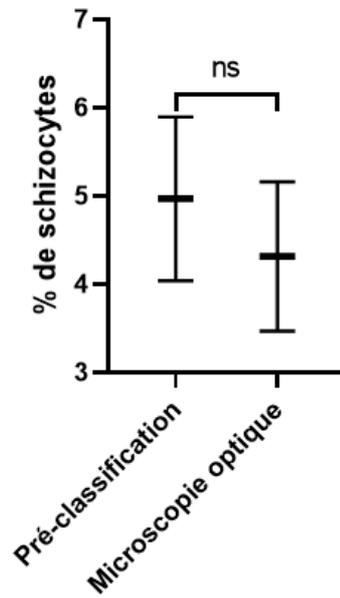


Figure 30

**Comparaison entre le compte des schizocytes :
post-classification vs microscopie optique (n=50)**

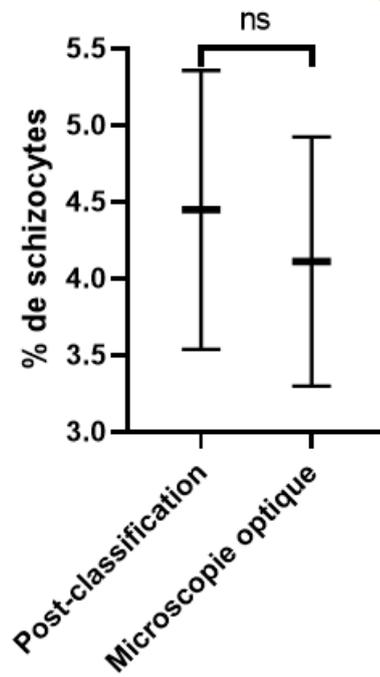
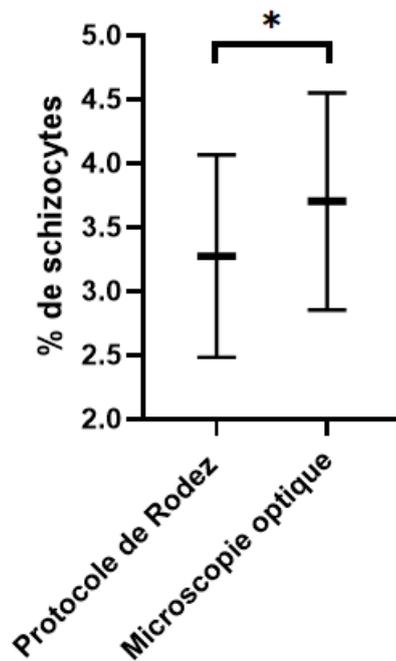


Figure 31

**Comparaison entre le compte des schizocytes :
Protocole de Rodez vs Microscopie Optique (n=50)**



5. Discussion

Nous avons eu différents retours par les utilisateurs concernant l'utilisation du module érythrocytaire :

- **Premièrement**, la maniabilité d'utilisation du module a été appréciée, avec une facilité exprimée par les participants pour discuter après les classements des différentes formes érythrocytaires. De plus, et ce, spécifiquement pour les échantillons exempts de schizocytes, les utilisateurs ont souligné la rapidité et l'efficacité avec lesquelles ils ont pu accomplir les comptes.
- **Après une utilisation plus prolongée**, les utilisateurs ont également fait part de certaines observations moins optimistes. En effet, lors des comptes impliquant un nombre important de schizocytes, le processus de reclassement des différentes formes érythrocytaires pouvait parfois être très chronophage. Les utilisateurs ont également noté que le fait de devoir cliquer sur chaque schizocyte puis de zoomer pour les visualiser dans leur environnement afin de s'assurer qu'il n'y ait pas d'erreurs de pré-classification, nuisait à la simplicité d'utilisation.

En revanche, **dans un premier temps**, les retours concernant l'utilisation du **protocole de Rodez** ont été plutôt **négatifs**.

En effet, les utilisateurs ont noté un **allongement du temps d'analyse**, et ce, pour tous les échantillons qu'ils soient positifs ou négatifs.

Cependant, **après s'être familiarisés** avec son utilisation et avoir gagné en rapidité d'analyse, les utilisateurs ont finalement apprécié ce module, qui rappelle davantage la microscopie optique habituellement utilisée pour les comptes.

De plus, ce protocole permet comme le module érythrocytaire de **mémoriser les images** et de **discuter** des différentes formes de schizocytes. En outre, il est plus aisé d'observer **l'environnement érythrocytaire** ainsi que d'éventuels artefacts en utilisant ce protocole.

