



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**L'INTERET DE LA NUMERATION PLAQUETTAIRE
PAR FLUORIMETRIE DANS L'HEMOGRAMME**

Présenté par : M^{lle} Kaoutar CHBIHI

Encadré par : Pr EL ABIDA Kaouakib (FST Fès)

Pr MASRAR Azlarab (LCHISR)

Soutenu le : 13 Juin 2019

Devant le jury composé de :

- **Pr : EL ABIDA Kaouakib**
- **Pr : SEFRIOUI Samira**

Stage effectué au : Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat

Année Universitaire : 2018 / 2019

Remerciements

Je profite par le biais de ce rapport, pour remercier vivement toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de cet humble travail.

Je tiens en tout premier lieu, à adresser ma plus grande gratitude et mes remerciements les plus sincères au **PR. MASRAR Azlarab**, Professeur d'Hématologie Biologique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat et Chef de Service du Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat, de m'avoir permis d'intégrer son équipe de laboratoire de très bonne renommée et de m'avoir impliqué dans un travail de recherche très récent. Je vous remercie vivement de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail. Sans votre clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables. Je vous remercie pour la gentillesse et la disponibilité dont vous avez fait preuve en m'accueillant en toute circonstances. Veuillez Professeur, trouver dans ce travail l'expression de ma grande estime et mes sentiments les plus sincères.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à mon encadrante à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès **Pr. EL ABIDA Kaouakib** pour l'honneur qu'elle m'a accordé pour l'encadrement de ce mémoire et pour pouvoir accepter de diriger ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils et suggestions si fructueuses lors de la correction de mon rapport et pour le soutien que vous m'avez accordé tout le long de ma période de stage.

Je remercie vivement **Pr. HALOTI Said** coordonnateur de la filière Sciences Biologiques Appliquées et Santé (**SBAS**) en reconnaissance de sa disponibilité et sa sympathie envers les étudiants. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde estime.

Un grand merci aux **pharmaciens internes et résidents**, et **tout le personnel** du Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat pour leur aide et soutien.

Je souhaite également exprimer mon grand respect et gratitude à **tous mes professeurs** de la licence **SBAS**, ce fut une année enrichissante et inoubliable.

Je formule mes sincères remerciements aux **membres du jury**, je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant d'être le jury de ce projet de fin d'étude.

DÉDICACES

Au nom de Dieu le tout Puissant le Miséricordieux,

Je dédie ce travail

À ma mère

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon amour infini. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et très longue vie,

À ma sœur Sara

Je te dédie ce travail en témoignage de profonds sentiments, d'amour et d'attachement. J'implore Dieu de te réserver un avenir meilleur,

À la mémoire de mon père et mes grands-parents

Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble. J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Puisse Dieu tout puissant vous accorder sa clémence, sa miséricorde et vous accueillir dans son saint paradis,

À toute ma famille

Je vous dédie ce travail avec tout mon amour et respect. Que Dieu vous comble et vous procure santé et longue vie,

À mes chers amis et collègues de la licence Sciences Biologiques Appliquées Et Santé (SBAS)

En souvenir des meilleurs moments que nous avons passés et aux liens solides qui nous unissent. Avec toute mon affection et estime, je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur, autant dans votre vie professionnelle que personnelle,

A tous ceux qui me sont chers,

Liste des abréviations

PLT- I : Plaquettes en impédance

PLT-O : Plaquettes en optique

PLT-F : Plaquettes en fluorimétrie

LCHISR : Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat

IgG : Immunoglobulines G

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CFU-MK : Colony forming unit mégacaryocyte

MK : Mégacaryocyte

VWF : Facteur de Von Willebrand

GR : Globule rouge

PLT : Plaquettes ou Platelets

NFS : Numération formule sanguine

EDTA : Ethylènediaminetétraacétique

Fl : Femtolitre (10^{-15} l)

PBS : Phosphate-buffered saline ou Tampon salin

FSC : Forward scatter ou diffusion en avant

SSC : Side scatter ou diffusion latérale

PNN : Polynucléaire neutrophile

ARN : Acide ribonucléique

IPF : Immature platelet fraction ou Fraction immature des plaquettes

RET : Réticulocytes

Liste des figures

Figure 1 : Observation des plaquettes sanguines par microscopie électronique à balayage.....	3
Figure 2 : Différentes étapes de la mégacaryopoïèse et libération des plaquettes.....	5
Figure 3 : (A) Frottis sanguin d'un patient montrant des schizocytes et une thrombopénie. (B) Sang périphérique d'un patient avec une thrombocytémie essentielle montrant une thrombocytose isolée.....	7
Figure 4 : Résultat de l'hémogramme effectué au sein du LCHISR.....	8
Figure 5 : Schéma expliquant la technique de comptage selon le principe de Coulter.....	10
Figure 6 : Histogramme montrant les différentes limites de comptage des plaquettes et des interférences (GR microcytaires et Schizocytes) en fonction de la taille et du volume.....	12
Figure 7 : Schéma montrant le mode de fonctionnement d'un analyseur-trieur suivant le principe de la cytométrie en flux.....	13
Figure 8 : Scattergramm représentant la numération plaquettaire dans le canal des réticulocytes..	15
Figure 9 : Diagramme de dispersion du canal PLT-F avec une distribution cellulaire normale....	16
Figure 10 : Prélèvements sanguins sur tube EDTA destinés à être analysés par l'automate d'hémogramme Sysmex XN-9000.....	18
Figure 11 : L'analyseur d'hémogramme Sysmex XN-9000 récemment introduit au sein du LCHISR.....	19
Figure 12 : Les réactifs utilisés par l'analyseur d'hémogramme pour la réalisation de la numération formule sanguine.....	20
Figure 13 : Fluorocell PLT : réactif fluorescent utilisé pour le marquage des plaquettes.....	21
Figure 14 : Fluorocell RET : Réactif fluorescent permettant le marquage à la fois des réticulocytes, des globules rouges et des plaquettes.....	22
Figure 15 : Paillasse de validation au sein du laboratoire central d'hématologie Ibn Sina de Rabat.....	23
Figure 16 : Fiche du travail permettant la préparation des résultats au sein du laboratoire.....	24
Figure 17 : Résultat de l'hémogramme d'un patient tiré à partir de l'analyseur Sysmex XN-9000. (A) Les plaquettes sont comptées uniquement par impédance électrique (B) Les plaquettes sont comptées à la fois par fluorimétrie ainsi par méthode optique.....	25

Figure 18 : Répartition des taux de plaquettes comptées par impédance et fluorimétrie pour 100 patients.....27

Figure 19 : Répartition des taux de plaquettes comptées à la fois par impédance électrique, méthode optique et fluorimétrie pour 60 patients.....27

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre de patients atteints de thrombopénie et de thrombocytose dans l'ensemble de 100 patients.....	26
Tableau 2 : Nombre de patients atteints de thrombocytose et de thrombopénie dans l'ensemble de 60 patients.....	26
Tableau 3 : Coefficient de variation calculé pour 2 méthodes de comptage pour 71 échantillons des patients atteints de thrombopénie.....	28
Tableau 4 : Coefficient de variation calculé pour 3 méthodes de comptage pour 51 échantillons des patients atteints de thrombopénie.....	28
Tableau 5 : Coefficient de variation calculé pour 3 méthodes de comptage pour 9 échantillons des patients atteints de thrombocytose.....	29
Tableau 6 : Coefficient de corrélation calculé pour le groupe échantillon 1 de 100 patients.....	30
Tableau 7 : Coefficient de corrélation calculé pour le groupe échantillon 2 de 60 patients.....	30

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	I
DÉDICACES.....	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	III
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
SOMMAIRE.....	VII
RESUMÉ, ABSTRACT.....	X
PARTIE 1 : PRÉSENTATION	
LABORATOIRE CENTRAL D'HÉMATOLOGIE IBN SINA DE RABAT.....	1
OBJECTIF DU STAGE.....	1
BUT DE TRAVAIL.....	1
INTRODUCTION.....	2
PARTIE 2 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- LES PLAQUETTES OU THROMBOCYTES.....	3
1. La membrane plasmique.....	3
2. Le cytosquelette.....	3
3. Le cytoplasme.....	4
3.1. Les granules α	4
3.2. Les granules δ	4
4. Physiologie plaquettaire et thrombopoïèse.....	4
4.1. Mégacaryopoïèse.....	4
4.2. Thrombopoïèse.....	5
5. Rôle et fonction des plaquettes.....	5

LA NUMERATION PLAQUETTAIRE ET SA VARIATION DANS L'HÉMOGRAMME.....	6
1. Thrombocytose.....	6
2. Thrombopénie.....	7
III- L'HÉMOGRAMME OU NUMÉRATION FORMULE SANGUINE.....	8
IV- L'AUTOMATISATION DANS L'ANALYSE D'HÉMOGRAMME.....	9
1. Historique et évolution.....	9
2. L'analyseur Sysmex XN-9000.....	9
V- PRINCIPES ET TECHNIQUES UTILISÉES PAR L'ANALYSEUR SYSMEX XN-9000 DANS LA NUMÉRATION PLAQUETTAIRE.....	10
1. La numération plaquettaire par impédance électrique.....	10
2. Analyse par diffraction laser ou cytométrie en flux.....	12
3. La numération plaquettaire par méthode optique et canal RET.....	14
4. La numération plaquettaire par fluorimétrie et canal PLT-F.....	15
VI- MÉTHODE DE COMPTAGE DE RÉFÉRENCE.....	17
 PARTIE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	
I- POPULATION D'ÉTUDE.....	18
II- MATÉRIEL.....	19
1. L'analyseur Sysmex XN-9000.....	19
2. Les réactifs utilisés.....	19
2.1 Fluorocell PLT.....	21
2.2 Fluorocell RET.....	22
III- MÉTHODES.....	23
6. Le travail au sein du LCHISR.....	23
7. Préparation des résultats.....	25

PARTIE 4 : RÉSULTATS

I- PATIENTS ET ÉCHANTILLONS SANGUINS.....	26
II-RÉPARTITIONS.....	27
1. Groupe échantillon 1 de 100 patients.....	27
2. Groupe échantillon 2 de 60 patients.....	27
III- VARIATIONS ET CORRÉLATIONS.....	28
1. Variations.....	28
1.1. Groupe échantillon 1 de 100 patients.....	28
a. Thrombopénie.....	28
1.2. Groupe échantillon 2 de 60patients.....	28
a. Thrombopénie.....	28
b. Thrombocytose.....	29
2. Corrélations.....	29

PARTIE 5 : DISCUSSION

DISCUSSION DES RÉSULTATS.....	31
Conclusion et Recommandations.....	32

Références bibliographiques, Webographie

ANNEXES

RÉSUMÉ

Un taux de plaquettes exacte et précis est nécessaire pour une prévention des risques hémorragiques ou risques de thromboses, particulièrement en cas de suivi des patients atteints de cancers du sang ou sous traitement onco-hématologique. En raison de l'imprécision dans le comptage plaquettaire par impédance électrique ou la méthode optique entraînant une sous-estimation de la numération plaquettaire ou faisant entrer des interférences dans le comptage, une nouvelle technique (fluorimétrie) et un nouveau canal (PLT-F) ont été introduits dans les analyseurs récents d'hématologie. Afin d'évaluer la précision de ce canal et de confirmer la précision de cette nouvelle technique de comptage, un ensemble de 160 échantillons sanguins présentant un taux anormal de plaquettes ont été analysés au sein du Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat à l'aide de l'analyseur Sysmex XN-9000, et une comparaison a été établie entre les trois méthodes de comptage. Le coefficient de variation calculé pour les 3 techniques a montré des valeurs faibles pour la fluorimétrie par rapport à l'impédance électrique et la méthode optique pour les 2 catégories patients à savoir : patients atteints thrombopénie et de thrombocytose. Ainsi une forte corrélation a été mise en évidence entre la fluorimétrie et les deux autres techniques de comptage par calcul du coefficient de corrélation qui a donné des valeurs proches de 1.

