

# Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

<b>Hématologie</b>	<b>13HEM2</b>	<b>Novembre 2013</b>
--------------------	---------------	----------------------

**Frottis sanguin**  
**Dosage des hémoglobines A2 et F**

**Juillet 2014**

Anne GUYARD (Ansm)  
Christophe MARZAC (Hôpital Saint-Antoine - Paris)  
Josiane BARDAKDJIAN-MICHAU (Hôpital Henri Mondor - Créteil)

Expédition : 16 octobre 2013

Clôture : 4 novembre 2013

Edition des compte-rendus individuels : 5 février 2014

Paramètres contrôlés : **13BF : Frottis sanguin**

**13BH et 13BJ : Hémoglobine A2, hémoglobine F**

Nombre de laboratoires concernés\* : 1497

Nombre de laboratoires participants\*\* : 1408

\* Laboratoires ayant déclaré à l'Ansm pratiquer les analyses concernées par l'envoi

\*\* Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

## Résumé de l'opération

L'opération 13HEM2 comportait un frottis sanguin et deux échantillons pour dosage de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F.

Le frottis 13BF, provenant d'un patient présentant une leucémie myélomonocytaire chronique, comportait une monocytose (monocytes : 18 %) et une myélémie (précurseurs granuleux : 26 %). On notait également la présence de polynucléaires neutrophiles hypogranuleux et de macroplaquettes. L'hypothèse diagnostique attendue (Leucémie myélomonocytaire chronique) a été rendue par 78,1 % des 1313 laboratoires participants. Avec le score établi sur l'association de résultats de la formule sanguine, des commentaires sur le frottis et des hypothèses diagnostiques, 91,4 % des laboratoires obtiennent une « Bonne réponse » ou une « Réponse acceptable ».

Au questionnaire, qui suivait l'analyse du frottis, concernant la numération plaquettaire, 91 % des laboratoires auraient utilisé une autre méthode proposée sur leur automate ou estimé le nombre de plaquettes sur le frottis afin de rendre le résultat.

Quant aux examens complémentaires, 94,7 % des laboratoires aurait proposé au prescripteur un myélogramme et un caryotype et près des trois-quarts (70 %) la recherche du transcrite BCR/ABL.

Deux échantillons de sang natif étaient proposés pour le dosage de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F : 13BH et 13BJ. Sur l'échantillon 13BH, les résultats d'HbA2 montrent une amélioration : pour une moyenne générale à 2,50 %, le CV est de 6,5 % et les résultats intra-techniques peu dispersés en HPLC (CV < 8 %) et en électrophorèse capillaire (CV < 5 %).

Le taux d'HbF dans l'échantillon 13BJ était inférieur à 1 %. Cependant, avec certaines techniques d'HPLC, le taux d'HbF a été rendu faussement élevé en raison de la présence d'hémoglobine H, l'une des fractions de l'hémoglobine H pouvant être élue au niveau de l'HbF. La mise en évidence de cette interférence conforte la recommandation de pratiquer au moins deux techniques pour toute étude de l'hémoglobine dans le cadre d'une recherche chez un patient.

Les techniques les plus utilisées en 2013 par les 171 participants sont l'électrophorèse capillaire (56 %) puis l'HPLC (32 %), l'électrophorèse en gel n'étant plus utilisée que par 11 % des laboratoires.

## Méthode statistique et exploitation des résultats

Les paramètres statistiques : effectif, médiane, moyenne et écart-type sont calculés à partir des données fournies par les laboratoires.

L'élimination des valeurs extrêmes est réalisée par la méthode de Tukey, puis les paramètres statistiques sont déterminés après une troncature à 3 écarts-types. Cette procédure a été appliquée au groupe toutes techniques et à chaque groupe technique.

Dans les tableaux de résultats figurent selon les cas :

- les effectifs non tronqués (n) mais après élimination des valeurs aberrantes (Tukey)
- la médiane et l'intervalle interquartile ou la moyenne tronquée (mTr), l'écart-type tronqué (sTr) et le coefficient de variation tronqué (CVTr) calculé par la formule  $100 \times sTr / mTr$ .

## Echantillon 13BF Frottis sanguin

### Définition de l'échantillon

L'échantillon 13BF, frottis sanguin coloré au MGG, provenait d'un patient qui présentait une leucémie myélomonocytaire chronique (figure 1). Les résultats de la formule sanguine sont présentés dans le tableau I.

Les laboratoires disposaient du cas clinique suivant :

Mr N.C., né en 1954, est connu depuis 14 ans pour une thrombopénie modérée, initialement supérieure à 100 G/L, associée à une polynucléose neutrophile. Il consulte à la suite d'une symptomatologie douloureuse au niveau des cartilages de l'auricule et du nez.

Les résultats de la NFS actuelle sont : (valeurs de référence entre parenthèses)

Leucocytes 55,15 G/L (4,00 - 10,00) ; Hématies 4,18 T/L (4,00 - 6,20) ; Hémoglobine 12,3 g/dL (12,0 - 18,0)

Hématocrite 37,6 % (40,0 - 54,0) ; VGM 90 fL (80 - 100) ; TCMH 29,4 pg (27,0 - 33,0)

CCMH 32,7 g/dL (32,0 - 36,0) ; Indice Distribution Hématies 20,0 % (12,0 - 15,0)

Plaquettes 67 G/L (150 - 400)

L'analyse des graphes montre :

- un histogramme plaquettaire aplati, de répartition non gaussienne,
- une augmentation du nuage en lieu et place des monocytes et une confluence partielle de celui-ci avec le nuage des lymphocytes,
- de nombreux éléments en lieu et place de la myélémie de répartition pyramidale.

Deux questions optionnelles étaient posées à la suite de l'analyse du frottis. Elles interrogeaient les biologistes sur d'une part leur démarche analytique, l'automate ayant rejeté la numération plaquettaire effectuée en impédance, et d'autre part les examens complémentaires proposés au prescripteur à titre de conseil.

Les biologistes référents ont examiné le frottis 13BF : Ch. Marzac, Paris – V. Baccini, Marseille – V. Bardet, Paris – C. Mathiot, Paris – C. Settegrana, Paris.

tableau I - résultats attendus

	Résultats des référents (moyenne en %)
Polynucléaires neutrophiles	45
Polynucléaires éosinophiles	0
Polynucléaires basophiles	0
Lymphocytes	10
Monocytes	19
Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	-
Myélémie / précurseurs granuleux	26
Blastes	0
Erythroblastes	0

**Commentaires attendus** : neutrophiles hypogranuleux (grains peu visibles), myélémie / précurseurs granuleux (PML/ML/MML), macroplaquettes, blastes (<5 %) [éventuellement], anisocytose [éventuellement].

**Réponse attendue** : Leucémie myélomonocytaire chronique

**Réponse acceptable** : Syndrome myéloprolifératif (autre type)

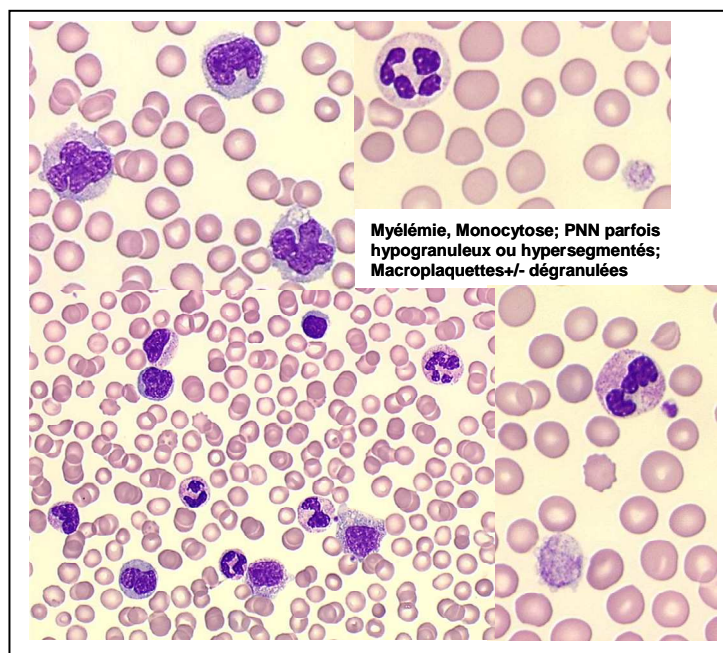
**Remarques** : La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une hémopathie myéloïde chronique présentant des caractéristiques à la fois de syndrome myéloprolifératif et de syndrome myélodysplasique. Le diagnostic doit être évoqué devant une monocytose supérieure à 1 G/L persistant plus de 3 mois, en l'absence de tout contexte infectieux, inflammatoire ou néoplasique. Des signes de dysplasie d'au moins une lignée myéloïde, le plus souvent la lignée granuleuse, doivent être recherchés pour étayer le diagnostic. Il s'agissait dans le cas de ce patient d'une dégranulation des polynucléaires neutrophiles.