On peut noter qu'en cas de décision d'utilisation du **protocole de Rodez**, il pourrait être **judicieux de l'adapter** pour faciliter son utilisation :

- Il serait envisageable de **limiter le décompte des érythrocytes totaux** à seulement un tiers d'un champ du module des plaquettes. En effet, la présence d'une grille, comme illustré dans la figure 14 facilite cette démarche. Ensuite, il serait possible d'extrapoler ce décompte pour estimer le nombre total d'érythrocytes, nécessaire au calcul de la proportion de schizocytes.
- Il serait également envisageable de **réduire le nombre de champs à observer** pour le décompte des schizocytes, par rapport aux 9 champs prévus dans le protocole de Rodez. En effet, nos calculs basés sur les comptages d'érythrocytes totaux ont révélé une moyenne d'environ 2400 érythrocytes comptés selon le protocole de Rodez, comme illustré dans la figure 24. Or, **les recommandations de l'ICSH de 2021** indiquent qu'il est conseillé de compter les schizocytes sur au moins 1000 érythrocytes[2]. Par conséquent, il serait envisageable de limiter le comptage des schizocytes à seulement **5 champs**, ce qui permettrait de gagner un temps opérateur précieux.

En outre, l'un des atouts de l'utilisation du **protocole de Rodez**, en plus de la **gratuité** du module des plaquettes, est qu'il n'y aurait pas besoin de former les utilisateurs aux **biais de l'usage de l'intelligence artificielle**.

En effet, le protocole de Rodez, par sa conception même, est **assimilable** à l'utilisation de la **microscopie optique**. Tandis que notre étude nous a montré que l'intelligence artificielle a des limites et peut engendrer des biais qu'il faut connaître :

- Au-delà des difficultés de classement en cas d'anisopoïkilocytose érythrocytaire, le logiciel se trompe régulièrement en mettant des **plaquettes**, mais également par exemple des acanthocytes en schizocytes. Cet impact des plaquettes est plus important pour les frottis sans schizocytes et diminue donc la spécificité en pré-classification.
- Les erreurs de **découpage** peuvent entraîner des erreurs de l'utilisateur s'il ne regarde pas les schizocytes dans leur environnement. Cliquer sur chaque schizocyte étant fastidieux et chronophage, après un tri nous conseillons de regarder l'image globale des érythrocytes avec les schizocytes en surbrillance pour vérifier qu'il n'y a pas d'artéfact type rayure et que la répartition est régulière.
- De nombreux schizocytes sont éliminés par le logiciel, il est **complexe de présumer de l'impact** que cette sous-estimation des érythrocytes totaux peut avoir sur le pourcentage de schizocytes calculé par le logiciel. En effet il n'est pas possible de savoir si l'intelligence artificielle exclut en proportion plus importante les schizocytes ou les érythrocytes sains.

Cette étude comprend de nombreuses **limites et biais** :

- Malgré le grand nombre de comptes réalisés les **données sont souvent partielles**. En effet, nous avons été confrontés à différentes **difficultés** pour le recueil des données :

- Nous avons eu des difficultés à faire **participer les différents opérateurs** (techniciens et internes) à notre étude, ceci s'explique par une charge de travail déjà importante au sein du laboratoire ainsi que par le nombre important de variables recueillies ainsi que l'utilisation de trois méthodes rendant les comptes chronophages.
 - Le **module érythrocytaire** nous a été proposé gratuitement par CellaVision® et ce pour **une période limitée**, nous avons donc dû concentrer nos analyses sur le module érythrocytaire dans un premier temps, et finaliser nos comptes en utilisant les autres méthodes dans un deuxième temps.
 - Nous avons identifié certaines particularités de l'intelligence artificielle, telles que des erreurs récurrentes dans la classification des plaquettes au cours de notre étude. Par conséquent, nous avons décidé **d'ajouter des variables à recueillir au cours de l'étude**.
- **Les comptes** ont souvent été effectués par **ordre séquentiel**, à savoir dans un premier temps le module érythrocytaire, puis le Protocole de Rodez, puis la microscopie optique. Ceci a potentiellement causé un biais important, en effet nous n'avons pas pu démontrer de différences significatives entre les valeurs de schizocytes obtenues par le module érythrocytaire par rapport à la microscopie optique. Mais notre **expérience** nous fait penser que le **module érythrocytaire surestime** le nombre de schizocytes par rapport à la microscopie optique. En effet, si de nombreux globules rouges ont été classés en schizocytes, l'opérateur aura tendance à en laisser un certain nombre alors qu'en méthode optique il ne les aurait pas laissés. Le fait d'avoir utilisé le module érythrocytaire avant la microscopie optique de manière presque systématique, a pu induire les opérateurs à compter plus de schizocytes en microscopie optique « lissant » ainsi la surestimation du module érythrocytaire.