ABSTRACT

The accuracy in platelet counting is a major factor allowing prevention of risks related to thromboses and haemorrhages, especially for people who suffer from blood cancer or who are on hemato-oncological treatment. The inaccuracy observed in platelet count by electrical impedance and optical method, and that showed an underestimation and falsely high values of the count, led to the search for a more accurate method. Therefore, a new technique of fluorimetry represented by the new PLT-F channel has been introduced in recent hematology analyzers. Our study which aims to confirm the reliability of this new technique consists of comparing the three counting methods by analysing 160 blood samples in the Sysmex XN-9000 analyser, within the Central Hematology Laboratory Ibn Sina of Rabat. The coefficient of variation calculated for the 3 techniques showed the lowest values for the new technique in comparaison with the others, for each thrombocytopenic and thrombocytosis samples. Furthermore, the calculated correlation coefficient reported values close to 1 which allows to conclude a strong correlation between the new technique and the two old ones.

Partie 1

PRÉSENTATION

LABORATOIRE CENTRAL D'HEMATOLOGIE IBN SINA DE RABAT

Historique et présentation :

Créé au cours des années 1960, le Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat (LCHISR) est doté d'une plateforme qui s'étale sur une superficie de $170m^2$ et qui répond aux normes de bonnes pratiques de laboratoire. Le LCHISR est placé sous la responsabilité médicale du Chef de service Pr Azlarab MASRAR et adjoints représentés par Pr Souad BENKIRANE, Dr Larbi DOUKKALI et Dr Asma LAMRABET. Il répond aux demandes d'analyses provenant des hôpitaux, mais aussi de demandeurs externes. Le laboratoire est organisé de sorte à fournir des prestations techniquement fiables, dans le respect des délais, et pour favoriser les contacts avec le prescripteur. En 2010, après avoir fait l'objet de rénovations massives dans le cadre de la politique de centralisation de l'ensemble des laboratoires de l'hôpital Ibn Sina, ce laboratoire a réussi à devenir un laboratoire central d'hématologie. En plus de son professionnalisme et son service de très bonne renommée, Le LCHISR collabore avec d'autres laboratoires d'hématologie ainsi que des hôpitaux, privés et publiques. Par ailleurs, il participe à l'enseignement universitaire pré et post-gradué des médecins et pharmaciens internes et résidents ainsi, contribue à compléter et suivre la formation des étudiants en biologie dans le cadre de la recherche universitaire [4].

OJECTIF DU STAGE

Effectuer un stage au sein du Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat est pour moi un atout majeur. Ce stage m'a permis d'être impliquée dans un travail de recherche très récent ainsi de voir en pratique ce que j'ai appris en théorie. Et à l'aide de la compétence du personnel du laboratoire, j'ai pu apprendre de nouvelles notions, techniques et méthodes me permettant d'approfondir mes connaissances en hématologie.

But de travail : La numération plaquettaire est donnée par l'analyseur d'hémogramme selon 3 méthodes : impédance électrique, méthode optique et fluorimétrie basées tous deux sur la cytométrie en flux et la fluorescence. A l'aide des propriétés du réactif utilisé, la fluorimétrie est maintenant la technique la plus précise dans le comptage plaquettaire. Afin de confirmer ceci, des échantillons de 160 patients présentant un taux de plaquettes anormal ont été analysés par l'analyseur Sysmex XN-9000 et une comparaison entre les 3 méthodes a été établie.

INTRODUCTION

Les plaquettes ou thrombocytes sont les plus petites cellules sanguines, anucléées, formées au niveau de la moelle osseuse par mégacaryopoïèse. Ces petites particules issues de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes jouent un rôle primordial dans des phénomènes physiologiques tel que la coagulation, l'hémostase, et les thromboses.

La numération plaquettaire est un examen effectué au cours de la réalisation de la numération formule sanguine, aussi connue sous le nom d'Hémogramme ou encore « NFS », qui est un test biologique très fréquemment prescrit dans le domaine médical. Cette analyse sanguine permet de mettre en évidence de nombreuses anomalies en relation avec les lignées sanguines notamment les plaquettes dont la numération peut avoir de larges indications pouvant orienter le clinicien ou le médecin vers des interprétations encore plus vastes, spécialement lorsque le taux indique une thrombocytopenie ou une thrombocytose. La numération plaquettaire est considérée comme essentielle dans les laboratoires d'hématologie clinique et de recherche plaquettaire où un dénombrement précis des plaquettes est essentiel pour faciliter le diagnostic et le traitement de divers troubles cliniques [1, 2].

Lors d'une thrombopénie, une précision élevée dans la numération plaquettaire est nécessaire pour une prise d'une décision appropriée. La série XN-9000 de l'analyseur Sysmex récemment introduite propose donc trois méthodes de comptage des plaquettes à savoir : l'impédance électrique (PLT-I), comptage optique (PLT-O), et la nouvelle méthode basée sur la fluorescence et la cytométrie en flux (PLT-F). Cette dernière repose essentiellement sur l'utilisation d'un colorant fluorescent, ainsi d'un volume et d'un temps de comptage prolongés, et grâce à la photoluminescence et la fluorescence, les plaquettes apparaissent plus claires et se distinguent facilement des autres cellules sanguines [3].

L'évaluation de la fiabilité de la fluorimétrie dans la numération plaquettaire a pour objectif de tirer l'intérêt de cette nouvelle méthode et son influence sur le plan clinique lors de l'interprétation d'une étiologie ou d'un diagnostic vis-à-vis du résultat de l'hémogramme d'un patient où le taux des plaquettes peut être décisif.

Partie 2

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. LES PLAQUETTES OU THROMBOCYTES

Les plaquettes ou thrombocytes, représentent les plus petites cellules du sang, anucléées, de forme discoïde, avec un diamètre allant de 2 à 4 μm et un volume de 6 à 12 μm^3 . Sur le plan physique, les plaquettes comportent 3 régions : la membrane plasmique, le cytosquelette, et les organites intracellulaires [7] (figure 1).

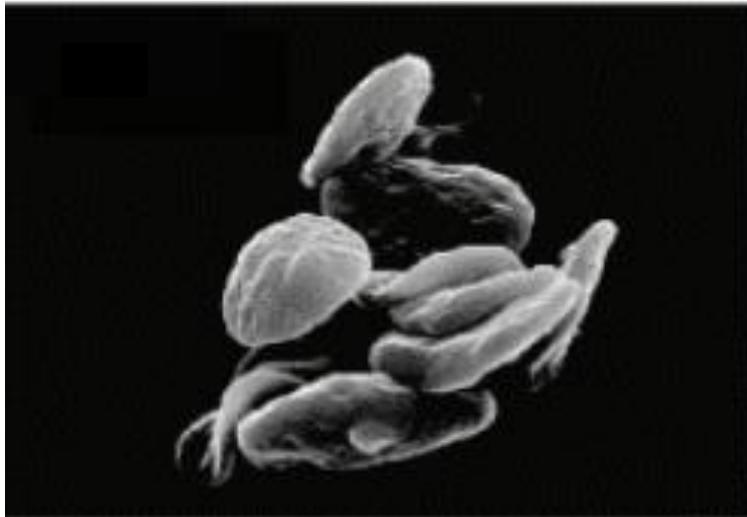


Figure 1 : Observation des plaquettes sanguines par microscopie électronique à balayage [7]

1. La membrane plasmique :

Formée d'une bicouche phospholipidique, constituée de lipides et de glycoprotéines jouant le rôle de récepteurs impliqués dans la fonction plaquettaire. La membrane plasmique joue essentiellement un rôle de protection et confère à la cellule sa forme et sa rigidité ainsi, elle représente de nombreuses invaginations ouvertes vers l'extérieur permettant à la cellule de se mobiliser et de sécréter son contenu lors de son activation [7].

2. Le cytosquelette :

Système de support de la cellule et de la membrane plasmique, constitué essentiellement d'un réseau de fibrille représenté par les microtubules et les microfilaments d'actine. Le cytosquelette est responsable de la forme discoïde des plaquettes au repos, et de son changement lors de l'activation et de l'agrégation plaquettaire [7].

3. Le cytoplasme :

Le cytoplasme renferme l'ensemble des organites spécifiques des plaquettes comme les mitochondries, et les différents types de granules.

3.1 Les granules α :

Les plus abondants, renferment des protéines (chimiokines) qui sont des facteurs de coagulation, des immunoglobulines plasmatiques (IgG), de la β -thromboglobine, des protéines d'adhésion (facteur de von Willebrand, fibrinogène) et des facteurs de croissance. [7]

3.2 Les granules δ :

Moins nombreux, denses, densité qui est due à la présence des électrons, contiennent de l'adénosine diphosphate (ADP) et de l'adénosine triphosphate (ATP) synthétisés in situ, des ions Ca^{2+} et de la sérotonine. [7]

En plus des granules, le cytoplasme des plaquettes comporte des organites tel que les lysosomes à contenu acide (hydrolases), ainsi que des mitochondries, siège de la production d'énergie. En outre, les plaquettes sont dépourvues de noyaux, mais, contiennent de l'ARN messenger (ARNm) issu des mégacaryocytes, ainsi que des éléments nécessaires (ribosomes et réticulum endoplasmique rugueux) pour la transcription de ces ARNm [7, 8].

4. Physiologie plaquettaire et thrombopoïèse :

La génération des plaquettes sanguines est le résultat de deux étapes de formation :

4.1. Mégacaryopoïèse :

S'effectue au niveau de la moelle osseuse. Commence par la différenciation de la cellule souche hématopoïétique (CSH) multipotente qui, allant vers des stades plus avancés de maturation perd sa potentialité vers la formation du progéniteur mégacaryocytaire qui est une cellule à 2N capable de proliférer. Le progéniteur aussi appelé CFU-MK, transforme ces mécanismes de multiplication à une polyploïdisation (multiplication du noyau sans division du cytoplasme). Le dernier stade est représenté par le mégacaryocyte qui correspond au précurseur mégacaryocytaire et à partir duquel proviennent les plaquettes [9].

4.2. Thrombopoïèse :

Au cours de la dernière étape de la mégacaryopoïèse, le noyau du mégacaryocyte mature grossit progressivement et se segmente, ainsi, il y a accumulation des molécules spécifiques dans le cytoplasme et acidification de ce dernier. A cette étape, les mégacaryocytes émettent de longs prolongements cytoplasmiques pour se fragmenter dans la circulation générale. En effet, des territoires se forment au sein des mégacaryocytes dans lesquels les nouvelles plaquettes apparaissent suite à une rupture ultérieure du cytoplasme [10] (figure 2).

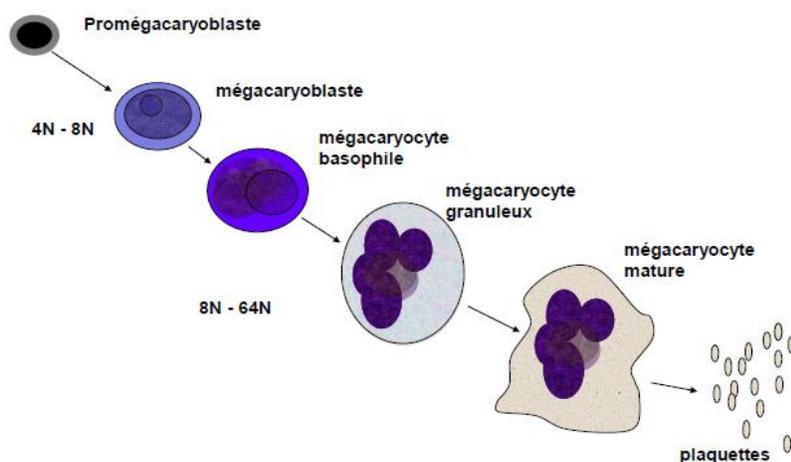


Figure 2 : Différentes étapes de la mégacaryopoïèse et libération des plaquettes (Pr. Lainey, (2017), UE6- Tissu sanguin).