Le diagnostic de LMMC sera confirmé par l'absence de transcrite BCR/ABL et par l'examen du myélogramme complété d'un caryotype, le décompte médullaire permettant également de classer la maladie en LMMC-1 ou LMMC-2 et d'exclure une acutisation en fonction du taux de blastes, le caryotype ajoutant une information pronostique et éliminant formellement une présentation inhabituelle de leucémie myéloïde chronique.

Concernant le rejet de la numération plaquettaire par l'automate en impédance, le décompte par une autre méthode, proposé par la plupart des automates de nos jours, permet en général de rendre un chiffre fiable, après vérification des passages des contrôles de qualité internes du jour. Le décompte sur sang prélevé en capillaire n'est pas

recommandé, cette méthode étant peu précise et liée à l'opérateur. Le décompte sur tube citraté n'est pas justifié en l'absence d'agrégats plaquettaires observés sur lame.

**figure 1** – éléments caractéristiques du frottis 13BF



## Résultats des participants

### 1 – Analyse des réponses

Le frottis 13BF a été analysé par 1313 laboratoires. Le bordereau-réponse permettait de rendre la formule sanguine, de donner 1 à 4 commentaires sur l'aspect des 3 lignées cellulaires et de formuler 1 ou 2 hypothèses diagnostiques, à choisir dans des listes pré-établies. Les différents types de réponses sont détaillés dans le tableau II.

**tableau II** – types de réponses

Formule	Commentaires	Hypothèses diagnostiques	Nombre de laboratoires
X	X	X	1280
X		X	22
X	X		7
X			3
	X	X	1
<b>Total</b>			<b>1313</b>

### 2 – Formule sanguine

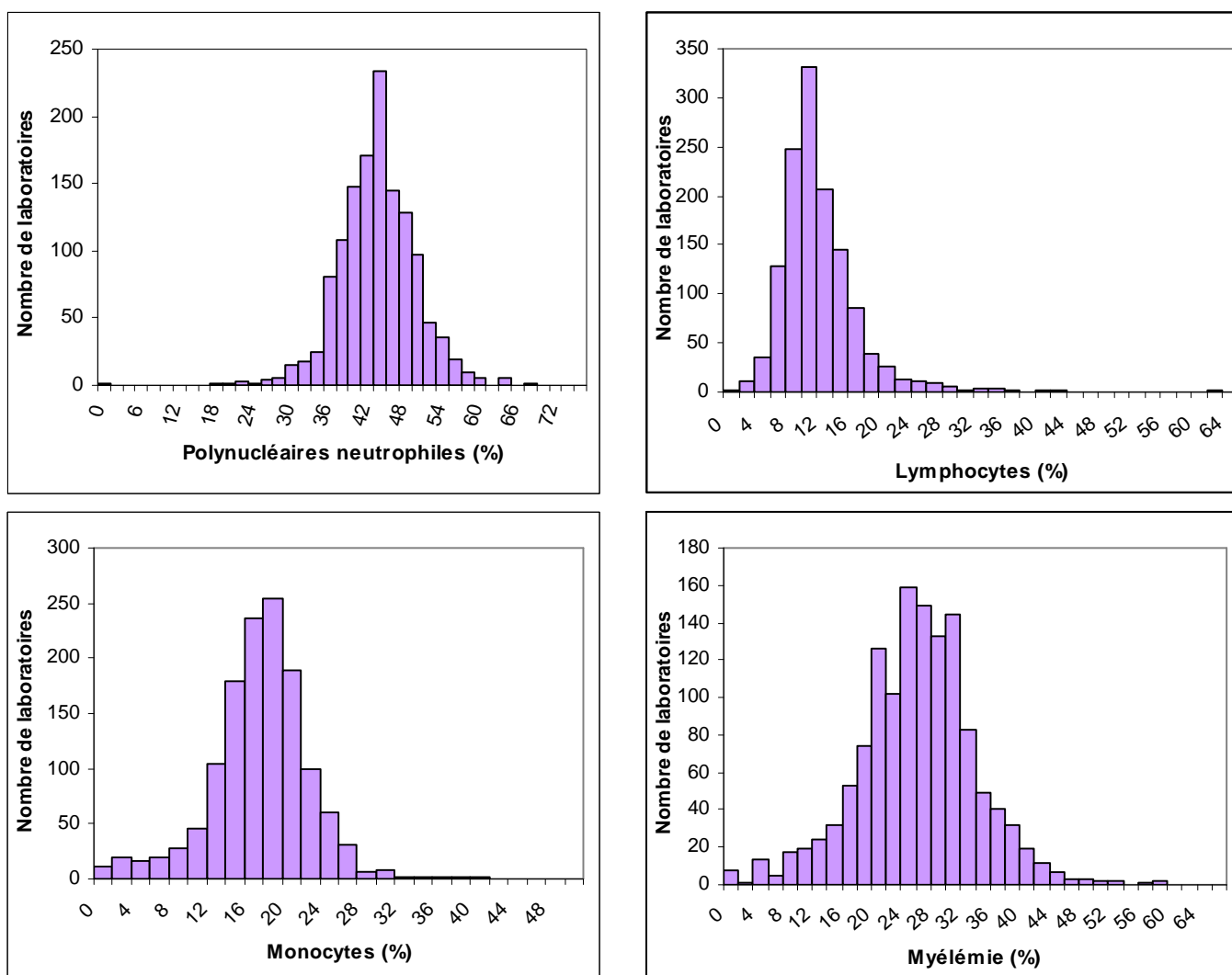
Les résultats des participants figurent dans le tableau III. Les histogrammes de distribution des résultats des participants pour les polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, myélémie, blastes, cellules lymphoïdes hyperbasophiles et cellules autres sont présentés sur la figure 2.

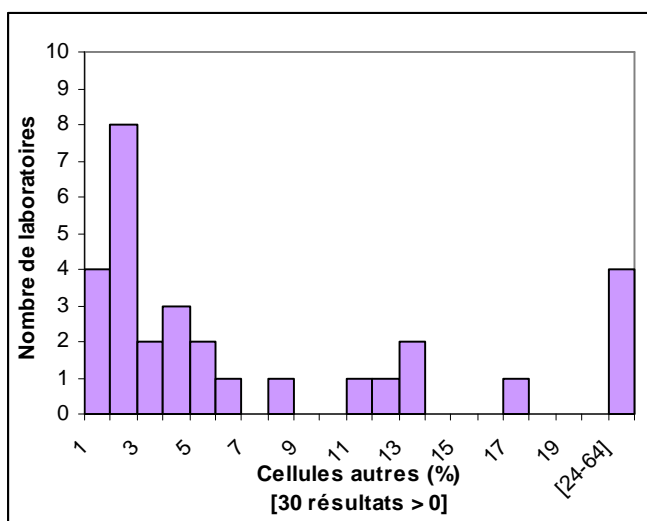
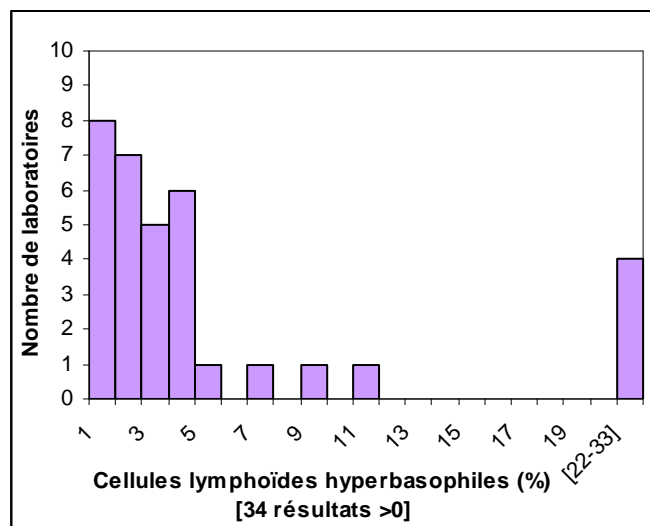
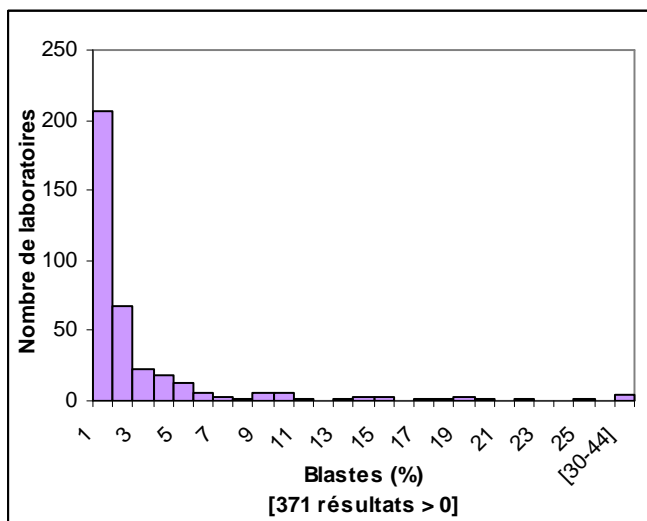
**tableau III** – résultats des participants