- En outre, une **proportion significative** des comptes a été réalisée par **un seul opérateur**, ce qui pourrait introduire un biais potentiellement important. En effet, la répétition de nombreux comptes dans les différentes méthodes, tend à atténuer les différences à long terme, et à harmoniser les comptes entre eux, créant ainsi en plus d'un biais opérateur dépendant, un **biais de progression ou d'amélioration**.
 - Par exemple, si nous retirons les comptes effectués par l'auteur de cette thèse et que nous effectuons un test de Wilcoxon apparié sur le pool restant (n=12), nous trouvons une surestimation significative des valeurs de schizocytes obtenues par le module érythrocytaire, par rapport à la microscopie optique (p=0.0024) comme présenté dans la figure de l'annexe 4.

- Nous n'avons pas pu analyser la **sensibilité et la spécificité** du **protocole de Rodez** en raison d'un nombre de comptes trop faible, mais nous supposons qu'elle est **similaire à la microscopie** optique du fait que ce protocole est une analyse optique dans un champ numérisé par le microscope intelligent DM-1200®.

Concernant **notre avis** sur le **module érythrocytaire** et sur le **protocole de Rodez**, nous pouvons dire que :

- Les deux méthodes permettent une bonne **formation initiale et continue**, de par la possibilité de revenir facilement sur les comptes effectués par les opérateurs ;
- Le **module érythrocytaire** semble montrer une **meilleure harmonisation** des comptes étant donné la diminution du coefficient de variation lors de l'analyse de reproductibilité, par rapport au protocole de Rodez, ainsi qu'à la microscopie optique ;
- Le **module érythrocytaire** présente une **forte sensibilité**.

Il serait intéressant **d'analyser** les capacités de pré-classification du **module érythrocytaire** pour le **screening** en routine avec la mise en place potentielle de nouveaux seuils, du fait d'une mauvaise spécificité pour un seuil à 1% (sp=62.77%).

Il serait aussi utile d'analyser les performances du **module érythrocytaire** ou d'autres intelligences artificielles plus récentes pour la détection de schizocytes dans les **MAT débutantes**. En effet, **31% des PTT sont négatifs en schizocytes** au moment du diagnostic, et la négativité des schizocytes est reconnue comme étant un facteur d'erreur diagnostic[17].

6. Conclusion

La recherche des schizocytes sur frottis sanguins peut avoir une importance cruciale dans les suspicions de microangiopathies thrombotiques. Malgré les recommandations des sociétés savantes, le décompte est long, souvent difficile et la variabilité inter opérateurs reste très importante.

Mon travail de thèse a permis d'évaluer deux nouvelles méthodes utilisant un microscope automatisé, le DM-1200® de CellaVision®.

Nous avons tout d'abord étudié le **module érythrocytaire** avec classification automatique des schizocytes par intelligence artificielle. Cette méthode montre :

- Une excellente **détection des schizocytes**, et ce, dès la pré-classification (sensibilité de 100% avec IC95%= [94,25% à 100,0%]) ;

- Un **temps de classification** similaire au temps de compte en microscopie optique ;
- Une **surestimation en pré-classification**, et ce, de manière importante, du nombre de schizocytes chez les patients négatifs en schizocytes (292%)
- Une **mauvaise spécificité** pour un seuil à 1% (62,77%)
- Une **équivalence à la microscopie optique en post-classification**, avec une courbe ROC ayant une aire sous la courbe de 0.99 ;
- L'intelligence artificielle montre ses **limites** en mettant par exemple régulièrement des **plaquettes** en schizocytes, en effectuant parfois de **mauvais découpages** ou en ne prenant pas en compte les **rayures sur le frottis**. Dans la plupart des cas cela n'a que peu d'impact sur les comptes des schizocytes mais peut générer des erreurs de manière ponctuelle ;
- Par ailleurs, l'intelligence artificielle **sous-estime** de manière majeure **le nombre d'érythrocytes** totaux du champ observé, que ce soit dans les champs de bonne densité (13.9%) ou de trop forte densité (46.8%). Il est difficile d'estimer l'impact de cette sous-estimation sur le compte des schizocytes.