5. Rôle et fonction des plaquettes :

Les plaquettes jouent un rôle majeur dans l'hémostase primaire et dans les phénomènes de coagulation. Grâce à leur composition membranaire, les plaquettes s'activent et sont impliquées dans le phénomène d'adhésion à l'aide du système de microtubules [11]. Suite à une brèche vasculaire, ou lésion tissulaire les plaquettes sont libérées par la rate où sont auparavant stockées après thrombopoïèse. Lors de leur activation, les plaquettes subissent des changements où elles se gonflent et deviennent collantes. Ceci entraîne leur agglutination autour de la lésion, et interagissent avec le fibrinogène pour former le clou plaquettaire afin de colmater temporairement la brèche dans le vaisseau sanguin [12].

II. LA NUMÉRATION PLAQUETTAIRE ET SA VARIATION DANS L'HÉMOGRAMME

La numération plaquettaire constitue un examen capital, dont le résultat influe sur les décisions d'ordre clinique ou thérapeutique. Les analyseurs d'hématologie de dernière génération associent des techniques d'impédance et des méthodes optiques (diffraction laser et fluorescence) pour obtenir un chiffre de plaquettes le plus proche de la réalité. Cependant, des erreurs de comptage par excès (pseudo thrombocytose) ou par défaut (pseudo thrombopénie) existent et ne doivent pas être méconnues. De nos jours, on ne peut concevoir un bilan d'hémato-coagulation sans la détermination du taux des plaquettes [13].

Il existe donc plusieurs méthodes de comptage des plaquettes, allant de la plus ancienne vers la plus récente. On distingue [14] :

- Méthode manuelle utilisant un microscope à contraste de phase (Méthode ancienne)
- Une méthode qui repose sur la variation de l'impédance électrique (1^{ère} génération)
- Une méthode optique avec diffraction de lumière et de fluorescente (2^{ème} génération)
- Une méthode d'immunomarquage par cyrtométrie en flux (méthode de référence)
- Et la nouvelle méthode : **Fluorimétrie (Technique nouvelle)**

Dans l'hémogramme, le taux normal des plaquettes varie entre **150 000 / mm³** et **400 000 / mm³**. Hors de ces limites, l'hémogramme peut indiquer deux cas de figure, on distingue :

1. Thrombocytose :

On parle de thrombocytose ou hyperplaquettose lorsque **le taux des plaquettes dépasse 400 000 / mm³** lors de deux examens successifs à une semaine d'intervalle et elles sont réactionnelles dans près de 90% des cas [15]. La thrombocytose réactive correspond à la surproduction des plaquettes en réponse à un trouble tel que : une infection aiguë, les troubles inflammatoires chroniques, une carence en fer, et certains cancers, et ne présente pas un risque de thromboses. Il faut bien distinguer entre une thrombocytose réactionnelle et une vraie thrombocytose ou thrombocytémie qui correspond à un syndrome myéloprolifératif qui comprend une surproduction de plaquettes due à une anomalie clonale d'une cellule souche hématopoïétique et qui peut être associé à un risque de

thrombose et un saignement en raison de la perte de multimères de VWF de poids moléculaire élevé (site web 1) (figure 3).

2. Thrombopénie :

Définie lorsque **le taux des plaquettes est inférieur à $150\ 000 / mm^3$** et qui peut avoir pour causes : Une défaillance de production des plaquettes, une thrombopénie auto-immune induisant des destructions plaquettaires, l'augmentation de la destruction ou de la consommation des plaquettes. Et comme celles-ci sont stockées au niveau de la rate après leur libération par les mégacaryocytes, on peut assister aussi à une augmentation de séquestration splénique des plaquettes avec survie normale de ces dernières (site web 1) (figure 3).

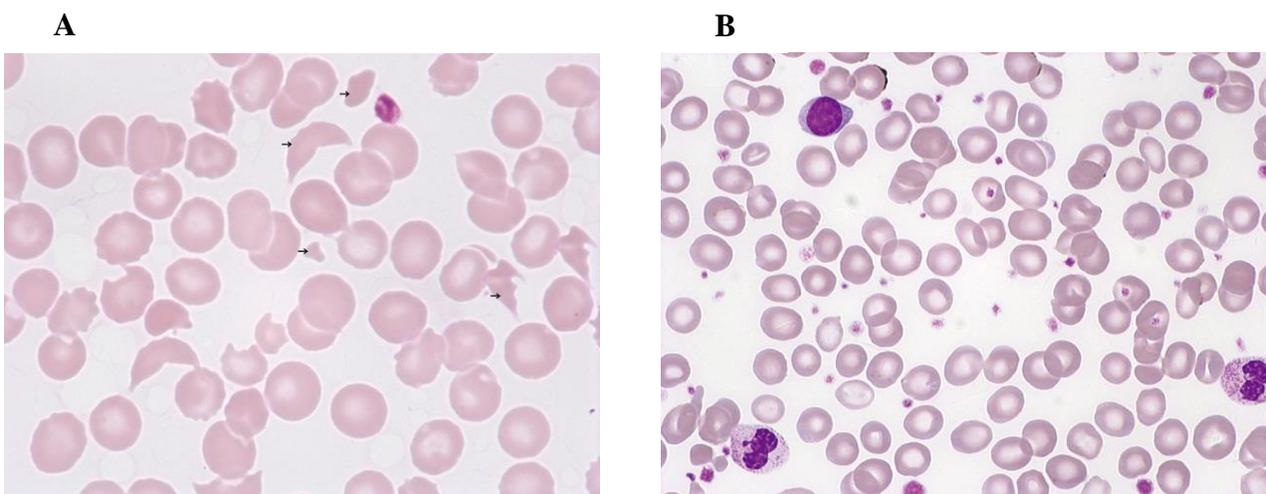


Figure 3 : (A) Frottis sanguin d'un patient montrant des schizocytes (→) et une thrombopénie. (B) Sang périphérique d'un patient avec une thrombocytémie essentielle montrant une thrombocytose isolée (<https://www.sysmex.fr>)

III. L'HÉMOGRAMME OU NUMÉRATION FORMULE SANGUINE

L'hémogramme est un test très fréquemment prescrit et qui permet d'évaluer la quantité et la qualité des trois lignées sanguines à savoir : les hématies ou globules rouges (GR) ou encore érythrocytes, les leucocytes ou globules blancs, et les plaquettes (PLT) ou thrombocytes. Il est souvent requis devant une suspicion d'anémie, une altération de l'état général, en cas d'hémorragie, de thromboses, d'infection persistante ou de cancer et aussi dans le cadre de la surveillance d'un traitement médicamenteux [16]. Aujourd'hui la numération formule sanguine (NFS) est réalisée par des automates, qui comptent les globules rouges et les globules blancs, dosent l'hémoglobine, calculent ou mesurent l'hématocrite et les constantes érythrocytaires ainsi, établissent la formule leucocytaire. Les prélèvements destinés donc à être analysés dans l'appareil d'hémogramme doivent être effectués sur un tube contenant 5 ml de sang et de l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) étant un anticoagulant [17] (figure 4).

COMPTÉ RENDU		
Demande du : 07/05/2019 à 04:14	Demande N° : 070519-E3717	N° d'entrée : 365116/19
Nom et prénom : FILS DE HASNA ELHANI	IPP :	Service : NEONATOLOGIE
Date de naissance : 03/05/2019	Etablissement : HOPITAL D'ENFANTS	Date d'analyse : 07/05/2019
Sexe : U	Médecin Prescripteur :	
Échantillon N° : 1905074961(C057) reçu le 07/05/2019 à 04:14		
HÉMATOLOGIE		
HÉMOGRAMME (Sysmex XN-9000)		
LIGNÉE ÉRYTHROCYTAIRE		
ÉRYTHROCYTES	1.37 $10^9/\mu\text{l}$	(3.9 - 5.5)
HÉMOGLOBINE	5.1 g/dl	(13.4 - 19.8)
HÉMATOCRITE	15.9 %	(42 - 60)
VGM	116.1 μm^3	(98 - 125)
TCMH	37.2 pg	(31 - 37)
CCMH	32.1 %	(30 - 36)
RDW-CV	19.2 %	(11.0 - 14.5)
ÉRYTHROBLASTES CIRCULANTS	43.3 pour 100GB	
RÉTICULOCYTES	84.3 $10^3/\mu\text{l}$	(50 - 200)
TCMH Réticulocytaire	27.0 pg	
DIFFÉRENTIELLE SANGUINE		
LEUCOCYTES	0.67 $10^3/\mu\text{l}$	(10.0 - 30.0)
Polynucléaires Neutrophiles	13.7 %	
Lymphocytes	0.09 $10^3/\mu\text{l}$	(6.0 - 26.0)
Monocytes	78.8 %	
Polynucléaires Éosinophiles	0.53 $10^3/\mu\text{l}$	(2.0 - 11.0)
Polynucléaires Basophiles	4.5 %	
Lymphocytes	0.03 $10^3/\mu\text{l}$	(0.4 - 1.2)
Monocytes	1.5 %	
Polynucléaires Éosinophiles	0.01 $10^3/\mu\text{l}$	(0.2 - 0.8)
Polynucléaires Basophiles	1.5 %	
Lymphocytes	0.01 $10^3/\mu\text{l}$	(0 - 0.1)
Monocytes		
Polynucléaires Éosinophiles		
Polynucléaires Basophiles		
LIGNÉE PLAQUETTAIRE		
PLAQUETTES	11 $10^3/\mu\text{l}$	(150 - 450)
Fraction immature plaquettaire	5.6 %	
Taux de plaquettes contrôlé par fluorimétrie.		
s valeurs de références sus - proposées correspondent à la date de naissance du patient communiquée dans son code à barres.		

Figure 4 : Résultat de l'hémogramme effectué au sein du LCHISR

IV. L'AUTOMATISATION DANS L'HÉMOGRAMME

1. Historique et évolution :

L'automatisation de l'hémogramme est apparue en 1532. A la fin du 19^{ème} siècle, et à l'aide du développement des colorants des éléments figurés du sang, la cytologie hématologique est mise en évidence et ceci a permis de caractériser, distinguer les différentes lignées sanguines par observation microscopique et d'en apprécier les proportions. Au cours des années, les colorants continuaient à évoluer mais la méthode restait toujours manuelle, observateur-dépendante et peu précise car effectuée sur un faible nombre de cellules. C'est jusqu'aux années 1950 que les appareils d'hématologie automatisés ont été découverts, ces appareils fonctionnent selon le principe de variation d'impédance or, ils ne réalisent pas la formule leucocytaire et les paramètres mesurés sont peu nombreux. En 1970, la cytochimie en flux a été découverte et, Technicon Instrument Corporation® a été la première firme à commercialiser des appareils fonctionnant avec cette nouvelle technologie [18].

2. L'analyseur Sysmex XN-9000 :

La gamme d'automates d'hématimétrie XN est développée par la société SYSMEX® (SYSMEX® Corporation, Kobe, Japon). Ces appareils sont composés de différents modules analytiques qui peuvent être complétés par un étaleur colorateur (SP-10) et par un module de lecture automatisée des lames de frottis sanguins. Le LCHISR utilise l'analyseur Sysmex XN-9000 qui comporte 3 modules [19] :

- 1 module classique permettant de réaliser les tests hémogrammes.
- 2 modules experts permettant chacun de compter le taux de réticulocytes (RET) et les plaquettes par fluorimétrie (PLT-F) en plus de la réalisation de la numération formule sanguine.

Le système d'hématologie automatisé Sysmex XN-9000 a été conçu pour répondre aux exigences de débit et d'efficacité des laboratoires à grand volume avec des échantillons principalement anormaux [20].

V. PRINCIPES ET TECHNIQUES UTILISÉES PAR L'ANALYSEUR SYSMEX XN-9000 DANS LA NUMÉRATION PLAQUETTAIRE

1. Numération plaquettaire par impédance électrique :

Méthode de comptage par défaut, l'analyse par impédance électrique permet de compter les hématies, les leucocytes et les plaquettes en fonction de leur taille uniquement [20]. En 1940, Wallace H. Coulter a développé une technologie de comptage et de dimensionnement des particules à l'aide de mesures d'impédance. Cette nouvelle technologie a été développée afin de compter rapidement les cellules sanguines en suspension dans un liquide conducteur en mesurant les changements de conductance électrique entre deux électrodes (site web 2) (figure 5).