	n	Médiane (%)	Intervalle interquartile (%)
Polynucléaires neutrophiles	1300	44	40 – 48
Polynucléaires éosinophiles	1300	0	0 – 0
Polynucléaires basophiles	1300	0	0 – 0
Lymphocytes	1300	11	9 – 14
Monocytes	1300	17	15 – 20

Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	1300	0	0 – 0
Myélémie / précurseurs granuleux	1300	26	21 – 30
Blastes	1300	0	0 – 1
Autres	1300	0	0 – 0
Erythroblastes	627	0	0 – 1

**figure 2** : histogramme de distribution des polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes, myélémie, blastes, cellules lymphoïdes hyperbasophiles et cellules autres





### 3 – Commentaires descriptifs

Le bordereau réponse offrait la possibilité de faire quatre commentaires descriptifs sur les trois lignées cellulaires. Le nombre de laboratoires ayant fait au moins un commentaire est de 1288 ; leur répartition figure dans le tableau IV. Les tableaux V, VI et VII listent les commentaires cités par les laboratoires pour chacune des trois lignées cellulaires.

**tableau IV** - nombre de commentaires descriptifs du frottis 13BF

Nombre de commentaires	Nombre de laboratoires
1	151
2	311
3	327
4	499

**tableau V** - commentaires descriptifs du frottis 13BF : hématies

Commentaires : hématies	Nombre de laboratoires
Anisocytose	508 (38,7 %)
Poïkilocytose	117
Dacryocytes	92
Ponctuations basophiles	50
Anisochromasie	28
Erythroblastes circulants	28

Polychromatophilie	19
Hématies en rouleaux	19
Schizocytes	12
Hypochromie	11
Corps de Jolly	9
Double population	5
Hématies cibles	4
Ecchinocytes	4
Sphérocytes	3
Acanthocytes	2
Autres anomalies érythrocytaires	2
Macrocytose	1

**tableau VI** - commentaires descriptifs du frottis 13BF : plaquettes

<b>Commentaires : plaquettes</b>	<b>Nombre de laboratoires</b>
Macroplaquettes	703 (53,5 %)
Autres anomalies plaquettaires	38
Mégacaryocyte circulant	9
Agrégats plaquettaires	5

Commentaire attendu

**tableau VII** - commentaires descriptifs du frottis 13BF : leucocytes

<b>Commentaires : leucocytes</b>	<b>Nombre de laboratoires</b>
Myélémie/précurseurs granuleux (PML/ML/MML)	923 (70,3 %)
Neutrophiles hypogranuleux (grains peu visibles)	445 (33,9 %)
Neutrophiles hyposegmentés (anomalie type Pelger)*	213
Promonocytes ou monocytes immatures	176
Neutrophiles hypersegmentés (>10%)*	76
Cellules blastiques	71
Neutrophiles autres anomalies*	64
Grands lymphocytes granuleux (en excès)	24
Neutrophiles vacuolisés*	17
Ombres de Gümprécht	11
Neutrophiles hypergranuleux (granulations "toxiques")	10
Autres cellules lymphoïdes anormales	10
Corps apoptotiques	8
Neutrophiles corps de Döhle	7
Cellules lymphoïdes hyperbasophiles	7
Lymphocytes activés	6
Corps d'Auer	5
Cellules de Sézary	2
Agrégats de polynucléaires	1
Anomalies des basophiles	1
Prolymphocytes (nucléole unique évident)	1
Lymphocytes villeux	1
Lymphocytes binucléés	1
Cellules plasmocytaires normales ou anormales	1

Commentaire attendu

\* signes de dysplasie des neutrophiles participant à l'orientation diagnostique



#### 4 – Hypothèses diagnostiques

Les laboratoires pouvaient émettre 2 hypothèses diagnostiques dans un ordre décroissant de probabilité : 1303 laboratoires ont posé au moins un diagnostic. Le nombre de participants ayant rendu une seule hypothèse est de 336 et deux hypothèses de 967.

Le tableau VIII présente par ordre de fréquence l'ensemble des hypothèses diagnostiques émises ainsi que les hypothèses considérées comme les plus probables par les laboratoires. Les pourcentages indiqués entre parenthèses sont calculés par rapport au nombre total de laboratoires ayant participé à l'analyse du frottis soit 1313.

tableau VIII - hypothèses diagnostiques émises sur le frottis 13BF

Diagnostic	Ensemble des hypothèses diagnostiques	Hypothèse diagnostique la plus probable
Leucémie myélomonocytaire chronique	1026 (78,1 %)	894 (68,1 %)
Leucémie myéloïde chronique (phase chronique)	429	164
Syndrome myéloprolifératif (autre type)	311	60
Syndrome myélodysplasique	201	43
Leucémie myéloïde chronique (phase accélérée)	88	43
Myélémie	55	29
Splénomégalie myéloïde / myélofibrose primaire	40	21
Leucémie aiguë myéloïde	23	10
Monocytose	23	7
Leucémie aiguë monocytaire	17	6
Leucémie aiguë autre	11	2
Polynucléose	10	5
Leucémie aiguë promyélocytaire	5	5
Phase leucémique de lymphome (autre type)	4	1
Pathologie constitutionnelle (autre type)	4	2
Hémopathie lymphoïde chronique (autre type)	3	2
Leucémie lymphoïde chronique	2	2
Leucémie/lymphome de l'adulte (ATLL)	2	
Lymphome à grandes cellules	2	1
Syndrome mononucléosique	2	1
Thrombocytémie essentielle	2	1
Syndrome de May-Hegglin	2	
Leucémie prolymphocytaire	1	1
Leucémie à tricholeucocytes	1	
Myélome	1	1
Lymphocytose non spécifique	1	1
Lymphocytose à lymphocytes binucléés	1	
Leucémie aiguë lymphoblastique	1	
Microangiopathie thrombotique	1	1
Anomalies prédominantes des plaquettes	1	

Diagnostic attendu

Diagnostic acceptable

Diagnostic inapproprié

Diagnostic erroné : toutes les hypothèses diagnostiques différentes des hypothèses attendues, acceptables ou inappropriées sont considérées comme erronées.

Dans le cas où deux hypothèses diagnostiques ont été rendues, on a déterminé quelle était la meilleure pour chaque laboratoire. Le tableau IX montre le regroupement des meilleures hypothèses diagnostiques (une ou deux rendues).



**tableau IX** - Meilleure des hypothèses diagnostiques (attendue, acceptable ou inappropriée) rendues par laboratoire sur le frottis 13BF

Diagnostic	Meilleure des hypothèses diagnostiques rendues par laboratoire
Leucémie myéomonocytaire chronique	1026
Syndrome myéoprolifératif (autre type)	103
Leucémie myéloïde chronique (phase chronique ou accélérée)	116
Syndrome myélodysplasique ou Myélémie ou Monocytose ou Leucémie aiguë monocyttaire ou Polynucléose ou Lymphocytose non spécifique	39

## 5 – Questionnaire

A la suite de l'analyse du frottis 13BF figurait un questionnaire optionnel concernant la démarche qu'aurait suivie le biologiste confronté à un tel cas. Deux questions étaient posées et chacune comportait six propositions de réponses. Les biologistes pouvaient donner une ou plusieurs réponses.

