Le myélogramme
Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire GFHC

PRÉAMBULE

Le myélogramme reste un examen aux modalités de réalisation hétérogènes. Il peut être appréhendé en période de garde ou dans les laboratoires moins spécialisés ; il est parfois plus banalisé dans les laboratoires universitaires surchargés par les envois protocolaires. L'hétérogénéité des pratiques est vaste, du prélèvement médullaire à la rédaction du compte-rendu, avec des modalités presque uniques à chaque centre. Caricature ? La discussion entre collègues montre la grande variabilité des pratiques, mais également le besoin de textes d'harmonisation, de référentiels et de standards en particulier pour l'accréditation des laboratoires.

Le Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC), émanation de la Société Française d'Hématologie et organisme de référence pour tout ce qui traite de la morphologie, a décidé d'écouter l'ensemble des biologistes concernés puis de rédiger un « guide de bonne exécution ». Le but était de proposer des recommandations pour l'harmonisation des pratiques. Le travail a été coordonné par Jean-François Lesesve (Nancy) entre 2015 et 2018. Voici le résultat des réflexions des participants aux groupes de travaux. Espérons que ces documents combleront l'attente des biologistes impliqués dans la lecture du myélogramme !

Résultats de l'enquête des pratiques du myélogramme effectuée en 2015 par le GFHC

J.- F. LESESVE[1], R. GENEWE[1], B. CHATELAIN[2], POUR LE GFHC

I. - INTRODUCTION

Le myélogramme est l'examen de la moelle osseuse, au microscope optique, permettant d'apprécier la qualité de la production hématopoïétique, d'identifier les troubles de répartition des différentes lignées cellulaires et de détecter la présence de cellules anormales (anomalies quantitatives et qualitatives). Son objectif essentiel est de proposer au prescripteur une orientation diagnostique, plus qu'un décompte détaillé. Fondé sur l'analyse morphologique des cellules et l'expérience de l'observateur, il est parfois considéré plus comme un art qu'une science, avec de multiples modalités de réalisation et d'interprétation (1). Sa réalisation n'est pas si aisée (myélogramme de « qualité insuffisante » car mal prélevé, étalements défectueux insatisfaisants…) et son interprétation peut rester difficile même pour un laboratoire « expert ». Il nécessite une formation qualifiante puis un maintien des compétences.

Le GFHC, organisme de référence pour toute question de morphologie, a souhaité recenser les pratiques de ses membres, avec l'objectif de proposer à terme des recommandations pour la réalisation de cet examen hématologique. Nous rapportons ici les résultats d'une enquête reposant sur le volontariat, effectuée durant le mois d'octobre 2015. Les réponses de 74 laboratoires (103 participants) ont été analysées.

A) Données générales

Le questionnaire a été envoyé par diffusion générale à tous les membres du GFHC (environ 250 membres répartis en France, en Belgique et dans les pays du Maghreb). Les laboratoires « volontaires » ayant participé à l'enquête (n = 74) font partie de Centres Hospitaliers et Universitaires (CHU) (42), de Centres Hospitaliers (CH) (30) et de sociétés d'exercice libéral (2). Trente-deux laboratoires sont spécialisés en hématologie cellulaire, 17 en hématologie biologique et 25 sont polyvalents. Pour information, des items n'ont pas toujours été renseignés et le nombre de réponses n'atteint pas systématiquement 74.

L'activité annuelle recensée (Figure 1) varie de 50 jusqu'à environ 8 000 myélogrammes (moyenne 1 173 +/- 1 244), soit un total de 84 429 analyses pour les 74 laboratoires. La très grande majorité des participants interprète des frottis réalisés après aspiration médullaire puis étalement sur une lame de verre, la lecture de « grumeaux » écrasés ou d'empreintes de biopsie ostéo-médullaire (BOM) étant beaucoup plus rare (Tableau I). L'estimation totale des BOM réalisées est d'environ 2 300, 75 % étant effectuées en CHU. Le nombre de frottis reçus est généralement compris entre 4 et 12, avec une médiane de 8.

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) est utilisée par 72 centres, standardisée dans la limite de spécificités propres à chacun d'eux (pH, nature des réactifs, temps de coloration). Un laboratoire recourt à la coloration de Wright modifiée ; un autre pratique en supplément une coloration par aérospray (éosine/thiazine, Elitech®). Presque tous les laboratoires (71/72 ; pas de réponse, 2) effectuent les éventuelles colorations cytochimiques associées à la réalisation du myélogramme, représentant un volume cumulé de 16 734 examens par année (moyenne 230/an). La coloration de Perls et la cytochimie des peroxydases sont les plus fréquemment réalisées avec respectivement un cumul annuel d'environ 12 635 (75 % des cytochimies) et 1888, et une moyenne respective de 175/an et 26/an pour les laboratoires les pratiquant. Quelques laboratoires pratiquent également la réaction des estérases (total 532), des phosphatases acides et la coloration au bleu de toluidine.

[1] Service d'Hématologie biologique, CHRU Brabois, Nancy.
[2] UCL Mont Godinne, Namur (Belgique).

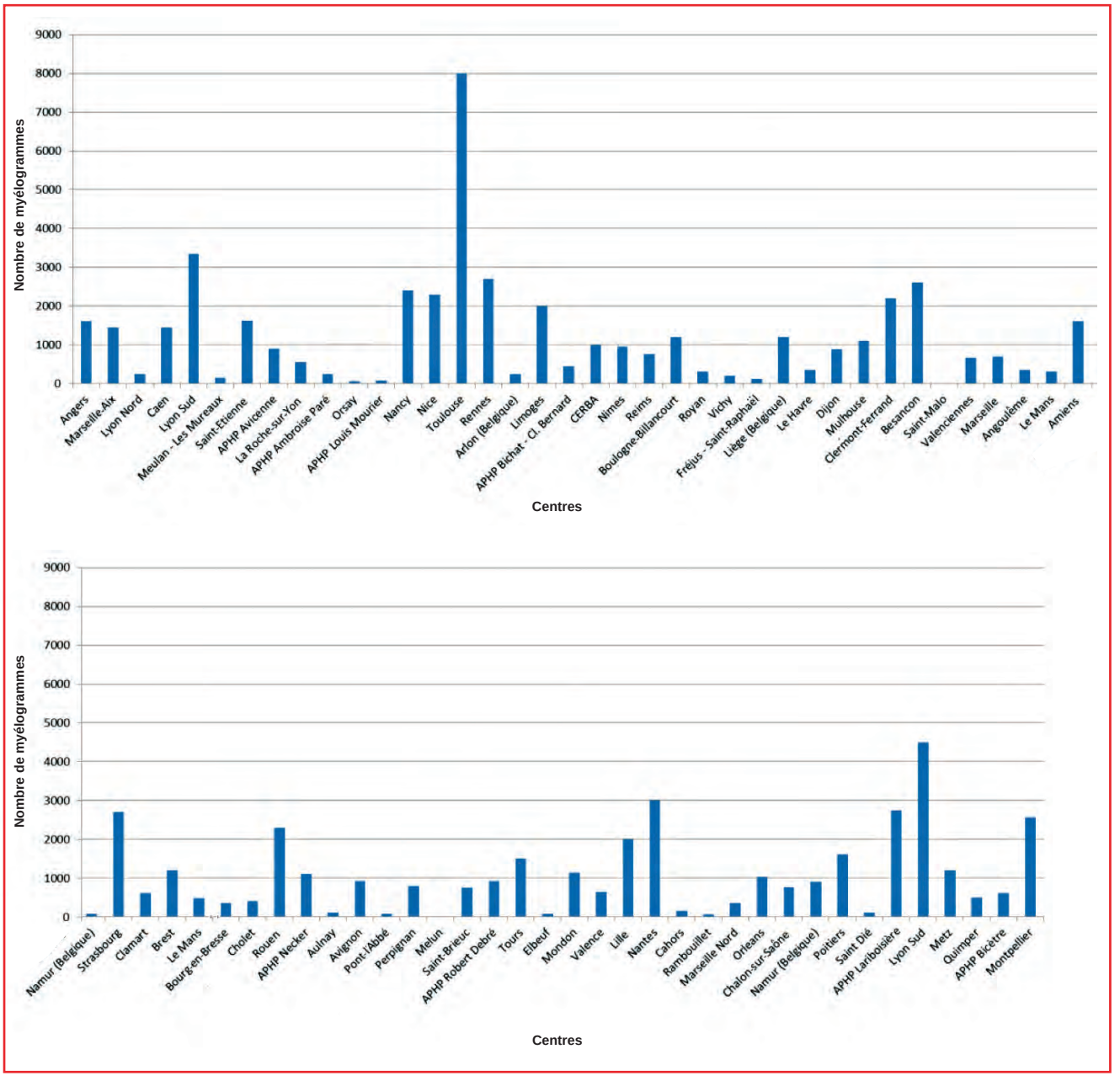


Fig. 1 - Nombre annuel de myélogramme par centre.

Un immunophénotypage précisant la nature des cellules pathologiques (diagnostic des hémopathies aiguës, des hémopathies lymphoïdes) est parfois associé. Il est réalisé par le même laboratoire dans 70 % des cas (49/70 laboratoires) et dans une autre structure dans 30 % des cas (23/70 laboratoires), aucune réponse n'étant communiquée par 4 laboratoires. L'interprétation morphologique et phénotypique est néanmoins conjointe pour 50/65 (77 %) laboratoires.

B) Pré-analytique

Le prélèvement médullaire est une étape importante pour la qualité de l'interprétation. Dans 41 (55 %) centres, il est effectué au sein même du laboratoire qui réalise la lecture et l'interprétation des frottis. Il est effectué par un médecin ou un pharmacien (respectivement dans 49 et 31 laboratoires), un senior ou des internes (respectivement dans 30 et 39 laboratoires), les modalités pouvant être cumulées dans un même centre. Une anesthésie locale est pratiquée dans 52 (70 %) centres (par xylocaïne, lidocaïne, lidocaïne et prilocaïne [Emla®]), voire une sédation « générale » par le protoxyde d'azote (Kalinox®).

Dans la majorité des centres (52/68 réponses, 76 %), les étalements de moelle sont effectués par le préleveur, au lit du patient. Les frottis sont principalement réalisés (68/74 réponses, 92 %), puis les « grumeaux » écrasés (42/74, 57 %) ou des empreintes de BOM (26/74, 35 %) (Tableau I). Un

Tableau I - Conditionnement des échantillons médullaires prélevés et techniques d'étalement des myélogrammes.

Réception d'échantillon non étalé	Nombre	%
Oui	45	61
Non	28	38
Non répondu	1	1
Conditionnement de l'échantillonnon étalé	**Nombre**	**%**
EDTA	33	73
Héparine	5	11
EDTA + Héparine	7	16
Technique d'étalement (modalités de réception)	**Nombre**	**%**
Frottis uniquement	24	33
« Grumeau » uniquement	6	8
Empreinte uniquement	0	0
Frottis + « Grumeau »	18	24
Frottis + « Grumeau » + Empreinte	18	24
Frottis + Empreinte	8	11

nombre moyen de 7 frottis (4 à 12) est considéré comme optimal par les participants. Dans deux centres, le prélèvement médullaire est introduit dans un tube contenant de l'EDTA, puis envoyé au laboratoire où les frottis sont étalés dans un second temps. Dans 45 (61 %) centres, un échantillon de moelle conditionné dans un tube avec anticoagulant (EDTA, 40 ; héparine, 12) est associé aux étalements pour un éventuel complément d'analyse, mais il n'est pas systématiquement étalé.

Le délai d'acheminement au laboratoire est d'environ 2 heures (0-8 heures (Figure 2). Cinquante-quatre laboratoires recourent à une boîte de transport ou boîte porte-lames de contenance variable (2 à 6 lames), en carton ou en plastique, avec parfois un absorbeur d'humidité, ou une boîte isotherme, ou encore à une mallette. Neuf laboratoires utilisent un plateau fermé ; 16, des pochettes dans lesquelles les lames sont plus ou moins enveloppées dans une compresse ou un papier ; 1, un haricot avec lames en vrac.

L'identification des lames est le plus souvent effectuée au crayon sur la partie dépolie de la lame de verre ou par gravure directe sur le verre (56 laboratoires). Vingt-quatre laboratoires étiquettent la boîte de transport ou le papier enveloppant les frottis (les frottis étant, ou non, identifiés). Il convient de noter que 3 laboratoires rédigent une non-conformité si l'identité manque. Enfin, 6 laboratoires reçoivent les prélèvements non identifiés (souvent parce qu'effectués par eux-mêmes).

Un hémogramme est exigé par la quasi-totalité des lecteurs. Cette requête est précisée dans le manuel de prélèvement pour quelques centres (complément de réponse, la question n'était pas expressément formulée). Vingt laboratoires font une demande impérative d'hémogramme (exigence de prescription) s'il n'y a pas possibilité de disposer d'un résultat récent. L'appel des laboratoires de ville correspondants, des collègues, la récupération des informations par photocopie ou fax… sont cependant privilégiés et l'examen est réalisé même si la requête échoue. Seulement 7 laboratoires refusent d'effectuer le myélogramme ou diffèrent le résultat de l'examen en cas d'absence d'hémogramme. En revanche, 20 laboratoires rédigent une fiche de non-conformité (non bloquante), 21 font une remarque sur le compte rendu, 14 rendent un résultat à interpréter en fonction de la clinique et /ou de la biologie.

L'obtention de renseignements cliniques, lorsqu'ils manquent, est réalisée par la très grande majorité des participants (63) : appel du prescripteur ou du service, consultation du dossier clinique informatisé. Douze laboratoires ne sont jamais confrontés à une omission de renseignements cliniques ou biolo-

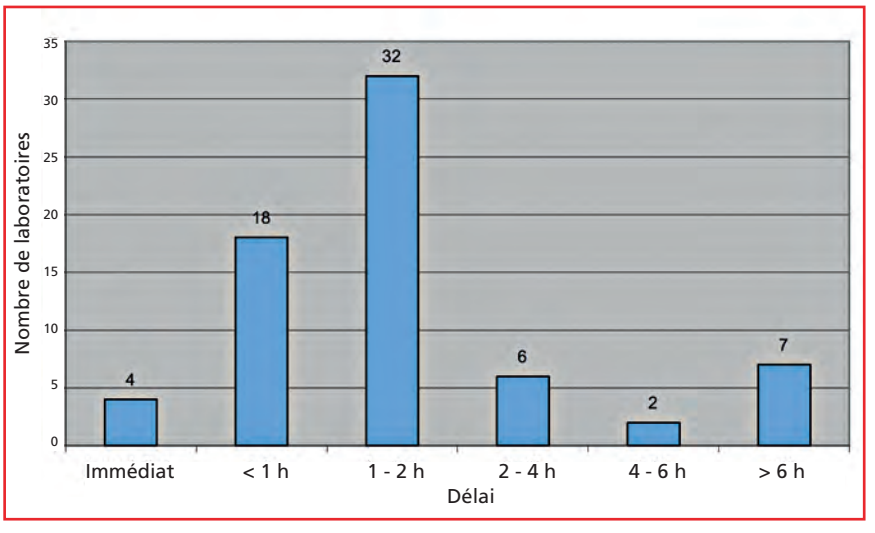


Fig. 2 - Délai d'acheminement de l'échantillon de moelle vers le laboratoire.

giques, le plus souvent parce qu'ils assurent le prélèvement, souvent dans un contexte hospitalier ou de contact privilégié avec les prescripteurs.

La notion d'urgence reste assez mal précisée. Par ordre de fréquence des réponses des participants, les indications urgentes d'un myélogramme sont :

- Blastose sanguine, suspicion de leucémie aiguë (44) ;
- Suspicion de syndrome d'activation macrophagique (43) ;
- Thrombopénie inexpliquée, sévère, suspicion de purpura thrombopénique idiopathique (34) ;
- Suspicion de leucémie promyélocytaire, syndrome de coagulation intra-vasculaire disséminée (28) ;
- Pancytopénie ou cytopénies importantes (28) ;
- Suspicion de lymphome de haut grade, de lymphome de Burkitt (20) ;
- Leucémie aiguë hypercytaire, hyperleucocytose (20) ;
- Agranulocytose (18) ;
- Suspicion de myélome (en particulier en cas d'insuffisance rénale concomitante) (13) ;
- Suspicion de métastases (11) ;
- Suivi thérapeutique (quinzième jour du traitement d'induction en cas de leucémies…), suspicion de rechute (10) ;
- Prélèvement pédiatrique (3) ;
- Présence de cellules anormales sanguines (2).

Trois laboratoires réfutent toute urgence, indiquant la « non-urgence » ou l'urgence relative du myélogramme. Un centre a mentionné ne pas effectuer cet examen durant la nuit.

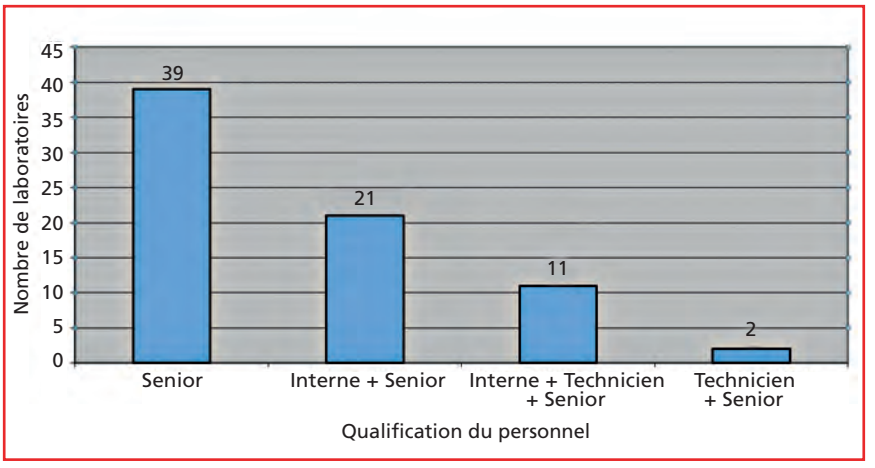


Fig. 3 - Personnels effectuant la lecture des myélogrammes.

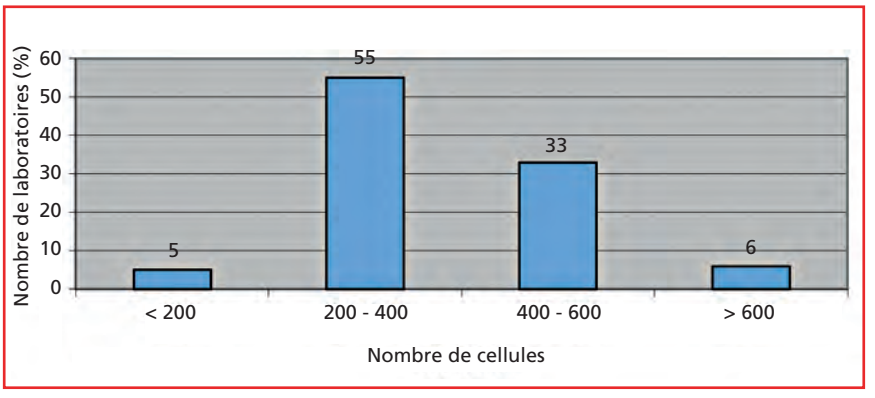


Fig. 4 - Nombre de cellules comptées pour un myélogramme.

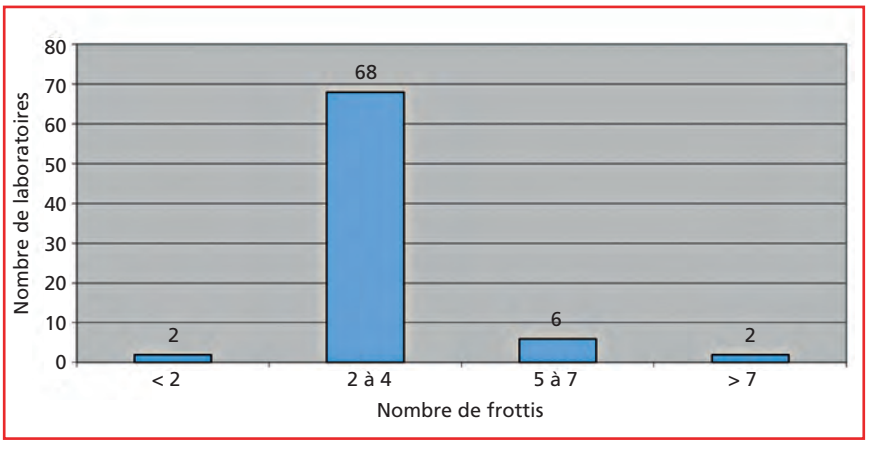


Fig. 5 - Nombre de frottis examinés lors de la lecture du myélogramme.

C) Analytique

Le myélogramme est analysé dans tous les cas par un biologiste expérimenté. Un examen microscopique initial par un technicien (13 centres) et/ou par un interne « niveau 2 » (32 centres) est effectué dans 34 laboratoires (Figure 3), suivi dans tous les cas d'une vérification par un biologiste spécialisé qui rend le résultat et l'interprétation définitive. Dans 39 laboratoires, l'analyse est réalisée d'emblée par le biologiste (senior ou assistant), un contrôle systématique n'étant qu'assez rarement pratiqué par un autre biologiste (29 centres, et uniquement pour les cas difficiles ou les diagnostics initiaux pour 22 centres). Une double lecture est donc effectuée, systématiquement ou occasionnellement, dans 51 laboratoires.

Le nombre de cellules observées n'a pas été évalué dans ce questionnaire (mais renseigné dans 94 % des cas). Le nombre de cellules comptées varie de 100 à 500 ou plus : au minimum 100 pour 5 biologistes, 200 pour 21 biologistes, 300 pour 18 biologistes, 400 pour

16 biologistes, 500 ou plus pour 19 biologistes (Figure 4). Très souvent, les laboratoires qui comptent 200 à 300 cellules en dénombrent plus (jusqu'à 500) si un diagnostic d'hémopathie est envisagé ou bien pour quantifier une dysmyélopoïèse. Deux laboratoires comptent jusqu'à 1 000 cellules.

Le nombre de frottis examinés est variable selon les laboratoires : le plus souvent 2 (36 réponses) voire 3 (22), plus rarement 4 (10) ou 5 ou plus (8) (Figure 5). Un laboratoire examine systématiquement tous les frottis. De nombreux laboratoires observent l'ensemble des frottis si une localisation métastatique est suspectée ou pour rechercher un envahissement lymphoïde anormal. Un laboratoire examine systématiquement un « grumeau » écrasé associé aux frottis.

La cellularité du prélèvement est appréciée ou évaluée de manière hétérogène d'un laboratoire à l'autre. La majorité (52/74 laboratoires) mentionne explicitement la richesse par un qualificatif (« désertique » à « très riche ») soit comme unique commentaire (24), soit associé à un système de gradation allant de 1 à 5 (18) ou de + à +++ (13). Un laboratoire observe le tapis d'hématies pour évaluer sa richesse ; un autre ne l'évalue pas.

La richesse en mégacaryocytes sur un frottis est estimée quantitativement par la grande majorité des participants, avant tout sur sa totalité, rarement par champ microscopique. Un laboratoire répond en grades, un autre ne les compte pas. La richesse normalement attendue est variable : entre 5 et 10 mégacaryocytes sur la totalité du frottis (18 réponses), entre 10 et 20 (12), entre 20 et 30 (19), entre 30 et 40 (11), plus de 40 (3) ; par champ microscopique au grossissement x10, entre 1 à 2 mégacaryocytes (1), entre 3 à 4 (4).