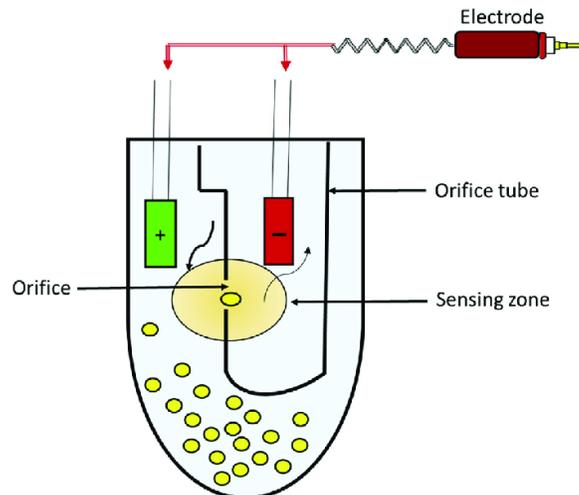


Figure 5 : Schéma expliquant la technique de comptage selon le principe de Coulter (Kaushik Kuche)

- **Principe de comptage :**

Un tube de verre muni d'un micro orifice est introduit dans une cuve contenant une solution saline permettant la conduction du courant électrique. De part et d'autre du tube de verre se trouve deux électrodes entre lesquelles existe une impédance électrique constante Z , et la solution saline est aspirée ainsi que les cellules sanguines qui s'y trouvent en suspension par le micro orifice. Un générateur de courant fournit un courant I constant, et le voltmètre mesure la tension aux bornes des deux électrodes selon la relation suivante :

$$U = Z.I = \text{constante}$$

Une cellule est une mauvaise conductrice du courant et son passage entraîne une augmentation dans l'impédance (résistance) électrique entre les deux électrodes de mesure qui génère à son tour une rupture du courant électrique traduite par une impulsion [21].

- Le nombre d'impulsions correspond au nombre de cellules ayant franchi l'orifice [20].
- L'amplitude de l'impulsion est proportionnelle au volume de la cellule [20].

Les plaquettes et les globules rouges sont énumérés dans le même canal de dilution. Selon la taille on distingue [23] (figure 6) :

- ✓ Les particules dont la taille est inférieure à **2 Femtolitre (Fl)** sont considérées comme des débris cellulaires ou schizocytes.
- ✓ Les particules dont la taille varie entre **2 et 6 Fl** sont comptées comme étant plaquettes.
- ✓ Les particules dont la taille varie entre **20 et 40 Fl** sont considérées comme des globules rouges microcytaires.

Dans la numération plaquettaire et en particulier dans le cas des thrombopénies, l'histogramme de la numération par impédance peut avoir plusieurs formes. Dans plusieurs cas, des particules de taille comparable aux plaquettes tel que les hématies de taille réduite ou fragmentées, peut aboutir à une fausse augmentation du taux des plaquettes. Dans des cas différents, il peut y'a avoir une sous-estimation du taux des plaquettes qui peut être dû à une pseudo-thrombopénie qui correspond à un phénomène provoqué in vitro par des anticorps particuliers, présents dans les échantillons sanguins prélevés sur EDTA, et qui réagissent avec les plaquettes pour les agréger entre elles, dans ce cas la thrombopénie est une fausse thrombopénie. L'agrégat plaquettaire peut être aussi dû à un satellitisme des plaquettes, ou encore rosettes leucoplaquettaires, et qui est un phénomène acquis in vitro en présence d'EDTA et lié à l'adhésion des plaquettes à la membrane des polynucléaires neutrophiles (PNN) matures ou parfois à d'autres cellules. Un autre cas peut conduire à une sous-estimation du taux des plaquettes liée à la présence des macroplaquettes ou plaquettes géantes qui dans des conditions normales ou même pathologiques, peuvent avoir un volume plus élevé (36-40 voire même 60 FL), de ce fait elles peuvent présenter une taille (volume) identique ou proche de celle des leucocytes et peuvent même être incluses dans le décompte des GR ou/et celui des leucocytes [23].

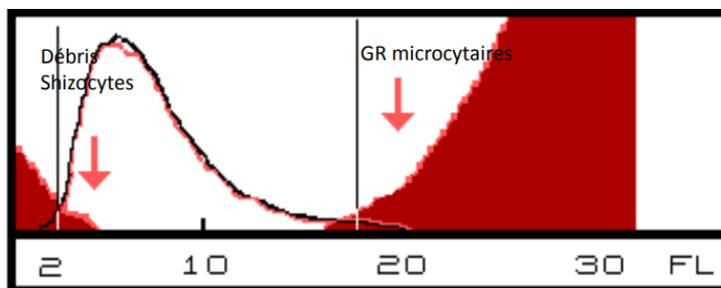


Figure 6 : Histogramme montrant les différentes limites de comptage des plaquettes et des interférences (GR microcytaires et Schizocytes) en fonction de la taille et du volume (Bernard CHATELAIN (2016) CHU Dinant Godinne)

2. Analyse par diffraction laser ou cytométrie en flux :

La cytométrie en flux désigne la mesure des propriétés optiques des cellules transportées par un liquide de flux vers une source d'excitation lumineuse qui est souvent un laser. Un cytomètre de flux est constitué de plusieurs unités [22] :

- **Fluidique** : Consiste à trier les cellules, les séparer et les aligner afin qu'elles passent une à une devant le faisceau laser.
- **Optique** : Comprend une source lumineuse (laser), des détecteurs, des filtres et des miroirs dichroïques pour la séparation des spectres d'absorption.
- **Electronique** : Des photomultiplicateurs et des détecteurs collectent et analysent les signaux optiques, et contrôlent les sources lumineuses.
- **Informatique** : Un logiciel informatique et un ordinateur permettent l'affichage des données recueillies et les représentent sous forme de graphiques (Scattergramms).

- **Principe de fonctionnement** :

D'abord les cellules en suspension dans l'échantillon subissent une focalisation hydrodynamique. Elles sont aspirées de l'échantillon par une buse vers une chambre de flux contenant un liquide de gaine (courant continu de tampon de type PBS) qui permet leur alignement et leur passage individuel devant le faisceau laser (site web 3).

Chaque cellule passée devant le laser génère une diffraction de la lumière selon deux angles :

- Diffraction de la lumière à petit angle (0 à 3°) : Donne une information sur la taille et le volume de la cellule (Forward-scattered light FSC).

- Diffraction de la lumière à grand angle (15 à 90°) : Donne une information sur la structure interne (granularité) de la cellule ainsi que sa complexité (Side-scattered light SSC) [17,18].

En plus des signaux lumineux, d'autres signaux fluorescents peuvent diffuser et qui peuvent être émises par la cellule elle-même (auto-fluorescence) ou par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule. La lumière diffusée à petit angle est capturée par une photodiode, tandis que la lumière émise à grand angle est capturée par des photomultiplicateurs, chaque multiplicateur est chargé de recevoir une longueur d'onde de lumière bien définie. Les signaux optiques sont ensuite convertis en données numériques qui vont être collectées et identifiées par le système informatique afin de réaliser une décision de tri. Le tri, dernière étape de la cytométrie en flux, peut être défini comme la séparation physique de cellules ou de particules d'intérêt à partir d'une population hétérogène (site web 3) (figure 7).

Principe de fonctionnement d'un analyseur-trieur.

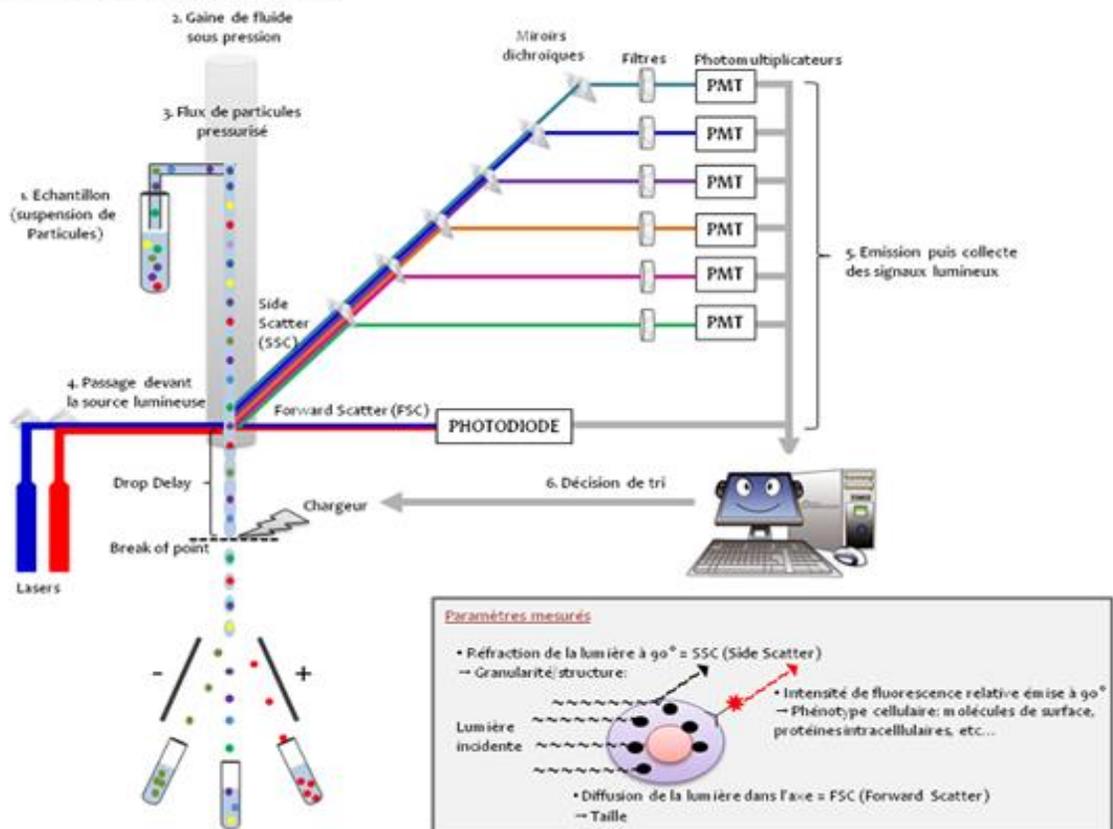


Figure 7 : Schéma montrant le mode de fonctionnement d'un analyseur-trieur suivant le principe de la cytométrie en flux (BFA - Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative CNRS UMR 8251).

3. Numération plaquettaire par méthode optique et canal RET :

L'analyse plaquettaire optique fluorescente (PLT-O) est un paramètre rapportable qui complète la numération de l'impédance plaquettaire. C'est une technique qui associe à la fois la fluorescence, la cytométrie de flux et la diffraction lumineuse. La source de lumière étant généralement un laser, la cellule dévie la lumière en fonction de sa taille, de sa granularité et de la forme de son noyau [24].

La numération plaquettaire est réalisée au niveau du canal de mesure des réticulocytes suivant le principe de la cytométrie en flux. Un fluorochrome contenant de la polyméthine et de l'oxazine pénètre la membrane des plaquettes et des hématies immatures, se lie exclusivement aux acides nucléiques de ces cellules notamment l'acide ribonucléique (ARN), ainsi a la propriété colorer fortement la membrane plasmique des érythrocytes et des érythrocytes fragmentés ayant la même taille que les plaquettes et pouvant par conséquent conduire à un taux faussement élevé de ces dernières [27].

Les cellules passent tout le long du canal « Réticulocytes » jusqu'à ce qu'elles arrivent devant un faisceau laser d'une longueur d'onde de 633 nm qui fait exciter le fluorochrome colorant les cellules qui à son tour induit l'émission d'une fluorescence rouge.

Les cellules sont classées d'une part en fonction de la taille par diffusion de la lumière aux petits angles (forward scatter) et d'une autre part en fonction de la granularité et la structure interne reflétée par la diffusion lumineuse au grands angles (side scatter). Un logiciel « IPF Master Software, Sysmex » traite les données et les regroupe dans un graphe sous le nom de « Scattergramm ». Chaque cellule est représentée par un point dans le scattergramm donnant le volume cellulaire en fonction de la fluorescence. Le fluorochrome utilisé permet non seulement d'identifier les hématies, les réticulocytes et les plaquettes matures, mais permet aussi de mettre en évidence la fraction immature des plaquettes, plus active et plus riche en ARN contrairement à la fraction mature [25] (figure 8).

