

## **Sysmex Educational Enhancement & Development**

Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex

Bulletin d'information SEED-Afrique | No 5 | Juin 2011

### *Hématologie de base*

*L'objectif de ce bulletin d'information est de donner un aperçu des avantages qu'il y a à remplacer un analyseur d'hématologie différentiel en 3 populations par un modèle en 5 populations.*

#### **En quoi la numération différentielle des leucocytes est-elle nécessaire ?**

Les leucocytes se divisent en plusieurs sous-populations présentant diverses fonctions biologiques. La numération leucocytaire (NGB) en elle-même n'est pas d'une grande utilité pour évaluer l'état de santé d'un individu. Une NGB normal ne signifie pas pour autant qu'il se porte bien. Compte tenu de cet élément, il est courant de pratiquer ce que l'on appelle une numération leucocytaire différentielle.

La numération leucocytaire différentielle standard partage les leucocytes en 5 sous-populations principales :

- Lymphocytes
- Monocytes
- Neutrophiles
- Éosinophiles
- Basophiles

La comptabilisation manuelle au microscope est la méthode traditionnelle pour la différenciation des leucocytes. Elle nécessite la préparation d'un frottis mince (technique du wedge smear) qui est ensuite séché à l'air libre puis coloré avec l'un des colorants de Romanowsky. Dans la première méthode de référence pour la numération leucocytaire différentielle, publiée par l'Institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI) en 1984, quatre opérateurs exécutaient chacun une numération différentielle de 200 cellules sur deux frottis différents prélevés du même du tube d'échantillon. La moyenne des quatre numérations devait ensuite être consignée. Constatant que cette configuration était irréaliste, le CLSI a depuis réduit dans ses recommandations le nombre d'opérateurs à deux.

Toutefois, la plupart des laboratoires sont bien trop occupés pour suivre cette procédure qui nécessite beaucoup de temps. Dans la pratique les numérations différentielles manuelles proviennent donc généralement d'un seul opérateur réalisant 100 numérations sur un unique frottis. La numération différentielle était à l'origine représentée en termes relatifs uniquement, à savoir en pourcentage. Mais aujourd'hui, il est généralement admis que les valeurs absolues étaient plus instructives. Les populations leucocytaires sont donc habituellement exprimées en valeurs absolues ( $\times 10^9/L$ ) et en pourcentages (%) de la numération leucocytaire totale.

Grâce aux progrès technologiques, il est devenu possible de procéder à la différenciation des cellules sanguines sur des analyseurs automatiques. Cette avancée a pour principaux avantages la vitesse d'exécution et l'amélioration de l'exactitude. Bien loin de la numération manuelle de 100 cellules, les analyseurs automatiques traitent en moyenne 15 000 cellules par échantillon.

#### **Numération leucocytaire différentielle automatisée**

Les analyseurs d'hématologie automatiques pouvant différencier les leucocytes sont devenus une chose courante dans les laboratoires d'hématologie de routine. Ces analyseurs sont classés en deux grandes catégories: les analyseurs différentiels en 3 populations et ceux en 5 populations.

##### **a) Analyseurs différentiels en 3 populations**

La fonction de différenciation en 3 populations des analyseurs d'hématologie automatique se basent sur la technologie de l'impédance afin de compter et de séparer les leucocytes en fonction de leur taille. Les érythrocytes sont lysés à l'aide de réactifs chimiques tandis que les leucocytes restent intacts. La technologie de l'impédance

implique le passage de cellules en suspension à travers un micro orifice sur lequel est appliqué un courant électrique. Le passage de chaque cellule modifie l'impédance électrique et elle peut donc être comptée. Le degré de variation est directement proportionnel à la taille de la cellule. La méthode d'hydrofocalisation améliore encore l'exactitude des résultats : elle garantit que les cellules passent à travers l'orifice en une seule file et élimine donc les estimations de volume incorrectes, qui peuvent par exemple se produire si 2 cellules passent en même temps.