La présence de cellules rares ou extra-hématopoïétiques est également indiquée de manière hétérogène. Soixante-sept laboratoires précisent la présence de mastocytes avec une appréciation semi-quantitative et leur dystrophie éventuelle, 48 mentionnent l'existence d'histiocytes / macrophages avec une appréciation quantitative et un commentaire en cas de suspicion de syndrome d'activation macrophagique, et 42, celle d'ostéoclastes ou ostéoblastes. Les cellules graisseuses ou endothéliales sont signalées par une minorité de laboratoires, 26 pour les adipocytes et 15 pour les cellules endothéliales, mais surtout dans un contexte de moelle « graisseuse », très pauvre en cellules hématopoïétiques et riche en adipocytes », souvent lié à une aspiration proche du périoste. En réalité, toutes ces cellules ne sont pas systématiquement mentionnées mais elles le sont, en revanche, si leur présence est significative ou pathologique. Trente-huit réponses positives ont été obtenues pour les cellules non hématopoïétiques (cellules métastatiques, cellules de surcharge) mais il est évident qu'il existe un biais dans la réponse et on peut considérer que tous les laboratoires observant ces cellules les mentionneraient (question précise non posée).

Concernant la dysmyélopoïèse, celle-ci est mentionnée par 51 laboratoires, souvent avec une appréciation qualitative, et 17 la quantifient. Dix-huit laboratoires n'évaluent pas la dysmyélopoïèse de manière détaillée.

Enfin, il était demandé aux praticiens s'ils considéraient le myélogramme comme un examen quantitatif ou qualitatif : il est perçu comme essentiellement qualitatif par 49 participants (68 %) et 22 associent les critères quantitatifs et qualitatifs ; seul un laboratoire estime le caractère quantitatif comme étant prépondérant.

D) Délai de rendu et présentation du compte-rendu de l'analyse

Les délais moyens de rendu des résultats sont variables, allant de la demi-journée à plus de 2 jours. La majorité des laboratoires (52) rendent les résultats dans les 24 heures et seulement 15, au-delà de la journée (Figure 6). Tous les laboratoires (74) téléphonent les résultats urgents mais l'appel n'est tracé dans le système informatique du laboratoire que pour seulement 42 d'entre eux. Les diagnostics téléphonés sont, à peu de chose près, les mêmes que ceux mentionnés comme étant urgents à réaliser. Sont mis en exergue, en revanche, les nouveaux diagnostics, les rechutes, les diagnostics non suspectés ou inattendus et les diagnostics rares. Vingt-quatre laboratoires indiquent ne jamais tracer ces appels.

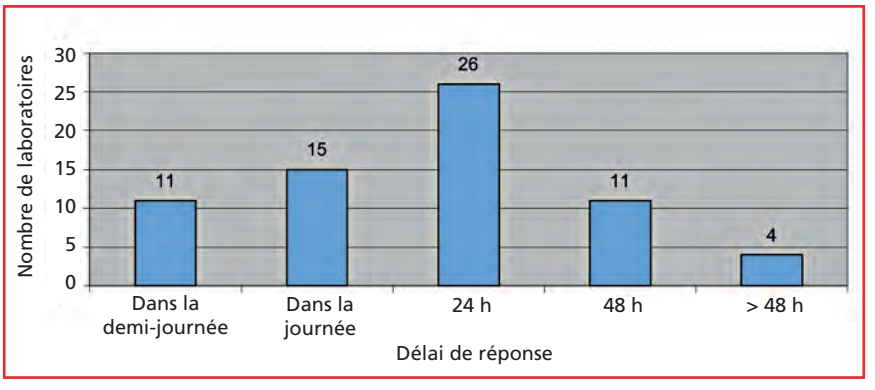


Fig. 6 - Délai de rendu de l'examen.

Les valeurs de référence sont le plus souvent celles préconisées par la Société Française d'Hématologie, mais il n'y a pas eu de questions sur leur adéquation avec l'expérience des cytologistes.

Seize laboratoires recourent à la codification de l'Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et en Anatomie Pathologique (ADICAP) (version du GFHC adaptée à l'hématologie) pour indiquer le diagnostic et 5 la mentionnent explicitement sur le compte rendu. Cinquante-deux laboratoires ne l'utilisent pas. Afin d'harmoniser les conclusions de l'analyse du myélogramme, la constitution, d'une part d'un catalogue de commentaires standardisés et validés par le GFHC et d'autre part, d'un thésaurus de diagnostics serait jugée utile par la très grande majorité des participants, respectivement par 65 (87 %) et 72 (95 %) d'entre eux ; il en est de même, pour la création d'une base de données bibliographiques (accessible en ligne sur le site du GFHC) relatives aux myélogrammes et concernant les techniques et les valeurs de référence.

E) Archivage

Les résultats sont systématiquement archivés sur le serveur informatique du laboratoire (74 réponses) ; dans certains centres (29), ils le sont également sous le format papier (parfois avec une durée limitée), mais toujours associés à l'archivage informatique. Certains laboratoires conservent parfois des feuilles de paillasse ainsi que des brouillons. Certains établissent des résultats sous le format pdf (3) ou des microfiches (1) ou bien les recopient sur une fiche cartonnée (1). Parfois (3), des photos sont associées (fichier ou appareil de numérisation associé au compteur automatisé, DM96). La durée de conservation des archives est très hétérogène selon les centres participant à l'enquête : 5 ans (4), 10 ans (11), 20 ans (7), 30 ans (3), illimitée (39).

Les frottis médullaires sont conservés selon des modalités diverses : dans des boites en carton, des pochettes, des caisses, des classeurs (« lamothèque »). Trois centres congèlent ; un emballe sous vide des lames. Dans la plupart des centres, les lames observées sont ensuite dégraissées, 20 centres les montent avec une lamelle collée. Un centre ne conserve pas de frottis, 20 ne conservent que les étalements pathologiques. La durée de conservation des frottis est très variable, conditionnée en partie par l'espace de stockage : 2 ans (3 laboratoires), 5 ans (4), 10 ans (8), 20 ans (15), 25 ans (3), 30 ans (7), illimitée (21), pas de réponse (13). Le nombre de frottis conservés varie aussi beaucoup (de 2 à tous). De nombreux laboratoires gardent les documents associés (sang, cytochimies, adénogramme éventuel,…) mais souvent que s'ils sont pathologiques (sinon ils sont jetés). Des frottis médullaires non colorés sont gardés par tout le monde (70), là aussi sur une période de temps variable : 7 jours (7), 1 mois (8), 2 mois (3), 3 mois (10), 6 mois (9), 1 an (10), 2 ans (6), 5 ans (4), 10 ans (3), 20 ans ou illimité (10), pas de réponse 4. Quelques rares centres gardent aussi des frottis sanguins non colorés.

F) Accréditation

L'enquête indique que peu de laboratoires (6) sont déjà accrédités pour le myélogramme (Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille [APHM] en 2006, CH de Valenciennes en 2013, CHU de Nice en 2014, CH de Saint-Malo en 2015, CHU de Caen et de Lille en 2015). Quelques laboratoires envisageaient de présenter le myélogramme à l'accréditation en 2016 mais la plupart a reporté cette présentation au-delà de cette date, en raison même de l'attente d'un document émanant du GFHC.

La grande majorité des laboratoires ne dispose pas d'un contrôle interne de qualité (CIQ). La pratique d'un CIQ n'est effectuée que par quelques laboratoires, surtout ceux des CHU, en particulier pour vérifier la concordance des résultats lorsque plusieurs cytologistes participent à l'activité (CHU de Nancy, de Nice…). Plusieurs réseaux inter-laboratoires (à la limite entre CIQ et évaluation externe de la qualité [EEQ]) se sont également constitués, à dimension régionale le plus souvent : région Poitou-Charentes (CHU de Poitiers, CH d'Angoulême,…), région PACA (APHM, Institut Paoli-Calmettes, CH d'Avignon…), région centre (CHU de Limoges, laboratoires privés), région Grand Ouest (groupe HUGO : CHU de Brest, d'Angers, de Nantes, de Rennes, de Tours, CH d'Orléans, CH du Mans,…), région Hauts-de-France (CH de Valenciennes, de Roubaix, CHU de Lille, Hôpital Saint-Philibert de l'Institut Catholique de Lille), région Grand Est (CHU de Reims, de Nancy, de Strasbourg). Ces échanges bénéficient d'une très forte adhésion de la part des participants.

Bien que théoriquement obligatoire, une minorité de laboratoires participe à un EEQ. Actuellement, plusieurs EEQ sont proposés mais 3 sont utilisés en pratique (Association Biologie Prospective-CTCB, 4 dossiers annuels : 6 participants à cette enquête ; association Biologie Praticienne, 6 dossiers annuels : 31 participants ; Contrôle National Belge : 1 dossier annuel, 4 participants). Des échanges externes d'avis entre biologistes et experts peuvent être utilisés également et font partie intégrante de ces exercices (réseau ANDRAL proposé par le GFHC par exemple, 2 réponses).

Concernant les conditions « minimales » d'habilitation d'un biologiste à la lecture du myélogramme, la quasi-unanimité des participants à l'enquête fixe à

au moins une lecture quotidienne pour considérer le test comme faisant partie des habitudes. Pour les indications « difficiles » (fréquentes en CHU), une expérience de plusieurs années est recommandée. Pour les indications « plus courantes », une majorité des participants estime nécessaire une expérience de plusieurs mois avec une adhésion régulière à des ateliers ou à des confrontations cytologiques. Des ateliers de morphologie existent, présentiels ou à distance via des échanges numérisés, et sont parfois proposés dans le cadre du DPC (actions du GFHC, du Collège des Hôpitaux Généraux, Belgique…). Certains utilisent aussi des boîtes de frottis préparés. Enfin, il existe des sites virtuels d'apprentissage (Hematocell®, Tribvn®, par exemples). Après la formation initiale (au cours de l'internat), un tutorat de plusieurs mois avec un senior, avec lecture en double et contre signature des examens, est mentionnée. L'utilisation d'un microscope multitête est alors appropriée selon les quelques laboratoires possédant un tel équipement. Quelques participants soulignent que la participation aux CIQ et EEQ fait partie de la formation.

G) Cotation

Le myélogramme est actuellement coté B100 (B = 0,27 € pour les départements métropolitains, 0,31 € pour les Antilles, 0,33 € pour la Guyane et la Réunion ; soit 27 € en métropole) et B2000 (B = 0,032613, soit 65 €) en Belgique. Excepté deux laboratoires estimant cette cotation suffisante, l'ensemble des participants la désapprouve eu égard au temps passé et le niveau d'expertise requis pour cet examen, sa discussion fréquente avec les prescripteurs, la demande éventuelle de relecture, etc. Certains insistent sur la nécessité de désormais compléter la lecture par une quantification précise de cellules (par exemple, l'Organisation Mondiale de la Santé [OMS] et le Groupe Français des Myélodysplasies [GFM] préconisent la lecture de 500 cellules pour quantifier les blastes), par une description précise de la dysplasie (OMS et GFM : 10 % de cellules anormales pour affirmer une dysplasie). L'inclusion dans des protocoles thérapeutiques requiert souvent une lecture précise des anomalies, avec discussion consécutive lors des réunions de concertation pluridisciplinaire avec les cliniciens, ce qui majore le temps consacré à cet examen. Une relecture est parfois demandée (discordance avec la clinique, apparition de données cliniques nouvelles, rechute d'hémopathies…) et elle n'est pas cotée. La cotation B50 en suivi est jugée non adaptée. Les propositions de cotation du myélogramme varient entre B200 et B500.

Concernant le prélèvement médullaire, les cotations K5 pour la ponction-aspiration et K30 pour la biopsie ostéo-médullaire devraient aussi être revalorisées pour les 5 participants ayant abordé ce point. Plusieurs laboratoires ne cotent pas cet acte. En fait, ce mode de cotation n'existe plus et la codification de l'acte est réalisée aujourd'hui via un logiciel CCAM qui code les actes de myélogramme avec les codes FDHB001 (aspiration simple à 9,60 €), FDHB002 (BOM à 62,07 €), FDHB003 (ponction de moelle osseuse pour myélogramme et analyses biologiques dans plusieurs territoires sous anesthésie générale, par voie transcutanée à 58,28 €) [https://www.ameli.fr/accueil-de-la-ccam/trouver-un-acte/par-code.php].

H) Suggestions /commentaires libres des participants à l'enquête

Une réflexion, d'une part sur la présentation du compte rendu (voire l'établissement d'un modèle), et d'autre part, sur la dénomination des cellules blastiques, est souhaitée par plusieurs participants. Elle sera abordée, pour le premier point dans un document de synthèse (prévu pour 2018) tirant parti de cette enquête ; le second point sera précisé dans un texte de standardisation du GFHC (2).

Un modèle de protocole pour comparaison de méthode (Cofrac) est suggéré : il serait effectivement pertinent de s'assurer que les seuils de 1 %, 5 %, 10 %, 20 % utilisés pour classer les hémopathies soient vérifiés en pratique. La suggestion est retenue et fera l'objet d'une réflexion ultérieure, déjà abordée par quelques centres (CHU de Limoges, de Nancy par exemple).

1) Points techniques

- Proposition d'un protocole de séchage des lames : ce point sera traité dans un document de recommandations prévu pour 2018.
- Standardisation de la coloration MGG : point crucial, mais spécifique. Ne fait pas l'objet de cette enquête.
- Matériel utilisé (trocarts) et procédure de prélèvement : ceci sera abordé dans le document de recommandations prévu pour 2018.

2) Perspectives

- Faire le même type d'enquête pour les adénogrammes : point spécifique, non prévu à court terme.
- Proposer une standardisation pour l'interprétation de la coloration de Perls et le décompte des sidéroblastes : point spécifique, non envisagé à court terme.
- Réaliser un atlas en ligne, en particulier pour la dysmyélopoïèse : le document de synthèse prévu pour 2018 proposera des images pour la richesse. Des documents en ligne concernant les dysplasies existent déjà, en particulier ceux proposés par le GFHC ou le GFM.

- Proposer un document de standardisation des termes et commentaires : ceci sera effectué dans un document de synthèse prévu pour 2018.
- Faire relire les propositions établies par des cliniciens : procédure déjà utilisée lors de la rédaction des précédents textes de recommandation du GFHC.

I) Discussion

Nous rapportons une enquête des pratiques concernant la réalisation du myélogramme en France et en Belgique. Elle a permis de connaître les modalités de son exécution, en 2015. Elle a été initiée par le GFHC dans le but de préparer ultérieurement un document le plus consensuel possible proposant des recommandations sur cet examen afin de préparer au mieux le dossier d'accréditation des laboratoires (norme ISO EU 15189). Cette enquête a été réalisée grâce au volontariat des membres du GFHC. La participation de 74 centres (103 participants) témoigne de l'intérêt des cytologistes pour cet enjeu et de leurs attentes relatives à des documents de standardisation. En revanche, elle ne reflète que le point de vue des participants « volontaires » (le GFHC comptait 234 membres en 2015) et ne peut pas être considérée comme une statistique rigoureuse, même si les plus impliqués ont quasiment tous répondu (les 234 membres du GFHC ne lisent pas tous les myélogrammes).

Le GFHC compte avant tout des praticiens travaillant dans le secteur hospitalier. Le fait que 72 des laboratoires fassent partie des centres hospitaliers était un biais attendu, la plupart (49) ayant une activité importante en cytologie. Comme supposé, la grande majorité des participants examine des frottis réalisés après aspiration (seringue montée sur un trocart) et colorés suivant le protocole MGG. Les recommandations à venir devront tenir compte de cette modalité largement répandue. Un complément d'investigation pour la recherche de sidéroblastes anormaux (coloration de Perls) est très fréquent et il pourrait faire l'objet d'une réflexion ultérieure car le résultat de ce test fait partie de l'interprétation finale. Le prélèvement de moelle osseuse est réalisé soit par le laboratoire, soit dans une autre unité. Ce point est crucial car il sous-entend une difficulté à maîtriser les conditions pré-analytiques pour une « moitié » des centres et tout particulièrement les modalités d'acheminement du produit biologique vers son lieu d'analyse. Si la durée du transport n'est pas critique ou d'une importance majeure pour l'examen médullaire, en revanche la manière dont sont identifiés les frottis est cruciale. Or, on note une diversité importante dans les pratiques, la plupart des frottis étant identifiés au crayon sur la partie dépolie de la lame. Mais les boîtes de conditionnement ne sont pas forcément étiquetées et, parfois, les frottis sont mis « en vrac » dans des pochettes. Il y aura là un point d'amélioration potentielle, en particulier dans une démarche d'accréditation.

Il est plus inattendu de constater que deux tiers des centres reçoivent, en plus des frottis, de la moelle liquide (parfois dénommée « sang / suc médullaire »), particulièrement utile lorsqu'il faut réaliser des cytochimies complémentaires (préparation de frottis supplémentaires) et, surtout, un immunophénotypage permettant de préciser le diagnostic. Il pourrait être proposé de généraliser cette association (frottis + tube EDTA) en laissant le libre choix au laboratoire de pratiquer un phénotypage complémentaire, en accord avec le prescripteur.

Les indications urgentes ont été bien ciblées par les participants. Cette notion « d'urgence » est souvent floue et difficile à théoriser. Or, il apparaît ici quelques indications majeures : présence de blastes dans le sang périphérique, suspicion d'hémopathie aiguë (en particulier de leucémie promyélocytaire), exploration d'une thrombopénie profonde, suspicion de syndrome d'activation macrophagique, cytopénies plus ou moins associées et sévères. Bien entendu, il est difficile de proposer une liste limitative, au sens strict, mais la confrontation de l'expérience des « habitués » du myélogramme permet de dégager une liste permettant de limiter les demandes des prescripteurs (case « urgent » cochée systématiquement sur la pochette de tout myélogramme, par exemple !). Ce concept d'urgence sera à discuter au sein du futur groupe de travail et à clarifier pour établir des recommandations.

Il reste indispensable que le myélogramme soit lu par un cytologiste expérimenté. Si c'est le cas, une relecture ne s'impose pas. Le nombre de cellules à compter est souvent fixé arbitrairement à 500 mais l'expérience indique que ce n'est pas un pré-requis. En revanche, certains textes de recommandation indiquent cette valeur pour la détermination des blastes (OMS 2008), en particulier dans le cadre des syndromes myélodysplasiques. L'hétérogénéité des réponses concernant l'estimation de la cellularité du frottis et de sa richesse en mégacaryocytes plaide en faveur de la réalisation de documents référentiels. Des planches photographiques pourraient être utiles pour tenter une standardisation inter-laboratoires et pourraient être mises en ligne sur le site du GFHC. La dispersion des réponses relatives au nombre de cellules comptées (lui-même différent du nombre de cellules observées), au nombre et à la nature des frottis évalués (étalement, grumeau écrasé…), à la manière d'évaluer puis d'exprimer la cellularité du frottis, son abondance en mégacaryocytes… montrent bien l'utilité du futur groupe de travail pour coordonner les efforts !

Les modèles de comptes rendus fournis par les participants restent, de manière attendue, assez similaires. Les items devant obligatoirement y figurer feront l'objet d'une prochaine publication de recommandations. Des modèles de commentaires, de diagnostics, de documents de référence…, cooptés par le GFHC, sont souhaités par la quasi-unanimité des participants à l'enquête. La rédaction de descriptifs est en cours, avec un format permettant de les informatiser sous forme de codes ou de menus déroulants pouvant être exportés à l'ensemble de la communauté biologique. La codification diagnostique existe déjà sous forme d'un thésaurus proposé par l'ADICAP et régulièrement remanié (1995, 2001 et 2015 en finalisation prévue en 2018). La dernière version de la codification ADICAP figure sur le site du GFHC et une publication « papier » est prévue, dans un format consultable à la paillasse.

La phase d'accréditation actuelle oblige à tracer les renseignements fournis, en particulier la communication téléphonique des résultats. Au vu de cette enquête, l'attitude des biologistes devra être plus stricte, quitte à transmettre des non-conformités aux prescripteurs si les renseignements sont incomplets. En revanche, l'archivage illimité sur le système informatique du laboratoire semble déjà acquis pour la quasi-totalité des confrères. Un flou persiste sur la nature des frottis à conserver. Le groupe de travail du GFHC devra statuer sur ce point, en accord avec les textes juridiques. En attendant, il semble nécessaire de conserver au moins 20 ans les frottis colorés, d'une manière ou d'une autre.

Pour le myélogramme, les exigences de la norme 15189 semblent bien en avance sur les conditions réelles de pratique de la plupart des biologistes. La notion d'habilitation reste mal définie pour cet examen de seconde ligne, et l'obligation de participation à des CIQ et EEQ se heurte à l'absence de procédures définies et de tests de contrôle disponibles. Cette carence en contrôle commence à être prise en compte par des organismes avec des modalités diverses : tests proches de la vie réelle (Association de Biologie Praticienne) ou bien contrôle de qualité analytique strict (Biologie Prospective). Le GFHC a initié un travail de réflexion sur l'organisation d'un tel EEQ pour le proposer à la communauté. Un contrôle national existe déjà en Belgique (110 participants) avec une forte adhésion des praticiens. Il y a probablement beaucoup à apprendre de cette initiative.

II. - CONCLUSION

Cette enquête des pratiques a permis d'objectiver les points forts/faibles des morphologistes francophones concernant la réalisation d'un myélogramme. Deux groupes de travail, rassemblant 56 volontaires, ont été constitués pour proposer des recommandations, tenter une standardisation et mettre au point un test de contrôle. Les réponses des participants à cette enquête des pratiques permettront de mieux adapter les futures propositions.