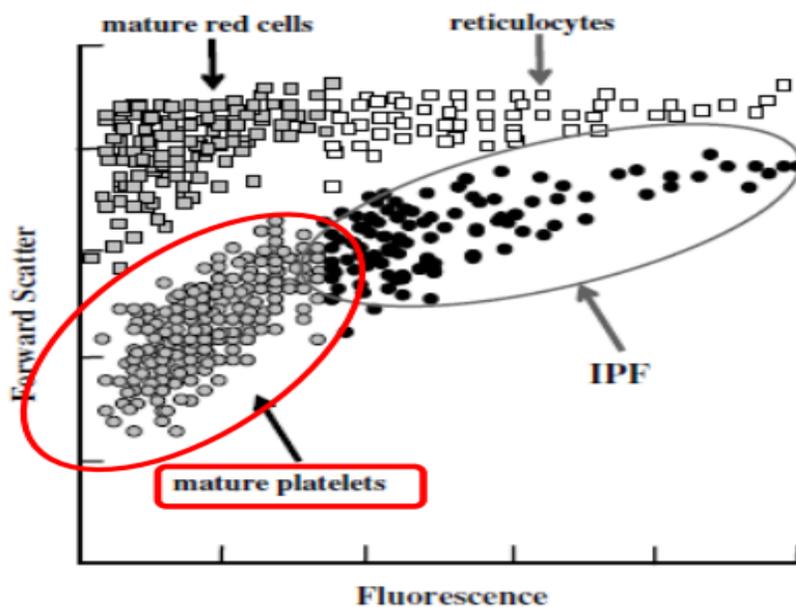


Figure 8 : Scattergram représentant la numération plaquettaire dans le canal des réticulocytes (Saigo et al, Transfusion and Apheresis Science, 2008) [26].

4. La numération plaquettaire par fluorimétrie et canal PLT-F :

Les techniques de comptage (impédance et optique) installées dans les analyseurs d'hématologie permettent un comptage exact des plaquettes dans les échantillons normaux mais, se montrent incapables de donner une numération plaquettaire précise dans des échantillons anormaux (échantillons contenant des amas plaquettaires, macro ou plaquettes géantes, fragments des globules rouges, schizocytes ou encore dans des échantillons de faible concentration). Afin d'améliorer cette numération et éliminer la marge d'imprécision, un nouveau canal PLT-F basé sur la fluorescence et la cytométrie en flux a été introduit dans les analyseurs d'hémogramme les plus récents [27, 28].

Le canal PLT-F est un canal récemment introduit exclusivement dans les séries XN des analyseurs Sysmex d'hématologie notamment la nouvelle série XN-9000. Ce canal est utilisé uniquement pour le comptage des plaquettes et a la capacité de fournir une numération plaquettaire précise et exacte même dans des échantillons sanguins anormaux. La précision de la numération dans ce canal est due essentiellement à l'utilisation du réactif fluorescent qui marque spécialement les plaquettes exclusivement au niveau de l'ADN mitochondrial, de l'ARN cytosolique et des protéines de surface spécifique des plaquettes : GPIIb et GPIIIa, permettant ainsi de minimiser les

interférences [27]. La précision du canal est aussi due au volume d'échantillon analysé qui est 5 fois plus grand que celui aspiré dans l'analyse par impédance. La mesure dans le canal PLT-F est automatiquement déclenché comme test de réflexe dans les échantillons fortement thrombopéniques ou dont un message de détection indique une mesure non fiable de comptage par l'impédance électrique (site web 5).

➤ **La fraction immature des plaquettes IPF :**

La fraction immature des plaquettes est un paramètre mesuré lors du comptage des plaquettes par cytométrie en flux. C'est un paramètre indicateur de l'activité de la moelle osseuse qui permet une bonne interprétation de la cause des thrombopénies. La fraction immature des plaquettes indique si la thrombopénie est due à une diminution de la production plaquettaire par la moelle osseuse ou s'il s'agit d'une destruction ou consommation accrue des plaquettes dans le sang périphérique [29,30]. Cette fraction immature des plaquettes est rapidement quantifiée au niveau du canal PLT-F et elle est clairement distinguée de la fraction mature à savoir que les plaquettes immatures sont plus réactives et plus riches en ARN ce qui permet une émission élevée de la fluorescence inversement proportionnelle au degré de la maturité (site web 4) (figure 9).

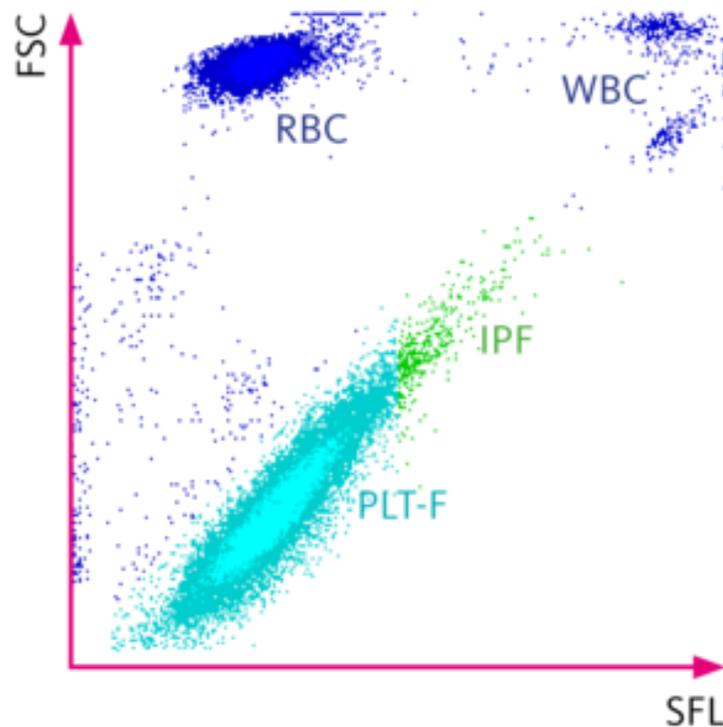


Figure 9 : Diagramme de dispersion du canal PLT-F avec une distribution cellulaire normale (site web 4).

VI. MÉTHODE DE COMPTAGE DE RÉFÉRENCE

Méthode d'immunomarquage des plaquettes et cytométrie en flux :

En raison de la non reproductibilité de la méthode manuelle exigeant beaucoup de main-d'œuvre, la méthode de comptage des plaquettes basée sur l'impédance PLT-I a été développée et impliquée dans les analyseurs de première génération. Or, ces systèmes ne peuvent distinguer les plaquettes des autres particules de même taille, car dépendent uniquement de la taille des particules, mesurée à l'aide de l'impédance électrique. Afin de résoudre ce problème, une autre méthode basée sur la cytométrie en flux et les anticorps monoclonaux a été développée. Cette méthode consiste essentiellement à utiliser des anticorps liés à des fluorochromes notamment l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et le phycoérythrine (PE) dirigés contre les antigènes de surface des plaquettes connus sous le nom de CD41 et CD61 qui correspondent respectivement aux glycoprotéines plaquettaires GPIIb et GPIIIa. La fluorescence ainsi émise est mesurée par cytométrie en flux et permet de distinguer clairement les plaquettes des autres particules de taille similaire, même dans des échantillons de sang anormaux. Par conséquent, cette méthode s'est révélée la plus fiable d'entre toutes les méthodes de comptage (impédance et méthode optique) et est devenue la méthode de référence pour le comptage des plaquettes. En revanche, en raison de son fonctionnement coûteux et ses procédures légèrement compliquée, cette méthode n'a pas été standardisée dans les laboratoires. La nouvelle méthode de numération plaquettaire, basée sur la fluorescence et la cytométrie en flux (PLT-F), récemment développée dans la série XN des analyseurs Sysmex est venue remplacer la technique immunologique avec laquelle a montré une très forte corrélation. Et en raison de sa rapidité, sa fiabilité et son utilisation facile, cette nouvelle méthode est devenue la méthode standard, abordable dans le comptage des plaquettes, au sein des laboratoires d'hématologie [27] notamment le LCHISR.

Partie 3

**MATÉRIEL ET
MÉTHODES**

I. POPULATION D'ETUDE

Chaque jour, des centaines de prélèvements arrivent au LCHISR, depuis plusieurs services de l'hôpital et même des services externes.

Les prélèvements qui intéressent notre étude sont les prélèvements reçus sur des tubes EDTA. Après que les échantillons sanguins passent par la phase pré-analytique, ils passent ensuite dans l'analyseur d'hémogramme afin qu'ils soient analysés pour un test NFS, pour une exploration non seulement de la lignée plaquettaire mais aussi des autres lignées sanguines à savoir la population blanche et la lignée érythrocytaire.

Les échantillons pour lesquelles le test PLT-F est effectué automatiquement ou sur demande sont souvent des échantillons où est détectée une **thrombopénie** où le taux des plaquettes est \leq à 150 000 / μ l ou une **thrombocytose** où le taux des plaquettes dépasse les 400 000 / μ l (figure 10).



Figure 10 : Prélèvements sanguins sur tubes EDTA destinés à être analysés par l'automate d'hémogramme Sysmex XN-9000

II. MATÉRIEL

1. L'analyseur Sysmex XN-9000 :

L'hémogramme est réalisé à l'aide de l'analyseur Sysmex XN-9000 d'hématologie, composé de 3 unités permettant chacune d'effectuer en quelques minutes la numération formule sanguine notamment la numération plaquettaire par les 3 techniques expliquées auparavant : Impédance électrique, méthode optique et fluorimétrie, en plus d'un écran d'affichage des résultats (figure 11).



Figure 11 : L'analyseur d'hémogramme Sysmex XN-9000 récemment introduit au sein du LCHISR.

2. Les réactifs utilisés :

L'automate se sert lors des analyses de 4 réactifs dont 2 sont utilisés dans la numération des plaquettes : RET et PLT (figure 12).



Figure 12 : Les réactifs utilisés par l'analyseur d'hémogramme pour la réalisation de la numération formule sanguine.

Les réactifs utilisés sont basés essentiellement sur la fluorescence et colorent exclusivement les acides nucléiques des cellules sanguines (ADN et ARN), et à l'aide de la cytométrie en flux, cette fluorescence est mesurée selon des longueurs d'ondes lumineuses appropriées.

Vu que notre étude s'intéresse uniquement à la numération plaquettaire, on va alors détailler uniquement les deux réactifs suivants : RET et PLT

2.1. Fluorocell PLT :

Lorsque l'automate reçoit un échantillon de sang, un volume sanguin est introduit dans l'analyseur à partir du sang total. Une partie de ce volume est diluée automatiquement au 1/200^{ème} par un diluant « CELLPACK DFL », ensuite le réactif fluorochrome « Fluorocell PLT » est introduit. Le mélange dilué est conservé à température constante pendant une durée prédéfinie afin de repérer les plaquettes qui y sont présentes (figure 13). L'échantillon étiqueté entre par la suite dans une chambre de mesure où la lumière diffusée vers l'avant et la fluorescence émise par le fluorochrome lié aux plaquettes sont mesurées à l'aide d'un détecteur suivant le principe de la cytométrie en flux.

Les composants de base de ce réactif sont : Oxazine 0,003%

Ethylène glycol 99,9%

➤ Mode de fonctionnement :

Avant que le fluorocell PLT entre dans les plaquettes, un réactif de lyse entraîne des perforations dans la membrane plasmique des plaquettes permettant ainsi l'entrée du réactif fluorescent qui se lie directement aux acides nucléiques représentés par l'ADN mitochondriale et l'ARN cytosolique contenus dans les plaquettes. Des études récentes ont montré que ce réactif colore faiblement la membrane plaquettaire et marque uniquement les plaquettes où les structures internes de ces dernières sont fortement marquées (coloration des acides nucléiques) ainsi de sa capacité de détecter des protéines de surface spécifiques des plaquettes : GPIIb et GPIIIa après avoir montré qu'il y a une grande similitude entre la composition du réactif et celle des anticorps dirigés contre ces protéines (site web 4, [27]).