– A la question A : « L'automate a rejeté la numération plaquettaire effectuée en impédance. Quelle est votre démarche analytique ? », 1273 laboratoires ont rendu au moins une réponse dont le détail figure dans le tableau X.

**tableau X** - réponses à la question A

« L'automate a rejeté la numération plaquettaire effectuée en impédance. Quelle est votre démarche analytique ? »		
	Nombre de laboratoires	%
1 - Vérifier les contrôles du jour (CQI) de votre automate	500	39,3%
2 - Rechercher des agrégats plaquettaires sur lame malgré l'absence de l'alarme correspondante	1012	<b>79,5%</b>
3 - Effectuer une mesure dans autre canal de l'automate (optique, anti-CD61, autre...)	721	<b>56,6%</b>
4 - Effectuer un décompte sur prélèvement capillaire au bout du doigt	118	9,3%
5 - Demander une numération sur tube citraté malgré l'absence d'agrégats observés sur lame	214	16,8%
6 - Estimer la vraisemblance du résultat au microscope sur le frottis sanguin coloré au MGG	929	<b>73,0%</b>

Les réponses des laboratoires ont été majoritairement en faveur de la recherche d'agrégats sur lame (réponse 2) et de l'estimation du nombre de plaquettes sur le frottis (réponse 6).

La réponse « Vérifier les contrôles du jour (CQI) de votre automate » (réponse 1) a pu déconcerter certains biologistes qui n'ont pas coché cet item, considérant que cette étape était réalisée systématiquement, quel que soit le résultat des plaquettes.

Le décompte par une autre méthode (réponse 3), proposé par la plupart des automates de nos jours, permet en général de rendre un chiffre fiable. Le décompte sur sang prélevé en capillaire (réponse 4) n'est pas recommandé, cette méthode étant peu précise et liée à l'opérateur. Le décompte sur tube citraté (réponse 5) n'est pas justifié en l'absence d'agrégats plaquettaires observés sur lame. L'estimation de la vraisemblance du résultat sur le frottis reste indispensable (réponse 6).

1160 laboratoires (soit 91,1 %) ont rendu au moins l'une des deux réponses « mesure dans autre canal de l'automate » (réponse 3) ou « estimation de la vraisemblance du résultat sur le frottis » (réponse 6) afin de rendre le résultat de la numération plaquettaire.

– La question B « Parmi les examens complémentaires suivants, lesquels proposeriez-vous au prescripteur à titre de conseil ? », reliée à l'hypothèse diagnostique formulée sur le frottis 13BF, a suscité une ou plusieurs réponses de 1270 laboratoires (tableau XI).

**tableau XI** - réponses à la question B

« Parmi les examens complémentaires suivants, lesquels proposeriez-vous au prescripteur à titre de conseil ? »		
	Nombre de laboratoires	%
1 - Aucun	2	0,2 %
2 - Recherche du transcrit BCR / ABL	889	<b>70,0 %</b>
3 - Recherche de la mutation JAK2	322	25,4 %
4 - Myélogramme + caryotype	1203	<b>94,7 %</b>
5 - Surveillance mensuelle	298	23,5 %
6 - Dosage de la CRP	368	29,0 %

Une proportion élevée des laboratoires (94,7 %) aurait proposé de faire un myélogramme et un caryotype et près des trois-quarts (70 %) la recherche du transcrit BCR/ABL. L'association des deux réponses « Myélogramme + caryotype » et « Recherche du transcrit BCR / ABL » a été rendue par 856 laboratoires, soit 67,4 %. La réponse « recherche de la mutation JAK2 » a été cochée par 25 % des laboratoires et « dosage de la CRP » par près d'un tiers des laboratoires.

Le diagnostic de LMMC sera confirmé par l'absence de transcrit BCR/ABL et par l'examen du myélogramme complété d'un caryotype. Le décompte médullaire permet également de classer la maladie en LMMC-1 ou LMMC-2 et d'exclure une acutisation en fonction du taux de blastes ; le caryotype ajoute une information pronostique et élimine formellement une présentation inhabituelle de leucémie myéloïde chronique.

## 6 – Bilan des réponses au frottis

Le frottis 13BF comportait une monocytose (monocytes = 18 %) et une myélémie (précurseurs granuleux = 26 %) dans le cadre d'une hyperleucocytose à 55,15 G/L.

Le commentaire « Myélémie/précurseurs granuleux » a été rendu par 923 laboratoires qui ont compté au moins 4 % de « myélémie » dans la formule. On notait la présence de polynucléaires neutrophiles hypogranuleux et de macroplaquettes, cités respectivement par un tiers et la moitié des laboratoires.

Quelques laboratoires ayant rendu un pourcentage de cellules « autres » ou de blastes a précisé qu'il s'agissait de promonocytes ; le commentaire « promonocytes ou monocytes immatures » a été rendu par 176 laboratoires.

L'hypothèse diagnostique attendue (Leucémie myélomonocytaire chronique) a été rendue par 78,1 % des laboratoires. En intégrant la réponse acceptable « Syndrome myéloprolifératif (autre type) », on peut considérer que 86,0 % des laboratoires ont donné une réponse satisfaisante quant au diagnostic.

Une dizaine de laboratoires a ajouté le diagnostic complémentaire de polychondrite atrophiante.

Aucun laboratoire n'a signalé de défaut de qualité du frottis (défaut de coloration ou d'étalement).

A titre de comparaison, un frottis de LMMC avait été envoyé en 1997 et comportait 30 % de monocytes, 39 % de lymphocytes et l'absence de myélémie. Hormis le fait que le nombre de laboratoires participants (2982) était plus du double de celui de 2013, les hypothèses diagnostiques les plus probables rendues étaient monocytose (39 %) et LMMC (20 %). En 2013, 68 % des laboratoires ont émis LMMC comme hypothèse diagnostique la plus probable, démontrant une amélioration considérable de l'orientation diagnostique, le diagnostic monocytose n'étant rendu comme le plus probable que par 0,5 % des laboratoires.

## 7 – Score

Les résultats des frottis sanguins ont été évalués sur la base d'un score prenant en compte pour chaque laboratoire l'association de résultats de la formule sanguine, des commentaires sur le frottis et des hypothèses diagnostiques rendus. Dans le cas du frottis 13BF, ont été pris en compte le pourcentage de monocytes, de myélémie, de blastes et de cellules lymphoïdes hyperbasophiles, les commentaires et les hypothèses diagnostiques.

Les critères positifs étaient un compte de monocytes > 7 % et de myélémie > 7 % et les critères négatifs : blastes > 5 % et cellules lymphoïdes hyperbasophiles > 4 %. Les commentaires pris en compte dans le score étaient :

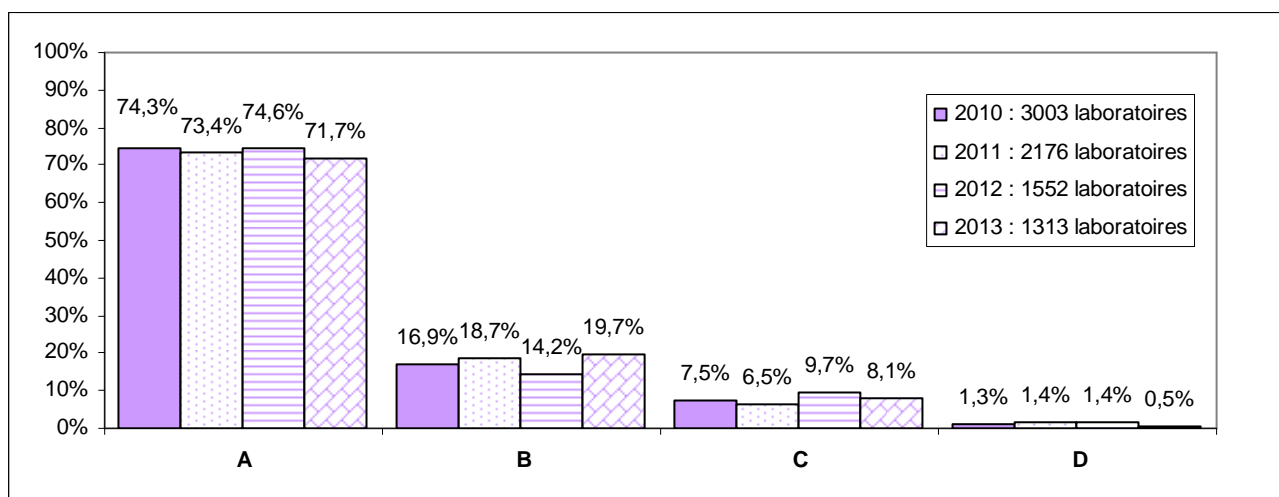
myélémie / précurseurs granuleux (PML/ML/MML), macroplaquettes, neutrophiles hypogranuleux. Enfin, était retenu le meilleur des deux diagnostics rendus : Leucémie myélomonocytaire chronique (coté 5), Syndrome myéloprolifératif (autre type) (coté 3) ; les diagnostics inappropriés : Leucémie myéloïde chronique (phase chronique) et Leucémie myéloïde chronique (phase accélérée) (cotés 2), Syndrome myélodysplasique, Myélémie, Monocytose, Leucémie aiguë monocytaire, Polynucléose et Lymphocytose non spécifique étaient cotés 1, alors que les autres diagnostics, erronés, étaient cotés -1.