Participation à l'enquete

Les réponses ont parfois été collégiales pour un centre donné. Les biologistes ayant répondu à l'enquête du GFHC sont (par ordre alphabétique arbitraire) :

Isabelle AMOUROUX (Rambouillet)
Élisabeth ANDRÉ-KERNEIS (Avignon)
Valérie ANDRIEU (Bichat-Claude Bernard, Paris)
Anne ARNAUD (Nîmes)
Maud ARPIN-BONNET (Marseille)
Cédric AUMONT (Bicêtre)
Véronique BACCINI (Aix-en-Provence)
Bouchra BADAOUI (Créteil)
Francois BAILLY (Dijon)
Brigitte BARDET (Bourg-en-Bresse)
Valérie BARDET (Cochin, Paris)
Lucile BASEGGIO (Lyon)
Céline BEHIER (Angoulême)
Adelkader BELMEKKI (Rabat, Maroc)
Yaël BERDA-HADDAD (Marseille)
Cécile BOSSARD (Lyon)
Éléonore BOTTON (Pontoise)
Sabrina BOUYER (Poitiers)
Caroline BRET (Montpellier)
Audrey BRIGNOU (Lannemezan)
Chantal BROUZES (Necker, Paris)
Caren BRUMPT (Lariboisière, Paris)
Sophie BRUN (Nîmes)
Caroline BUORS (Brest)
Béatrice CARON-SERVAN (Pontoise)
Sylvain CAU (Saint-Brieuc)
Bernard CHATELAIN (Namur, Belgique)
Marc CHATELAIN (Namur, Belgique)
Jean-François CLASSEN (Arlon, Belgique)
Valérie COIGNARD (Saint-Malo)
Édouard CORNET (Caen)
Jill CORRE (Toulouse)
Jean-Paul COUAILLAC (Cahors)
Françoise COURTIER (Valence)
Sylvie DALIPHARD (Rouen)
Marie DAUTEL (Cholet)
Agathe DEBLIQUIS (Mulhouse)
Anne DELAVAL (Aulnay-sous-Bois)
Véronique de MAS (Toulouse)
Frédérique DUBOIS (Toulouse)
Alice EISCHEN (Strasbourg)
Vincent ESTEVE (Orsay)
Odile FENNETEAU (Robert Debré, Paris)
Vincent FOISSAUD (Clamart)
Nicolas FREYNET (Créteil)
Julie GAGNANT (Vichy)
Anne-Cécile GALOISY (Strasbourg)
Francine GARNACHE-OTTOU (Besançon)
Franck GENEVIEVE (Angers)
Luc-Marie GERLAND (Lyon)
Sandrine GIRARD (Lyon)
Julien GOUSTILLE (Saint-Malo)
Charlotte GROSDIDIER (Marseille)
Philippe GUEUDET (Perpignan)
Éric GUIHENEUF (Amiens)
Julien GUY (Dijon)
Inès HARZALLAH (Mulhouse)
Jean-Pierre HURST (Le Havre)
Sophie IQUEL (Orléans)
Nathalie KERGOAT (Brest)
Véronique KIRCHGESNER (Chalon-sur-Saône)
Sébastien LACHOT (Tours)
Carinne LAFON (Reims)
Bruno LANSON (Pont-l'Abbé)
Hélène LEFRAND (Avignon)
Marthe LE GALL-GODARD (Rennes)
Franck LELLOUCHE (Royan)
Béatrice LELOUP-POILANE (Saint-Brieuc)
Pierre LEMAIRE (Le Mans)
Caroline LEONNET (Marseille)
Jean-François LESESVE (Nancy)
Claire LETELLIER (Saint-Brieuc)
Vincent LEYMARIE (Brive-la-Gaillarde)
Daniel LUSINA (Bobigny)
Béatrice LY-SUNNARAM (Rennes)
Gabrielle MAREYNAT (Clermont-Ferrand)
Jean-Michel MARTELLI (Meulan-lès-Mureaux)
Valérie MATHIEU (Besançon)
Caroline MAYER-ROUSSE (Strasbourg)
Lofti MEHIAUOI (Lille)
Alexandra MEYER (Nancy)
Laurie MONNIER (Strasbourg)
Annie MOTARD (Fréjus-Saint-Raphaël)
Mélanie PANNETIER (Reims)
Benoîte PEREZ (Le Mans)
Marie PICQUE (Melun)
Géraldine PROTON (Elbeuf-Louviers)
Stéphanie POULAIN (Valenciennes)
Claude PREUHOMME (Lille)
Sandrine PUYRAIMOND (Besançon)
Emmanuelle RAULT (Tours)
François REINS (Saint-Dié)
Bénédicte RIBOURTOUT (Angers)
Mikael ROUSSEL (Rennes)
Françoise SCHILLINGER (Besançon)
Gérard SEBAHOUN (Marseille)
Béatrice SERVAN (Pontoise)
Valérie SOENEN (Lille)
Françoise SOLLY (Saint-Étienne)
François SUBIGER (La Roche-sur-Yon)
Isabelle SUDAKA (Nice)
France TEILLET (Colombes)
Catherine TRICHET (Argenteuil)
Franck TRIMOREAU (Limoges)
Xavier TROUSSARD (Caen)
Myriam VASBIEN (Liège, Belgique)
Orianne WAGNER-BALLON (Créteil)
Soraya WUILLEME (Nantes)
Loria ZALMAI (Mulhouse)
Marc ZANDECKI (Angers)

Références Bibliographiques

(1) Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC ; International Council for Standardization in Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol* 2008 ; **30** : 349-64.

(2) Trimoreau F, Galoisy AC, Geneviève F, Bardet V, Cornet E, Hurst JP, *et al.* Harmonisation of full blood count reports, recommendations of the French-speaking cellular haematology group (GFHC). *J Clin Pathol* 2017 ; **70** : 395-402.

Recommandations du GFHC

J.-F. LESESVE[1], B. CHATELAIN[2], O. WAGNER-BALLON[3], F. GENEVIÈVE[4], V. LEYMARIE[5], O. FENNETEAU[6], L. BASEGGIO[7], S. GIRARD[7], G. SEBAHOUN[8], M. ZANDECKI[4], X. TROUSSARD[9], V. BACCINI[10], K. MALOUM[11], V. BARDET[12], POUR LE GFHC

RÉSUMÉ

De 2015 à 2017, le Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC) a recensé les pratiques des biologistes, réuni des groupes de travail et émis plusieurs recommandations pratiques pour l'examen « myélogramme ». Outre les examens clairement indiqués comme urgents et justifiés, seront effectués rapidement les myélogrammes prescrits dans les contextes de blastose sanguine ou suspicion/suivi/rechute de leucémie aiguë ; suspicion de lymphome de haut grade ; suspicion de syndrome d'activation macrophagique ; cytopénie (isolée ou associée) sévère en particulier thrombopénie inexpliquée, agranulocytose, pancytopénie. Mais, c'est avant tout au biologiste d'évaluer la notion d'urgence, en concertation avec le prescripteur. Le personnel préleveur devra être formé et habilité. Le patient devra être informé préalablement au geste invasif et son consentement devra être obtenu. Les contre-indications au prélèvement de moelle osseuse devront être systématiquement recherchées. Six à 8 étalements médullaires sur lames (frottis) de qualité seront réalisés. Les frottis devront tous être identifiés et transmis au laboratoire dans un conditionnement lui-même identifié. On pourra éventuellement joindre aux frottis un prélèvement de moelle dans un tube avec anticoagulant (EDTA), que le laboratoire pourra utiliser à sa convenance. La coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) est préconisée. La cellularité médullaire sera appréciée semi-quantitativement (désertique, pauvre, diminuée, normale, augmentée), de même que les mégacaryocytes (non observés, très rares, diminués, normaux, nombreux, augmentés). Il n'existe pas de nombre précis de cellules à compter. En revanche, il faut souligner la limite d'un pourcentage donné si le nombre d'évènements comptés est faible ; il faut si possible visualiser 400 à 500 cellules sur 2 frottis. Le GFHC recommande une pratique régulière et la participation à des exercices de qualité (tests intra-laboratoire, échanges de proximité, inscription à une évaluation externe de la qualité [EEQ] nationale…). Au minimum, un frottis coloré (MGG) et toutes les cytochimies complémentaires avec, si possible, un frottis sanguin correspondant, seront archivés pour une durée d'au moins 20 ans. Ces recommandations visent à une bonne pratique de l'examen « myélogramme », dans un souci d'harmonisation interlaboratoire. Elle s'inscrit dans une démarche de « qualité » suivant les préconisations de la norme 15189.

MOTS-CLÉS : myélogramme, Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire, recommandations.

I. - INTRODUCTION

Dans le cadre de sa démarche actuelle d'harmonisation des pratiques en hématologie cellulaire, le Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire (GFHC) a souhaité établir des recommandations pour la réalisation du myélogramme. Après une enquête des pratiques effectuée durant le mois d'octobre 2015 et regroupant les réponses de 74 laboratoires / 103 biologistes, le GFHC a constitué un

Laboratoires d'Hématologie des centres hospitaliers de Nancy[1], Namur-Mont Godinne (Belgique)[2], Créteil[3], Angers[4], Brive-la-Gaillarde[5], Paris-Robert Debré[6], Lyon[7], Marseille[8], Caen[9], Pointe-à-Pitre[10], Paris Pitié-Salpêtrière[11] et Boulogne-Billancourt[12].

groupe de travail (GT) de 56 cytologistes pratiquant cet examen afin d'établir des points consensuels ou, à défaut, de proposer des recommandations, voire des attitudes innovantes par rapport aux habitudes traditionnelles. Ces recommandations sont exposées ci-après à la communauté biologique.

II. - MÉTHODOLOGIE

Le texte a été élaboré en plusieurs étapes. En mai 2016 a eu lieu la première réunion du GT avec rédaction d'une première ébauche. Plusieurs sous-groupes de travail ont été alors formés pour des points plus spécifiques (techniques, cellularité, habilitation). En juin 2016, le texte a été envoyé à l'ensemble des participants et au bureau du GFHC pour réflexion. Au cours de l'été 2016, les réflexions des sous-groupes de travail ont été recueillies avec établissement de propositions à valider. La deuxième réunion du groupe de travail s'est déroulée en octobre 2016. Le texte émis par les groupes de travail a été validé. Au cours de l'année 2017, le texte a circulé entre les participants et a été discuté lors des réunions de bureau du GFHC (méthode DELPHI). Il a été finalisé en janvier 2018.

III. - DÉNOMINATION

Plusieurs dénominations existent pour nommer l'examen « myélogramme » (« ponction-aspiration médullaire » par exemple) ou la « biopsie ostéo-médullaire » (« ponction-biopsie osseuse » par exemple). Elles correspondent aux termes anglo-saxons *bone marrow aspirate* et *bone marrow biopsy* ou *trephine/core biopsy*. Les « étalements » de moelle (également nommés « sang médullaire » ou « suc médullaire ») sur des lames sont effectués sous forme de « frottis » (*film*, *smear*, *wedge* ou *spread*), et les « appositions de biopsies », sous forme « d'empreintes » (*biopsy section*, *imprints*). Les « grumeaux » ou « grains écrasés » correspondent aux *squash* ou *crush* des anglo-saxons (1, 2, 3).

Une ambiguïté peut exister entre l'acte (aspiration ou biopsie, prélèvement aux modalités différentes) et le compte rendu (terme commun pour les deux). Le renseignement des modalités de ponction sur le compte rendu écartera tout doute éventuel. Les recommandations du GFHC concernent les deux modalités (frottis et empreintes) pour la lecture, mais seulement l'aspiration pour le prélèvement.

Le GT/GFHC recommande les termes « myélogramme » et « biopsie ostéo-médullaire » pour nommer ces deux actes avec les termes « frottis » et « empreintes » pour qualifier les étalements sur lames correspondants (frottis obtenus à partir d'un myélogramme et empreintes réalisées à partir d'une biopsie ostéo-médullaire (suggestion non opposable laissée à l'initiative de chaque centre).

IV. - INDICATIONS DU MYÉLOGRAMME (ET INDICATIONS « URGENTES »)

En théorie, il est difficile de proposer une liste exhaustive d'indications (1, 3). En tentant de regrouper par grands cadres d'explorations, les principales indications sont les suivantes :

a) Exploration à but de diagnostic d'un dysfonctionnement médullaire (hémopathie bénigne ou maligne) :
- Exploration de cytopénies (anémies, leucopénies, thrombopénies) isolées ou non.
- Anomalies de l'hémogramme et/ou présence de population(s) cellulaires anormale(s) signalée(s) sur les histogrammes de distributions cellulaires établis par les appareils d'hématimétrie.
- Exploration d'anomalies morphologiques détectées sur le frottis sanguin et orientant possiblement vers un dysfonctionnement d'origine médullaire.
- Points d'appel cliniques (organomégalie,…) ; anomalies biochimiques (pic monoclonal d'immunoglobulines,…).
- Exploration des réserves en fer médullaire par coloration de Perls (principalement bilan d'anémie ou suspicion d'un syndrome myélodysplasique) (4).

b) Exploration à but de bilan d'extension ou de surveillance post-thérapeutique, de suivi de greffe : Présence d'une pathologie hématopoïétique connue (suivi, bilan évolutif, évaluation post-thérapeutique) : hémopathies aiguës et chroniques, syndromes myélodysplasiques, néoplasies myéloprolifératives, prolifération lymphoïdes et plasmocytaires tumorales, mastocytose…

c) Exploration ou suspicion d'une pathologie connue d'origine extra-hématopoïétique : métastases, maladie de surcharge, infections (tuberculose, leishmaniose)…

d) Bilan pré-greffe (donneurs et/ou receveurs) (hors procédures spécifiques de type « qualification du don », contrôle de qualité des greffons des centres de thérapie cellulaire).

Il est nécessaire de rappeler que certaines prescriptions sont injustifiées : anomalie ponctuelle d'un hémogramme (en l'absence de contexte clinique suggestif d'un retentissement médullaire), anomalie quantitative de l'hémogramme sans revue préalable du frottis sanguin associé (par exemple, parasitose non recherchée), diagnostic de pathologies pour lesquelles des explorations périphériques sont plus pertinentes (diagnostic moléculaire possible), exploration d'artéfacts (fausses thrombopénies, neutropénies par déficit en peroxydase par exemple), bilan systé-

matique d'anomalies sans diagnostic médullaire pertinent attendu (suivi de gammapathie monoclonale d'origine indéterminée…). De même, l'attitude anglo-saxonne d'effectuer systématiquement une coloration de Perls lors de tout bilan initial n'est pas pratiquée en France alors que cette pratique est plus fréquente en Belgique.

En pratique, il faut admettre que les indications ne relèvent pas le plus souvent du laboratoire qui reçoit, de services de soins, un prélèvement médullaire à analyser. Cependant, l'enquête des pratiques a permis de recenser les situations auxquelles les biologistes sont confrontés avec une demande « urgente » associée à la prescription.

Deux groupes d'indications apparaissent :

a) Avant tout, les blastoses sanguines et les suspicions de leucémie aiguë surtout si hyperleucocytaire (> 50 G/L ou suspicion clinique de leucostase) ; les suspicions de syndrome d'activation macrophagique ; les thrombopénies inexpliquées sévères ; les suspicions de leucémie promyélocytaire (CIVD) ; les pancytopénies ou les cytopénies importantes ; les suspicions de lymphome de haut grade (tel que le lymphome de Burkitt) ; les hyperleucocytoses (> 100 G/L) et les agranulocytoses.

b) Accessoirement (variable suivant les centres) : les suspicions de myélome (en particulier si insuffisance rénale concomitante) ; les suspicions de métastases ; les suivis de traitement (post-inductions de leucémies…) ; les suspicions de rechute ; les examens provenant de pédiatrie.

Le libellé « urgent », systématique de la part de certains prescripteurs, est une dérive abusive qui doit être réévaluée. La notion d'urgence (motif et délai de réponse escompté) est une notion très dépendante du contexte et du prescripteur, mais aussi du fonctionnement intrinsèque du laboratoire (½ journée, journée...). Le niveau réel d'urgence est apprécié avant tout par une concertation de qualité avec le prescripteur qui doit être encouragée, permettant d'optimiser la demande du clinicien tout en valorisant le travail du biologiste. De plus, certains centres pourront proposer plusieurs niveaux d'urgence selon les périodes de gardes et jours fériés et activité de semaine en fonction des habitudes locales et de la présence d'un cytologiste durant ces périodes. Dans ce cas, un contrat est à définir avec les services cliniques pour précisions.

Le GT/GFHC recommande d'effectuer sans délai, outre les examens clairement indiqués comme « urgents » et justifiés, les myélogrammes prescrits dans les contextes suivants : blastoses sanguines ou suspicion/suivi/rechute de leucémies aiguës ; suspicion de lymphome de haut grade ; suspicion de syndrome d'activation macrophagique ; cytopénies (isolées ou associées) sévères en particulier thrombopénie inexpliquée, agranulocytose, pancytopénie. Mais, avant tout, le GFHC recommande de laisser l'initiative au biologiste d'évaluer la notion d'urgence, en concertation avec le prescripteur (dialogue clinico-biologique, accord professionnel fort).

V. - PRÉ-ANALYTIQUE

A) Prélèvement médullaire

Il conditionne la qualité de l'interprétation de l'examen et le laboratoire en est responsable. L'enquête du GFHC a constaté qu'une moitié des prélèvements de moelle osseuse échappe aux biologistes en étant réalisés hors de l'enceinte des laboratoires, par des préleveurs hétérogènes (médecins ou pharmaciens, seniors ou internes, les modalités pouvant être cumulées dans un même centre). Une anesthésie n'est pas systématiquement pratiquée. Même si l'étape pré-analytique lui échappe, le laboratoire devra s'assurer de sa maîtrise correcte par les préleveurs (contrat clinico-biologique (1, 5)).

Le GT a émis les propositions suivantes (uniquement pour le myélogramme par aspiration) :

1) Formation - habilitation

L'ensemble des internes de biologie médicale pourra être sensibilisé à la technique du prélèvement de moelle osseuse durant leur(s) stage(s) dans un laboratoire. Concernant les services cliniques, cette formation est laissée à la responsabilité des pôles et unités cliniques. Un document de formation devra être proposé (procédure d'habilitation). Le nombre de ponctions observées et effectuées par un interne pendant la période de tutorat est laissé à l'appréciation de chaque centre. Une mention accessoire de tutorat supplémentaire pour la réalisation des étalements pourra être proposée. En plus de l'habilitation nécessaire aux internes de biologie issus de la filière médicale vient s'ajouter, pour celle des internes originaires de la filière pharmaceutique, une attestation à transmettre à l'Agence Régionale de Santé, afin d'obtenir une capacité de prélèvement correspondant aux ponctions médullaires, avec un nombre minimal de 20 ponctions. Les seniors devront eux aussi être habilités à ce geste. Cela nécessite d'avoir précédemment répondu aux critères de la grille de formation des internes (pour les praticiens récemment nommés) ou bien d'avoir pratiqué en double avec un autre senior plusieurs ponctions sternales et/ou iliaques. Le nombre sera à définir localement pour chaque centre. Un document devra être rédigé confirmant cette habilitation au geste (si possible en le prouvant). Il devra être mentionné avoir eu la

connaissance des textes légaux (Journal Officiel des 4/11/2005, 3/1/2006 et 23/6/2009, textes relatifs aux prélèvements effectués par les pharmaciens biologistes (6-8)). Il n'est pas utile de différencier une habilitation pour une ponction iliaque et sternale ; en revanche, l'expérience pratique des deux modalités est requise.

2) Accueil du patient au laboratoire

L'information préalable du patient est impérative pour obtenir son adhésion à la ponction de moelle osseuse et limiter le caractère anxiogène de celle-ci. On peut conseiller de distribuer une fiche d'information destinée au patient. Pour un sujet mineur ou sous curatelle, la personne légalement responsable doit être avertie. Le patient devra avoir connaissance de l'indication du myélogramme et du contenu de sa prescription (hémogramme, immunophénotypage, cytogénétique, biologie moléculaire,...). Son consentement devra être obtenu oralement (et enregistré selon les procédures locales, comme une case à cocher sur le bon de demande par le prescripteur). Un consentement écrit n'est pas actuellement une obligation. Pour une ponction médullaire réalisée dans un service clinique, le biologiste s'assurera avant celle-ci que l'information correspondante a bien été faite par le médecin prescripteur et comprise par le patient (contrat clinico-biologique).

Lors de l'accueil du patient au laboratoire, la vérification de son identité, la rédaction d'un bon de demande et l'enregistrement informatisé de la consultation devront être pratiqués selon les procédures locales habituelles. Après la ponction, un document de « traçabilité » pourra être remis au patient, mentionnant le nom du préleveur et du senior responsable, le déroulement de l'acte (« RAS, ponction blanche, difficulté d'aspiration »,...) ainsi que les coordonnées du laboratoire en cas de nécessité de renseignements (par exemple, que faire en cas de saignement au point de ponction ?). Un questionnaire de satisfaction du patient à l'issue de la ponction de moelle osseuse est laissé à l'initiative de chaque laboratoire (non obligatoire, il pourra cependant faire partie du management de la qualité).

3) Mode opératoire - matériel - manuel de prélèvement

Les prélèvements de moelle osseuse devront être exécutés dans une salle médicalisée (et non pas dans un bureau de consultation médicale) afin de pallier immédiatement un incident (malaise, saignement,...). Il n'est pas recommandé de les réaliser sans la possibilité d'une prise en charge d'éventuelles complications immédiates. Des moyens de réanimation sont à prévoir dans la salle de prélèvement (type chariot d'urgence) ou, de façon plus pragmatique, un « circuit/schéma » avec des correspondants anesthésistes-réanimateurs (ou qualifiés équivalents) susceptibles d'intervenir sans délai en cas de problème. Document à intégrer dans le chapitre « gestion des risques » de la politique qualité du laboratoire.

Chaque site devra procéder à la rédaction d'un mode opératoire enregistré dans son service documentaire selon les modalités locales. On peut également préconiser la rédaction d'une fiche synthétique figurant dans le manuel de prélèvement de l'établissement. Enfin, il est conseillé de disposer, dans la salle de prélèvement, d'une liste de vérification (document plastifié ou affiché) afin que le préleveur puisse s'assurer de la disponibilité de l'ensemble du matériel. Cette liste devra énumérer les matériels à employer avec leur référence pour simplifier éventuellement leur renouvellement ou leur commande (matériel de désinfection, solution d'anesthésique, trocart, lames de verre, nécessaire pour pansements après la réalisation du geste, seringues et tubes divers pour prélèvements,...).

4) Précautions et contre-indications

Les contre-indications sont des antécédents de sternotomie (pour la ponction sternale) et de radiothérapie (en fonction du site irradié), une infection locale et des troubles importants de l'hémostase (5).

Concernant le risque hémorragique, il n'existe pas de données claires, ni de recommandations dans la littérature. Une recherche bibliographique à partir de PubMed (« *bone marrow aspiration/biopsy* and *haemorrhage* » ; « anticoagulant » ; « *antiplatelet* ») fait retenir une incidence des complications hémorragiques autour de 1/1 000 après une ponction-biopsie médullaire (9). La complication hémorragique est exceptionnelle après un myélogramme. En revanche, les saignements après une biopsie ostéo-médullaire sont favorisés par l'hémopathie sous-jacente (thrombopathie des syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs, thrombopénie) et les traitements anticoagulants et/ou antiplaquettaires. Les habitudes sont variables d'une équipe à l'autre et une enquête de pratique serait intéressante.

Dans l'attente, les propositions sont les suivantes :

Le myélogramme peut être réalisé chez tous les patients à l'exception de ceux atteints d'hémophilie ou présentant un déficit sévère connu en facteur de coagulation (taux < 10 UI/dL) pour lesquels il convient de contacter le Centre de Ressources et de Compétences (CRC) Maladies Hémorragiques Consti-

tutionnelles (MHC) (anciennement CRTH). En cas de traitement anticoagulant à dose curative, il faut de préférence effectuer le geste à distance du pic d'activité après la prise de l'anticoagulant, idéalement en résiduel, c'est-à-dire juste avant la prise. Pour rappel, le pic d'activité se situe 2-3 heures après la prise d'un anticoagulant oral direct (AOD), 3-4 h après l'injection sous-cutanée d'une héparine de bas poids moléculaire (HBPM) administrée 2 fois/jour, 4-6 h après l'injection sous-cutanée d'une HBPM administrée 1 fois/jour, 90 min après l'injection sous-cutanée d'héparine calcique. Sous antivitamine K (AVK), un contrôle d'INR est recommandé (INR < 3 pour le geste). Dans tous ces cas ainsi que lors de traitement antiplaquettaire, une compression locale est souhaitable. Le site de ponction est laissé au choix de l'opérateur. Il faudra surveiller la constitution d'un éventuel hématome.