Nous avons ensuite évalué le **module des plaquettes**, avec décompte manuel des schizocytes sur un champ numérisé en utilisant un protocole actuellement utilisé au CH de **Rodez**. Notre étude a montré que :

- Cette méthode est plus **chronophage** que la microscopie optique avec une augmentation des temps d'analyse de 41.3%, mais cela **pourrait être optimisé** ;
- Il **sous-estime dans notre étude** de 11.6% les valeurs de schizocytes par rapport à la microscopie optique ;

- Il nous apparaît **plus adapté** au compte des schizocytes chez les **patients positifs**, du fait de la plus grande facilité pour l'opérateur de voir les schizocytes dans leur environnement, par rapport au module érythrocytaire, et ainsi de pouvoir mieux apprécier leurs formes.

Ces **deux méthodes** permettent d'améliorer la formation initiale et continue et contribuent à harmoniser les comptes inter opérateurs. Mais elles restent contributives de la **qualité du champ érythrocytaire** photographié par le DM-1200®. Dans les cas où le champ érythrocytaire est de mauvaise qualité du fait d'une trop forte densité ou même de la présence d'hématies en rouleaux, l'analyse via ces deux méthodes se révèle inadaptée. La **microscopie optique, technique de référence**, restera alors la technique plus appropriée.

L'intelligence artificielle est un sujet d'actualité majeur dans de nombreuses disciplines. Les laboratoires d'hématologie utilisent depuis maintenant plusieurs décennies les microscopes automatisés, mais le module érythrocytaire, payant, est encore peu déployé. Mon travail, axé spécifiquement sur **l'évaluation de cette intelligence artificielle** (Annexe 3), a été accepté par le Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire pour **communication orale** au congrès de la Société Française d'Hématologie le 27 mars 2024. Cela montre l'intérêt de notre discipline dans la compréhension de ces nouvelles technologies.

Différents microscopes automatisés sont en train d'arriver sur le marché et vont concurrencer la technologie CellaVision®. Reste à voir quels sont leurs qualités et leurs défauts. Mais pour l'instant, une chose est sûre, la vérification par l'œil aguerri d'un cytologiste reste essentielle.

Vu et permis d'imprimer,
 À Toulouse, le 02/04/2024
 La Présidente de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
 Faculté de Santé
 Par délégation, le Doyen - Directeur du Département de
 Médecine, Maïeutique et Paramédical
 Pr Thomas GEERAERTS

Pr Dominique CHAUEAU
 Département de Néphrologie et Transplantation d'Organes
 CHU RANGUEIL
 1, avenue Jean Poulhès - TSA 50032
 31059 TOULOUSE Cedex
 Tél. 05 61 32 32 83 - Fax 05 61 32 23 51
 N° RPPS : 10006449693

Vu, et autorisé à soutenir
 Thoma
 26.03.24

Bibliographie

1. Lesesve JF, Salignac S, Bordigoni P, Lecompte T, Troussard X. Rôle du biologiste confronté à une recherche de schizocytes. *Hématologie*. 1 mai 2007;13(3):193-204.
2. Zini G, d'Onofrio G, Erber WN, Lee SH, Nagai Y, Basak GW, et al. 2021 update of the 2012 ICSH Recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes: Impact and revisions. *Int J Lab Hematol*. déc 2021;43(6):1264-71.
3. Lesesve JF, Lecompte T, Alla F, Fenneteau O, Cynober T, Siest JP, et al. Schizocytes : reproductibilité du diagnostic morphologique et intérêt de méthodes observateur-indépendantes. *Annales de Biologie Clinique*. 1 mai 2005;63(3):279-89.
4. Fossat C, Roméo M. Schizocytes : recherche et interprétation. 2006;
5. Alkhouli M, Farooq A, Go RS, Balla S, Berzingi C. Cardiac prostheses-related hemolytic anemia. *Clin Cardiol*. 6 mai 2019;42(7):692-700.
6. Siah S, El Khatib K, Messaoudi N. Mécanismes et traitement de l'anémie aiguë chez le brûlé grave. *Ann Burns Fire Disasters*. 30 juin 2016;29(2):108-10.
7. Klein PJ, Pullman H, de Lacroix WF, Pahnke V, Imig H, Fischer R. [Quantitative determination of fragment erythrocytes (schistocytes) in healthy subjects and patients after surgery]. *Klin Wochenschr*. 15 sept 1975;53(18):847-51.
8. Levi M, ten Cate H. Disseminated Intravascular Coagulation. *New England Journal of Medicine*. 19 août 1999;341(8):586-92.
9. Lesesve JF, Martin M, Banasiak C, André-Kerneis E, Bardet V, Lusina D, et al. Schistocytes in disseminated intravascular coagulation. *Int J Lab Hematol*. août 2014;36(4):439-43.
10. Bandaru SS, Killeen RB, Gupta V. Poikilocytosis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 11 mars 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562141/>
11. Purpura thrombotique thrombocytopénique [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 12 mars 2024]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3375723/fr/purpura-thrombotique-thrombocytopenique
12. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's Disease. Wood AJJ, éditeur. *N Engl J Med*. 12 août 2004;351(7):683-94.