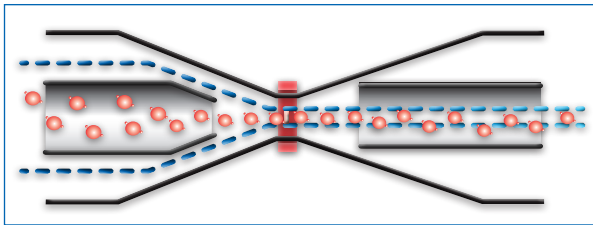


Figure 1. Principe de l'impédance avec méthode d'hydrofocalisation.

Trois groupes différents sont identifiés en fonction du volume des cellules :

- les cellules de grande taille ou granulocytes
- les cellules de petite taille ou lymphocytes
- les cellules de taille moyenne ou monocytes.

Les analyseurs différentiels en 3 populations de Sysmex, le POCH-100i et le KX-21N sont plus sophistiqués que les autres systèmes dans la mesure où ils peuvent identifier séparément les neutrophiles grâce à la composition chimique des réactifs.

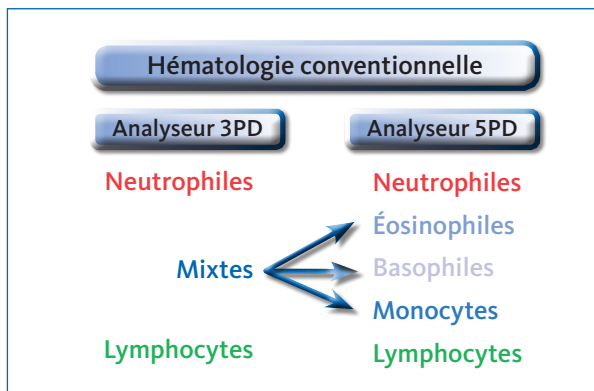


Figure 2. La numération différentielle en 3 populations selon Sysmex. Les neutrophiles et lymphocytes sont identifiés séparément, tandis que les monocytes, les éosinophiles et basophiles sont regroupés dans une population dite mixte.

Les études comparant l'exactitude des numérations différentielles en 3 populations automatisées à celle de la première méthode de référence pour la numération manuelle de 800 cellules révèlent que bien que la précision soit excellente, l'exactitude est moins élevée, en particulier pour les échantillons anormaux où les numérations relatives et l'apparence morphologique des cellules peuvent être modifiées. Bien que l'analyse automatique représente une avancée décisive, il est généralement admis que cette génération d'appareils qui permet de différencier 3 groupes uniquement n'est pas idéale.

Chez un individu en bonne santé, les 5 sous-populations principales se situent dans les plages de valeurs habituelles et les ratios (numération en %) observés sont ordinaires.

Chez un individu malade, toutefois :

- les ratios peuvent être faussés, et les numérations en pourcentage n'ont donc aucun sens en l'absence de valeur absolue.
- les sous-populations peuvent augmenter, par exemple le nombre d'éosinophiles peut augmenter suite à une réaction allergique.
- les sous-populations peuvent diminuer, par exemple le nombre de lymphocytes peut être progressivement réduit chez un patient dont l'infection par le VIH n'est pas traitée.
- des cellules immatures que l'on trouve d'ordinaire uniquement dans la moelle osseuse peuvent apparaître dans le sang périphérique, par exemple des granulocytes immatures chez des patients présentant une infection sévère.
- des cellules immatures anormales peuvent apparaître, par exemple des cellules blastiques chez des patients atteints de leucémie aiguë.

Une différenciation en 5 populations est bien plus instructive qu'une en 3 populations lorsque l'on cherche à identifier la maladie dont un individu est atteint.