En cas de biopsie ostéo-médullaire, il faut considérer cette fois-ci le risque hémorragique (3, 9, 10). Il convient d'effectuer un interrogatoire (11), de tenir compte d'un traitement antiplaquettaire et/ou anticoagulant, de vérifier l'hémostase (plaquettes, TP, TCA, fibrinogène) du patient, de corriger si besoin les troubles identifiés : plaquettes < 50 G/L, TP < 50 % (INR > 1,5) et de contacter le CRC maladies hémorragiques constitutionnelles s'il existe un déficit en facteur de coagulation. En cas de traitement antiplaquettaire, le geste est possible sous monothérapie (aspirine ou clopidogrel), mais dans le cadre d'une bithérapie, il conviendra d'arrêter le second antiplaquettaire pour ne conserver que l'aspirine (recommandations HAS 2013 (12)). Si le patient est sous héparine, le délai dépend du type d'héparine et d'une éventuelle insuffisance rénale : en cas d'héparines non fractionnées (HNF), l'arrêt doit durer 4 heures si la perfusion intraveineuse est continue ; la dernière injection doit intervenir 12 heures avant le geste si la voie est sous-cutanée ; en cas d'HBPM, la dernière injection doit être réalisée 12 heures avant le geste si le traitement est préventif et 24 heures avant si il est curatif (recommandations SFAR 2006 (13)). En cas d'AVK, la dernière prise doit se faire à J-4 ou J-5 selon le dernier INR, avec un éventuel relai par héparine avant le geste (HAS 2008 (14)). En cas d'AOD, la dernière prise intervient à J-3 pour le rivaroxaban et l'apixaban (J-4, voire J-5 pour le dabigatran) sans relai par héparine avant le geste (propositions GIHP 2015 (15)). Pour les autres traitements (fondaparinux, danaparoïde, argatroban), il convient de contacter un hémostasien. Si le geste doit être effectué en urgence, une prise en charge adaptée est à proposer (transfusion plaquettaire, concentré de complexe prothrombinique, vitamine K, idarucizumab) avec l'aide éventuelle d'un hémostasien, en évaluant au cas par cas le rapport bénéfice / risque pour le patient. Après le geste, une compression ferme doit être réalisée et il faut surveiller la survenue d'un éventuel hématome.

Il faudra également vérifier l'absence d'allergie aux produits utilisés, en particulier les anesthésiques de type xylocaïne/lidocaïne (sans adrénaline) et désinfectants cutanés (produits iodés).

Ces points 2 à 4 pourront être colligés dans un document type « revue de prescription ».

5) Mode opératoire

Le mode opératoire devra reprendre, outre des considérations générales, les modalités d'anesthésie et de réalisation technique du geste, le choix de trocarts adaptés au site de ponction et à l'âge du patient, la conduite à tenir en cas de difficulté ou d'incident, l'ordre de réalisation des prélèvements en cas d'échantillons multiples.

Chez l'enfant, la moelle osseuse devra être prélevée prioritairement par ponction dans la crête iliaque avant la puberté (1, 5, 16) ; la ponction sternale n'est tolérée que lorsqu'il a atteint sa morphologie adulte, après la puberté.

Les modalités d'anesthésie devront discuter les possibilités d'anesthésie locale par timbre transdermique (patch) (EMLA® ou équivalent) ou injection de xylocaine ou de lidocaine, et d'utilisation de gaz antalgiques (protoxyde d'azote type Entonox® ou Kalinox®) en ayant connaissance de leurs contre-indications (fournies également par le distributeur Air Liquide) (17).

Le mode opératoire devra détailler la position adoptée par le patient, avec le matériel nécessaire, un lit d'examen permettant le prélèvement. La réalisation technique du geste devra être évoquée avec nécessité d'une asepsie/stérilité : modalités, matériel utilisé pour la ponction médullaire (en cas d'usage, l'utilisation d'aiguilles pour ponction lombaire devra être justifiée), choix du site de ponction, ordre chronologique de réalisation des différents prélèvements (cytologie, phénotypage, cytogénétique et biologie moléculaire, congélation et enfin microbiologie). Il devra enfin mentionner les modalités de terminaison du geste, du nettoyage de la peau, de la réalisation du pansement et de l'information concernant sa surveillance. Le mode opératoire devra également préciser les modalités de transport des échantillons (lames de verre et tubes).

Enfin, un paragraphe doit être consacré aux difficultés éventuelles en cas de manifestations douloureuses, allergiques, de malaise avec les conduites à tenir face à ces différentes situations. Le mode opératoire devra donner des documents de référence. Le mode opératoire devra donner des documents de référence (3). Les décrets de 2005, 2006, 2009

concernant les prélèvements de moelle par les pharmaciens biologistes ont été remplacés récemment par le décret 2016-46 du 26 janvier 2016 (18) et la règle qui prévaut désormais est que « le biologiste pratique tous les prélèvements et actes nécessaires à la réalisation d'un examen de biologie médicale, sous réserve d'avoir la compétence ou la formation adéquate en rapport avec l'acte réalisé ». Le pharmacien peut prélever tout ce qui est nécessaire à de la biologie médicale (myélogramme par aspiration) et le médecin pourra en plus prélever ce qui relève de l'anatomopathologie (BOM).

Le GT/GFHC recommande que le personnel préleveur soit formé et habilité. Le patient devra recevoir une information préalable au geste et un consentement devra être obtenu de sa part. Les prélèvements devront être réalisés dans une salle médicalisée selon un mode opératoire enregistré. Les contre-indications au geste devront être systématiquement recherchées. Un interrogatoire et éventuellement un bilan biologique devront être effectués chez un patient à risque hémorragique. Une anesthésie locale est recommandée (accord professionnel fort).

B) Préparation des frottis

L'enquête des pratiques a confirmé que les étalements médullaires sont effectués par le préleveur au lit du patient dans une majorité de centres. Cependant, certains réalisent ou reçoivent des échantillons médullaires en suspension et exécutent leurs étalements de façon différée. Le frottis est la technique d'étalement médullaire très majoritairement mise en œuvre mais des « grumeaux » sont parfois écrasés, en complément. La lecture du myélogramme dépend fondamentalement de la qualité initiale de l'étalement. De plus, il existe des différences d'interprétation entre frottis et « grumeaux » écrasés, les deux techniques étant complémentaires (19-22). En cas de non réalisation des étalements par le biologiste, une sensibilisation voire une formation de l'opérateur (internes et étudiants en formation, prescripteur occasionnel non habitué…) est souhaitable afin de le sensibiliser à l'importance du geste et lui montrer ce qu'attend le futur lecteur (volume aspiré, qualité du frottis). La mise à disposition, sur le manuel de prélèvement par exemple, de photographies de frottis de bonne et mauvaise qualité est encouragée. En cas de BOM (biopsie ostéo-médullaire), on pourra soit déposer la goutte de moelle +/- liquide au bout de la carotte et faire un frottis, soit rouler doucement la carotte sur la lame de verre en prenant soin de ne pas la casser. En effet, la pratique d'empreintes à partir de BOM est parfois controversée par les pathologistes qui considèrent que celle-ci peut « vider » la BOM de ses cellules et interférer avec l'interprétation histologique. La qualité de l'empreinte est difficilement escomptable, aussi il est recommandé d'en faire deux, si possible (3).

Un nombre moyen de 7 frottis est considéré comme optimal (entre 4 et 10). Il faut éviter la réalisation d'un trop grand nombre de frottis car souvent une diminution de leur qualité est alors constatée. Les frottis doivent être séchés à l'air pendant quelques minutes, posés sur un plan horizontal. Aucun fixateur ne doit être utilisé, ce qui nécessite parfois une information auprès du préleveur. En cas de réception de moelle osseuse recueillie sur anticoagulant (EDTA le plus souvent), le délai d'étalement doit rester raisonnable et compatible avec l'absence d'artéfacts nuisant à l'interprétation (23). D'après l'expérience de certains membres du GT, on peut estimer à environ 24 heures ce délai. Au-delà, ou en raison de prélèvements venant de l'étranger pour expertise par exemple, la possibilité d'une lecture de qualité sera estimée par le biologiste qui assumera la responsabilité de la faisabilité du test. En effet, un délai de 24 heures ou plus génère des artéfacts qui doivent être connus du biologiste, mais qui ne devront pas obligatoirement être mentionnés dans le compte-rendu s'ils ne modifient pas l'hypothèse diagnostique.

L'identification des lames est le plus facilement, et donc le plus souvent, effectuée au crayon sur la partie dépolie de la lame de verre ou par gravure directe sur le verre en cas d'absence de partie dépolie. La gravure d'une identité complète est fastidieuse et génère des artéfacts (éclats de verre de petite taille) : elle doit donc être abandonnée (consensus fort). L'utilisation de lames de verre avec une partie dépolie est donc encouragée. Une alternative est le collage d'une étiquette de format adapté, en respectant l'étalement (risque de retrouver l'étiquette sur le frottis ou sous la zone de lecture… nécessitant éventuellement une information des préleveurs). Cette étiquette devra résister aux solvants et à l'huile d'immersion. Une étiquette débordant sur la face inférieure de la lame de verre ou sur ses côtés empêchera une mise au point micrométrique correcte. Dans un souci de sécurité et de non-contestation, il est aussi indispensable d'identifier la boîte de transport, le papier ou tout autre dispositif enveloppant les étalements. Un risque d'erreur d'identification est possible en cas de ponctions de moelle de plusieurs malades (salle dédiée à cet examen par exemple, transport global des échantillons). Une non-conformité doit donc être discutée si l'identification des frottis manque. L'ensemble pourra être regroupé dans des boîtes de transport ou des boîtes porte-lames de contenance variable, en carton ou en plastique qui devront être aussi identifiées. En cas de transport groupé (boîte porte-lames commune, par exemple), le biologiste préleveur prendra la responsabilité de ne pas mélanger les frottis réalisés à partir de la moelle de différents patients. En revanche, un absorbeur d'humidité ou un dispositif isotherme ne sont pas utiles dans la majorité des cas ; en cas d'utilisation d'un dis-

positif de transport, il faut vérifier qu'il ne génère pas d'eau de condensation. En milieu hospitalier, les frottis sont souvent regroupés dans une pochette scellée, elle-même identifiée. Le transport des frottis disposés en vrac ou dans un haricot est déconseillé, encore plus en l'absence d'identification (accord professionnel unanime). Le manuel de prélèvement précisera les conditions de stockage et d'acheminement des frottis.

Le myélogramme doit être considéré comme un « prélèvement précieux », ce qui justifie une dérogation à sa non réalisation en cas de non-conformité (notamment en cas d'absence d'identification). Il importe bien entendu de tout mettre en œuvre pour corriger une situation initialement non conforme. Cependant, tout doute sur l'identité des frottis ou du malade justifie le refus de réaliser le test.

Parfois, une aspiration de moelle osseuse est recueillie dans un tube EDTA et envoyée au laboratoire en supplément des frottis (3). Cet échantillon médullaire supplémentaire peut s'avérer utile s'il faut refaire des frottis (frottis complémentaires, écrasement d'un « grumeau », examen(s) cytochimique(s), voire collection,…). Il permettra aussi un complément d'investigation par un immunophénotypage (typage de blastes ou de cellules lymphoïdes, par exemple) ou des examens moléculaires, mais ces aspects sortent du cadre de ce référentiel. En revanche, l'anticoagulant peut compromettre la coloration et le recueil sur EDTA est à privilégier. L'utilisation d'héparine est possible mais est plus complexe. Le préleveur devra être sensibilisé à ne prendre qu'un volume réduit (pas plus de 0,5 cm^3) pour éviter une trop grande hémodilution et l'apparition d'artéfacts morphologiques (24).

Le GT/GFHC recommande que 6 à 8 frottis de qualité soient réalisés et si possible que 2 « grumeaux » soient écrasés. En cas de BOM, au moins 2 empreintes doivent être exigées. Une information auprès du préleveur pourra aider. Chaque frottis devra être identifié et transmis au laboratoire dans un conditionnement identifié (boîte de transport multilame, boîte porte-lames horizontale, emballage papier ou compresse,…). L'ensemble sera conditionné dans la pochette dédiée (ou autre modalité) pour le transport vers le laboratoire, elle-même identifiée. L'identité du patient sera écrite au crayon sur la partie dépolie de chaque lame de verre ou sur une étiquette collée de format adapté. Une non-conformité (non bloquante) devra être émise si l'identité manque et le prescripteur devra dans cette circonstance certifier celle-ci ; si elle reste douteuse, le test sera refusé (accord professionnel fort).

Le GT/GFHC considère qu'il peut être recommandé de joindre au frottis un peu (environ 0,5 mL/cm^3) de moelle que le laboratoire pourra utiliser à sa convenance en particulier pour la réalisation d'examens complémentaires utiles à la démarche diagnostique. La moelle devra alors être recueillie dans un tube avec anticoagulant (EDTA) (point laissé à l'initiative de chaque centre).

L'interprétation du myélogramme nécessite la connaissance de l'hémogramme du patient, datant de moins d'un mois si possible voire même de 2 jours pour l'*International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) (3), et l'observation directe des cellules sanguines (frottis sanguin conjoint). L'exigence de la prescription conjointe d'un hémogramme doit être précisée dans le manuel de prélèvement. Souvent, l'hémogramme est effectué dans le même laboratoire mais dans le cas contraire, il est alors parfois difficile de récupérer en temps utile le résultat de cet examen. Aussi, il est indispensable que le prescripteur renseigne alors des données sanguines minimales (hémoglobine, volume globulaire moyen, leucocytes et formule, plaquettes, et réticulocytes éventuellement) sur le bon de demande ou, mieux, joigne une copie du résultat de l'hémogramme effectué « en ville ». Une fiche de non-conformité (non bloquante) pourra être réalisée en cas d'indisponibilité d'un hémogramme. En cas d'analyse du myélogramme malgré l'absence d'hémogramme, l'attention du prescripteur devra être attirée par un commentaire sur la difficulté et les limitations d'interprétation de l'examen (1).

De même, en l'absence de renseignements cliniques ou de résultats indispensables à l'interprétation du myélogramme (électrophorèse des protéines, bilan martial, …) leur recherche active est conseillée. Elle semble d'ailleurs menée par une grande partie des laboratoires : appel du prescripteur ou du service clinique, consultation du dossier clinique informatisé,… En cas d'impossibilité, l'interprétation du myélogramme devra en tenir compte et le mentionner dans la conclusion de l'analyse. L'indication de l'examen (« question posée ») est indispensable (accord fort). La connaissance de l'action thérapeutique envisagée à la suite de l'interprétation de l'examen est utile pour l'interprétation. Le myélogramme doit être considéré comme une véritable consultation hématologique, et non comme un simple geste technique (1).

Le GT/GFHC invite à exiger la connaissance d'au moins un hémogramme récent pour l'interprétation du myélogramme. En cas d'impossibilité, une fiche de non-conformité (non bloquante) devra être établie et mentionnée dans le compte rendu. Par ailleurs, la fourniture d'un frottis sanguin est de bonne pratique si cet examen n'est pas effectué dans le même laboratoire (accord fort). La question posée par le prescripteur devra figurer sur la demande d'examen.

C) Acheminement vers le laboratoire

Le délai d'acheminement recommandé entre le moment du prélèvement et l'enregistrement au laboratoire est sans objet pour la conservation des frottis de moelle étalés sur des lames au lit du patient. En effet, non fixés, ils peuvent être conservés pendant plusieurs jours à l'abri de la poussière sans qu'aucune altération ne survienne, ce qui n'impose pas leur transmission en urgence du site préleveur vers le laboratoire. Il convient néanmoins de vérifier l'absence d'humidité dans les containers protégeant les frottis en cas d'une éventuelle transmission très différée. Le problème réel est le délai de réponse souhaité par le clinicien, qui peut varier de la nécessité d'un diagnostic urgent à une réponse différée. L'enquête a permis de constater que le délai médian d'acheminement au laboratoire varie suivant les configurations, entre 0 (prélèvement effectué sur place) et 8 heures, le délai médian étant d'environ 2 heures. Le temps d'acheminement devra en revanche prendre en compte la durée de conservation des éventuels tubes de moelle sur EDTA joints avec le myélogramme et destinés à la réalisation d'analyses complémentaires (phénotypage, extraction d'ARN, caryotype, congélation de cellules…). Un délai de 6 heures a alors été proposé (25).

Le GT/GFHC ne formule pas de recommandation sur le temps d'acheminement du myélogramme, qui relève de la politique de transport des examens de chaque centre et d'une éventuelle concertation entre le prescripteur et le lecteur. Ce délai devra tenir compte du délai de réponse souhaité.

D) Prise en charge au laboratoire

Lors de la réception de l'examen, tous les étalements sont triés, enregistrés (traçabilité de la réception) et traités par site de ponction (s'il y en a plusieurs, par exemple dans le cas de bilans d'extension de tumeurs). Entre 2 et 4 étalements pour chaque site sont le plus souvent choisis pour être colorés, en sélectionnant si possible les lames pour lesquelles l'étalement médullaire est homogène et les « grumeaux » sont présents dans les franges du frottis (absents chez le nourrisson, et mauvais témoins de la certitude d'un prélèvement de moelle : des étalements sans grumeaux peuvent être représentatifs et, avec « grumeaux », ils peuvent être hémodilués ou graisseux). Dans le cas d'empreintes, un seul étalement est sélectionné pour être coloré. Dans certaines indications (recherche de métastases, par exemple) l'ensemble des frottis devra être examiné. Ces attitudes sont laissées à l'initiative du biologiste.

Les frottis sont colorés selon une procédure standard type « May Grünwald Giemsa (MGG) » (26). La qualité de la coloration doit être contrôlée par un frottis test (sanguin, par exemple). La reproductibilité de la coloration doit être vérifiée à chaque changement de réactifs, surtout si elle n'est pas fréquemment réalisée (consensus fort). La rédaction d'un document attestant ce contrôle est préconisée dans l'esprit de la norme. En principe, les colorants doivent être renouvelés quotidiennement. L'utilisation d'un colorateur automatisé est possible à partir du moment où une coloration MGG respectant les concentrations et temps habituels est programmée (responsabilité du laboratoire). Le recouvrement par une lamelle du frottis coloré (lutage des lames) est laissé à l'initiative de chaque laboratoire.

Le GT/GFHC recommande la coloration des frottis suivant la technique MGG. Les autres frottis seront conservés, au moins la durée de l'examen plus quelques jours (pour des colorations complémentaires éventuelles). Tous les frottis devront être identifiés (selon les habitudes du laboratoire : nom écrit, étiquette, numéro,…).

Les étalements non colorés sont conservés en prévision de colorations cytochimiques éventuelles ou pour une nouvelle coloration MGG (qualité médiocre des frottis initiaux, bilan d'extension d'une néoplasie,…). Leur identification doit être vérifiée pour éviter tout risque de mélange avec les frottis d'autres patients (lames identifiées, paquet enveloppé étiqueté, ou pochette…).

Le myélogramme sera enregistré dans le système informatique du laboratoire (SIL) selon les procédures du laboratoire, une fiche technique précisant les modalités d'enregistrement étant souhaitable. Ces modalités sont propres à chaque centre et ne font pas l'objet de recommandations du GT/GFHC. Une revue de prescription (indication, délai de rendu souhaité,…) est nécessaire, soit idéalement au moment de la prise en charge pré-analytique au laboratoire, soit avant l'analyse cytologique par le biologiste. Les modalités de formalisation doivent être définies par le laboratoire.

VI. - ANALYTIQUE

A) Délai de prise en charge

Même si la plupart des examens peuvent être différés (*cf* situations d'urgence), il est d'usage qu'après réception au laboratoire, les examens soient pris en charge dans la journée ou le lendemain, permettant l'obtention du résultat dans les 24 à 48 heures. Certains centres ont une attitude particulière pour la gestion des week-ends et jours fériés, qui devra être définie dans le contrat avec les prescripteurs. Néanmoins, il est difficile en pratique de codifier ce point et le GFHC insiste sur la bonne pratique d'un dialogue prescripteur-lecteur pour

optimiser la validation du test en temps utile. Le délai devra être conditionné par l'urgence de la situation clinique. Pour une prescription connectée ou des renseignements à cocher sur la pochette d'emballage, le GFHC suggère de demander le délai attendu de réponse en ½ journée (par exemple : « réponse souhaitée dans la ½ journée, dans la journée, différée possible) si une concertation avec le prescripteur est difficile à organiser.

Le GT/GFHC recommande, dans la mesure du possible, une prise en charge de l'examen dans les 24 heures après réception dans les situations non urgentes. En cas d'urgence, la prise en charge doit bien entendu être la plus rapide possible, suivant les modalités prévues par chaque laboratoire. Néanmoins, une information plus précise obtenue par un dialogue avec le prescripteur prime sur toute autre attitude (contrat clinico-biologique). Pour les week-ends et jours fériés, les modalités de prise en charge doivent être connues des prescripteurs en fonction des spécificités locales. De manière globale, le délai sera à adapter à l'urgence de la situation clinique (accord fort).

B) Lecture microscopique

Le myélogramme devra être examiné par une (ou plusieurs) personne(s) habilitée(s). Un microscope optique comprenant au minimum un objectif de faible (x10 ou x20), moyen (x40, x50 ou x63) et fort grossissement (x100) est nécessaire. Outre le grossissement, il importe de s'assurer aussi de la qualité de la résolution fournie par les objectifs (résolution de ± 200 nm pour une ouverture numérique élevée, ≥ 1,0) (27).

L'observation microscopique comporte deux temps : le premier, réalisé à l'aide d'un objectif assurant un faible grossissement, apprécie la cellularité de l'étalement (ainsi que celle de la lignée mégacaryocytaire et des autres éléments de grande taille) et détecte les anomalies évidentes ; le second, exécuté avec les objectifs permettant un moyen et fort grossissements, décompte les cellules et recherche des anomalies morphologiques détaillées. Plusieurs textes généraux ont été publiés en français, auxquels le lecteur pourra se référer (25, 28, 29, 30).

1) Appréciation générale des lames

Dans un premier temps, la qualité de la coloration MGG est vérifiée rapidement par une observation microscopique à faible grossissement des lames.

a) Densité cellulaire (« cellularité », « richesse »)

La moelle est normalement « riche ». La densité cellulaire normale a été proposée comme comprise entre au moins 30 et 60 cellules nucléées par champ au grossissement x100, mais elle dépend de l'âge (31). De plus, l'appréciation de la richesse varie d'un laboratoire à l'autre. Certains la quantifient (avec un score, lui-même variable, mais souvent de 0 à 5), d'autres l'évaluent semi-quantitativement (0/+/++/+++), les deux systèmes étant parfois simultanés. Dans la mesure où ces appréciations dépendent des observateurs, la richesse est aussi souvent exprimée par des adjectifs : désertique, pauvre, diminuée, normale, augmentée… et parfois en complément du score. Afin de pallier un défaut de référentiel, le GFHC a validé des exemples de différentes cellularités (se référer aux planches photographiques disponibles).

Le GT/GFHC recommande une appréciation semi-quantitative de la cellularité, claire (adjectifs, et ne pas multiplier les sous-catégories). Par exemple : désertique, pauvre, diminuée, normale, augmentée. Afin d'améliorer la reproductibilité, un étalonnage avec les planches de référence pourra être effectué.

b) Densité en mégacaryocytes

Le nombre de mégacaryocytes est difficile à apprécier. Quantitativement, le chiffre de 1 mégacaryocyte pour 1 000 cellules constitue un ordre de grandeur mais il est inexploitable en pratique. L'estimation de la richesse en mégacaryocytes sur un frottis est effectuée semi-quantitativement par la grande majorité des biologistes, mais selon des modalités hétérogènes, par champ ou sur la totalité de l'étalement. L'appréciation de la richesse normalement attendue est très subjective, variant de 1 à 2 mégacaryocytes à 3 à 4 par champ au grossissement 10, ou bien de 5 à 40 mégacaryocytes sur la totalité du frottis. Ces déclinaisons nuisent à la reproductibilité de la quantification. Une appréciation semi-quantitative est la seule alternative pratique.