Figure 13 : Fluorocell PLT : réactif fluorescent utilisé pour le marquage des plaquettes (REF : CD-994-563, Code à barre : (O1) 04987562423057 (17) 181214 (10) 17 1 1 7)

2.2. Fluorocell RET :

Ce réactif est utilisé pour repérer à la fois les réticulocytes, les globules rouges et les plaquettes. La phase qui précède le marquage (dilution et temps de repérage) par le fluorochrome est la même que celle détaillée pour le réactif précédent (figure 14). La lumière diffusée et la fluorescence émise sont toujours mesurées par cytométrie en flux, donnant ainsi la numération de chaque type cellulaire (RET, PLT, GR).

Les composants de base de ce réactif sont : Polyméthine 0,03%

Méthanol 7,9%

Ethylène glycol 92,0%

➤ Remarque :

Une présence des érythrocytes fragmentées dans un échantillon sanguin, peut conduire à une numération imprécise des plaquettes et un taux faussement élevé de ces dernière, et ceci est expliqué expérimentalement par la présence d'une similitude de taille entre ces deux éléments sanguins ainsi par la capacité du réactif (RET) à colorer efficacement la membrane plasmique des érythrocytes et des érythrocytes fragmentés. [27].



Figure 14 : Fluorocell RET : Réactif fluorescent permettant le marquage à la fois des réticulocytes, des globules rouges et des plaquettes (REF : BN-337-547 Code à barre : (O1) 049875622423040 (17) 1901 1 8 (10) A7084)

III. MÉTHODES

1. Le travail au sein du LCHISR :

La validation des résultats de l'hémogramme est une étape indispensable de l'étude et qui va permettre d'établir les résultats et les interprétations ultérieures.

Après avoir terminé l'analyse des échantillons sanguins par l'analyseur d'hémogramme, le résultat de chaque patient est affiché automatiquement sur l'écran de l'automate ainsi sur les écrans de validation. Avant de rendre les résultats, l'hémogramme est contrôlé par les pharmaciens internes et résidents du laboratoire (figure 15). Le résultat où est détectée une thrombopénie ou une thrombocytose nécessite de faire repasser l'échantillon correspondant dans l'automate et le re-analyser, et cette fois ci avec une demande du test « PLT-F » afin d'obtenir une numération des plaquettes par fluorimétrie.



Figure 15 : Paillasse de validation au sein du LCHISR

2. Préparation des résultats :

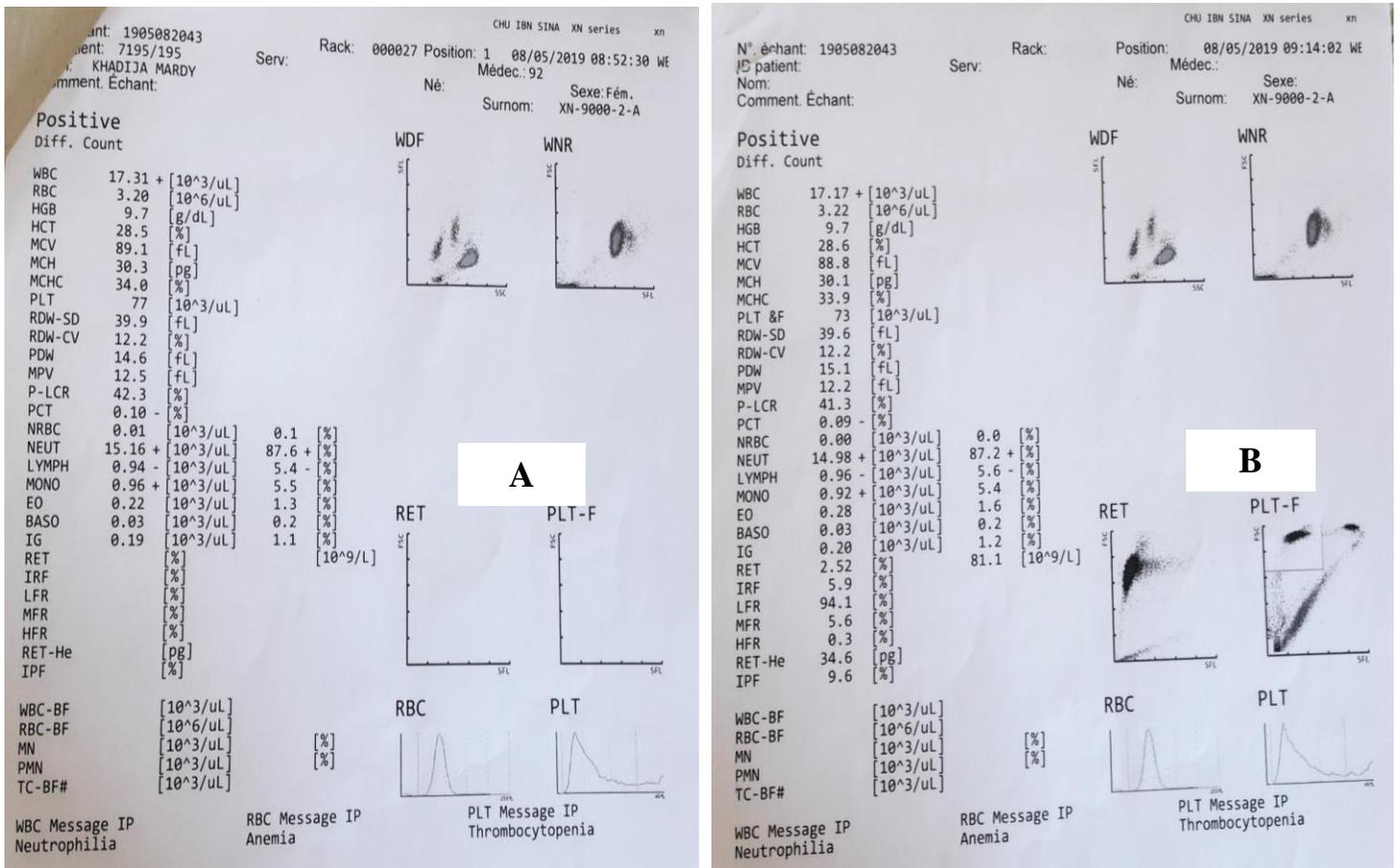


Figure 17 : Résultat d'hémogramme d'un patient tiré à partir de l'analyseur Sysmex XN-9000. (A) Les plaquettes sont comptées uniquement par impédance électrique (B) Les plaquettes sont comptées à la fois par fluorimétrie ainsi par méthode optique.

La valeur du taux des plaquettes peut être obtenue par le système de l'analyseur. Dans ce cas :

- $\text{PLT-I} = 77 \times 10^3/\mu\text{L}$
- $\text{PLT-O} = 66 \times 10^3/\mu\text{L}$
- $\text{PLT-F} = 73 \times 10^3/\mu\text{L}$

Le résultat est accompagné aussi d'un commentaire spécifique de chaque lignée sanguine. Dans ce cas de figure le commentaire concernant la lignée plaquettaire indique une Thrombopénie.

➔ Pour chaque patient, l'automate d'hémogramme fournit deux résultats successifs donnant respectivement le taux de plaquettes par impédance en 1^{er} lieu, ensuite le taux par fluorimétrie suite à la demande (figure 17). Le taux des plaquettes par la méthode optique est donné uniquement si le taux de réticulocytes est mesuré aussi. Les valeurs des plaquettes sont ensuite regroupées dans des tableaux Excel, permettant ainsi l'établissement des résultats.

Partie 4

RÉSULTATS

I. PATIENTS ET ÉCHANTILLONS SANGUINS

L'étude a été effectuée sur l'ensemble de 160 échantillons sanguins des patients atteints de thrombocytose et de thrombopénie, séparés en :

- 100 échantillons : Où les plaquettes sont comptées par : Impédance électrique et fluorimétrie.
- 60 échantillons : Où les plaquettes sont comptées par : Impédance électrique, méthode optique et fluorimétrie.

Tableau 1 : Nombre de patients atteints de thrombopénie et de thrombocytose dans l'ensemble de 100 patients

Groupe d'échantillon 1	Plaquettes comptées par : impédance électrique et fluorimétrie
Nombre d'échantillons avec thrombopénie	71
Nombre d'échantillons avec thrombocytose	29
Total	100

Tableau 2 : Nombre de patients atteints de thrombocytose et de thrombopénie dans l'ensemble de 60 patients

Groupe d'échantillon 2	Plaquettes comptées par : impédance électrique, méthode optique et fluorimétrie
Nombre d'échantillons avec thrombopénie	51
Nombre d'échantillons avec thrombocytose	9
Total	60

II. RÉPARTITIONS

1. Groupe échantillon 1 de 100 patients :

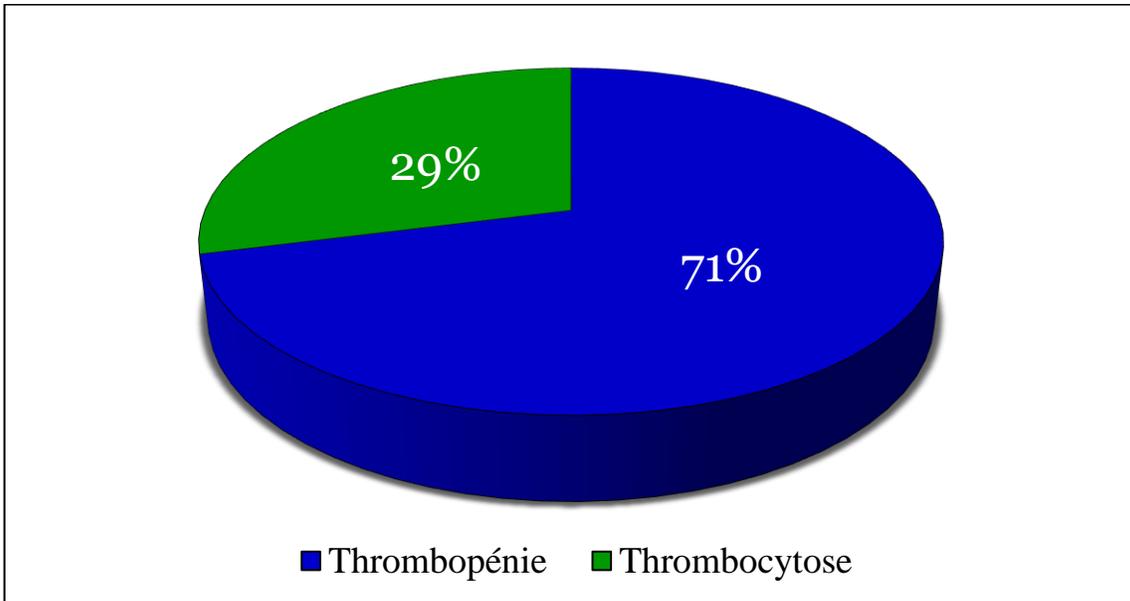


Figure 18 : Répartition des taux de plaquettes comptées par impédance et fluorimétrie pour 100 patients