#### b) Analyseurs différentiels en 5 populations

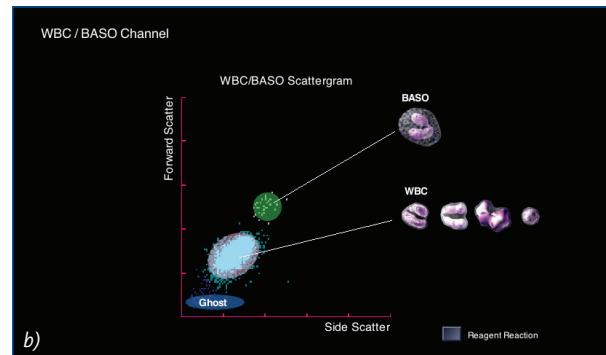
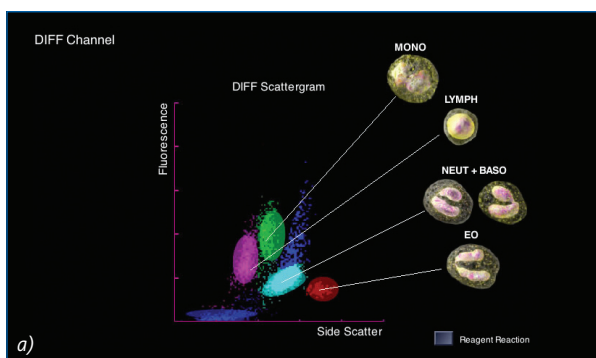
Pour la différenciation leucocytaire, les analyseurs différentiels automatiques en 5 populations combinent à divers degrés impédance volumétrique, énergie électromagnétique de haute fréquence et techniques de colorations optiques et cytochimiques. La principale

différence avec la technologie différentielle en 3 populations réside dans le fait que l'identification des cellules repose non pas sur leur volume uniquement, mais sur une analyse bidimensionnelle.

Les analyseurs Sysmex X-class utilisent la cytométrie de flux par fluorescence pour réaliser une différenciation en 5 populations. Les sous-populations sont séparées en fonction de la complexité de leur cellule ou du signal de fluorescence ou de la lumière diffusée latéralement. L'échantillon est exposé à un colorant fluorescent qui se lie à l'ARN et l'ADN intracellulaires. L'intensité du signal fluorescent est proportionnel à la concentration d'ARN/d'ADN de chaque cellule. En outre, la différenciation atteint un degré élevé d'exactitude grâce au logiciel offrant un système d'analyse cluster adaptative (ACAS). Ceci garantit que chaque population cellulaire forme un cluster distinct avant que les événements soient identifiés comme appartenant à une sous-catégorie de cellule. D'autres systèmes utilisent un portillonnage fixe pouvant générer le comptage, dans un groupe incorrect, de certaines cellules, en particulier dans le cas d'échantillons pathologiques.

La capacité des analyseurs différentiels en 5 populations à séparer les populations de cellules les moins nombreuses (à savoir les monocytes, les éosinophiles et les basophiles) plutôt qu'à les regrouper dans une population mixte représente une avancée majeure.

Comme mentionné plus haut, les différents types de leucocytes occupent des fonctions diverses. Les modifications de la quantité absolue d'une population spécifique fournissent donc des informations très pertinentes qui permettent au médecin de conclure au diagnostic clinique le plus probable et de surveiller la réponse au traitement



**Figure 3.** Graphiques de corrélation des analyseurs Sysmex x-class. A) graphique de corrélation différentielle. La fluorescence, qui est une mesure du contenu RNA/ADN des cellules, est représentée sur l'axe Y. La complexité cellulaires, ou lumière diffusée latéralement, est représentée quant à elle sur l'axe X. b) canal numération leucocytaire/basophile. Ce canal, présent sur les analyseurs XT et XE, utilise une réaction chimique qui garde les basophiles intacts afin de les séparer de la population leucocytaire restante, sur la base de la lumière diffusée vers l'avant (axe Y) et sur le côté (axe X).

Mais il y a une raison essentielle qui permet d'expliquer pourquoi les analyseurs différentiels en 5 populations Sysmex offrent bien plus qu'un simple passage de 3 à 5 populations comptées. La réponse se trouve dans la technologie de cytométrie de flux par fluorescence sous-jacente.

### Pourquoi la numération leucocytaire différentielle basée sur la cytométrie de flux par fluorescence est-elle supérieure aux technologies différentielles en 3 populations et à celles en 5 populations offertes par la concurrence ?