La lignée mégacaryocytaire est constituée de quatre stades morphologiquement reconnaissables : mégacaryoblaste, mégacaryocyte basophile, mégacaryocyte granuleux, mégacaryocyte thrombocytogène. La description de la répartition de ces 4 stades n'a pas d'intérêt le plus souvent, sauf en cas de déséquilibre de maturation (par exemple, excès de mégacaryoblastes) ou pour statuer sur le caractère périphérique d'une thrombopénie (mégacaryocytes augmentés, de morphologie normale, présents à tous les stades de maturation y compris thrombocytogène). Les particularités et anomalies morphologiques éventuelles sont signalées, en particulier pour statuer sur la présence d'une dysmégacaryocytopoïèse. Celle-ci sera considérée comme significative si elle concerne plus de 10 % des cellules (et idéalement à partir de l'observation minimale de 30 mégacaryocytes – recommandations OMS 2008), ce qui sous-entend l'examen de nombreux mégacaryocytes et une interprétation

prudente si ceci est impossible. Certaines équipes ont proposé d'élever ce seuil à 40 %, notamment en cas de dysmégacaryopoïèse isolée.

À titre d'information, une étude (CHU de Tours) a évalué le nombre de mégacaryocytes sur un frottis « habituel », selon la richesse aux alentours de (5e-95e percentiles) : 5 à 130 pour une moelle de richesse diminuée, 35 à 360 pour une moelle de richesse normale, 160 à 820 pour une moelle de richesse augmentée. Ce travail n'a pas été vérifié par le GT/GFHC.

La présence de fibrine est parfois constatée. Elle témoigne d'un processus de coagulation qui peut influer sur le nombre et la morphologie des mégacaryocytes. La mention de la présence de fibrine dans le compte rendu est optionnelle et est laissée au libre choix du laboratoire. Un commentaire pondérant la densité des mégacaryocytes doit être effectué si ce point est d'importance (par exemple, absence de mégacaryocytes au cours d'un purpura thrombotique idiopathique).

Le GT/GFHC recommande :
- ***Une appréciation des mégacaryocytes semi-quantitative, claire (adjectifs), reproductible (ne pas multiplier les sous-catégories). Par exemple : non observés, très rares, diminués, normaux, nombreux, augmentés.***
- ***La description des anomalies morphologiques éventuelles (dysmégacaryocytopoïèse si ≥ 10 % des mégacaryocytes concernés).***

c) Autres cellules

La présence de cellules rares ou extra-hématopoïétiques est indiquée de manière hétérogène suivant les laboratoires. Elles peuvent être présentes normalement (macrophages,…) ou bien anormalement (métastases,…). La plupart des laboratoires indiquent la présence de mastocytes avec une appréciation semi-quantitative ; il en est de même pour les histiocytes/macrophages avec, en supplément, un commentaire en cas de suspicion de syndrome d'activation macrophagique. La présence d'ostéoclastes ou d'ostéoblastes, de cellules graisseuses (adipocytes), de cellules endothéliales est précisée par une minorité de laboratoires. En revanche, toutes ces cellules deviennent systématiquement mentionnées si leur présence est significative ou pathologique. Par exemple, en cas de mastocytes pathologiques, pour lesquels le seuil de 20 % a défini l'entité « leucémie à mastocytes », un décompte est nécessaire. L'existence de macrophages, d'ostéoblastes ou d'ostéoclastes est importante à considérer dans l'interprétation des moelles pauvres ou désertiques (hémodilution *versus* aplasie).

La présence éventuelle d'éléments pathologiques de grande taille, hématopoïétiques (cellule de Sternberg, cellules de surcharge par exemple) ou extra-hématopoïétiques (amas de cellules métastatiques ou de cellules de métastases isolées) doit bien entendu être signalée ainsi que celle de parasites (leishmanies ou autres) (32, 33).

Le GT/GFHC recommande :
- ***De rechercher systématiquement des amas cellulaires au petit grossissement microscopique.***
- ***De signaler toute anomalie pouvant influencer l'interprétation (et le diagnostic).***
- ***De mentionner l'existence de mastocytes et de macrophages, avec une appréciation semi-quantitative (exceptionnellement quantitative) s'ils sont pathologiques. Pour les autres cellules (adipocytes, ostéoblastes/clastes, cellules endothéliales), le choix est laissé au laboratoire de les mentionner ou non, leur importance clinique étant mineure.***

2) Décompte et recherche des anomalies morphologiques

Cette lecture s'effectue à l'aide d'objectifs à moyen ou fort grossissements après avoir choisi les zones du frottis où l'étalement des cellules est convenable en densité et en qualité. Il n'existe pas de consensus international concernant le nombre de cellules à compter : l'OMS recommande 500 cellules en cas de dysplasie (34), l'ICSH, un minimum de 500 cellules sur au moins deux frottis mais pondère sa recommandation en diminuant ce nombre à 300 si le décompte des cellules n'est pas essentiel au diagnostic (3). L'attitude des biologistes francophones est hétérogène en fonction des indications et/ou de la densité cellulaire du test. Une attitude rigide sur un nombre précis de cellules à identifier est écartée par le GT. En revanche, un décompte sur un minimum de 200 cellules (sauf exception) est préconisé pour ne pas sous-estimer par une appréciation uniquement quantitative les évènements rares. Le GT insiste sur la connaissance de l'influence du nombre de cellules comptées pour l'interprétation de l'intervalle de confiance d'un pourcentage donné. Si ce pourcentage est proche d'un seuil décisionnel (blastose à 5, 10, 20 % par exemple) un décompte de 500 cellules est conseillé. Une documentation du risque statistique est proposée dans l'un des articles suivants.

Le GT/GFHC ne préconise pas un nombre précis de cellules à identifier et laisse la liberté à chaque biologiste d'adapter son décompte au cas par cas. En revanche, le GT rappelle la limite d'un pourcentage donné si le nombre d'évènements comptés est faible. Sans rigidité, le GT recommande dans les situations anormales de compter sur chaque frottis, si possible 200 à 250 cellules, pour visualiser au total 400 à 500 cellules. En cas de frottis pauvre, un décompte d'au moins 100 à 200 cellules reste conseillé. En cas de frottis quasi désertique, un commen-

taire qualitatif précisant que de rares cellules sanguines/médullaires (préciser lesquelles) sont observées suffit (sans établir de pourcentage). En cas de frottis désertique, sans grains médullaires observables, la mention « frottis ne comportant pas de cellules médullaires, contrôle recommandé » sera indiquée dans la conclusion et suffira. Enfin, le GT rappelle les préconisations OMS 2008 de compter 500 cellules en cas de dysplasie.

Après avoir parcouru plusieurs champs microscopiques, on pourra alors :

- Signaler toute anomalie morphologique des lignées leucocytaire, érythrocytaire et plaquettaire (les anomalies des hématies et des plaquettes seront idéalement observées sur le frottis sanguin).
- Donner le pourcentage des éléments cellulaires de chaque lignée.
- Interpréter ces résultats avec les renseignements cliniques transmis, l'hémogramme et la morphologie sanguine afin d'émettre des hypothèses diagnostiques.

Le SIL des laboratoires devrait pouvoir permettre le plus possible une saisie directe des chiffres qui donnent les pourcentages et éventuellement des commentaires. Sinon, le décompte « manuel » sera recopié dans le SIL et nécessitera alors une phase de vérification (obligation de la norme). En cas d'analyse et de saisie des résultats par une même personne, le GT estime que la vérification lors de la signature électronique du compte rendu fait office de « double saisie » et garantit la conformité du compte rendu (sous la responsabilité du biologiste).

En cas d'échanges d'avis entre biologistes habilités en cytologie, une trace devra être enregistrée dans le SIL (dans la rubrique signataires, par exemple, pour identifier les lecteurs). En cas de double comptage, une trace papier ou informatique (autre colonne de données numériques, par exemple) est attendue sans pour autant la mentionner sur le compte-rendu.

VII. - EXPRESSION DES RÉSULTATS, COMPTE RENDU

Chaque laboratoire a des modalités spécifiques qui dépendent des habitudes (laboratoires et cliniciens) et des possibilités offertes par le SIL. Le GT/GFHC ne s'est pas donné pour mission de réformer ces habitudes. Il rappelle simplement la nécessité évidente d'être en accord avec les préconisations de la norme.

En revanche, le compte rendu devra mentionner :

1) Des renseignements administratifs

- Papier à en-tête du laboratoire (nom des biologistes, optionnel) ;
- Identité, date de naissance du patient (âge en clair, optionnel) ;
- Service prescripteur, nom du médecin prescripteur, nom du destinataire ;
- Date et heure de prélèvement, date et heure d'enregistrement ;
- Date et heure d'édition (impression informatique).

2) Des renseignements médico-techniques :

- Indication du prélèvement (accord fort), renseignements cliniques minimaux (si absents indiquer « non renseignés », optionnel) ;
- Site de ponction (si absent indiquer « non renseigné »), dureté de l'os (optionnel), type de l'étalement (frottis, grumeaux écrasés, empreinte BOM) ;
- Non obligatoire : matériel utilisé, type de coloration.

3) Compte rendu cytologique

- Nombre de cellules comptées (optionnel mais permet d'interpréter l'intervalle de confiance des % rendus, en particulier pour un nombre de cellule à la limite d'un seuil décisionnel).
- Densité cellulaire (« richesse »).
- Densité mégacaryocytaire.
- Chaque catégorie de cellules est rendue en pourcentage :
  - blastes (le GFHC a préconisé d'appeler blaste toute cellule immature, bénigne ou maligne) (25) ;
  - lignée granulocytaire (myéloblastes, promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, polynucléaires neutrophiles) ;
  - lignée érythroblastique (proérythroblastes, érythroblastes basophiles, érythroblastes polychromatophiles, érythroblastes acidophiles) ;
  - lignée éosinophile (myélocytes, métamyélocytes, polynucléaires, détail en sous-catégories optionnel) ;
  - lignée basophile (myélocytes, métamyélocytes, polynucléaires ; détail en sous-catégories optionnel) ;
  - lignée monocytaire (monocytes ; monoblastes et promonocytes si présents). Pour les promonocytes, ils peuvent être intégrés aux blastes en fonction du contexte (*cf* recommandation OMS) ;
  - lignée lymphoïde (lymphocytes, plasmocytes ; lymphoblastes si présents).

En cas de pathologie maligne, le GT laisse liberté à chacun de classer les blastes dans une catégorie à part – *cf* OMS – ou de les intégrer dans les catégories myéloblastes, monoblastes, lymphoblastes. En revanche, aucune ambiguïté ne devra exister dans la conclusion commentée de l'examen.

- Les cellules rares sont estimées de façon semi-quantitative.

- Les anomalies érythrocytaires éventuellement observées peuvent être notées (dacryocytes, par exemple), de même pour les plaquettes. Mais les étalements médullaires ne sont pas les matériaux de référence pour ces particularités. En conséquence, il reste de la responsabilité du biologiste de vérifier leur présence sur le frottis sanguin, et de les noter sur l'hémogramme.

- La conclusion mentionne :
  - Les anomalies morphologiques significatives.
  - La (les) hypothèse(s) diagnostique(s).
  - Les examens complémentaires à effectuer.
  - La classification ADICAP (Association pour le développement de l'informatique en cytologie et en anatomie pathologiques) hématologie (optionnel).

L'ensemble des données est validé dans le SIL, parfois également sous forme d'un compte rendu papier destiné au service clinique. Pas de recommandations du GT qui prend en compte les spécificités de chaque centre.

Les résultats sont rendus avec un avertissement particulier lorsque le frottis est ininterprétable pour des raisons telles qu'un mauvais prélèvement (dilution sanguine), un frottis mal étalé (trop épais), un état pathologique de la moelle (fibrose)… La raison de cette précaution doit être signalée dans le commentaire du résultat.

Toute discussion (échange d'avis entre cytologistes et histologistes ; discussion de dossiers au niveau local ou régional) ; réunion de concertation pluridisciplinaire ; demande d'avis auprès d'experts confirmés ; système ANDRAL du GFHC,…) devra être mentionnée dans le SIL et le GT encourage (sans obligation) qu'elle figure dans le compte rendu.

Les valeurs de référence, souvent anciennes, ne sont pas consensuelles et ont été généralement fixées à partir de petites séries de sujets. Même sans divergences rédhibitoires, il est difficile de statuer. À titre documentaire, le GT a établi une compilation de ces données et proposé une synthèse validée par l'expérience des participants au GT (*cf* article « Valeurs de référence »). En revanche, ***le GT estime que la mention de valeurs de référence dans le compte rendu est laissée à l'initiative de chaque centre, et que celles-ci peuvent même être non précisées si les remarques de conclusions signalent explicitement tout déséquilibre des pourcentages affichés.***

En cas de compte rendu adressé au patient (myélogramme réalisé en laboratoire de ville, ou en secteur hospitalier pour des consultations extérieures, par exemple), il conviendra de s'assurer que le mode de transmission (simple courrier,…) et le type d'édition (conclusion *in extenso*) sont bien appropriés pour informer le patient d'une éventuelle pathologie. Une édition différentielle invitant le patient à contacter le prescripteur pour être informé des résultats complets est une option à discuter en cas de compte-rendu mentionnant explicitement le diagnostic d'une pathologie grave.

A) Délai de réponse

Le document cadre de l'ICSH recommande l'édition d'un compte rendu écrit dans les 24 heures pour les urgences mais tolère un délai de 48 heures et valide un délai de 5 jours en particulier quand la lecture d'une BOM est associée (3). L'enquête des pratiques du GFHC a montré que le délai de transport vers le laboratoire restait court (médiane estimée à environ 2 heures), permettant une réponse du test dans les 24 heures pour la majorité des situations et dans les 48 heures pour celles restantes. Néanmoins, le GT refuse d'imposer des délais précis, incompatibles avec l'organisation propre de chaque laboratoire. Il encourage un contact avec le prescripteur pour évaluer le délai attendu, en particulier en cas de diagnostic de maladie maligne, et le délai de prise en charge thérapeutique souhaité. Ce délai doit rester compatible avec le fonctionnement habituel du laboratoire.

Le GT/GFHC préconise en premier lieu un délai de réponse adapté aux attentes du prescripteur (dialogue clinico-biologique) et à l'urgence de la situation clinique. Une réponse en deux temps est possible, en particulier si des explorations complémentaires sont effectuées (cytochimies, immunophénotypage…).

B) Contrôle(s) de qualité

Le myélogramme est un examen pouvant être de reproductibilité médiocre au vu de la multiplicité des catégories cellulaires et des dystrophies éventuelles pouvant être la source de confusions entre types cellulaires. Afin d'assurer la reproductibilité interobservateurs (intracentres et intercentres), des exercices sont souhaitables et les revues de cas difficiles sont encouragées.

La pratique d'un contrôle interne de qualité (CIQ) intralaboratoire est déjà mise en place par quelques laboratoires, surtout des CHU, en particulier pour vérifier la concordance des résultats lorsque plusieurs cytologistes participent à l'activité. Plusieurs réseaux interlaboratoire se sont constitués, régionaux le plus souvent. Ces échanges bénéficient d'une très forte adhésion de la part des participants.

Des échanges externes d'avis entre biologistes et experts peuvent être envisagés également et font partie intégrante de ces exercices (réseau ANDRAL proposé par le GFHC, par exemple). Ils seront tracés dans le SIL.

Une évaluation externe de la qualité (EEQ) est désormais rendue obligatoire. Actuellement, sont utilisés en pratique : association Biologie Prospective-CTCB, association Biologie Praticienne, Contrôle National Belge. Dans toutes les configurations, une correction du test est remise à chaque laboratoire participant, le situant par rapport aux résultats fournis par l'expert et les autres laboratoires. Ces fichiers devront être archivés dans le SIL du laboratoire ou dans un classeur spécifique.

Le GT/GFHC encourage dès que possible la participation à des exercices de qualité. Si l'activité est partagée entre plusieurs biologistes, un test intra-laboratoire est recommandé. Dans le cadre d'échanges de proximité (CHU, CH et laboratoires libéraux, par exemple) un exercice interlaboratoires est encouragé. Il peut être commun avec le test intralaboratoire. La fréquence de ce test devra être au moins biannuelle. L'inscription à un contrôle national est obligatoire d'après la norme, avec libre choix du laboratoire entre les propositions existantes. Tous les échanges internes et contrôles de qualité seront archivés selon la procédure de gestion des enregistrements des laboratoires.

VIII. - CONDITIONS DE STOCKAGE, D'ARCHIVAGE ET D'ÉLIMINATION DES ÉCHANTILLONS

Les modalités d'archivage concernent les frottis et les résultats. Pour les frottis, elles sont très diverses tant en ce qui concerne le conditionnement (boîte, carton, lamothèque…), que la nature des frottis (sang, cytochimies, autres documents...) et même le nombre de frottis (une lame à l'ensemble des lames, frottis colorés et frottis non colorés). Dans la mesure du possible, la majorité des centres garde les documents colorés associés aux colorations complémentaires, surtout en cas de pathologie, et encore plus en cas de diagnostic initial. Les obligations réglementaires sont mal définies. La nature des documents à conserver reste imprécise. Le bon sens recommande de conserver au moins un frottis coloré pour chaque patient avec les cytochimies complémentaires éventuelles et, si possible, le frottis sanguin correspondant. La durée légale d'archivage du test est de 20 ans. L'ICSH recommande d'archiver les frottis colorés au moins pendant cette durée et, si possible, indéfiniment (3). Pour le cas particulier de la pédiatrie, certains laboratoires préfèrent garder les dossiers durant 30 ans dans la mesure où un patient peut consulter son dossier médical à partir de sa majorité et jusqu'à 10 ans après. L'archivage concerne les frottis colorés (MGG et cytochimies) mais également, si possible, quelques lames natives (non colorées) pouvant servir à des tests ultérieurs (MGG complémentaire, coloration de Perls et cytochimies, récupération de cellules par grattage pour examens moléculaires,…). Cependant, la dégradation assez rapide (quelques mois) des frottis non fixés et non colorés peut rendre illusoire l'intérêt de les conserver. Certains centres stockent des frottis natifs emballés dans de l'aluminium et congelés à -20° C. Cette procédure permet d'allonger la sauvegarde des frottis pour le MGG, la coloration de Perls mais pas pour l'immunocytochimie. Les frottis peuvent être maintenus dans des pochettes plastiques ou cartonnées, des classeurs, des boîtes… suivant les habitudes du laboratoire, à température ambiante (pas de recommandation particulière). La seule limitation, de bon sens, est d'avoir un archivage pratique et précis permettant de retrouver les examens en cas de nécessité. La réalisation, la traçabilité de ces conditions devra être rédigée (EN ISO 15189). Les lames de verre seront éliminées dans des containers biologiques dédiés après la date limite de conservation.

Pour les résultats, on peut penser que tous les laboratoires sauvegardent informatiquement désormais les résultats (serveur du laboratoire et/ou du centre), le plus souvent sans limitation de durée. Certains laboratoires continuent à conserver les documents papier (feuilles de paillasse, compte rendus) souvent avec un problème d'encombrement à terme qui définit alors la durée de conservation… Cette pratique est probablement inutile si la sécurité d'un stockage informatique pérenne est assurée. Il est conseillé de garder temporairement les données de saisie manuelle sur papier, en l'absence d'avis définitif du Cofrac.

Le GT/GFHC recommande au minimum :

- ***D'archiver un frottis coloré (MGG) et toutes les cytochimies complémentaires avec, si possible, un frottis sanguin correspondant, pour une durée de 20 ans.***
- ***D'archiver les comptes rendus suivant les habitudes de chaque centre, mais en précisant les conditions de stockage locales, et en accord avec les obligations de la norme.***

A) Sécurité

Les précautions de sécurité ne nécessitent pas de mesures spécifiques une fois le frottis étalé. Le risque infectieux est quasiment nul et est exclu après fixation puis coloration par le MGG. Il existe un risque mécanique de coupure avec les lames en verre tout au long du processus. On doit donc porter attention à ce point lors des différents stockages (supports résistants et protégeant du bris des lames de verre) et de l'élimination des déchets (containers évitant les coupures de tout personnel manipulateur).

B) Habilitation

La lecture de myélogramme est autorisée à tout biologiste titulaire du Diplôme d'Études Spécialisées (DES) en Biologie Médicale. Mais aussi, en particulier pour les services universitaires, aux internes en formation en Biologie médicale et en Hématologie clinique qui peuvent être habilités. Il est souhaitable néanmoins d'avoir effectué un parcours spécialisé en hématologie. Actuellement, l'acquisition des compétences pour le myélogramme relève des stages effectués pendant la phase « d'approfondissement » ou de « consolidation » (ex « niveau 2 »). La formation initiale (au cours de l'internat) relève de chaque faculté et le GFHC n'a pas pour mission d'interférer. En revanche, on ne peut que souligner l'importance d'un tutorat de plusieurs mois avec un senior, avec contre signature des examens par exemple. L'utilisation d'un microscope multitête est alors facilitante. La participation aux CIQ et EEQ fait partie de la formation. Il existe également des sites virtuels d'apprentissage (Hematocell, Tribvn, par exemple) (35). La lecture de boîtes de frottis préparées relève de l'initiative de chaque laboratoire.

Il reste néanmoins évident que la qualité de lecture et d'interprétation du myélogramme est conditionnée par l'expérience acquise. La quasi-unanimité des participants à l'enquête fixe à au moins une lecture hebdomadaire, voire quotidienne, pour considérer le test comme faisant partie des habitudes. À l'autre extrémité, pour les indications « difficiles » (régulièrement rencontrées en CHU), une expérience de plusieurs années de pratique est recommandée. La majorité des biologistes « acteurs » témoigne de la nécessité d'une expérience permanente – renouvelée sur plusieurs mois – avec participation régulière à des ateliers ou à des confrontations pour rester dans le cadre du maintien des compétences. Des ateliers de morphologie existent, présentiels ou à distance via des échanges numérisés, parfois proposés dans le cadre du DPC (actions du GFHC, du Collège des Hôpitaux Généraux, Belgique…). De nombreux centres travaillent déjà en réseaux plus ou moins formalisés pour les cas problématiques (cytologistes référents dans certains domaines comme la pédiatrie par exemple, ANDRAL, Jeudis de cytologie à l'hôpital Cochin et avec le site Tribvn…). Les biologistes de laboratoires polyvalents (souvent un seul est spécialisé en Hématologie) demandent fréquemment des avis dans les CHU. Cette notion de correspondants / réseaux et de demande d'un deuxième avis pour les cas problématiques doit être encouragée, en particulier pour les centres avec peu de demandes, mais surtout doit être formalisée. La participation à un réseau, à des ateliers pratiques, à un contrôle régional, à un EEQ (avec preuves gardées) est considérée comme un atout fort par le GT et témoigne de la qualité du service rendu par le biologiste.

Une fiche d'habilitation devra être validée avec un maintien de compétence programmé. Pour les centres où la lecture des myélogrammes pendant les périodes de garde/astreintes est effectuée par des biologistes non spécialisés en morphologie, le rendu du test relève de la responsabilité de l'exécutant. Une réhabilitation du lecteur est à prévoir en cas d'absence de pratique de plus de 6 mois.

Le GT/GFHC recommande une pratique régulière de la lecture du myélogramme pour garantir une certaine compétence, mais refuse de subordonner le maintien de cette compétence à la lecture d'un nombre minimal d'examens à partir du moment où une formation initiale correcte et une participation régulière à des ateliers pratiques sont suivies (DPC ou hors DPC). Néanmoins, aucune obligation réglementaire n'est requise. Le travail en réseau est encouragé. Une information auprès des prescripteurs devra être effectuée en cas de lecture par des biologistes moins spécialisés (gardes et astreintes en particulier).