13. Moroniti JJ, Vrbensky JR, Nazy I, Arnold DM. Targeted ADAMTS-13 replacement therapy for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* avr 2024;22(4):896-904.
14. Retornaz F, Soubeyrand J. Le purpura thrombotique thrombocytopenique : physiopathologie et traitement.
15. Grall M, Azoulay E, Galicier L, Provôt F, Wynckel A, Poullin P, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura misdiagnosed as autoimmune cytopenia: Causes of diagnostic errors and consequence on outcome. Experience of the French thrombotic microangiopathies reference centre. *American Journal of Hematology.* 2017;92(4):381-7.
16. Coppo P, Scully M, Cataland S, Peyvandi F, Knoebl P, Kremer Hovinga J, et al. Résultats d'efficacité d'une analyse intégrée des essais cliniques de phase 2 et 3 évaluant caplacizumab dans le purpura thrombotique thrombocytopenique acquis. *La Revue de Médecine Interne.* 1 juin 2019;40:A76-7.
17. Scully M, Cataland S, Peyvandi F, Coppo P, Knoebl P, Kremer Hovinga J, et al. Résultats de l'essai de phase III HERCULES – Essai contrôlé randomisé en double aveugle du caplacizumab dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopenique acquis. *La Revue de Médecine Interne.* 1 juin 2018;39:A61-2.
18. Kremer Hovinga JA, George JN. Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *New England Journal of Medicine.* 24 oct 2019;381(17):1653-62.
19. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 12 août 2017;390(10095):681-96.
20. Jokiranta TS. HUS and atypical HUS. *Blood.* 25 mai 2017;129(21):2847-56.
21. Bilan des connaissances relatives aux Escherichia Coli producteurs de Sh | vie-publique.fr [Internet]. 2024 [cité 17 mars 2024]. Disponible sur: <http://www.vie-publique.fr/rapport/26938-bilan-des-connaissances-relatives-aux-escherichia-coli-producteurs-de-sh>
22. Brugère H. E. coli producteurs de shigatoxines (STEC): définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (EHEC).
23. Karpman D, Loos S, Tati R, Arvidsson I. Haemolytic uraemic syndrome. *Journal of Internal Medicine.* 2017;281(2):123-48.
24. Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Le Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU) Février 2021 [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 23 janv 2024]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3236879/fr/syndrome-hemolytique-et-uremique-shu
25. M. Fila G. Deschênes. Syndrome hémolytique et urémique post-diarrhée de l'enfant. *Revue générale Néphrologie.*

26. Freedman SB, van de Kar NCAJ, Tarr PI. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* and the Hemolytic–Uremic Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 12 oct 2023;389(15):1402-14.
27. Orth D, Khan AB, Naim A, Grif K, Brockmeyer J, Karch H, et al. Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome. *J Immunol*. 15 mai 2009;182(10):6394-400.
28. Garnier A, Brochard K, Kwon T, Sellier-Leclerc AL, Lahoche A, Launay EA, et al. Efficacy and Safety of Eculizumab in Pediatric Patients Affected by Shiga Toxin-Related Hemolytic and Uremic Syndrome: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Am Soc Nephrol*. 1 sept 2023;34(9):1561-73.
29. Nitschke M, Sayk F, Härtel C, Roseland RT, Hauswaldt S, Steinhoff J, et al. Association Between Azithromycin Therapy and Duration of Bacterial Shedding Among Patients With Shiga Toxin–Producing Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA*. 14 mars 2012;307(10):1046-52.
30. Raina R, Krishnappa V, Blaha T, Kann T, Hein W, Burke L, et al. Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome: An Update on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. 2019;23(1):4-21.
31. Frémeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, Bienaimé F, Dragon-Durey MA, Ngo S, et al. Genetics and Outcome of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Nationwide French Series Comparing Children and Adults. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5 avr 2013;8(4):554-62.
32. Frémeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Roumenina L, Dragon–Durey MA, Loirat C. Syndrome hémolytique et urémique lié à des anomalies du complément. *La Revue de Médecine Interne*. 1 avr 2011;32(4):232-40.
33. Zini G, d’Onofrio G, Briggs C, Erber W, Jou JM, Lee SH, et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes. *Int J Lab Hematol*. avr 2012;34(2):107-16.
34. Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Laboratory measurement of schistocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2007;29(2):149-51.