#### a) L'évaluation ne dépend pas du volume de la cellule

La cytométrie de flux par fluorescence différencie les leucocytes en se basant sur leur concentration en acide nucléique, leur structure interne ou leur complexité. Le premier avantage de cette approche est que l'analyse ne repose pas sur le volume cellulaire, à la différence des analyseurs différentiels en 3 et 5 populations de nos concurrents. Une différenciation des leucocytes indépendante du volume cellulaire représente un atout de taille:

- Le volume cellulaire change plutôt rapidement une fois le sang recueilli dans un dispositif de prélèvement contenant un EDTA. Cet environnement non physiologique exerce en effet sur les cellules sanguines un stress métabolique qui entraîne une déplétion glycogénique. De ce fait, il est impossible de conserver l'équilibre des mouvements à travers la membrane cellulaire, ce qui provoque le gonflement de la cellule et à terme, sa désintégration.

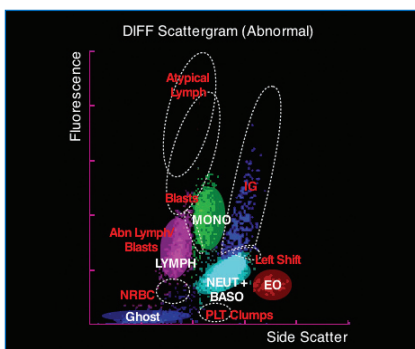
- Les numérations différentielles reposant sur le volume cellulaire perdent donc leur fiabilité en 24 heures. En revanche, les numérations différentielles des analyseurs Sysmex C-Class conservent leur fiabilité jusqu'à 48 heures après le prélèvement des échantillons.

### b) Identification des cellules immatures

Un autre avantage tout aussi important : la cytométrie de flux par fluorescence permet d'identifier les cellules immatures grâce au principe selon lequel leur concentration en acide nucléique est supérieure à celle des cellules matures. Ceci a rendu possible l'apparition d'une nouvelle génération de numération différentielle en 6 populations grâce à l'ajout des granulocytes immatures (GI). La numération GI inclut les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes mais pas les granulocytes non segmentés. La présence de granulocytes immatures est toujours pathologique, sauf après l'accouchement et chez le nouveau-né de moins de 3 jours. La numération automatisée des GI offre une bien meilleure précision que la microscopie manuelle, ce qui en fait un outil idéal pour la surveillance en série des patients. Elle supprime ainsi la tâche fastidieuse qu'est la numération manuelle.

### c) Système complet d'alarme pour l'identification des cellules anormales

Un autre avantage de taille des analyseurs différentiels en 5 populations X-class par rapport aux analyseurs différentiels en 3 populations est la présence d'un système d'alarmes sophistiqué qui permet l'identification qualitative des cellules immatures et anormales. Les analyseurs différentiels en 3 populations sont également pourvus d'un système d'alarmes, mais celui-ci est moins instructif car basé uniquement sur les aberrations de volume cellulaire.



**Figure 4.** Le graphique de corrélation différentiel de Sysmex indique les positions où il est probable de trouver les populations cellulaires anormales.

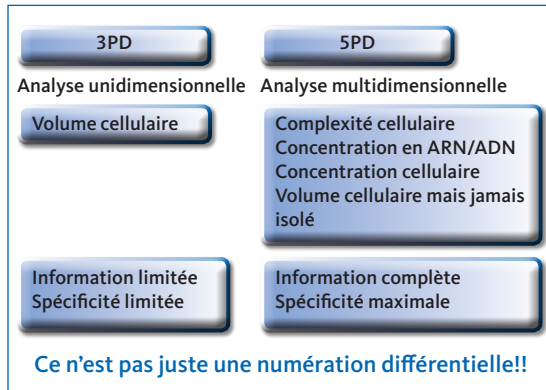
### La numération différentielle manuelle a-t-elle encore une utilité ?