IV. - PRÉSENTATION À L'ACCRÉDITATION

Le GT propose de présenter le myélogramme comme une analyse qualitative, en détaillant particulièrement l'analyse de risques et les points critiques du test : identitovigilance (du patient puis des étiquettes) ; préparation, information et prélèvement (patient) ; dispositifs de recueil du prélèvement (tubes) ; transport (délai d'acheminement des prélèvements) ; pré-traitement (coloration des frottis) ; matériel d'observation (microscope) ; incertitude de mesure (lecteurs) ; compétences du personnel (prélèvement et lecture du test) ; système informatique (gestion du rendu des résultats) ; délai de rendu post-analytique (notamment pour les myélogrammes urgents). L'échelle de criticité est laissée à l'appréciation de chaque centre.

Le GT/GFHC recommande une présentation qualitative du myélogramme pour l'accréditation, avec une analyse précise des risques et des points critiques du test (accord fort).

X. - COTATION

Le myélogramme est actuellement coté B100 (B = 0,27 €, soit 27 € pour les départements métropolitains ; 0,31 € pour les Antilles ; 0,33 € pour la Guyane et la Réunion) et B2000 en Belgique. Au cours de l'enquête préalable, les participants ont jugé cette cotation en désaccord avec le temps passé, le niveau d'expertise souvent requis, la discussion fréquente consécutive avec les prescripteurs, la demande éventuelle de relecture, la responsabilité de diagnostics parfois lourds de conséquences, etc. Le GFHC insiste sur le fait que le myélogramme est plus qu'un acte technique, il constitue une véritable consultation hématologique (1).

Il faut aussi prendre en compte la nécessité de désormais compléter la lecture par une quantification précise de cellules. L'OMS et le GFM préconisent une lecture de 500 cellules pour quantifier les blastes et les monocytes. En effet, les seuils de 5 %, 10 % et 20 % conditionnent les diagnostics et par conséquent orientent vers des prises en charges thérapeutiques différentes. Une description précise de la dysplasie est demandée par l'OMS et le GFM (≥ 10 % ou ≥ 50 % de cellules anormales pour affirmer une dysmyélopoïèse dans le cadre d'un SMD ou d'une leucémie aiguë). L'inclusion dans des protocoles thérapeutiques nécessite souvent une lecture précise des anomalies, avec discussion consécutive lors des réunions de concertation pluridisciplinaire avec les cliniciens, majorant ainsi le temps consacré à cet examen. La relecture du myélogramme est parfois demandée (discordance avec la symptomatologie clinique, apparition de données cliniques nouvelles, rechute d'hémopathie,...) et non cotée. La cotation serait à revaloriser à B500. Un supplément de cotation en fonction du temps passé à l'interprétation est souhaité.

Le GT/GFHC émet le souhait de reconsidérer la cotation du test et la prise en compte d'expertises additionnelles (quantification de la dysplasie, nouveau diagnostic, diagnostic d'hémopathie, relecture).

Participants aux réunions du groupe de travail ayant abouti à la rédaction du texte proposé :

Isabelle AMOUROUX (Rambouillet)
Valerie ANDRIEU (APHP Bichat-Claude Bernard, Paris)
Maud ARPIN-BONNET (Marseille)
Véronique BACCINI (Aix-en-Provence)
Francois BAILLY (Dijon)
Brigitte BARDET (Bourg-en-Bresse)
Valérie BARDET (Cochin, Paris)
Lucile BASEGGIO (Lyon)
Yaël BERDA-HADDAD (Marseille)
Florence BLANC JOUVAN (Annecy)
Cécile BOSSARD (Lyon)
Caren BRUMPT (APHP Lariboisière, Paris)
Caren BRUMPT (APHP Lariboisière, Paris)
Béatrice CARON SERVAN (Pontoise)
Bernard CHATELAIN (Namur, Belgique)
Marc CHATELAIN (Namur, Belgique)
Jean-François CLASSEN (Arlon, Belgique)
Edouard CORNET (Caen)
Jean Paul COUAILLAC (Cahors)
Sylvie DALIPHARD (Rouen)
Marie DAUTEL (Cholet)
Elodie DINDINAUD (Poitiers)
Odile FENNETEAU (APHP Robert Debré, Paris)
Anne-Cécile GALOISY (Strasbourg)
Franck GENEVIEVE (Angers)
Remi GENEWE (Nancy)
Luc-Marie GERLAND (Lyon)
Sandrine GIRARD (Lyon)
Eric GUIHENEUF (Amiens)
Jean-Pierre HURST (Le Havre)
Véronique KIRCHGESNER (Chalon-sur-Saône)
Béatrice LELOUP-POILANE (Saint-Brieuc)
Bruno LANSON (Pont-l'Abbé)
Pierre LEMAIRE (Le Mans)
Jean-François LESESVE (Nancy)
Vincent LEYMARIE (Brive-la-Gaillarde)
Daniel LUSINA (Bobigny)
Béatrice LY-SUNNARAM (Rennes)
Karim MALOUM (APHP Pitié-Salpétrière, Paris)
Jean-Michel MARTELLI (Meulan-lès-Mureaux)
Annie MOTARD (Fréjus-Saint-Raphaël)
Vanessa NIVAGGIONI (Marseille)
Mélanie PANNETIER (Reims)
Benoîte PEREZ (Le Mans)
Stéphanie POULAIN (Valenciennes)
Claude PREUDHOMME (Lille)
Emmanuelle RAULT (Tours)
Jean-Baptiste RIEU (Toulouse)
Gérard SEBAHOUN (Marseille)
Valérie SOENEN (Lille)
Françoise SOLLY (Saint-Étienne)
Isabelle SUDAKA (Nice)
Franck TRIMOREAU (Limoges)
Xavier TROUSSARD (Caen)
Orianne WAGNER-BALLON (Créteil)
Soraya WUILLEME (Nantes)
Marc ZANDECKI (Angers)

Remerciements

Le support de la société Siemens (Saint-Denis) a été important pour l'organisation matérielle des réunions (groupes de travaux, organisation des réunions) pendant les deux années de mise en place. Le Professeur Thomas Lecompte (Genève), les Docteurs Emmanuel de Maistre (Dijon) et Valérie Eschwège (Nancy) ont relu les recommandations pour les prélèvements chez des patients avec traitements. Valérie Eschwège a vérifié les textes officiels statuant sur les gestes de prélèvements par les pharmaciens. Le Docteur Chantal Brouzes a vérifié attentivement l'ensemble du manuscrit et les articles associés.

Références Bibliographiques

(1) Bain BJ. Bone marrow aspiration. *J Clin Pathol* 2001 ; **54** : 657-63.

(2) Bain BJ. Bone marrow trephine biopsy. *J Clin Pathol* 2001 ; **54** : 737-42.

(3) Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC; International Council for Standardization In Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol* 2008 ; **30** : 349-64.

(4) Bowman WD Jr. Abnormal ("ringed") sideroblasts in various hematologic and non-hematologic disorders. *Blood* 1961 ; **18** : 662-71.

(5) Letestu R, Valensi F. La ponction aspiration médullaire à visée diagnostique. *Ann Biol Clin* 2003 ; **61** : 655-65.

(6) Décret n°2005-1382 du 4 novembre 2005 relatif aux prélèvements de moelle osseuse en vue d'analyses de biologie médicale effectués par les pharmaciens biologistes et complétant le Code de la santé publique.

(7) Arrêté du 3 janvier 2006 fixant le contenu de la formation requise des pharmaciens biologistes pour effectuer les prélèvements de moelle osseuse en vue d'analyses de biologie médicale et les conditions de délivrance de l'attestation de formation mentionnée à l'article R.6211-31-1 du Code de la santé publique.

(8) (Décret n°2009-774 du 23 juin 2009 relatif aux prélèvements effectués par les pharmaciens biologistes.

(9) Bain BJ. Bone marrow biopsy morbidity : review of 2003. *J Clin Pathol* 2005 ; **58** : 406-8.

(10) Moix PA, Favre L, Rosselet A, Monti M. Ponction biopsie médullaire. *Rev Med Suisse* 2008 ; **4** : 2337-42.

(11) Bonhomme F, Ajzenberg N, Schved JF, Molliex S, Samama CM ; French Anaesthetic and Intensive Care Committee on Evaluation of Routine Preoperative Testing, *et al.* Pre-interventional haemostatic assessment : guidelines from the French Society of Anaesthesia and Intensive Care. *Eur J Anaesthesiol* 2013 ; **30** : 142-62.

(12) Antiagrégants plaquettaires : prise en compte des risques thrombotique et hémorragique pour les gestes percutanés chez le coronariens. Recommandations HAS novembre 2013.

(13) Godier A, Pernod G, Sié P pour le groupe de travail des recommandations. Chirurgies ou actes invasifs *In* Recommandations professionnelles. Prise en charge des surdosages en antivitamines K, des situations à risque hémorragique et des accidents hémorragiques chez les patients traités par antivitamines K en ville et en milieu hospitalier. *Sang Thrombose Vaisseaux* 2008 ; **20** : 84-102.

(14) Albaladejo P, Bonhomme F, Blais N, Collet JP, Faraoni D, Fontana P, *et al.* Gestion des anticoagulants oraux pour la chirurgie et les actes invasifs programmés : propositions réactualisées du Groupe d'Intérêt en Hémostase Périopératoire (GIHP) - septembre 2015.

(15) Godier A, Fontana P, Motte S, Steib A, Bonhomme F, Schlumberger S, *et al.* Management of antiplatelet therapy in patients undergoing elective invasive procedures : proposals from the French Working Group on perioperative hemostasis (GIHP) and the French Study Group on thrombosis and hemostasis (GFHT). In collaboration with the French Society for Anesthesia and Intensive Care (SFAR). *Arch Cardiovasc Dis* 2018 ; **111** : pii : S1875-2136(18)30002-0. Doi : 10.1016/j.acvd.2017.12.004.

(16) Abla O, Friedman J, Doyle J. Performing bone marrow aspiration and biopsy in children : Recommended guidelines. *Paediatr Child Health* 2008 ; **13** : 499-501.

(17) Hjortholm N, Jaddini E, Hałaburda K, Snarski E. Strategies of pain reduction during the bone marrow biopsy. *Ann Hematol* 2013 ; **92** : 145-9.

(18) Décret n°2016-46 du 26 janvier 2016 relatif à la biologie médicale.

(19) Aboul-Nasr R, Estey EH, Kantarjian HM, Freireich EJ, Andreeff M, Johnson BJ, *et al.* Comparison of touch imprints with aspirate smears for evaluating bone marrow specimens. *Am J Clin Pathol* 1999 ; **111** : 753-8.

(20) Chandra S, Chandra H. Comparison of bone marrow aspirate cytology, touch imprint cytology and trephine biopsy for bone marrow evaluation. *Hem reports* 2011 ; **3** : e22.

(21) Gong X, Lu X, Wu X, Xu R, Tang Q, Xu G, *et al.* Role of bone marrow imprints in haematological diagnosis : a detailed study of 3781 cases. *Cytopathology* 2012 ; **23** : 86-95.

(22) Lewandowski K, Kowalik MM, Pawlaczyk R, Rogowski J, Hellmann A. Microscopic examination of bone marrow aspirate in healthy adults - comparison of two techniques of slide preparation. *Int J Lab Hematol* 2012 ; **34** : 254-61.

(23) Lee SH, Van Der Weyden C, Mayson E, Desai S. Excessive EDTA induces morphologic changes in bone marrow smears that mimic specific features of dysplasia. *Int J Lab Hematol* 2013 ; **35** : 163-9.

(24) Bain BJ, Bailey K. Pittfalls in obtaining and interpreting bone marrow aspirates: to err is human. *J Clin Pathol* 2011 ; **64** : 373-9.

(25) Trimoreau F, Gachard N, Vrain A, Leymarie V, Perroud P, Feuillard J. Étapes préanalytiques pour la cytologie médullaire, ganglionnaire et des liquides biologiques. *EMC-Biologie médicale* 2011 ; article 90-15-0056-A.

(26) Imbert M, El Khoury M. Coloration de May-Grünwald-Giemsa. *EMC-Biologie médicale* 2006 ; article 90-15-0035.

(27) Fleming MD, Kutok JL, Skarin AT. Examination of the bone marrow. *In* Blood : Principles and Practice of Hematology, Handin RI, Lux SE & Stossel TP (Eds), *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia ; 2002 : 59-79.

(28) Charpentier A. Myélogramme normal chez l'adulte. *EMC-Biologie médicale* 2012 ; article 90-15-0098-A.

(29) Pages MP. Myélogramme normal chez l'enfant : indications techniques de prélèvement, valeurs usuelles, aspect cytologique normal. *EMC-Biologie médicale* 2013 ; article 90-15-0098-G.

(30) Le Tourneau A, Marzac C. Biopsie médullaire osseuse. *EMC-Biologie médicale* 2007 : article 90-15-002.

(31) Proytcheva M. Bone marrow evaluation for pediatric patients. *Int J Lab Hematol* 2013 ; **35** : 283-9.

(32) d'Onofrio G, Zini G (Eds). Morphology of the Blood. *Verduci Publisher*, Roma ; 1997 : 1-383.

(33) Zini G, Bain B, Bettelheim P, Cortez J, d'Onofrio G, Faber E, *et al.* A European consensus report on blood cell identification: terminology utilized and morphological diagnosis concordance among 28 experts from 17 countries within the European LeukemiaNet network WP10, on behalf of the ELN Morphology Faculty. *Br J Haematol* 2010 ; **151** : 359–64.

(34) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, *IARC Press*, Lyon ; 2001 : 1-351.

(35) Lesesve JF, Zalmaï L, Leymarie V, Foliguet B, Corberand JX, Chatelain B, *et al.* Lames virtuelles en hématologie cellulaire : quel avenir ? *Feuillets de Biologie* 2015 ; **325** : 5-15.

Cellularité médullaire

M. ZANDECKI[1], S. GIRARD[2], J.-F. LESESVE[3]

La « richesse » représente une « densité cellulaire ». Le terme « cellularité » est donc recommandé pour qualifier ce paramètre. Au cours de l'enquête des pratiques menée en 2015, l'absence de standardisation de ce paramètre a été constatée : 52/74 laboratoires rendent une mention explicite (allant de « désertique » à « très riche », soit comme commentaire unique (24 réponses) soit associé à un système de gradation lui-même hétérogène : de « 1 à 5 » (18 réponses) ou de « + à +++ » (13 réponses). Parfois, le tapis d'hématies est examiné pour évaluer la richesse. Rarement, la cellularité n'est pas mentionnée ou bien est comparée à celle d'un grumeau écrasé (dans les cas où il est fourni). La cellularité est appréciée en observant les frottis médullaires avec les objectifs x10 ou x20 du microscope.

La moelle normale est une moelle « riche », mais l'impression du cytologiste est fortement conditionnée par les usages locaux de ponction et d'étalement médullaire et elle est totalement faussée en cas d'étalement à partir d'un prélèvement collecté dans un tube contenant de l'EDTA. En conséquence, l'usage des catégories « désertique, très diminuée, diminuée, normale, augmentée ou très augmentée » n'est probablement pas pertinent. Pour le référentiel de l'*International Society for Laboratory Hematology* (1), cinq niveaux sont individualisés (« acellulaire, cellularité réduite, normale, augmentée ou très augmentée »). Le terme moelle « aplasique » doit être écarté car c'est un diagnostic, pas une évaluation. La comparaison avec la densité leucocytaire du frottis sanguin peut être utile pour évaluer la composante d'hémodilution. Le terme moelle « envahie » est à éviter car il supposerait que les cellules viennent de l'extérieur, ce qui n'est pas forcément prouvé : il lui faut préférer le qualificatif « infiltrée ».

La cellularité varie avec l'âge. Chez un nourrisson, la moelle est presque totalement dépourvue de graisse, et une répartition proche de celle de l'adulte est obtenue à partir de 5 ans (2). Une involution adipeuse s'effectue chez les sujets (très) âgés. L'interprétation devra en tenir compte.

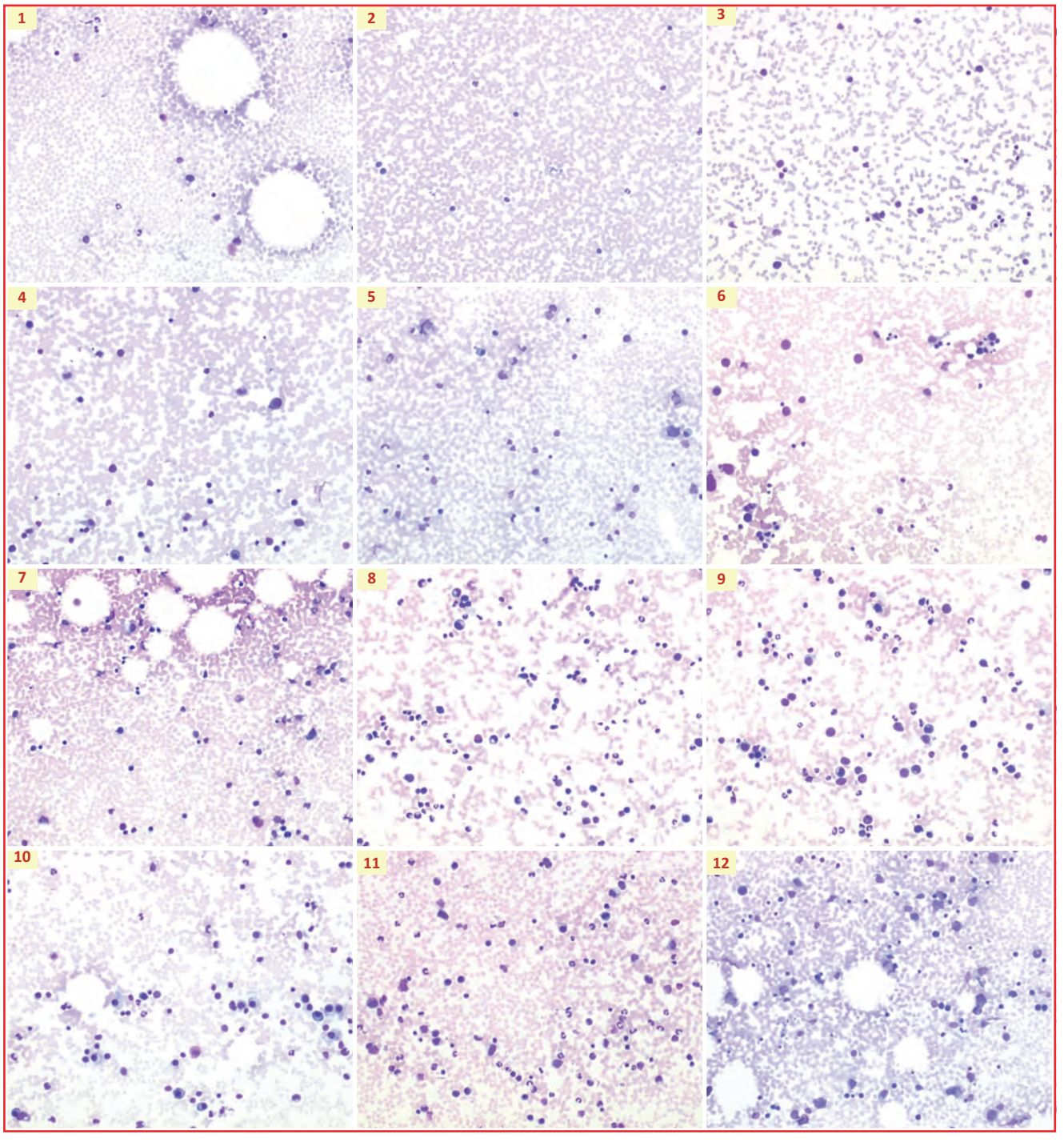
Sur un frottis, il existe presque toujours une dilution avec du sang, plus ou moins nette selon les cas. La cellularité est donc difficile à apprécier et doit tenir compte des habitudes locales liées au mode de prélèvement et d'étalement. Elle sera appréciée à partir de plusieurs (au moins deux) frottis, autour des grains de moelle, en évitant les zones trop épaisses. Les régions les plus cellulaires seront retenues pour la réponse.

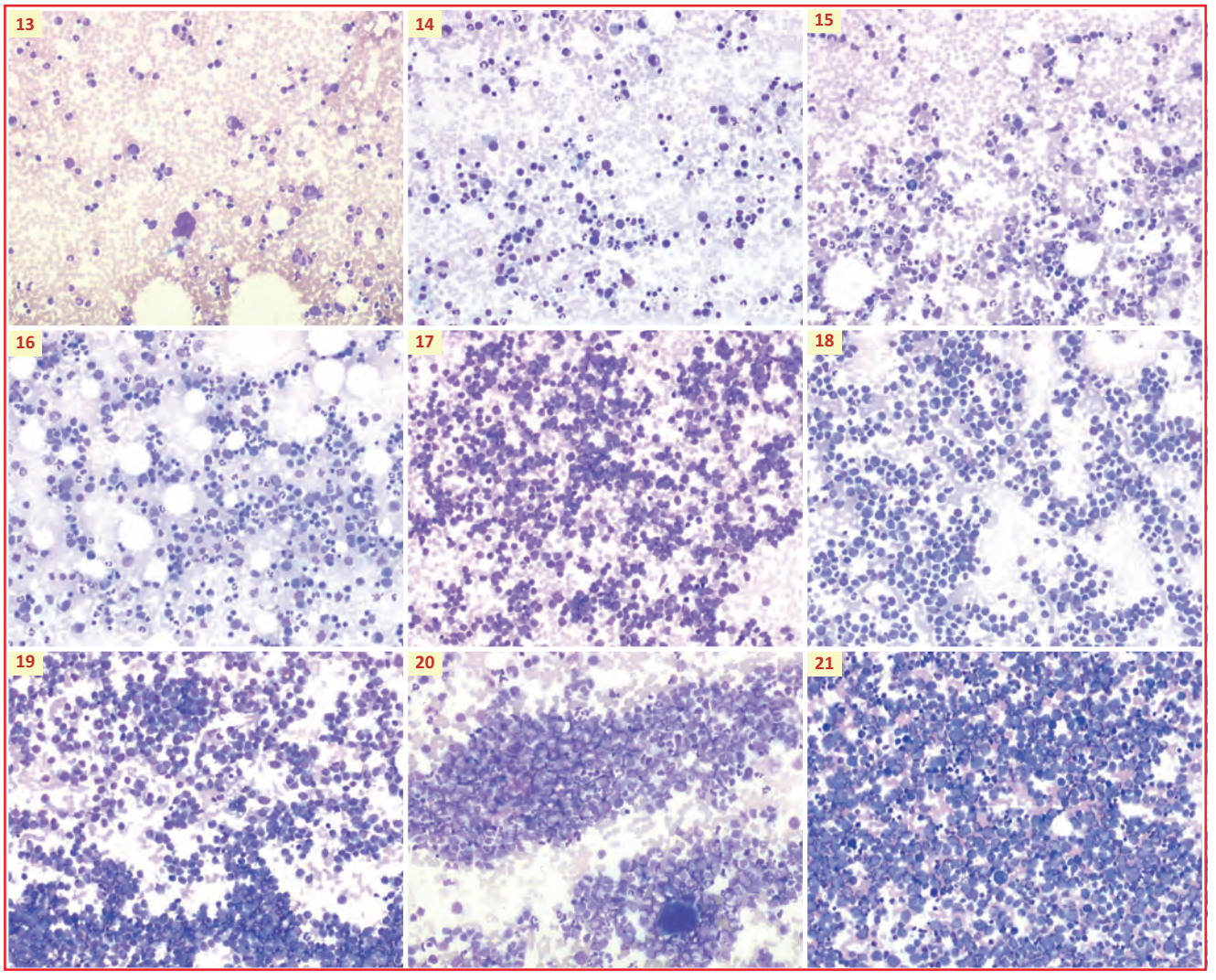
Pour les grains écrasés, la richesse est plus facile à apprécier car les hématies sont moins nombreuses. Cette technique est recommandée si l'estimation de la richesse est importante pour le diagnostic (aplasie médullaire). En effet, pour les grains, la cellularité est en principe indépendante de la cellularité du sang et de la qualité du prélèvement (sauf s'il n'y a pas de grains !). La réponse est idéalement effectuée à partir de l'observation de deux grains écrasés. Ce constat justifie la recommandation du GFHC de joindre, si possible, des « grumeaux » aux traditionnels frottis. De même, la densité en mégacaryocytes est plus facile à déterminer sur ce type de produit biologique.