La classification OMS de 2008 classe la leucémie myélomonocytaire parmi les syndromes frontières myélodysplasiques/myéloprolifératifs. Dans le cas présenté, la présence d'une monocytose importante de l'ordre de 10 G/L incitait à privilégier la réponse « syndrome myéloprolifératif » plutôt que « syndrome myélodysplasique ».

De même, l'hypothèse de leucémie myéloïde chronique, pouvait être évoquée dans un contexte de présentation inhabituelle, mais ne pouvait être considérée comme hypothèse diagnostique la plus probable.

L'application de ce score a permis d'évaluer les réponses des laboratoires en A (Bonne réponse), B (Réponse acceptable), C (Réponse à contrôler) et D (Réponse erronée). Une évaluation A a été obtenue par 71,7 % des laboratoires, une évaluation B par 19,7 %, soit 91,4 % pour l'ensemble A + B. La figure 3 montre que la répartition des scores en pourcentages est relativement stable entre 2010 et 2013.

**figure 3** : répartition des scores - années 2010 à 2013



## Commentaires

Il existe classiquement deux modes de présentation de la leucémie myélomonocytaire chronique : une forme proliférative telle que présentée ici et une forme dysplasique non hyperleucocytaire, les deux ayant en commun une monocytose chronique > 1 G/L et des signes plus ou moins prononcés de dysplasie sur les trois lignées myéloïdes. On sait désormais que cette présentation hétérogène correspond à une importante hétérogénéité moléculaire, les mutations observées touchant schématiquement des gènes induisant des modifications épigénétiques (TET2, ASXL1, IDH1/2, CBL...) et/ou des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (RAS, JAK2...).

En pratique quotidienne, les monocytoses observées sont réactionnelles, associées à un syndrome inflammatoire, la LMMC étant l'exception. Pour le biologiste confronté au flux de numérations-formules sanguines à valider dans son laboratoire, les signaux d'alerte qui doivent mener à l'examen minutieux du frottis sanguin sont donc l'absence de syndrome inflammatoire biologique, le caractère chronique (> 3 mois) de la monocytose, ou bien des éléments faisant suspecter myélodysplasie, anémie macrocytaire non carencielle ou thrombopénie chronique.

## Bibliographie

WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon : IARC Press, 2008.

Fain O., Fenaux P. Maladies systémiques et manifestations auto-immunes au cours des hémopathies myéloïdes. *Hématologie*, 2007, 1, 36-42.

## Echantillons 13BH et 13BJ

# Dosage des hémoglobines A2 et F

### Définition des échantillons

Les échantillons provenaient de sang frais natif d'un sujet non porteur d'anomalie de l'hémoglobine (13BH) et d'un sujet alpha-thalassémique (13BJ).

Les résultats des biologistes référents : J. Bardakdjian-Michau, Créteil – C. Badens, Marseille - R. Couque, Paris – P. Maboudou, Lille – sont présentés dans le tableau XII.

tableau XII – résultats des référents

Réactif	13BH		13BJ	
	HbA2 (%)	HbF (%)	HbA2 (%)	HbF (%)
BIORAD Variant II beta thal Dual programm	2,2	0,6	0,5	0,5
BIORAD Variant II beta thal Dual programm	2,2	<1	0,5	<1
BIORAD Variant II beta thal Dual programm	2,4	0,6	0,7	ND (1)
BIORAD Variant béta thalassemia short programm	2,4	<0,8	1,3	<0,8
SEBIA Kit Capillarys Hémoglobine	2,5	0	1	0 (2)
TOSOH G8	2,3		0,5	

(1) non déterminable – la présence d'HbH donne un taux d'HbF faussement augmenté (8,1 %) (HbH = 6,3 %).

(2) HbH = 10 %

### Résultats des participants

Sur l'ensemble HbA2 et /ou HbF, 171 laboratoires ont fourni une réponse. Comparé à l'année 2004 avec 309 laboratoires, cela correspond en 10 ans à une baisse de près de la moitié des laboratoires effectuant le dosage des hémoglobines A2 et F.

La date de l'analyse des échantillons a été recueillie : 53 % des dosages ont été effectués au cours des 5 jours suivant l'envoi des échantillons, 85 % dans les 9 jours et 6 % des laboratoires n'ont pas précisé la date.

#### 1 – Réactifs

Les réactifs et techniques utilisés par les participants sont présentés dans le tableau XIII.

tableau XIII – réactifs utilisés pour le dosage de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F

Réactifs	HbA2	HbF
<b>Electrophorèse en gel</b>	19 (11,1 %)	17 (10,2 %)
ELITECH / HELENA SAS-1 Hb alcaline	1	1
SEBIA Hydragel (7/15) Hb	17	15
SEBIA Hydragel Hémoglobine K20	1	1
<b>Electrophorèse capillaire</b>	95 (55,6 %)	94 (56,3 %)
SEBIA Kit Capillarys Hémoglobine	73	72
SEBIA Kit Minicap Hémoglobine	22	22
<b>Chromatographie Liquide Haute Performance</b>	54 (32,2 %)	55 (32,9 %)
BIORAD Variant béta thalassemia short programm	2	2

BIORAD Variant II beta thal Dual programm	25	24
BIORAD Variant II beta thal short programm	1	1
BIORAD D-10 HbA2/HbF/HbA1c Dual kit programm	20	19
ELITECH Adams A1c HA-8180V		1
TOSOH BIOSCIENCES HLC 723 G7	4	5
TOSOH BIOSCIENCES HLC 723 G8	3	3
<b>Résistance à la dénaturation alcaline</b>		1 (0,6 %)
Technique de Betke		1
Autre ou non précisé	2	
<i>Total</i>	<i>171</i>	<i>167</i>

## 2 – Résultats de l'hémoglobine A2

Les résultats des participants pour l'échantillon 13BH sont présentés dans le tableau XIV.

Les résultats de l'échantillon 13BJ, proches de la limite inférieure de linéarité des techniques, sont présentés dans le tableau XV.

**tableau XIV** – résultats du dosage de l'hémoglobine A2 - échantillon 13BH

Réactif HbA2	13BH			
	n	mTr (%)	sTr (%)	CVTr (%)
<b>Ensemble des résultats</b>	162	2,50	0,16	6,5
<b>Electrophorèse en gel</b>				
SEBIA Hydragel (7/15) Hb	17	2,69	0,60	22,1
<b>Electrophorèse capillaire</b>				
SEBIA Kit Capillarys Hémoglobine	68	2,49	0,08	3,0
SEBIA Kit Minicap Hémoglobine	22	2,55	0,10	4,0
<b>Chromatographie Liquide Haute Performance</b>				
BIORAD D-10 HbA2/HbF/HbA1c Dual kit programm	20	2,58	0,19	7,4
BIORAD Variant II beta thal Dual programm	25	2,40	0,11	4,7

**tableau XV** – résultats du dosage de l'hémoglobine A2 - échantillon 13BJ

Réactif HbA2	13BJ								
	n	mTr (%)	sTr (%)	CVTr (%)	Med (%)	P25 (%)	P75 (%)	Etnp (%)	CVnp (%)
<b>Ensemble des résultats</b>	153	0,87	0,19	21,3	0,90	0,8	1	0,15	16,5
<b>Electrophorèse en gel</b>									
SEBIA Hydragel (7/15) Hb	16	1,23	0,57	46,5	1,00	0,9	1,6	0,52	51,9
<b>Electrophorèse capillaire</b>									
SEBIA Kit Capillarys Hémoglobine	67	0,95	0,07	7,4	0,90	0,9	1	0,07	8,2
SEBIA Kit Minicap Hémoglobine	21	0,93	0,07	7,9	0,90	0,9	1	0,07	8,2
<b>Chromatographie Liquide Haute Performance</b>									
BIORAD D-10 HbA2/HbF/HbA1c Dual kit programm (1)	14	0,84	0,13	15,2	0,90	0,8	0,9	0,07	8,2
BIORAD Variant II beta thal Dual programm (2)	24	0,64	0,13	20,9	0,70	0,5	0,8	0,22	31,8

(1) De plus ont été rendus 1 résultat : « <1 » et 2 résultats : « <1,5 »

(2) 1 résultat : « <1,2 »

Pour l'échantillon 13BH, le taux d'HbA2 (moyenne = 2,50 %) correspond à un taux « normal » (valeurs normales ~ 2,0 à 3,4 %). Les résultats intra-techniques sont peu dispersés en HPLC (CV < 8 %) et en électrophorèse capillaire (CV < 5 %), alors qu'avec l'électrophorèse en gel le CV est de 22 %.