La microscopie manuelle conservera un rôle critique: elle doit être utilisée pour confirmer la présence de populations cellulaires anormales identifiées comme suspectes par l'analyseur automatique, et sur lesquelles le système d'alarmes a attiré l'attention de l'opérateur. L'objectif de cette revue manuelle n'est pas de vérifier la numération cellulaire différentielle mais plutôt de confirmer la présence de populations cellulaires anormales et de consigner toutes les caractéristiques morphologiques dignes d'attention. La numération manuelle ne sera jamais aussi précise que la numération automatisée du fait du nombre bien plus faible de cellules traitées. De la même manière, l'analyse automatique ne pourra jamais identifier avec exactitude toutes les variantes possibles de cellules anormales. Cependant, si l'analyseur n'a pas identifié un échantillon comme présentant une anomalie suspecte, il est fort probable qu'une revue manuelle ne présente aucun intérêt. Pour que la revue manuelle microscopique présente un véritable intérêt, le personnel en charge doit être hautement compétent et détenir l'expérience nécessaire. Dans cette perspective, l'analyseur différentiel en 5 populations réduit de façon drastique le besoin de procéder à une numération différentielle manuelle et d'orienter l'opérateur à la recherche d'une pathologie spécifique (à l'aide des alarmes générées). Il permet donc de libérer du temps au laboratoire et d'augmenter sa rentabilité, car un personnel aussi qualifié est difficile à recruter et requiert un temps de formation important.

### Alors pourquoi choisir un analyseur Sysmex 5PD ?

Si un laboratoire souhaite uniquement passer en revue les paramètres basiques tels que l'hémoglobine, la numération plaquettaire et leucocytaire, ce qui correspond à la pratique courante, alors il n'y a nul avantage à investir dans un analyseur différentiel en 5 populations. En règle générale, les analyseurs différentiels en 3 populations sont plus rentables que ceux en 5 populations. Toutefois, la supériorité des analyseurs différentiels en 5 populations pour l'analyse des individus malades est incontestable en raison des critères suivants :

- identification des sous-populations de leucocytes
- amélioration de la capacité à détecter des cellules anormales
- système d'alarmes plus évolué
- grâce à la pertinence clinique des paramètres supplémentaires, les analyseurs en 5 populations font bien plus que fournir une numération différentielle plus complète.



«Les analyseurs de la gamme X font bien plus que de compter les cellules – l'accent est passé sur l'identification de *caractéristiques qualitatives subtiles* visant à distinguer les situations normales et celles *pathologiques*.»

Compilé par  
**Dr Marion Münster**

**Figure 5.** Pourquoi un analyseur différentiel Sysmex en 5 populations est supérieur à un analyseur différentiel en 3 populations.

## Conclusion

Il faut tenir compte du fait que l'ensemble des informations générées par l'analyseur différentiel en 5 populations, plus sophistiqué, sont transmises aux médecins. Elles éclairent ses décisions quant à la prise en charge du patient, et profitent donc également à ce dernier. À ce titre, il est incontestable que l'analyseur différentiel en 5 populations soit aussi rentable, sinon plus, qu'un analyseur différentiel en 3 populations basique. Par rapport à un analyseur différentiel en 3 populations, un analyseur différentiel en 5 populations permet de consacrer moins de temps à l'examen microscopique manuel des échantillons. Il s'agit là d'un autre avantage que peut tirer le laboratoire de son utilisation. En règle générale, les caractéristiques et les paramètres de mesure disponibles sur les différents analyseurs d'hématologie deviennent plus avancés à mesure que la capacité de traitement augmente. Ceci explique que les caractéristiques les plus avancées, comme la capacité à traiter les cellules en 5 populations, soient d'ordinaire hors de la portée des laboratoires les plus modestes. Sysmex est conscient de cette limite et a proposé une solution en mettant sur le marché les analyseurs de la gamme XS. Tout comme le KX-21N, il est conçu pour les laboratoires avec une capacité de traitement relativement faible. Il offre une analyse de qualité supérieure, en particulier du point de vue des échantillons pathologiques, comme décrit dans ce bulletin d'informations.



---

**Sysmex South Africa (Pty) Ltd.**

Ferndale Office Park – Block 2, 5 Hunter Avenue, Ferndale, Randburg 2194 · Phone +27 11 329 9480 · Fax +27 11 789 9276 · info@sysmex.co.za · [www.sysmex.co.za](http://www.sysmex.co.za)