2. Groupe échantillon 2 de 60 patients :

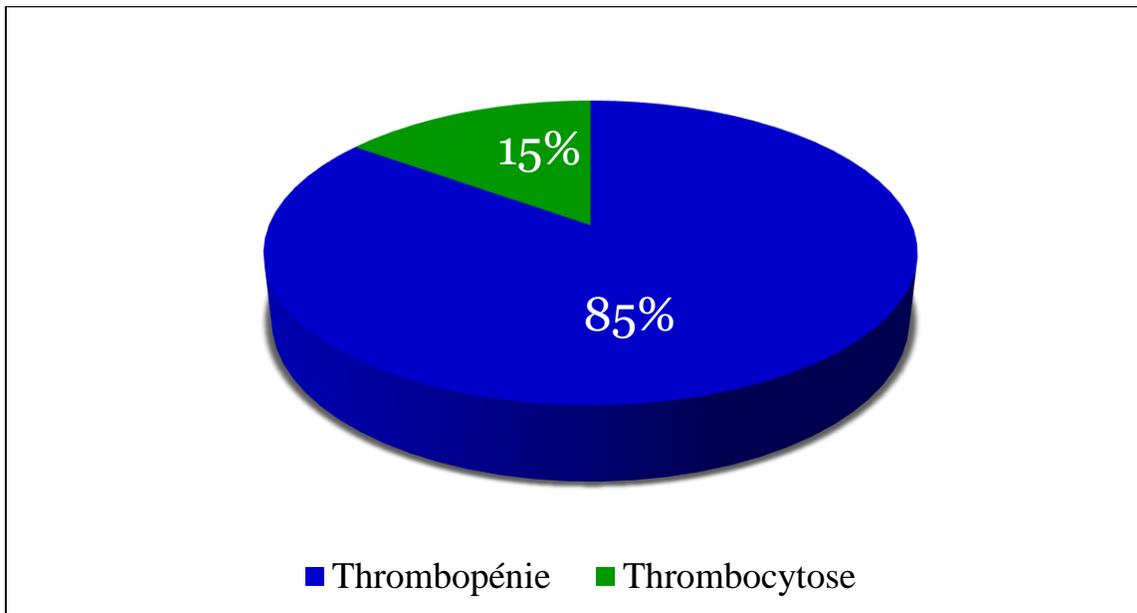


Figure 19 : Répartition des taux de plaquettes comptées à la fois par impédance électrique, méthode optique et fluorimétrie pour 60 patients

III. VARIATIONS ET CORRÉLATIONS

1. Variations :

1.1. Groupe échantillon 1 de 100 patients :

a. Thrombopénie :

Tableau 3 : Coefficient de variation calculé pour 2 méthodes de comptage pour 71 échantillons des patients atteints de thrombopénie

PLT < 150 000 x 10 ³ / µl		
Méthodes	PLT-I	PLT-F
Moyenne	55,61971831	58,31944444
SD	31,00431592	31,45389041
CV	55,743389	55,2104537

CV : Coefficient de variation en % ; SD : Déviation standard

→ Le coefficient de variation calculé à partir de la moyenne et la déviation standard (écart-type) pour les échantillons avec thrombopénie montre une valeur relativement faible pour la méthode de la fluorimétrie (PLT-F) par rapport à celle de l'impédance électrique (**55,21 < 55,74**).

1.2. Groupe échantillon 2 de 60 patients :

a. Thrombopénie :

Tableau 4 : Coefficient de variation calculé pour 3 méthodes de comptage pour 51 échantillons des patients atteints d'une thrombopénie

PLT < 150 000 x 10 ³ / µl			
Méthodes	PLT-I	PLT-O	PLT-F
Moyenne	45,41176471	44,23636364	55,90566038
SD	32,41245222	32,7877849	35,41187839
CV	71,3745709	74,1195302	63,3422057

b. Thrombocytose :

Tableau 5 : Coefficient de variation calculé pour 3 méthodes de comptage pour 9 échantillons des patients atteints de thrombocytose

PLT > 400 000 x 10³ / µl			
Méthodes	PLT-I	PLT-O	PLT-F
Moyenne	649,1111111	594,75	633,875
SD	116,298586	122,2909295	103,4952552
CV	17,9165915	20,5617368	16,3273919

→ Le coefficient de variation calculé à la fois pour la méthode d'impédance, méthode optique et fluorimétrie pour 51 échantillons avec une thrombopénie, montre une valeur inférieure pour la méthode de la fluorimétrie par rapport aux deux autres techniques de comptage. De même pour les 9 échantillons avec une thrombocytose, la valeur la plus basse du coefficient de variation est attribuée à la méthode de la fluorimétrie.

➤ Remarque :

Le coefficient de variation (CV) est une mesure statistique de la dispersion des points de données dans une série de données autour de la moyenne. Plus le ratio (rapport) entre l'écart type et le rendement moyen (moyenne) est faible, meilleur sera le compromis risque-rendement. Dans notre étude, le CV le plus bas correspond à la méthode de comptage la plus précise.

2. Corrélations :

En statistiques, la corrélation entre deux variables désigne l'intensité de la liaison qui existe entre elles. Un coefficient de corrélation est alors calculé afin de quantifier cette liaison. Il est généralement compris entre -1 et 1. Le rapprochement du coefficient de corrélation vers ces deux extrêmes renseigne sur une forte corrélation entre les variables utilisées. Par contre, un coefficient de corrélation qui est égale à 0 désigne une corrélation nulle et une indépendance entre les variables.

Dans notre étude le coefficient de corrélation est calculé comme suit :

- Pour le groupe échantillon 1 : entre les valeurs des plaquettes comptées par impédance électrique et celles comptées par fluorimétrie.

Tableau 6 : Coefficient de corrélation calculé pour le groupe échantillon 1 de 100 patients

Groupe échantillon 1	100 patients
Coefficient de corrélation	0,970913923

- Pour le groupe échantillon 2 : entre les valeurs des plaquettes comptées par méthode optique et celles comptées par fluorimétrie.

Tableau 7 : Coefficient de corrélation calculé pour le groupe échantillon 2 de 60 patients

Groupe échantillon 2	60 patients
Coefficient de corrélation	0,990386149

- **Tableau 1 :**

Le coefficient de corrélation calculé pour les deux variables PLT-I et PLT-F montre une forte corrélation entre les méthodes sauf que, la valeur du coefficient n'atteint pas 1, cela signifie alors que les méthodes sont corrélées mais, différentes.

- **Tableau 2 :**

De même, La valeur du coefficient de corrélation calculé pour les variables PLT-O et PLT-F montre que les deux méthodes sont fortement corrélées mais différentes, une différence traduite par la valeur du coefficient qui n'atteint jamais 1.

➤ **Remarque :**

Les résultats statistiques sont effectués d'une manière indépendante pour les 2 groupes d'échantillons.

Partie 5

DISCUSSION

DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'objectif de notre étude est d'évaluer la précision du nouveau canal de comptage plaquettaire (PLT-F) nouvellement introduit dans la série XN des analyseurs Sysmex, notamment la série XN-9000 et qui repose sur la fluorimétrie basée sur la cytométrie en flux et la fluorescence.

Le coefficient de variation calculé pour les trois méthodes de comptage PLT-I, PLT-O et PLT-F montre une valeur plus faible pour la méthode de la fluorimétrie (PLT-F). Ainsi, le coefficient de corrélation montre une forte corrélation entre les méthodes avec une différence qui peut être expliquée par le coefficient de variation qui attribue la plus grande précision au canal PLT-F vu sa valeur faible pour la nouvelle technique.

Ces résultats concordent bien avec ceux rapportés par Yuzo Tanaka et al en 2014, dans l'étude : « Evaluation de la performance de la numération plaquettaire par une nouvelle coloration fluorescente dans les analyseurs d'hématologie automatisés de la série XN », où le coefficient de variation présentait des valeurs basses pour le PLT-F lors de la comparaison des 3 techniques de comptage.

La précision du comptage est constatée plus dans des échantillons avec une thrombopénie où on distingue deux cas :

- Lorsque l'hémogramme indique le commentaire suivant : « PLT Abn distribution, Fragments » ou « Distribution anormal des plaquettes, Fragments », dans ce cas le taux de plaquettes est souvent faussement élevé lors de l'analyse par impédance ou par méthode optique et diminue après répétition de l'analyse par PLT-F. Ceci peut être expliqué par le fait que d'autres particules (fragments de globules rouges ou schizocytes) ont été comptés comme plaquettes, ayant la même taille que celles-ci.
- Si l'hémogramme indique le commentaire suivant : « PLT Clumps » ou « Amas plaquettaires », et que le taux de plaquettes augmente après analyse PLT-F, ceci signifie que l'échantillon comporte des amas de plaquettes ou aussi des macroplaquettes ou plaquettes géantes, considérés lors de l'analyse par impédance comme des globules blancs de taille plus importante.

La précision dans le comptage par fluorimétrie est due essentiellement au réactif utilisé dans le canal PLT-F, qui colore uniquement les plaquettes en ciblant la coloration de l'ADN

mitochondriale, l'ARN cytosolique ainsi que les protéines de surface spécifiques des plaquettes [27].

Conclusion

Cette étude effectuée pour la première fois au Maroc, au sein du Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina de Rabat, a permis de confirmer une haute précision pour le canal PLT-F de l'analyseur Sysmex XN-9000 récemment introduit, dans le comptage plaquettaire, même dans des échantillons anormaux ou de faible concentration.

Une précision dans le taux des plaquettes est considérée comme indispensable et qui peut avoir un impact majeur lors d'une interprétation clinique, précisément en cas de transfusion plaquettaire où la numération joue un rôle très important pour la prise d'une décision appropriée, d'où l'**intérêt** du comptage plaquettaire par **fluorimétrie** ou encore **PLT-F**.

Recommandations

- ✚ Introduction du nouveau canal PLT-F, même dans les analyseurs d'hémogramme à bas débit.
- ✚ Standardisation et adoption de cette nouvelle technique dans les nouveaux laboratoires.
- ✚ Association de la demande du test PLT-F au test NFS par le médecin avant vérification du taux des plaquettes lors de la validation de l'hémogramme permettant ainsi un gain de temps.
- ✚ Avoir conscience de l'intérêt de la précision dans le comptage des plaquettes afin d'éviter tout risque de thromboses ou d'hémorragie qui peuvent se répercuter chez un malade.

Références bibliographiques

1. CAROLE EMILE (2017) Option Bio n° 567-568
2. Kemble, S., Briggs, C., & Harrison, P. (2019). *Platelet Counting. Platelets*, 581
3. Margreet Schoorl, Marianne Schoorl, Jeanette Oomes, Johannes van Pelt, PhD, (2013)
Journal américain de pathologie clinique
4. Imane Rim El Fala RBOUB (2012), LA GAZETTE DU LABORATOIRE n° 62, P4
5. Philippe de Moerloose Françoise Boehlen (2005-2006), HEMOSTASE
6. Lauren Rigollet (2013), biomnis Focus numéro 4, Immunophénotypage : Technique et applications en biologie
7. Nicolas Guillot. PLAQUETTES SANGUINES ET MEGACARYOCYTES HUMAINS : IMPACT DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE SUR LEUR ACTIVATION ET LEUR ETAT REDOX. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008.
8. Gnatenko et al (2003), GENOMICS AND CLINICAL MEDICINE
9. William VAINCHENKER , Rodolphe BESANCENOT, Fabrizia FAVALE (2013), Bull. Acad. Natle Méd, n°2, Mégacaryopoïèse : régulation de la production plaquettaire par la thrombopoïétine
10. Amélie BOILLOT, (2010), T H E S E pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1, FACTEURS DE CROISSANCE HEMATOPOÏETIQUES AU COURS DES THERAPIES ANTI-CANCEREUSES : EFFETS INDESIRABLES ET PRECAUTIONS LORS DE LEUR DISPENSATION A L'OFFICINE.
11. Dr. Chantal KOHLER (2010-2011), Université Médicale Virtuelle Francophone, Les cellules sanguines