ANNEXE 1

Avantages et limites du module érythrocytaire du logiciel CellaVision® dans la quantification des schizocytes

Introduction : La recherche des schizocytes est un examen primordial en hématologie. Un CV autour de 50% du compte en microscopie optique est classiquement décrit. Nous avons évalué le module érythrocytaire du logiciel CellaVision® pour le décompte automatique des schizocytes.

Matériel et Méthode : Nous avons inclus 165 échantillons dont 63 présentant un nombre de schizocytes $\geq 1\%$ en microscopie optique. Les frottis sanguins ont été étalés et colorés avec un SP-50® (Sysmex®) et analysés par un DM-1200® (CellaVision®).

Résultats : Le CV retrouvé est de 25,2%. Sur les frottis $< 1\%$ en schizocytes, une surestimation de 292% a été retrouvée entre les valeurs avant et après reclassification. Sur les frottis $\geq 1\%$ en schizocytes, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les valeurs obtenues avant et après reclassification, mais de nombreuses modifications ont été effectuées avec 26.9% d'ajouts et 21.8% de retraits. Pour un seuil de 1% on retrouve en pré-tri une sensibilité à 100% et spécificité à 62,8%. Différentes limites du logiciel ont été observées. Au-delà de la difficulté logique à différencier les schizocytes de microcytes ou hématies déformées, sont en effet classés en schizocytes des plaquettes, acanthocytes ou des artéfacts comme des rayures du frottis. De plus, des biais existent : découpe des hématies présentant des images tronquées à l'utilisateur, compte des érythrocytes totaux erroné.

Conclusion: Notre étude montre des biais à connaître lors de l'utilisation du logiciel mais une utilité pour la formation et l'harmonisation des comptes et un intérêt potentiel pour le screening des schizocytes.

ANNEXE 2 : Sensibilité et Spécificité du module érythrocytaire en pré-classification