Pour l'échantillon 13BJ, dont le taux est plus faible (médiane = 0,9 %), les résultats sont plus dispersés et les résultats statistiques sont donnés à titre indicatif. Les deux automates d'électrophorèse capillaire ont des CV < 8 %, pour l'HPLC, les CV sont compris entre 15 et 21 % et pour l'électrophorèse en gel le CV est de 46 %.

Pour l'opération 13HEM2, la limite acceptable (LA) appliquée à l'échantillon 13BH est de 10 %.

### 3 – Résultats de l'hémoglobine F

#### 3 – 1 - Résultats HbF - échantillon 13BH

Le taux faible d'HbF dans l'échantillon 13BH a été rendu sous forme quantitative de 0 à 2 % et sous forme semi-quantitative (ex : <0,1 % ; <1 %).

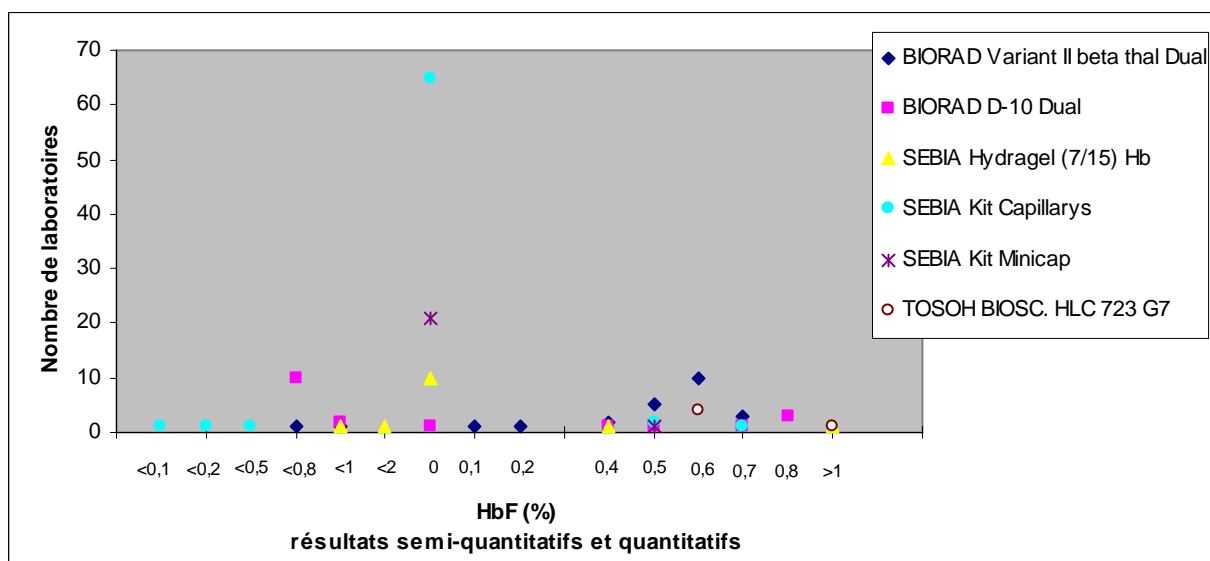
Parmi les 166 résultats quantitatifs et semi-quantitatifs, 162 soit 98 % sont inférieurs à 1 %.

Les résultats des participants sont présentés dans le tableau XVI et la figure 4 pour les réactifs dont l'effectif est d'au moins 5.

tableau XVI – résultats du dosage de l'hémoglobine F - échantillon 13BH

	HbF (%) - échantillon 13BH																total
	Résultats semi-quantitatifs						Résultats quantitatifs										
	<0,1	<0,2	<0,5	<0,8	<1	<2	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	>1	
<b>Electrophorèse en gel</b>																	
SEBIA Hydragel (7/15) Hb					1	1	10				1					1	14
<b>Electrophorèse capillaire</b>																	
SEBIA Kit Capillarys Hémoglobine	1	1	1				65				2			1		1	72
SEBIA Kit Minicap Hémoglobine							21				1						22
<b>Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)</b>																	
BIORAD Variant II beta thal Dual programm				1	1			1	1		2	5	10	3			24
BIORAD D-10 HbA2/HbF/HbA1c Dual kit pr.				10	2		1			1	1		1	3			19
TOSOH BIOSCIENCES HLC 723 G7												4				1	5

figure 4 – résultats du dosage de l'hémoglobine F - échantillon 13BH (graphique)



### 3 – 2 - Résultats HbF - échantillon 13BJ

Le taux d'HbF dans l'échantillon 13BJ a été rendu sous forme quantitative de 0 à 8,5 % et sous forme semi-quantitative (ex : <0,1 % ; <1 %).

Parmi les 164 résultats quantitatifs et semi-quantitatifs, 130 soit 79 % sont inférieurs à 1 %.

Certains résultats, en particulier avec l'HPLC, sont compris entre 5 et 8,3 %. Pour le BIORAD Variant II beta thal Dual programm (effectif de 22 laboratoires), on a : moyenne : 6,97 % ; CV : 12,4 % ; médiane : 6,90 %.

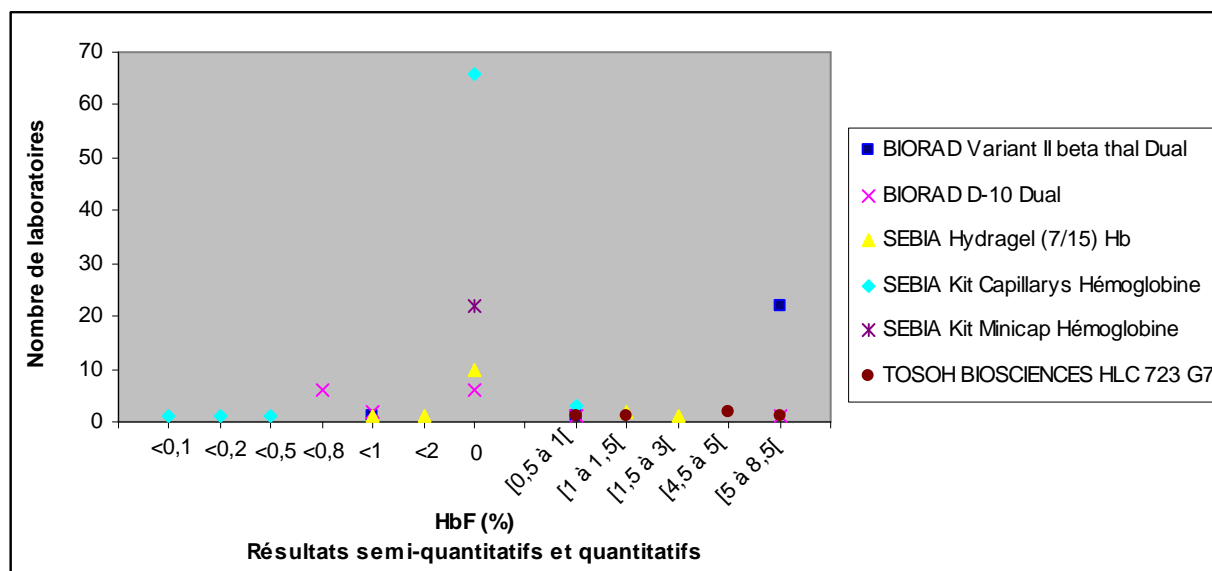
Les résultats des participants sont présentés dans le tableau XVII et la figure 5 pour les réactifs dont l'effectif est d'au moins 5.