12. Lyne Cloutier, Amélie René, et Annick Jutras, (2014), Pratique clinique, La formule sanguine complète. Des connaissances appliquées à la pratique infirmière.
13. Daniele NakuI-Aquaronne et all (2002), Revue Française des Laboratoire N ° 347, P581
14. Samuel Kemble et all (2019), Part III Clinical Tests Of Platelet Function, 32 Platelet Counting, P581
15. Dr Edmond Renard (2009), SYNLAB Labo link
16. Stéphane BERTHÉLÉMY (2014), Actualités pharmaceutiques • n° 538
17. René Caquet (2008), Numération-formule sanguine (NFS), hémogramme P225
18. Saloua ARDOUNI (2013), HEMOGRAMME : AVANCEES ACTUELLES, THESE N° :35
19. Delphine GERARD, (2017), Liquides d'épanchements : analyse par l'hématimètre XN (SYSMEX®), évaluation de la formule automatisée et mise en évidence des cellules pathologiques par cytométrie en flux, THESE pour le DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR en PHARMACIE, UNIVERSITE DE LORRAINE
20. E. Schapkaitza, S. Raburabu (2018), Clinical Biochemistry P 132-138
21. Équipe pédagogique du lycée Jean MOULIN (ANGERS)POCHET, (2008)
22. Gérald Grégori, La Cytométrie en flux : Principes, Laboratoire de Microbiologie, de Géochimie et d'Ecologie Marines CNRS UMR 6117
23. Anne Tessier-Marteau et al, (2010), Ann Biol Clin 68 (4) : 393-407
24. André BAYLE et al (2018), Biologie Sans Frontières, AUTOMATE A NUMERATION
25. Elsa Bera. Évaluation de la fraction des plaquettes immatures (IPF) sur l'automate à numération Sysmex XE-5000 dans le diagnostic des thrombopénies périphériques et centrales au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. Médecine humaine et pathologie. 2015. ffdumas-01236097f

26. Saigo K, Sakota Y, Masuda Y, Matsunaga K, Takenokuchi M, Nishimura K, et al. Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. Avr 2008 ;38(2) :127-32.
27. Wada A, Takagi Y, Kono M, Morikawa T (2015) Accuracy of a New Platelet Count System (PLT-F) Depends on the Staining Property of Its Reagents
28. Yuzo Tanaka, Yumiko Tanaka, Kazumi Gondo, Yoshiko Maruki, Tamiaki Kondo, Satomi Asai, Hiromichi Matsushita, and Hayato Miyachi (2014). Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-Series Automated Hematology Analyzers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 28 : 341–348
29. 2016 Sysmex America Inc. IMMATURE PLATELET FRACTION (IPF) Measurement of Thrombopoietic Activity XN-Series™/XE-5000™
30. 2017, Sysmex white paper Immature platelets – clinical use

Webographie

Site web 1 : <https://www.msmanuals.com/fr/professional/h%C3%A9matologie-et-oncologie/thrombop%C3%A9nie-et-dysfonctionnement-des-plaquettes/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-des-troubles-plaquettaires>

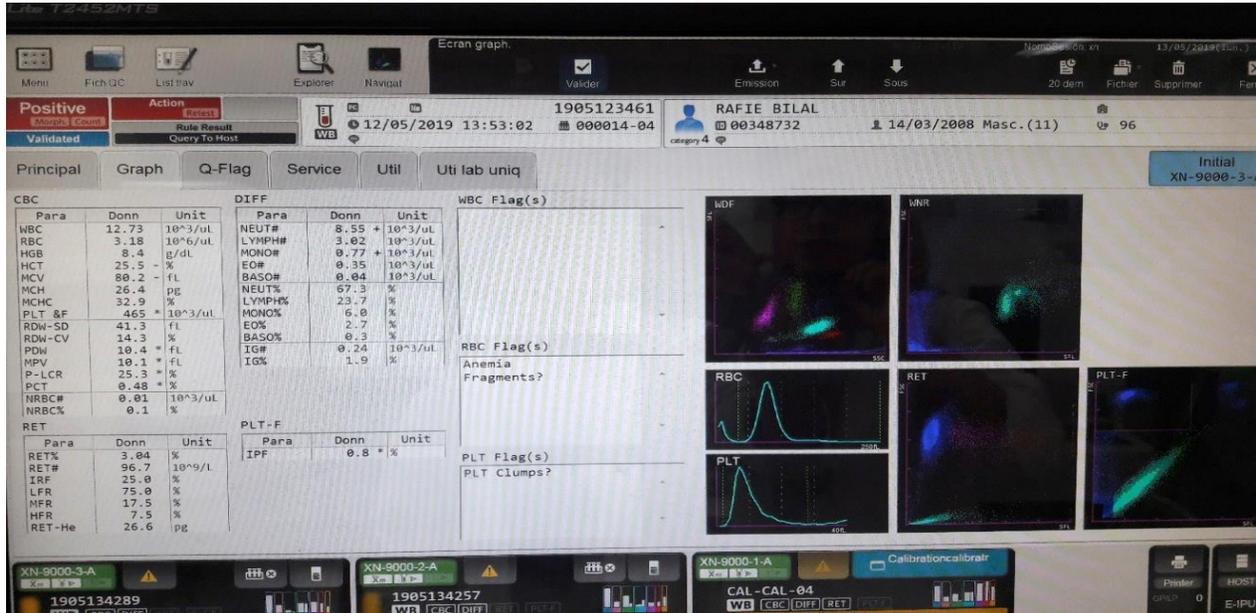
Site web 2 : <https://www.beckman.com/resources/fundamentals/history-of-flow-cytometry/the-coulter-principle>

Site web 3: <http://bfa.univ-paris-diderot.fr/cytometrie-en-flux-et-tri-cellulaire/>

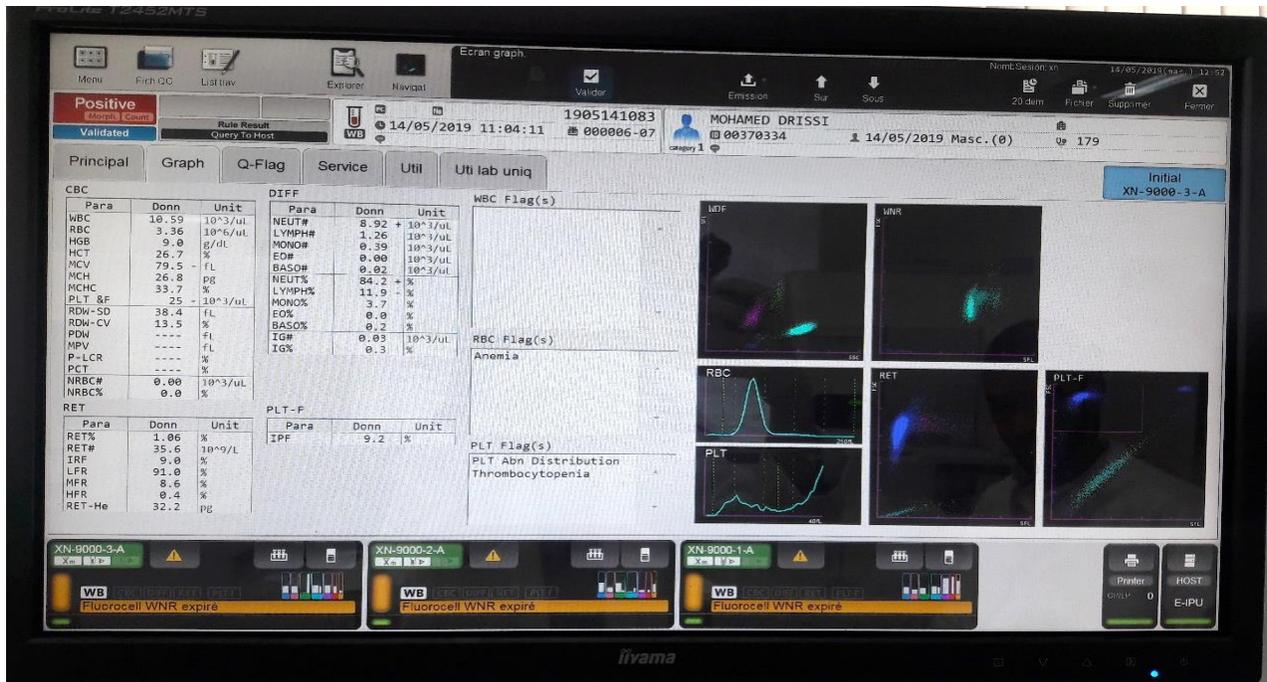
Site web 4 : <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/measurement-technologies/plt-f-channel.html>

ANNEXES

Annexe 1: Résultat donné par l'analyseur Sysmex XN-9000, montrant les différents graphes spécifiques des méthodes de comptage plaquettaire pour un patient atteint d'une thrombocytose (PLT = $465 \times 10^3 / \mu\text{l}$).



Annexe 2 : Résultat donné par l'analyseur Sysmex XN-9000, montrant les différents graphes spécifiques des méthodes de comptage plaquettaire pour un patient atteint d'une thrombopénie (PLT = $25 \times 10^3 / \mu\text{l}$).



Annexe 3 : Ensemble d'histogramme représentant les résultats de la numération plaquettaire par impédance électrique.

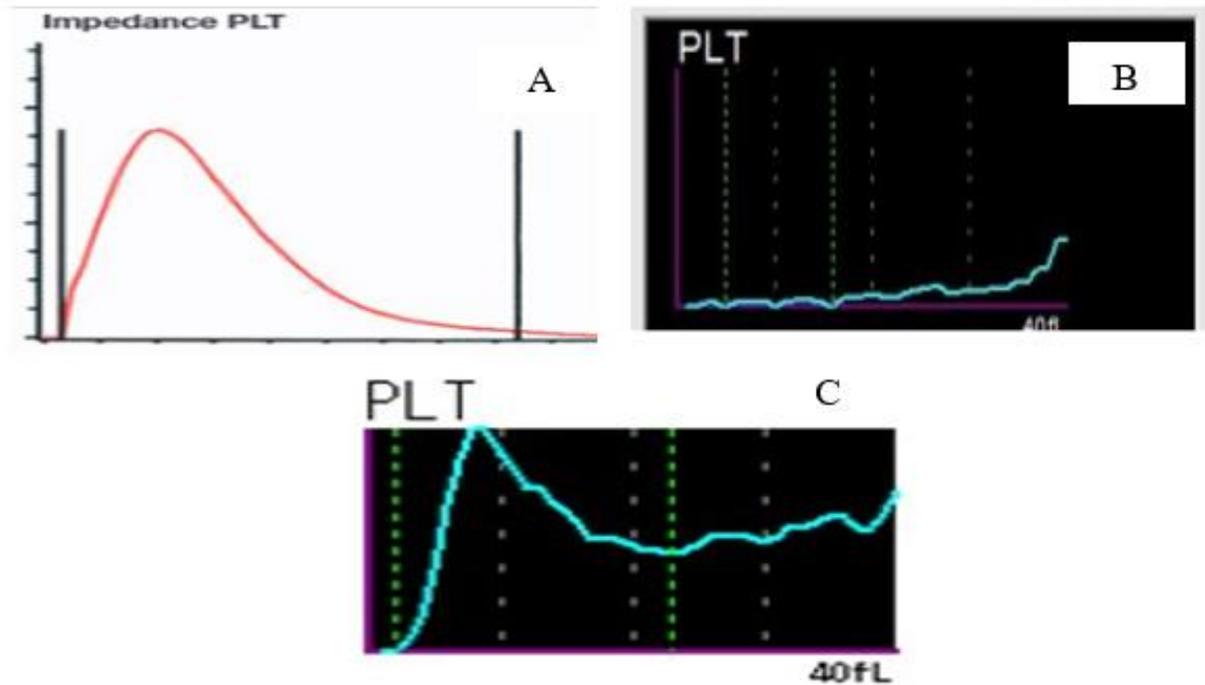


Figure 8 : (A) Histogramme normal (Bernard CHATELAIN (2016) CHU Dinant Godinne) (B) Taux de plaquettes comptées par impédance chez un sujet atteint d'une thrombopénie sévère (C) Présence de schizocytes perturbant la séparation plaquettes-hématies [24].

L'ensemble des histogrammes ci-dessus montrent le résultat du comptage plaquettaire par impédance électrique. On distingue :

- L'histogramme A montre l'allure normale qu'on peut obtenir après analyse d'un échantillon sanguin présentant un taux normal des plaquettes.
- Dans l'histogramme B on peut clairement constater un nombre effondré des plaquettes et qui peut être dû à la présence des amas plaquettaires ou, des macroplaquettes ou plaquettes géantes qui peuvent entraîner une sous-estimation du taux des plaquettes.
- L'histogramme C montre un taux de plaquettes qui peut être normal ou élevé avec des interférences pouvant être représentés par des GR microcytaires ou des érythrocytes fragmentés qui viennent influencer le comptage plaquettaire et induire un taux faussement élevé.