La cellularité peut être appréciée semi-quantitativement ou quantitativement. L'estimation semi-quantitative n'est pas (ou mal) reproductible d'un laboratoire à un autre. L'estimation quantitative (nombre de cellules par champ microscopique) dépend surtout de la zone du frottis examinée mais aussi des objectifs employés (oculaire et tourelle : plusieurs combinaisons possibles). Elle est donc difficile à effectuer, chronophage, avec une standardisation médiocre. C'est pourquoi le GFHC a préféré proposer la solution d'images de référence, de standardisation discutable aussi mais immédiatement utilisables en pratique et qui sont explicites pour les morphologistes habitués à cette évaluation.

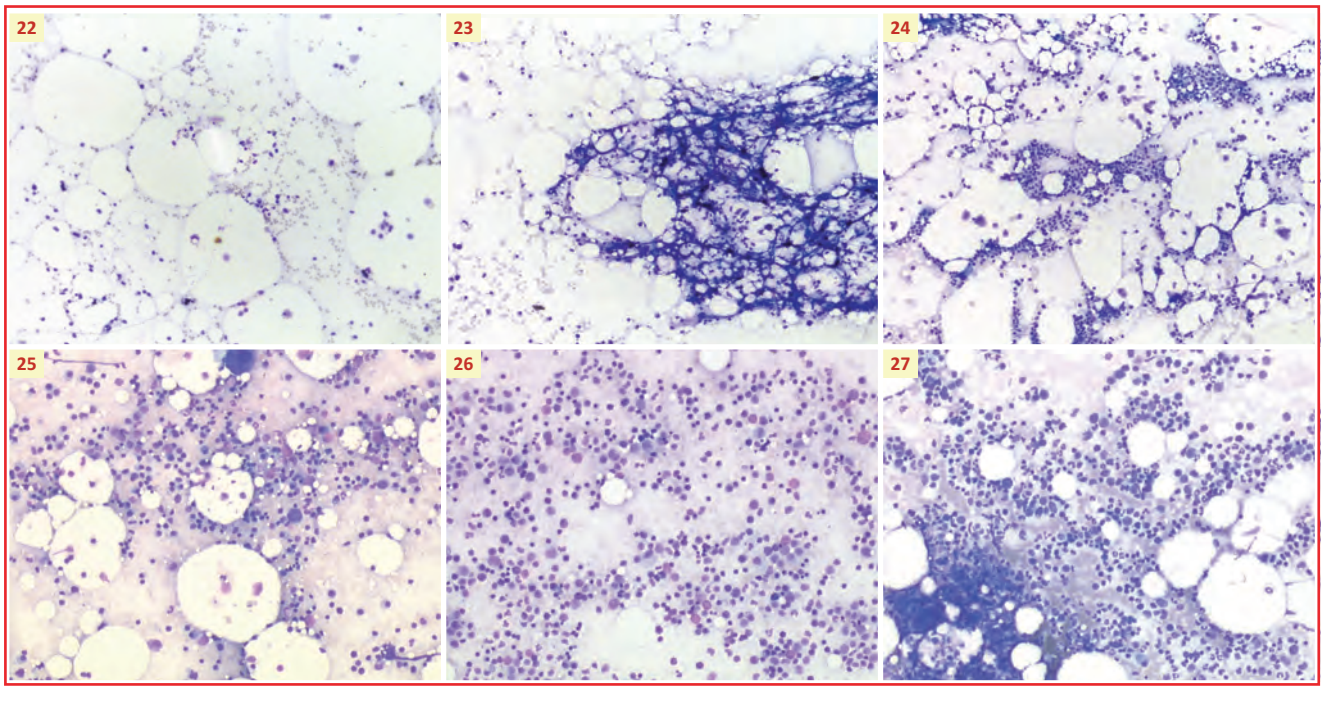
[1] Laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers.
[2] Laboratoire d'Hématologie du CHU de Lyon-Est.
[3] Service d'Hématologie biologique, CHRU Brabois, Nancy.

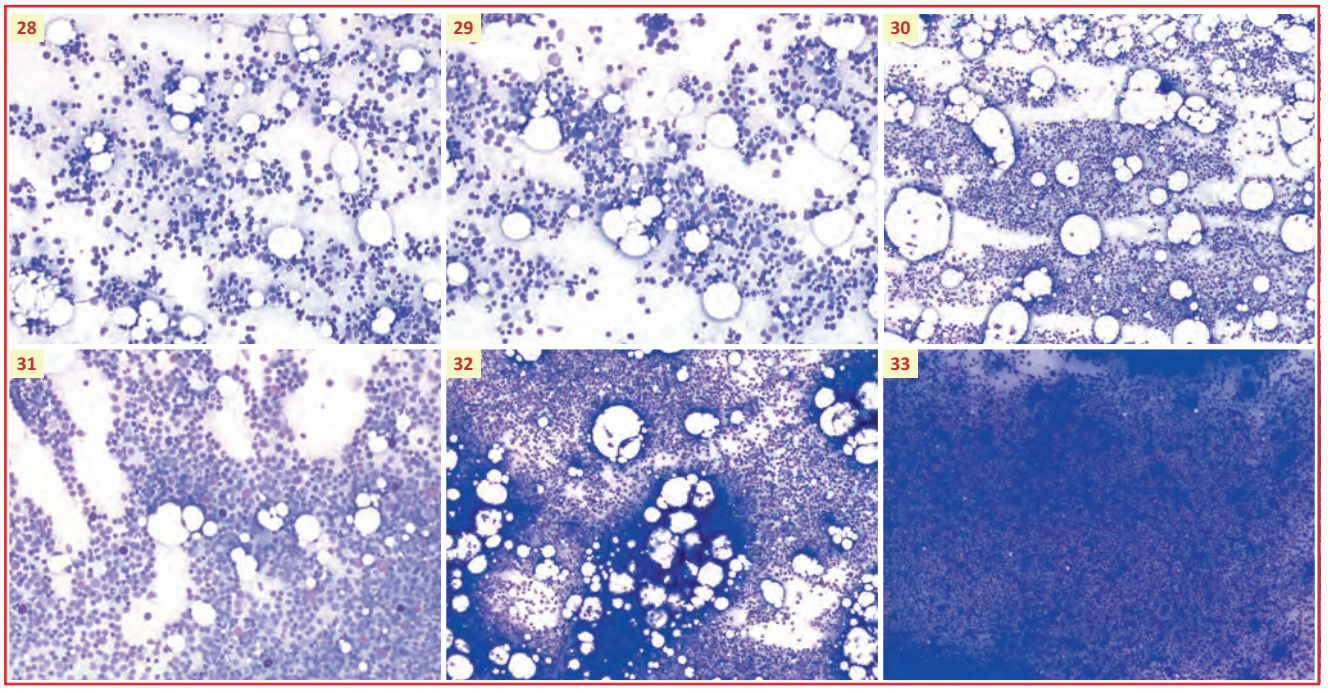
Les images suivantes (Figures 1 à 33) sont données à titre d'exemple pour standardiser l'évaluation de la cellularité médullaire (nourrissons et sujets âgés exclus). Elles ont été validées par le groupe de travail « myélogramme » du GFHC. Par analyse d'image informatique, un ratio nombre de leucocytes / nombre d'hématies a été calculé et a permis de documenter les catégories de cellularité. Ce ratio est indiqué à titre d'information ci-après, il s'inspire des méthodes utilisées en histologie pour lesquelles la cellularité est déterminée par des critères de surface occupée par la moelle hématopoïétique par rapport au tissu graisseux. La moelle normale ne comporte en principe que peu de globules rouges.





I. Frottis médullaires classés en fonction de la densité cellulaire :
- cellularité réduite : images 1 à 10 (1 % < ratio < 5 %) ;
- cellularité normale : images 11 à 18 (5 % < ratio < 10 %) ;
- cellularité augmentée : images 19 à 21 (10 % < ratio < 60 %).





II. Grains médullaires écrasés classés en fonction de la densité cellulaire :
- cellularité réduite : images 22 à 25 (ratio < 15 %) ;
- cellularité normale : images 26 à 30 (15 % < ratio < 30 %) ;
- cellularité augmentée : images 31 à 33 (30 % < ratio < 75 %).

Références Bibliographiques

(1) Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC ; International Council for Standardization in Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol* 2008 ; **30** : 349-64.

(2) Proytcheva M. Bone marrow evaluation for pediatric patients. *Int J Lab Hematol* 2013 ; **35** : 283-9.

Harmonisation des commentaires du myélogramme

J.-F. LESESVE[1], V. BARDET[2], POUR LE BUREAU DU GFHC

Lors de l'enquête des pratiques réalisée en janvier 2015, les biologistes ont souhaité disposer d'une liste de commentaires usuels, pouvant éventuellement être informatisés (codes, menus déroulants…) selon les vœux du laboratoire et les possibilités de son serveur informatique. Ceci va également dans le sens des recommandations du Cofrac qui préconise d'harmoniser les commentaires si l'examen du myélogramme est réalisé par plusieurs biologistes. Ce thésaurus ne concerne que les commentaires quantitatifs ou qualitatifs ; pour les diagnostics, il faudra se reporter à la codification de l'Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et en Anatomie Pathologique (ADICAP) adaptée à l'hématologie, disponible sur le site internet du GFHC (gfhc.fr) et actualisée en 2018. Certaines expressions équivalentes ont été maintenues pour conserver les habitudes des laboratoires et de leurs prescripteurs. Ces commentaires ont été validés par le bureau du GFHC. Ils restent néanmoins non opposables.

I. - ASPECT GÉNÉRAL DU FROTTIS

Étalements / frottis défectueux
Étalements / frottis désertiques/acellulaires. Frottis ne comportant pas de cellules médullaires. Absence quasi-totale d'éléments médullaires
Moelle hémodiluée (partiellement / modérément)

Moelle non contributive, décompte sans valeur

Nombreuses cellules lysées / artéfacts

Moelle aplasique
Moelle pauvre / hypoplasique pour l'âge
Moelle de richesse normale/attendue / normale pour l'âge
Moelle riche / hyperplasique pour l'âge

II. - LIGNÉE ÉRYTHROBLASTIQUE

Érythroblastopénie
Érythroblastes insuffisamment représentés, hypoplasie érythroblastique
Hyperplasie érythroblastique (modérée / majeure)
Nombreux érythroblastes en mitose

Morphologie érythroblastique normale / anormale
Dysérythropoïèse significative (anomalies concernant plus de 10 % des cellules) Dysérythropoïèse non significative

Macroblastose
Mégaloblastose

Asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique

Érythroblastes avec ponts inter-nucléaires / bi- ou multinucléés / à noyaux irréguliers / à noyaux fragmentés. Caryoschize, caryorrhexis, bourgeonnements nucléaires

Vacuolisation cytoplasmique des érythroblastes
Érythroblastes à cytoplasme feuilleté, mauvaise hémoglobinisation des érythroblastes acidophiles
Érythroblastes avec ponts intercytoplasmiques (pas de signification pathologique)
Érythroblastes avec ponctuations basophiles / avec corps de Jolly

Anomalies morphologiques des hématies identiques à celles observées dans le sang

Coloration de Perls recommandée (nombre / qualité des frottis insuffisants pour l'effectuer)
Coloration de Perls en cours

[1] Service d'Hématologie biologique, CHRU Brabois, Nancy.
[2] Hôpitaux Universitaires de Paris Île-de-France-Ouest, Boulogne-Billancourt.

III.- SÉRIE MÉGACARYOCYTAIRE

Absence de mégacaryocytes. Mégacaryocytes non observés
Nombre diminué / insuffisant de mégacaryocytes
Nombre attendu (normal) de mégacaryocytes
Hyperplasie mégacaryocytaire. Nombreux mégacaryocytes. Mégacaryocytes augmentés

Mégacaryocytes de morphologie normale / plaquettogènes
Mégacaryocytes dystrophiques / non dystrophiques
Mégacaryocytes parfois dystrophiques (< 10 % des cellules). Dysmégacaryopoïèse non significative
Dysmégacaryopoïèse significative (anomalies concernant plus de 10 % des cellules)

Micromégacaryocytes
Mégacaryoblastes
Mégacaryocytes à noyaux hypolobés / monolobés / ronds uniques / type anomalie 5q-
Mégacaryocytes bi- ou tri-nucléés (noyaux ronds séparés) / à noyau fragmenté
Mégacaryocytes à noyaux polylobés et segmentés
Anomalies cytoplasmiques des mégacaryocytes (vacuoles, coloration…)

IV. - LIGNÉE LYMPHOÏDE

Lymphocytose médullaire
Lymphocytose médullaire attendue pour l'âge

Lymphocytes non dystrophiques. Lymphocytes de morphologie normale
Lymphocytes dystrophiques

Lymphocytes à noyau nucléolé / clivé / déformé
Petits lymphocytes à noyau clivés (centrocytes)
Lymphocytes à noyau convoluté / contourné
Lymphocytes nucléolés (prolymphocytes, centroblastes, immunoblastes)
Nombreuses ombres nucléaires / cellulaires, lymphocytes lysés
Cellules lymphomateuses / tricholeucocytes / lymphoplasmocytes

Lymphocytes hyperbasophiles / lymphocytes d'aspect réactionnel
Lymphocytes et monocytes à cytoplasme basophile
Population lymphoïde polymorphe et hétérogène en rapport avec le syndrome mononucléosique observé en périphérie

Hyperplasie plasmocytaire sans / avec anomalies morphologiques
Plasmocytes dystrophiques / tumoraux/ nucléolés / géants / groupés en amas / corps de Rüssel / cellules de Mott / cristaux / flammés / anisocaryose / anisocytose / perte d'excentricité nucléaire / perte d'archoplasme / multinucléés
Plasmocytes d'aspect immature. Plasmoblastes. Proplasmocytes

Absence, présence de cellules de Reed-Sternberg / de cellules de Hodgkin

V. - LIGNÉE GRANULEUSE NEUTROPHILE

Hyperplasie de la lignée granuleuse neutrophile
Hypoplasie de la lignée granuleuse neutrophile. Lignée granuleuse neutrophile sous-représentée
Excès d'éléments immatures dans la lignée granuleuse neutrophile / pyramide de maturation déséquilibrée / Insuffisance d'éléments matures dans le lignée granuleuse neutrophile / déviation vers les précurseurs granuleux / Accentuation des formes jeunes de la lignée granuleuse

Blocage / pseudo-blocage de maturation de la lignée granuleuse au stade promyélocyte

Présence de métamyélocytes géants
Gigantisme cellulaire

Lignée granuleuse neutrophile de morphologie normale
Dysgranulopoïèse significative (anomalies concernant plus de 10 % des cellules)
Dysgranulopoïèse non significative
Anomalie de Pelger ou pseudo-Pelger
Noyau des polynucléaires parfois « pelgérisés »
Noyau des polynucléaires hyposegmentés
Polynucléaires neutrophiles à noyaux en bissac
Présence de polynucléaires hypersegmentés
Condensation chromatinienne anormale
Métamyélocytes à noyau rubané

Présence de cellules hypogranulaires / agranulaires / dégranulées / hypergranulaires
Présence de corps de Döhle
Vacuolisation des polynucléaires neutrophiles
Grains type Chediak-Higashi
Présence de granulations « toxiques » dans les granulocytes
Asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique

VI. - LIGNÉE MONOCYTAIRE

Hyperplasie monocytaire
Monocytose médullaire diminuée, absence de monocytes médullaires

Monocytes géants

Dysmonocytopoïèse, monocytes dystrophiques

Anomalie de lobulation des noyaux
Monocytes à noyaux rubanés

Dégranulation / hypogranulation des monocytes
Vacuolisation cytoplasmique des monocytes
Monocytes basophiles

Monoblastes, promonocytes. Monocytes immatures

Nombreux macrophages
Macrophage avec activité phagocytaire exacerbée (globules rouges, plaquettes, leucocytes). Activité macrophagique augmentée, macrophages surchargés de débris cellulaires et de pigments d'hémosidérine.
Hémophagocytose d'éléments intacts
Accentuation macrophagique sans image d'hémophagocytose

VII. - LIGNÉE ÉOSINOPHILE

Hyperéosinophilie médullaire

Éosinophiles dystrophiques

Éosinophiles à noyaux anormaux (hypo / hypersegmentation)
Anomalies cytoplasmiques des éosinophiles (granulations éosinophiles immatures de couleur pourpre, hypogranulation, vacuolisation)

Présence de cellules immatures de la lignée éosinophile
Éosinophiloblastes

VIII. - LIGNÉE BASOPHILE

Excès de basophiles médullaires

Lignée basophile dystrophique

Polynucléaires basophiles à noyaux anormaux (hypo / hypersegmentation)
Anomalies cytoplasmiques des basophiles (granulations basophiles immatures, hypogranulation, vacuolisation)

Présence de cellules immatures de la lignée basophile. Basophiloblastes

IX. - BLASTOSES

Présence de blastes. Blastose partielle. Excès de blastes

Blastose inférieure au seuil de sensibilité cytologique (< 5 %). Rémission cytologique
Infiltration blastique persistante

Blastes morphologiquement identiques à ceux observés au diagnostic

Blastes indifférenciés, blastes granulaires, blastes hypergranulaires
Myéloblastes, lymphoblastes, monoblastes, promyélocytes anormaux
Présence de corps d'Auer dans les blastes (uniques / multiples / en fagots)

X. - AUTRES CELLULES

Absence / Présence de cellules anormales

Absence / Présence de cellules métastatiques
Absence / Présence de cellules tumorales non hématopoïétiques

Absence / Présence de Leishmanies

Présence d'ostéoblastes (quelques / nombreux)
Présence d'ostéoclastes (quelques / nombreux)

Présence de mastocytes (quelques / nombreux)
Mastocytes dystrophiques (hypogranuleux, au cytoplasme fusiforme…)
Mastocytes regroupés en amas

Absence / présence de cellules de surcharge (rares / quelques / nombreuses)
Histiocytes bleus de mer

Présence d'adipocytes
Moelle graisseuse

Présence de cellules lysées (rares / quelques / nombreuses)

XI. - INTERPRÉTATION

L'aspect du frottis sanguin / médullaire évoque
L'aspect conjoint des frottis sanguins et médullaires évoque
Aspect cytologique en faveur de…

Résultats à interpréter avec le contexte clinique (non renseigné)
Résultats à interpréter avec le résultat de l'immunophénotypage sanguin / médullaire
Résultats à interpréter avec les résultats d'une autre exploration (coloration de Perls, cytochimies, histologie, génétique…)

Aspect similaire à celui décrit lors de l'examen précédent

Absence d'anomalie majeure
Moelle normale pour l'âge

XII. - COMMENTAIRES DIVERS

Insuffisance d'éléments médullaires pour proposer une formule. Nombre insuffisant de cellules pour un décompte représentatif
Frottis hémodilués, décompte sans valeur / Non contributif
Frottis coagulés, décompte sans valeur
Décompte réalisé dans les franges (représentativité ?)

Qualité de l'étalement insuffisante pour une analyse optimale
Présence d'artéfacts (décrire)

Contrôle souhaité / recommandé
Un nouveau myélogramme doit être envisagé. Une biopsie ostéo-mdullaire doit être envisagée
Résultat à vérifier si possible

Moelle infiltrée par, envahie par
Absence d'infiltration cellulaire suspecte

Dysmyélopoïèse / Dysplasie portant sur les 3 lignées

Évaluation de l'intervalle de confiance des pourcentages seuils (1 %, 5 %, 10 %, 20 %) utilisés pour la définition des hémopathies

J.-F. LESESVE[1], I. CLERC-URMES[2], R. GENEWE[1], C. BAUMANN[2]

I. - RATIONNEL

L'objectif essentiel du myélogramme est de proposer au prescripteur une orientation diagnostique. Il inclut un décompte de différentes catégories cellulaires (une trentaine environ) de répartition très hétérogène. Le GFHC insiste sur l'importance très relative de ces décomptes et sur la valeur non formelle des valeurs de référence. Or, depuis les années 1980, les seuils à 1, 5, 10, 20 % sont conventionnellement admis pour le classement des pathologies : le diagnostic de myélome est posé pour une infiltration médullaire > 10 % de plasmocytes ; une rémission de leucémie est définie par une moelle osseuse comprenant < 5 % de blastes ; les myélodysplasies sont classées en fonction des blastoses sanguines ou médullaires avec des seuils à 1, 5, 10 et 20 % de blastes ; une leucémie aiguë comporte le plus souvent > 20 % de blastes médullaires...(1, 2). En théorie, une réponse à 19 % exclurait donc le diagnostic de leucémie alors qu'une réponse à 20 % entraînerait peut-être le patient vers une chimiothérapie lourde. Or, chacun est bien conscient que 19, 20 ou 21 % sur un décompte de 200 à 500 cellules ne permettent pas de se prononcer avec certitude du fait de l'intervalle de confiance d'un pourcentage donné en fonction du nombre de cellules comptées.

II. - OBJECTIFS

Nous avons voulu vérifier la pertinence des pourcentages rendus au prescripteur quand ils se trouvaient proches des seuils diagnostiques. L'objectif était aussi d'aider à réaliser un document de validation de méthode pour l'accréditation (« décompte des cellules du myélogramme »).

Nous avons privilégié une approche pratique et tenté de répondre avec un raisonnement pragmatique à cette question : après un premier dénombrement indiquant un pourcentage de cellules anormales, quel serait le nombre de cellules à compter de nouveau pour diminuer l'imprécision de ce pourcentage initial, et donc rendre un résultat plus confiant.

III. - RÉSULTATS

A) Utilisation de la table de Rümke

Une méthode immédiate consiste à utiliser la table de Rümke (Tableau I) qui établit, en fonction du nombre de cellules comptées et du pourcentage cellulaire réel, un intervalle de valeur dans lequel le décompte est validé à 95 %. Elle permet de donner au prescripteur l'intervalle de confiance du pourcentage trouvé (3).

Par exemple, pour un pourcentage cellulaire réel estimé à 20, son intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) varie entre 12,7 % et 29,2 % de ces cellules si le décompte est réalisé sur 100 cellules ; entre 14,7 %

[1] Laboratoire d'Hématologie biologique, CHRU Brabois, Nancy.
[2] Service d'Épidémiologie et Évaluations Cliniques, CHRU de Nancy.

Tableau I - Extrait de la table de Rümke, d'après (3).