tableau XVII – résultats du dosage de l'hémoglobine F - échantillon 13BJ

	HbF (%) - échantillon 13BJ														total
	Résultats semi-quantitatifs						Résultats quantitatifs								
	<0,1	<0,2	<0,5	<0,8	<1	<2	0	0,3	[0,5 à 1[	[1 à 1,5[	[1,5 à 3[	[4,5 à 5[	[5 à 8,5[		
<b>Electrophorèse en gel</b>															
SEBIA Hydragel (7/15) Hb					1	1	10			2	1				15
<b>Electrophorèse capillaire</b>															
SEBIA Kit Capillarys Hb	1	1	1				66		3						72
SEBIA Kit Minicap Hb							22								22
<b>Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)</b>															
BIORAD Variant II beta thal Dual programm					1				1					22 (1)	24
BIORAD D-10 HbA2/HbF/HbA1c Dual kit pr.				6	2		6		1					1	16
TOSOH BIOSC. HLC 723 G7									1	1		2	1		5

(1) BIORAD Variant II beta thal Dual programm - mtr : 6,97 % ; ETr : 0,86 % ; CV : 12,4 %

figure 5 – résultats du dosage de l'hémoglobine F - échantillon 13BJ (graphique)



Les résultats d'HbF des deux échantillons (13BH et 13BJ) sont des valeurs basses, proches de la limite de détection, le rendu de résultats étant soit quantitatif (valeurs de 0 à 0,8 %) soit semi-quantitatif (<0,1, <0,8...).

Le taux d'HbF dans l'échantillon 13BJ était inférieur à 1 %, correspondant à un taux « normal ». Cependant, avec certaines techniques d'HPLC, le taux d'HbF a été rendu faussement élevé (moyenne : 6,9 %) en raison de la présence d'hémoglobine H (HbH) dans l'échantillon 13BJ, l'une des fractions de l'HbH pouvant être éluée au niveau de l'HbF.

En effet, pour l'échantillon 13BJ, la quasi-totalité des utilisateurs du BIORAD Variant II beta thal Dual programm a rendu des résultats compris entre 5 et 8,3 % (moyenne : 6,97 % - CV : 12 %). De même, la plupart des résultats des



automates TOSOH sont compris entre 1,2 et 7,9 %. En revanche, les utilisateurs des autres systèmes (électrophorèse capillaire, électrophorèse en gel, Biorad D10) ont rendu des taux d'HbF très faibles comme attendu. L'HbH peut se présenter sous les formes de trimères  $\beta_3$  ou de tétramères  $\beta_4$  qui éluent en HPLC à un temps de rétention très proche de celui de l'HbF, notamment la forme  $\beta_3$ . De plus, l'HbH est très instable et pouvait ne pas être détectée.

Dans le cas de cette opération de CNQ, il n'était proposé de réaliser qu'une seule technique pour la détermination de l'HbA2 et de l'HbF mais la mise en évidence de cette interférence conforte la recommandation de pratiquer au moins deux techniques pour toute étude de l'hémoglobine (cf recommandations SFBC 2003 et NABM n°1120) dans le cadre d'une recherche chez un patient.

De plus, le taux d'HbA2 anormalement bas aurait conduit à suspecter une hémoglobinoase H, rencontrée dans l'une des formes d'alpha-thalassémie, à laquelle est associée une anémie microcytaire.

## Commentaires

Alors qu'en 2010, les techniques se répartissaient en 3 groupes équivalents en nombre d'utilisateurs (électrophorèse en gel, chromatographie liquide haute performance (HPLC) et électrophorèse capillaire), en 2013 la technique utilisée de façon prépondérante par plus de la moitié des laboratoires est l'électrophorèse capillaire. L'HPLC représente un tiers des laboratoires et l'électrophorèse en gel poursuit sa décroissance avec seulement 11 % d'utilisateurs (figures 6 et 7).

Dix ans après les recommandations SFBC de 2003, on constate la disparition de la chromatographie sur microcolonne et de la technique de Betke. La régression de l'utilisation de l'électrophorèse en gel est en accord avec ces recommandations. L'utilisation de l'HPLC a progressé mais l'électrophorèse capillaire s'est largement implantée depuis sa récente apparition.

figure 6 – évolution de l'utilisation des techniques de dosage de l'hémoglobine A2

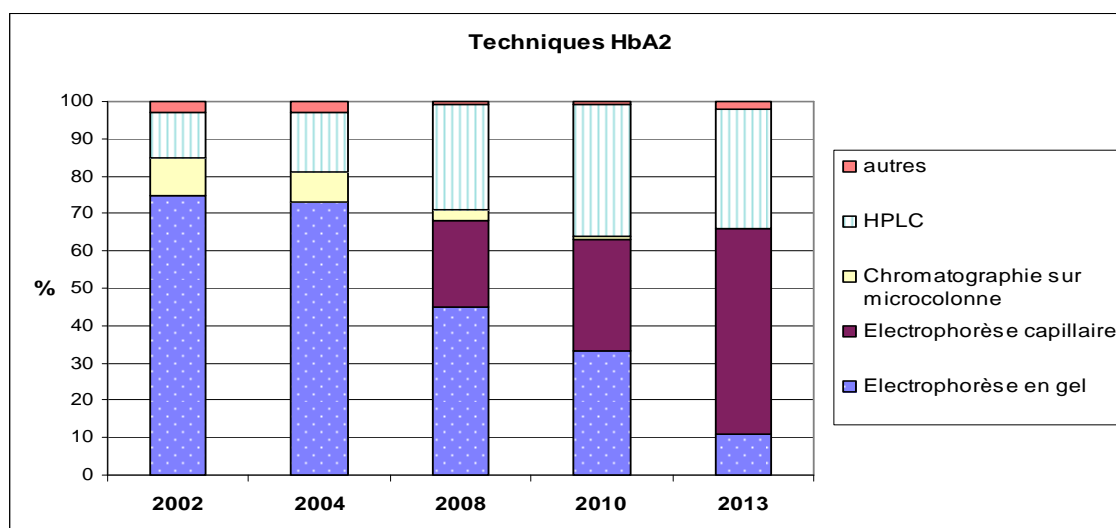
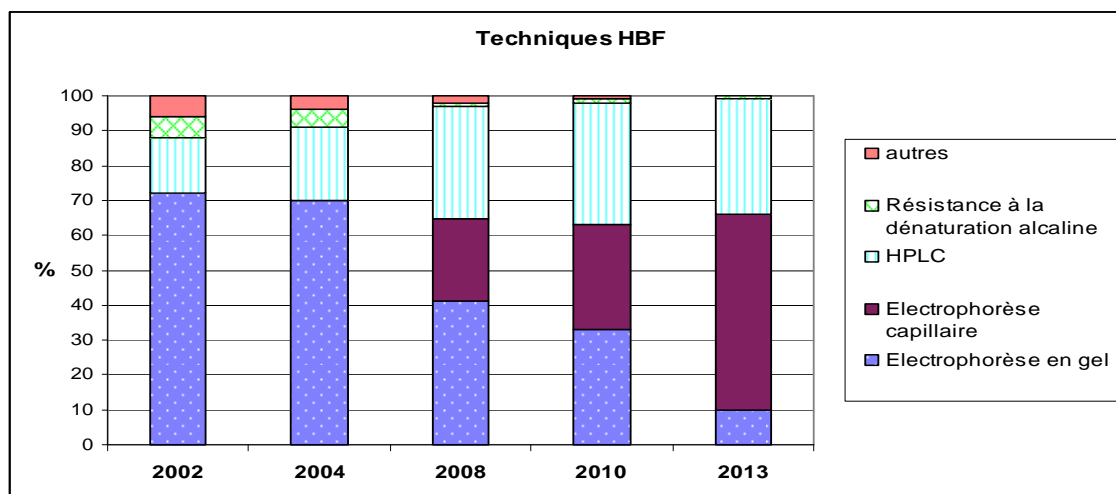


figure 7 – évolution de l'utilisation des techniques de dosage de l'hémoglobine F



Depuis 2004, quatre opérations portant sur le dosage de l'HbA2 ont été organisées sur des échantillons présentant des valeurs normales (2004, 2008-BH et 2013) : 2,5 à 2,75 %, ou des valeurs élevées (2008-BJ et 2010) : 5,13 à 5,61 % (tableau XVIII et figure 8).