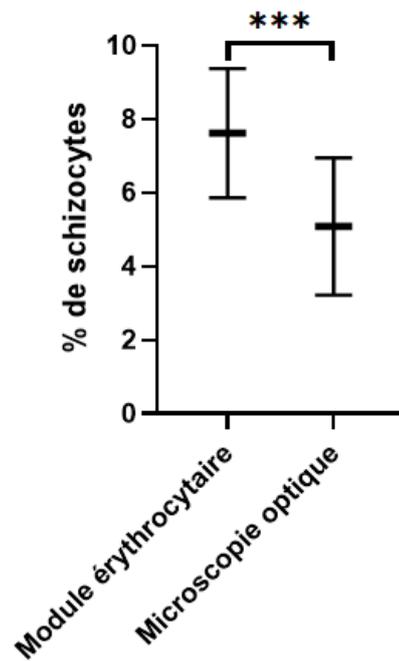
Colonne1	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI2	Likelihood ratio
> 0.5500	100	94,25% to 100,0%	27,66	19,63% to 37,44%	1,382
> 0.6350	100	94,25% to 100,0%	35,11	26,22% to 45,17%	1,541
> 0.6850	100	94,25% to 100,0%	36,17	27,18% to 46,25%	1,567
> 0.7500	100	94,25% to 100,0%	41,49	32,06% to 51,59%	1,709
> 0.8500	100	94,25% to 100,0%	52,13	42,15% to 61,94%	2,089
> 0.9500	100	94,25% to 100,0%	62,77	52,67% to 71,86%	2,686
> 1.050	96,83	89,14% to 99,44%	68,09	58,11% to 76,64%	3,034
> 1.150	96,83	89,14% to 99,44%	73,4	63,68% to 81,29%	3,641
> 1.250	95,24	86,91% to 98,70%	76,6	67,10% to 84,01%	4,069
> 1.350	92,06	82,73% to 96,56%	79,79	70,57% to 86,66%	4,555
> 1.450	90,48	80,74% to 95,56%	80,85	71,75% to 87,53%	4,725
> 1.550	88,89	78,80% to 94,51%	82,98	74,13% to 89,24%	5,222
> 1.700	87,3	76,89% to 93,42%	84,04	75,33% to 90,08%	5,471
> 1.850	82,54	71,38% to 89,96%	86,17	77,76% to 91,74%	5,968
> 1.950	80,95	69,59% to 88,75%	88,3	80,25% to 93,34%	6,918
> 2.050	79,37	67,83% to 87,52%	89,36	81,51% to 94,12%	7,46
> 2.150	77,78	66,09% to 86,27%	91,49	84,10% to 95,62%	9,139
> 2.250	77,78	66,09% to 86,27%	92,55	85,42% to 96,35%	10,44
> 2.500	76,19	64,36% to 85,01%	92,55	85,42% to 96,35%	10,23
> 2.800	73,02	60,97% to 82,42%	94,68	88,15% to 97,71%	13,73
> 2.950	71,43	59,30% to 81,10%	95,74	89,56% to 98,33%	16,79
> 3.050	69,84	57,64% to 79,76%	95,74	89,56% to 98,33%	16,41
> 3.150	65,08	52,75% to 75,67%	95,74	89,56% to 98,33%	15,29
> 3.250	63,49	51,15% to 74,28%	95,74	89,56% to 98,33%	14,92
> 3.350	61,9	49,56% to 72,88%	95,74	89,56% to 98,33%	14,55
> 3.450	58,73	46,42% to 70,04%	96,81	91,03% to 99,13%	18,4
> 3.600	55,56	43,32% to 67,15%	96,81	91,03% to 99,13%	17,41
> 3.750	53,97	41,79% to 65,69%	96,81	91,03% to 99,13%	16,91
> 3.900	53,97	41,79% to 65,69%	97,87	92,57% to 99,62%	25,37
> 4.050	52,38	40,27% to 64,22%	97,87	92,57% to 99,62%	24,62
> 4.150	50,79	38,76% to 62,73%	97,87	92,57% to 99,62%	23,87
> 4.250	47,62	35,78% to 59,73%	97,87	92,57% to 99,62%	22,38
> 4.500	46,03	34,31% to 58,21%	97,87	92,57% to 99,62%	21,63
> 4.850	44,44	32,85% to 56,68%	97,87	92,57% to 99,62%	20,89
> 5.200	39,68	28,53% to 52,02%	97,87	92,57% to 99,62%	18,65

ANNEXE 3 : Sensibilité et Spécificité du module érythrocytaire en post-classification