Le second échantillon de 2013 (13BJ), dont le taux faible (0,9 %) est proche des limites de quantification des techniques, n'a pas été pris en compte.

Le CV toutes techniques a diminué de plus de la moitié (16,3 % à 6,5 %) entre 2004 et 2013, montrant une réduction de la dispersion globale des résultats.

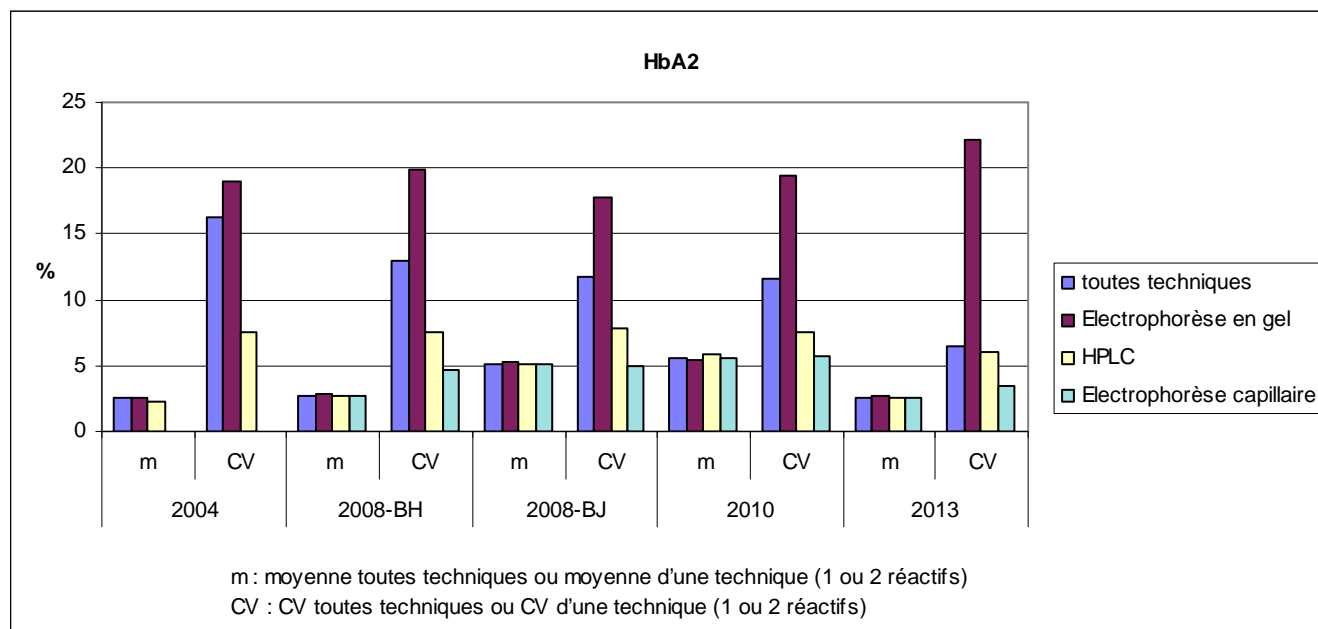
Les techniques d'HPLC et d'électrophorèse capillaire montrent des CV inférieurs à 10%, voire inférieurs à 5 %, et plutôt en amélioration. En revanche, les techniques d'électrophorèse en gel présentent, de façon stable, des CV proches de 20 %. De ce fait, pour des valeurs d'HbA2 à la limite supérieure de la normale (~ 3 %), les laboratoires utilisant cette technique peuvent rendre un résultat d'HbA2 surestimé et orienter à tort vers la présence d'une bêta-thalassémie, s'ils ne disposent pas du résultat du VGM. Cependant l'utilisation de l'électrophorèse en gel a diminué et n'est plus utilisée que par 11 % des laboratoires. La qualité de la quantification de l'HbA2 a donc progressé depuis la publication en 2003 des recommandations SFBC dans le domaine des diagnostics des hémoglobinopathies qui précisaient « Les techniques de quantification des fractions HbA2 et HbF par densitométrie des bandes d'électrophorèse sont à proscrire ».

**tableau XVIII** – résultats du dosage de l'hémoglobine A2 de 2004 à 2013

	HbA2 échantillon	Toutes techniques			Electrophorèse en gel		HPLC		Electrophorèse capillaire	
		effectif	m (%)	CV (%)	m (%) (1)	CV (%) (1)	m (%) (1)	CV (%) (1)	m (%) (1)	CV (%) (1)
2004	04CH	305	2,51	16,3	2,36 - 2,68	16,7 - 21,3	2,05 - 2,44	5,6 - 9,4	–	–
2008	08BH	257	2,75	12,9	2,78 - 3,05	17,6 - 22,3	2,55 - 2,90	5,8 - 9,4	2,65	4,7
2008	08BJ	252	5,13	11,8	5,04 - 5,38	16,3 - 19,1	5,09 - 5,27	7,8 - 7,9	5,12	4,9
2010	10BH	190	5,61	11,6	5,39 - 5,35	15,0 - 23,9	5,78 - 5,91	6,0 - 9,1	5,55 - 5,72	5,5 - 5,9
2013	13BH	162	2,50	6,5	2,69	22,1	2,40 - 2,58	4,7 - 7,4	2,49 - 2,55	3,0 - 4,0

(1) m et CV : moyennes d'HbA2 et CV pour les deux réactifs de chaque technique

**figure 8** – évolution des résultats du dosage de l'hémoglobine A2



## Bibliographie

- Groupe de travail SFBC « recommandations dans le domaine des diagnostics des hémoglobinopathies » : J. Bardakdjian-Michau, J.L. Dhondt, R. Ducrocq, F. Galactéros, A. Guyard, F.X. Huchet, A. Lahary, D. Lena-Russo, P.

Maboudou, M.L. North, C. Prehu, A.M. Soummer, M. Verschelde, H. Wajcman. « Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine ». Annales de Biologie Clinique, juillet-août 2003, vol. 61, n° 4, p401-409.

- Couque N., de Montalembert M. Diagnostic d'une hémoglobinopathie. Feuilles de biologie, mars 2013, vol. 311, p5-18.

## Conclusion

L'opération 13HEM2 qui comportait 3 échantillons a rassemblé au total 1408 participants.

Les résultats du frottis 13BF montrent que l'hypothèse diagnostique attendue a été rendue par 78,1 % des 1313 laboratoires participants sur ce cas de leucémie myélomonocytaire chronique. Le frottis sanguin, comportait une monocytose (monocytes : 18 %) et une myélémie (précurseurs granuleux : 26 %), ainsi que la présence polynucléaires neutrophiles hypogranuleux et de macroplaquettes. L'évaluation des laboratoires, prenant en compte notamment ces critères, a montré 71,7 % de « bonne réponse » (évaluation A) et 19,7 % de « réponse acceptable » (évaluation B).

Lors de l'envoi d'un frottis de leucémie myélomonocytaire chronique en 1997, 20 % des laboratoires avaient rendu leucémie myélomonocytaire chronique comme hypothèse diagnostique la plus probable ; en 2013, 68 % des laboratoires donnent cette réponse.

L'échantillon 13BH présentait des résultats « normaux », HbA2 : 2,50 % et HbF < 1 % et l'échantillon 13BJ montrait une valeur d'HbA2 basse < 1 % et d'HbF < 1 %. Avec certaines techniques d'HPLC, le taux d'HbF a été rendu faussement élevé (~ 7 %) en raison de la présence d'hémoglobine H dans l'échantillon 13BJ, l'une des fractions de l'hémoglobine H pouvant être éluée au niveau de l'HbF. La mise en évidence de cette interférence conforte la recommandation de pratiquer au moins deux techniques pour toute étude de l'hémoglobine (cf recommandations SFBC 2003 et NABM) dans le cadre d'une recherche chez un patient.

Depuis 2003, la dispersion globale des résultats d'HbA2 a diminué, le CV passant de 16,3 % à 6,5 %. Les résultats intra-techniques sont peu dispersés en HPLC (CV < 8 %) et en électrophorèse capillaire (CV < 5 %), alors qu'avec l'électrophorèse en gel le CV est de 22 %.

Les techniques maintenant utilisées majoritairement sont l'électrophorèse capillaire et l'HPLC.