Colonne1	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI2	Likelihood ratio
> 0.5230	100	94,25% to 100,0%	86,32	77,98% to 91,83%	7,308
> 0.5730	100	94,25% to 100,0%	87,37	79,21% to 92,62%	7,917
> 0.6115	100	94,25% to 100,0%	88,42	80,45% to 93,41%	8,636
> 0.6405	100	94,25% to 100,0%	89,47	81,70% to 94,18%	9,5
> 0.7289	100	94,25% to 100,0%	90,53	82,97% to 94,94%	10,56
> 0.8404	100	94,25% to 100,0%	91,58	84,25% to 95,67%	11,88
> 0.8904	100	94,25% to 100,0%	92,63	85,56% to 96,39%	13,57
> 0.9399	98,41	91,54% to 99,92%	95,79	89,67% to 98,35%	23,37
> 0.9899	98,41	91,54% to 99,92%	96,84	91,12% to 99,14%	31,16
> 1.050	96,83	89,14% to 99,44%	96,84	91,12% to 99,14%	30,66
> 1.115	93,65	84,78% to 97,50%	96,84	91,12% to 99,14%	29,66
> 1.165	93,65	84,78% to 97,50%	97,89	92,65% to 99,63%	44,48
> 1.250	90,48	80,74% to 95,56%	97,89	92,65% to 99,63%	42,98
> 1.324	88,89	78,80% to 94,51%	97,89	92,65% to 99,63%	42,22
> 1.374	88,89	78,80% to 94,51%	98,95	94,28% to 99,95%	84,44
> 1.497	87,3	76,89% to 93,42%	98,95	94,28% to 99,95%	82,94
> 1.597	85,71	75,03% to 92,30%	98,95	94,28% to 99,95%	81,43
> 1.700	80,95	69,59% to 88,75%	98,95	94,28% to 99,95%	76,9
> 2.050	79,37	67,83% to 87,52%	98,95	94,28% to 99,95%	75,4
> 2.350	77,78	66,09% to 86,27%	98,95	94,28% to 99,95%	73,89
> 2.450	76,19	64,36% to 85,01%	98,95	94,28% to 99,95%	72,38
> 2.522	73,02	60,97% to 82,42%	98,95	94,28% to 99,95%	69,37
> 2.572	71,43	59,30% to 81,10%	98,95	94,28% to 99,95%	67,86
> 2.620	69,84	57,64% to 79,76%	98,95	94,28% to 99,95%	66,35
> 2.720	68,25	56,00% to 78,41%	98,95	94,28% to 99,95%	64,84
> 2.830	63,49	51,15% to 74,28%	98,95	94,28% to 99,95%	60,32
> 2.880	61,9	49,56% to 72,88%	98,95	94,28% to 99,95%	58,81
> 2.909	58,73	46,42% to 70,04%	98,95	94,28% to 99,95%	55,79
> 2.959	57,14	44,86% to 68,60%	98,95	94,28% to 99,95%	54,29
> 3.100	53,97	41,79% to 65,69%	98,95	94,28% to 99,95%	51,27
> 3.250	53,97	41,79% to 65,69%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.350	52,38	40,27% to 64,22%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.433	50,79	38,76% to 62,73%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.483	49,21	37,27% to 61,24%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.539	47,62	35,78% to 59,73%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.603	46,03	34,31% to 58,21%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.664	44,44	32,85% to 56,68%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.750	41,27	29,96% to 53,58%	100	96,11% to 100,0%	
> 3.950	38,1	27,12% to 50,44%	100	96,11% to 100,0%	
> 4.150	36,51	25,72% to 48,85%	100	96,11% to 100,0%	

ANNEXE 4

Comparaison entre le compte des schizocytes après retrait des comptes de l'auteur de la thèse: Module érythrocytaire vs Microscopie Optique (n=12)



ZOUITINA Sami

2024 TOU3 1532

Comparaison de méthodes pour le compte des schizocytes sur frottis sanguin entre le module érythrocytaire du logiciel CellaVision®, le protocole de Rodez par utilisation du module des plaquettes du logiciel CellaVision® et la méthode de référence par microscopie optique.

RESUME EN FRANÇAIS :

Les schizocytes sont des hématies fragmentées circulantes dont la détection repose sur l'observation du frottis sanguin. Ils sont une des conséquences d'une hémolyse mécanique et seront d'une aide importante dans le diagnostic des microangiopathies thrombotiques. Cette thèse porte sur la comparaison entre trois méthodes de décompte des schizocytes : la microscopie optique (méthode de référence) ; le compte via le module érythrocytaire payant du DM-1200 (CellaVision®) et via un protocole mis en place par le laboratoire de Rodez utilisant le module des plaquettes gratuit du DM-1200. L'utilisation du module érythrocytaire a montré principalement : une surestimation des comptes (292%) pour les valeurs de schizocytes < 1%, une amélioration du coefficient de variation (CV=25.2%), des temps de classifications similaires à la microscopie optique ainsi qu'une sensibilité de 100% en pré-classification avant correction par l'utilisateur. L'utilisation du protocole de Rodez a montré principalement : une augmentation des temps d'analyses (41.3%), une légère sous-estimation du compte des schizocytes (11,6%) et un coefficient de variation équivalent à la microscopie optique (CV=42,78%). Ces deux méthodes nous semblent intéressantes, notamment pour améliorer la formation des opérateurs mais elles restent contributives de la qualité du champ érythrocytaire photographié par le DM-1200, c'est pourquoi elles ne pourront actuellement pas complètement remplacer la microscopie optique.

TITRE EN ANGLAIS : Comparison of methods for counting schistocytes on blood smears between the erythrocyte module of CellaVision® software, the Rodez protocol using the platelet module of CellaVision® software and the reference method by optical microscopy.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée en Biologie Médicale

MOTS-CLÉS : Schizocytes, Microangiopathies thrombotiques, CellaVision®, Module érythrocytaire, DM1200, Purpura thrombotique thrombocytopénique, Syndrome hémolytique et urémique, PTT, SHU