%	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1 000	n = 10 000
0	0-3,6	0-1,8	0-0,7	0-0,4	0-0,1
1	0-5,4	0,1-3,6	0,3-2,3	0,5-1,8	0,8-1,3
2	0,2-7,0	0,6-5,0	1,0-3,6	1,2-3,1	1,7-2,3
3	0,6-8,5	1,1-6,4	1,7-4,9	2,0-4,3	2,6-3,4
4	1,1-9,9	1,7-7,7	2,5-6,1	2,9-5,4	3,6-4,5
5	1,6-11,3	2,4-9,0	3,3-7,3	3,7-6,5	4,5-5,5
6	2,2-12,6	3,1-10,2	4,1-8,5	4,6-7,7	5,5-6,5
7	2,9-13,9	3,9-11,5	4,9-9,6	5,5-8,8	6,5-7,6
8	3,5-15,2	4,6-12,7	5,8-10,7	6,4-9,9	7,4-8,6
9	4,2-16,4	5,4-13,9	6,6-11,9	7,3-10,9	8,4-9,6
10	4,9-17,6	6,2-15,0	7,5-13	8,2-12,0	9,4-10,7
15	8,6-23,5	10,4-20,7	12,18,4	12,8-17,4	14,3-15,8
20	12,7-29,2	14,7-26,2	16,6-23,8	17,6-22,6	19,2-20,8
25	16,9-34,7	19,2-31,6	21,3-29,0	22,3-27,8	24,1-25,9
30	21,2-40	23,7-36,9	26,0-34,2	27,2-32,9	29,1-31,0
35	25,7-45,2	28,4-42,0	30,8-39,4	32,0-38,0	34,0-36,0
40	30,3-50,3	33,2-47,1	35,7-44,4	36,9-43,1	39,0-41,0
45	35,0-55,3	38,0-52,2	40,6-49,5	41,9-48,1	44,0-46,0
50	39,8-60,2	42,9-57,1	45,5-54,5	46,9-53,1	49,0-51,0
55	44,7-65	47,8-62,0	50,5-59,4	51,9-58,1	54,0-56,0
60	49,7-69,7	52,9-66,8	55,6-64,3	56,9-63,1	59,0-61,0
65	54,8-74,3	58,0-71,6	60,6-69,2	62,0-68,0	64,0-66,0
70	60,0-78,8	63,1-76,3	65,8-74,0	67,1-72,8	69,0-70,9
75	65,3-83,1	68,4-80,8	71,0-78,7	72,2-77,7	74,1-75,9
80	70,8-87,3	73,8-85,3	76,2-83,4	77,4-82,4	79,2-80,8
85	76,5-91,4	79,3-89,6	81,6-88,0	82,6-87,2	84,2-85,7
90	82,4-95,1	85,0-93,8	87,0-92,5	88,0-91,8	89,3-90,6
95	88,7-98,4	91,0-97,6	92,7-96,7	93,5-96,3	94,5-95,5
100	96,4-100	98,2-100	99,3-100	99,6-100	99,9-100

n : nombre total de cellules comptées ; % : pourcentage de cellules d'un type donné.

et 26,2 % de ces cellules si le décompte est réalisé sur 200 cellules : entre 19,2 % et 20,8 % de ces cellules si le décompte est réalisé sur 10 000 cellules.

Il est évident que plus le nombre de cellules pris en compte est grand, plus l'IC diminue, au détriment d'un allongement de la durée du test qui peut devenir contraignant en pratique : environ quelques minutes pour analyser 100 à 300 cellules, 10 minutes pour 500 cellules, plus d'une heure pour 10 000 cellules (donc jamais effectué !). Ceci a abouti à des recommandations de décompte sur 100 à 200 cellules pour la différentielle leucocytaire sanguine (4). En revanche, aucun conseil n'a été proposé pour le myélogramme.

On peut néanmoins améliorer le simple calcul de l'IC 95 % proposé par Rümke, par exemple, en déterminant le nombre total de cellules à compter en fonction du pourcentage de cellules pathologiques, mais aussi en fonction de l'imprécision souhaitée.

B) Nombre total de cellules à compter en fonction du pourcentage de cellules pathologiques et de l'imprécision souhaitée

La formule utilisée pour construire les tableaux/courbes proposés ci-après est celle de l'IC 95 % d'une proportion :

$$\hat{p} \pm 1{,}96\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$$

$\hat{p}$ étant le pourcentage de cellules comptées et n, le nombre de cellules comptées.

Tableau II - Nombre de cellules à compter en fonction du niveau d'imprécision et du pourcentage de cellules anormales présentes.

% cellules anormales \ Imprécision	20,00 %	10,00 %	5,00 %	2,00 %	1,00 %
0,00 %	0	0	0	0	0
1,00 %	96	381	1522	9508	38 032
2,00 %	95	377	1506	9412	37 648
3,00 %	94	373	1491	9316	37 264
4,00 %	93	369	1476	9220	36 880
5,00 %	92	365	1460	9124	36 496
6,00 %	91	362	1445	9028	36 112
7,00 %	90	358	1430	8932	35 727
8,00 %	89	354	1414	8836	35 343
9,00 %	88	350	1399	8740	34 959
10,00 %	87	346	1383	8644	34 575
11,00 %	86	342	1368	8548	34 191
12,00 %	85	339	1353	8452	33 807
13,00 %	84	335	1337	8356	33 422
14,00 %	83	331	1322	8260	33 038
15,00 %	82	327	1307	8164	32 654
16,00 %	81	323	1291	8068	32 270
17,00 %	80	319	1276	7972	31 886
18,00 %	79	316	1261	7876	31 502
19,00 %	78	312	1245	7780	31 117
20,00 %	77	308	1230	7684	30 733
21,00 %	76	304	1214	7588	30 349
22,00 %	75	300	1199	7492	29 965
23,00 %	74	296	1184	7396	29 581
24,00 %	73	292	1168	7300	29 197
25,00 %	73	289	1153	7203	28 812
26,00 %	72	285	1138	7107	28 428
27,00 %	71	281	1122	7011	28 044
28,00 %	70	277	1107	6915	27 660
29,00 %	69	273	1092	6819	27 276
30,00 %	68	269	1076	6723	26 892

Par exemple, si on s'autorise 10 % d'imprécision et que l'on pense avoir 5 % de cellules anormales, il faut faudra compter au moins 365 cellules.

Quel est alors le risque d'erreur ?

Les questions pratiques sont par exemple :

- si j'affirme qu'un patient a une leucémie avec 21 % de blastes, en fonction du nombre de cellules comptées, quel est le risque d'erreur, autrement dit, quel est le risque de surestimer le diagnostic ?

- si j'affirme qu'un patient n'a pas de leucémie avec 19 % de blastes, en fonction du nombre de cellules comptées, quel est le risque d'erreur, autrement dit le risque de sous-estimer le diagnostic ?

Les données présentées ci-dessous permettent de répondre à cette question.

Le tableau III fournit les valeurs des bornes supérieures en fonction du nombre total de cellules comptées et du pourcentage de cellules à tester estimé. Ces mêmes valeurs sont ensuite représentées graphiquement (Figure 1).

Tableau III - Valeurs de la borne supérieure de l'IC 95 % du pourcentage de cellules anormales rendu en fonction du nombre total de cellules comptées et du pourcentage de cellules anormales estimé.

% de cellules à tester \ Nombre de cellules comptées	N = 100	N = 200	N = 300	N = 400	N = 500
0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1,00 %	2,95 %	2,38 %	2,13 %	1,98 %	1,87 %
2,00 %	4,74 %	3,94 %	3,58 %	3,37 %	3,23 %
3,00 %	6,34 %	5,36 %	4,93 %	4,67 %	4,50 %
4,00 %	7,84 %	6,72 %	6,22 %	5,92 %	5,72 %
5,00 %	9,27 %	8,02 %	7,47 %	7,14 %	6,91 %
6,00 %	10,65 %	9,29 %	8,69 %	8,33 %	8,08 %
7,00 %	12,00 %	10,54 %	9,89 %	9,50 %	9,24 %
8,00 %	13,32 %	11,76 %	11,07 %	10,66 %	10,38 %
9,00 %	14,61 %	12,97 %	12,24 %	11,80 %	11,51 %
10,00 %	15,88 %	14,16 %	13,39 %	12,94 %	12,63 %
11,00 %	17,13 %	15,34 %	14,54 %	14,07 %	13,74 %
12,00 %	18,37 %	16,50 %	15,68 %	15,18 %	14,85 %
13,00 %	19,59 %	17,66 %	16,81 %	16,30 %	15,95 %
14,00 %	20,80 %	18,81 %	17,93 %	17,40 %	17,04 %
15,00 %	22,00 %	19,95 %	19,04 %	18,50 %	18,13 %
16,00 %	23,19 %	21,08 %	20,15 %	19,59 %	19,21 %
17,00 %	24,36 %	22,21 %	21,25 %	20,68 %	20,29 %
18,00 %	25,53 %	23,32 %	22,35 %	21,77 %	21,37 %
19,00 %	26,69 %	24,44 %	23,44 %	22,84 %	22,44 %
20,00 %	27,84 %	25,54 %	24,53 %	23,92 %	23,51 %
21,00 %	28,98 %	26,65 %	25,61 %	24,99 %	24,57 %
22,00 %	30,12 %	27,74 %	26,69 %	26,06 %	25,63 %
23,00 %	31,25 %	28,83 %	27,76 %	27,12 %	26,69 %
24,00 %	32,37 %	29,92 %	28,83 %	28,19 %	27,74 %
25,00 %	33,49 %	31,00 %	29,90 %	29,24 %	28,80 %
26,00 %	34,60 %	32,08 %	30,96 %	30,30 %	29,84 %
27,00 %	35,70 %	33,15 %	32,02 %	31,35 %	30,89 %
28,00 %	36,80 %	34,22 %	33,08 %	32,40 %	31,94 %
29,00 %	37,89 %	35,29 %	34,13 %	33,45 %	32,98 %
30,00 %	38,98 %	36,35 %	35,19 %	34,49 %	34,02 %

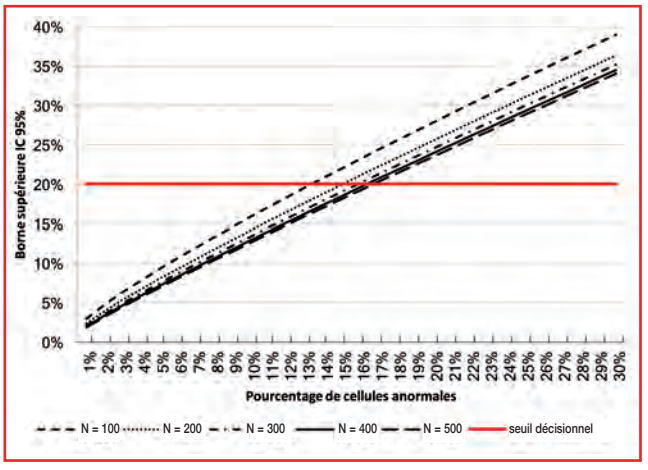


Fig. 1 - Valeur de la borne supérieure (IC 95 %) en fonction du pourcentage des cellules anormales estimées et du nombre de cellules comptées.

Comment interpréter ces données en pratique ?

Pour exclure le diagnostic de leucémie, la proportion de blastes doit être < 20 %.

Par exemple, à partir d'un premier décompte de 200 cellules, on estime à 15 % la proportion de blastes. D'après le tableau III, la borne supérieure de l'IC 95 % de cette estimation est de 19,95 %. Autrement dit, les 15 % de cellules comptées sont, avec un IC 95 %, < 20 %. Donc la décision de classer le patient comme non leucémique est adaptée car l'estimation reste < 20 %. En revanche, si on observe non plus 15 % mais 16 % de cellules pathologiques, alors il y a un risque (que l'on peut facilement quantifier à partir du graphique) que la valeur vraie du % de cellules pathologique soit > 20 %, avec un risque non négligeable (5 %) de prendre une mauvaise décision diagnostique (sous-estimation d'une leucémie).

En revanche, si on compte 500 cellules et que l'on estime à 16 % les cellules pathologiques, la borne inférieure de l'IC 95 % reste < 20 %, donc on a moins de 5 % de risque de classer à tort ce patient comme non atteint de leucémie.

On constate qu'un comptage de 100 cellules permet d'obtenir une estimation significativement < 20 % de blastes en dessous de 13 %, alors que ce chiffre passe à 16 % pour un comptage de 500 cellules.

L'utilisation de ces données permet donc de moduler le nombre de cellules à compter en fonction de la proportion de cellules pathologiques. En pratique, cela permet d'organiser un décompte dans le temps minimum consacré à celui-ci, tout en garantissant (à 95 %) la valeur du pourcentage rendu.

La figure 2 et le tableau IV fournissent les valeurs des bornes inférieures selon le nombre de cellules

Tableau IV - Valeurs de la borne inférieure de l'intervalle de l'IC 95 % du pourcentage de cellules anormales rendu en fonction du nombre total de cellules comptées et du pourcentage de cellules anormales estimé.

Nombre de cellules comptées / % de cellules à tester	N = 100	N = 200	N = 300	N = 400	N = 500
0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1,00 %	-0,95 %	-0,38 %	-0,13 %	0,02 %	0,13 %
2,00 %	-0,74 %	0,06 %	0,42 %	0,63 %	0,77 %
3,00 %	-0,34 %	0,64 %	1,07 %	1,33 %	1,50 %
4,00 %	0,16 %	1,28 %	1,78 %	2,08 %	2,28 %
5,00 %	0,73 %	1,98 %	2,53 %	2,86 %	3,09 %
6,00 %	1,35 %	2,71 %	3,31 %	3,67 %	3,92 %
7,00 %	2,00 %	3,46 %	4,11 %	4,50 %	4,76 %
8,00 %	2,68 %	4,24 %	4,93 %	5,34 %	5,62 %
9,00 %	3,39 %	5,03 %	5,76 %	6,20 %	6,49 %
10,00 %	4,12 %	5,84 %	6,61 %	7,06 %	7,37 %
11,00 %	4,87 %	6,66 %	7,46 %	7,93 %	8,26 %
12,00 %	5,63 %	7,50 %	8,32 %	8,82 %	9,15 %
13,00 %	6,41 %	8,34 %	9,19 %	9,70 %	10,05 %
14,00 %	7,20 %	9,19 %	10,07 %	10,60 %	10,96 %
15,00 %	8,00 %	10,05 %	10,96 %	11,50 %	11,87 %
16,00 %	8,81 %	10,92 %	11,85 %	12,41 %	12,79 %
17,00 %	9,64 %	11,79 %	12,75 %	13,32 %	13,71 %
18,00 %	10,47%	12,68%	13,65%	14,23%	14,63 %
19,00 %	11,31%	13,56%	14,56%	15,16%	15,56 %
20,00 %	12,16%	14,46%	15,47%	16,08%	16,49 %
21,00 %	13,02 %	15,35 %	16,39 %	17,01 %	17,43 %
22,00 %	13,88 %	16,26 %	17,31 %	17,94 %	18,37 %
23,00 %	14,75 %	17,17 %	18,24 %	18,88 %	19,31 %
24,00 %	15,63 %	18,08 %	19,17 %	19,81 %	20,26 %
25,00 %	16,51 %	19,00 %	20,10 %	20,76 %	21,20 %
26,00 %	17,40 %	19,92 %	21,04 %	21,70 %	22,16 %
27,00 %	18,30 %	20,85 %	21,98 %	22,65 %	23,11 %
28,00 %	19,20 %	21,78 %	22,92 %	23,60 %	24,06 %
29,00 %	20,11 %	22,71 %	23,87 %	24,55 %	25,02 %
30,00 %	21,02 %	23,65 %	24,81 %	25,51 %	25,98 %

comptées et le pourcentage de cellules à tester, suivant un principe identique.

Comment interpréter ces données en pratique ?

Pour poser le diagnostic de myélome, la proportion de plasmocytes médullaires doit être > 10 %.

Par exemple, à partir du comptage de 200 cellules, on estime à 15 % la proportion de plasmocytes. D'après le tableau IV, la borne inférieure de l'IC à

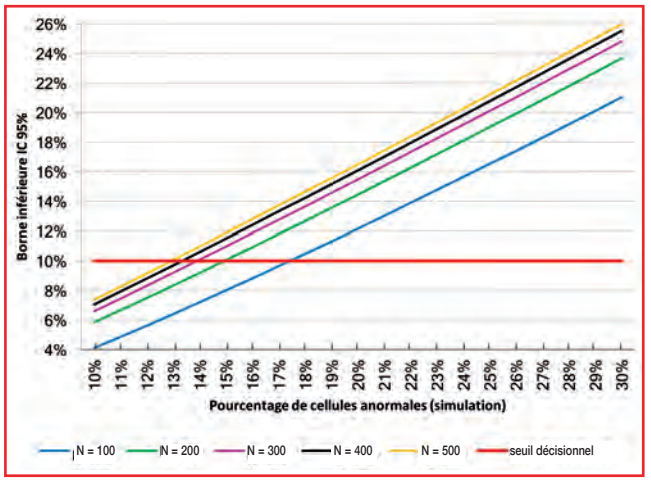


Fig. 2 - Valeurs de la borne inférieure de l'intervalle de l'IC 95 % du pourcentage de cellules anormales rendu (ordonnées) en fonction du nombre total de cellules comptées (abaques) et du pourcentage de cellules anormales estimé (abscisses).

95 % de cette estimation est > 10 %. Autrement dit, 15 % de cellules comptées est > 10 % avec un IC 95 %. La décision de classer la pathologie du patient en myélome est adaptée car l'estimation est garantie. En revanche, si on observe non plus 15 % mais 13 % de cellules malades, alors il y a un risque (que l'on peut facilement quantifier à partir du graphique) que la valeur vraie du pourcentage de cellules malades soit < 10 %, avec un risque non négligeable (5 %) de prendre une mauvaise décision diagnostique (surestimation du diagnostic).

Par contre, si on compte 500 cellules et que l'on estime à 13 % les cellules malades, la borne inférieure de l'IC 95 % est > 10%, donc on a moins de 5% de risque de classer à tort le patient comme atteint de myélome.

On constate qu'un comptage de 100 cellules permet d'obtenir une estimation significativement > 10 % de plasmocytes à partir du seuil de 18 % (intersection de la droite bleue et de la droite rouge), alors que ce dernier passe à 13 % pour un comptage de 500 cellules.

Cela justifie la recommandation empirique de l'OMS de compter 500 cellules pour déterminer la blastose des syndromes myélodysplasiques, mais nos tableaux permettent d'affiner ces recommandations au cas par cas.

IV. - RÉSULTATS GLOBAUX (À BUT PRATIQUE POUR LES LECTEURS DU MYÉLOGRAMME)

Pour un IC 95 % et d'après les incertitudes retrouvées dans les tableaux précédents, il est possible d'extrapoler les résultats suivants pour le décompte cellulaire :

Pour un seuil de 5 %

Nombre total de cellules comptées		Nombre de cellules pathologiques comptées		Nombre de cellules pathologiques comptées	
100	Significativement < 5 %	2	Zone d'incertitude	12	Significativement > 5 %
200		2		9	
300		3		9	
400		3		8	
500		3		8	

- Pour un décompte de 100 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 5 % (IC 95 %) s'il est ≤ 2 %.
- Pour un décompte de 300 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 5 % (IC 95 %) s'il est ≤ 3 %.

À l'opposé :

- Pour un décompte de 100 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 5 % (IC 95 %) s'il est ≥ 12 %.
- Pour un décompte de 200 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 5 % (IC 95 %) s'il est ≥ 9 %.
- Pour un décompte de 400 cellules, le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 5 % (IC 95 %) s'il est ≥ 8 %.

Entre ces valeurs, pour le nombre de cellules totales comptées, l'IC 95 % n'est pas garanti et le cytologiste se trouve dans une « zone grise », l'incertitude de mesure augmente.

Pour un seuil de 10 %

Nombre total de cellules comptées		Nombre de cellules pathologiques comptées		Nombre de cellules pathologiques comptées	
100	Significativement < 10 %	5	Zone d'incertitude	18	Significativement > 10 %
200		6		15	
300		7		14	
400		7		14	
500		7		13	

- Pour un décompte de 100 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 10 % (IC 95 %) s'il est ≤ 5 %.
- Pour un décompte de 200 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 10 % (IC 95 %) s'il est ≤ 6 %.
- Pour un décompte de 300 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 10 % (IC 95 %) s'il est ≤ 7 %.

À l'opposé :

- Pour un décompte de 100 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 10 % (IC 95 %) s'il est ≥ 18 %.
- Pour un décompte de 200 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 10 % (IC 95 %), s'il est ≥ 15 %.
- Pour un décompte de 300 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 10 % (IC 95 %) s'il est ≥ 14 %.
- Pour un décompte de 500 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 10 % (IC 95 %) s'il est ≥ 13 %.

Entre ces valeurs, pour le nombre de cellules totales comptées, l'IC 95 % n'est pas garanti et le cytologiste se trouve dans une « zone grise », l'incertitude de mesure augmente.

Pour un seuil de 20 %

Nombre total de cellules comptées		Nombre de cellules pathologiques comptées		Nombre de cellules pathologiques comptées	
100	Significativement < 20 %	13	Zone d'incertitude	29	Significativement > 20 %
200		15		27	
300		15		25	
400		16		25	
500		16		24	

- Pour un décompte de 100 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 20 % (IC 95 %) s'il est ≤ 13 %.
- Pour un décompte de 200 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 20 % (IC 95 %) s'il est ≤ 15 %.
- Pour un décompte de 400 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement < 20 % (IC 95 %) s'il est ≤ 16 %.

À l'opposé :

- Pour un décompte de 100 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 20 % (IC 95 %) s'il est ≥ 29 %.
- Pour un décompte de 200 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 20 % (IC 95 %) s'il est ≥ 27 %.
- Pour un décompte de 300 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 20 % (IC 95 %) s'il est ≥ 25 %.
- Pour un décompte de 500 cellules : le décompte de cellules pathologiques est considéré comme significativement > 20 % (IC 95 %), s'il est ≥ 24 %.

Entre ces valeurs, pour le nombre de cellules totales comptées, l'IC 95 % n'est pas garanti et le cytologiste se trouve dans une « zone grise », l'incertitude de mesure augmente.

Références Bibliographiques

(1) Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 ; **127** : 2375-90.

(2) Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016 ; **127** : 2391-405.

(3) Rümke CL. The accuracy of percentages; tables with reliability intervals. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1976 ; **120** : 2052-8 (*article in Dutch*).

(4) Fuentes-Arderiu X, Dot-Bach D. Measurement uncertainty in manual differential leukocyte counting. *Clin Chem Lab Med* 2009 ; **47** : 112-5.

Valeurs de référence

J.-F. LESESVE[1], S. GIRARD[2]

Les valeurs de référence sont indiquées dans les tabeaux I et II, à titre informatif. Le GFHC a statué que la mention des valeurs de référence dans le compte rendu d'analyse restait à l'initiative de chaque laboratoire. Par ailleurs, il a clairement indiqué qu'elles pouvaient même rester non précisées dans le compte rendu, à partir du moment où les commentaires de conclusion signalaient explicitement tout déséquilibre des pourcentages notifiés.

[1] Laboratoire d'Hématologie biologique, CHRU Brabois, Nancy.
[2] Laboratoire d'Hématologie, CHU de Lyon-Est.

Tableau I. Valeurs de référence chez l'adulte.

RÉFÉRENCES	(15)	(13)	(18)	(16)	(1)	(3)
Nombre de témoins		12			50	67
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*	0-3					
Lignée granuleuse	45-75		50-70	60-70		35,8-63
Myéloblastes	0-2	0,1-1,7	0-3	0-2	0-3	0-1,3
Promyélocytes	2-8	1,9-4,7	1-5	1-4	3,2-12,4	
Myélocytes neutrophiles	5-20	8,5-16,9	10-15	10-15	3,7-10	8-19,4
Myélocytes éosinophiles	0-2			0-1	0-2,8	
Myélocytes basophiles						
Métamyélocytes neutrophiles	5-25	7,1-24,7	10-15	10-20	2,3-5,9	
Métamyélocytes éosinophiles	0-2			0-1	0,4-2,1	0,4-3,1
Métamyélocytes basophiles						
Polynucléaires neutrophiles	10-30	13,2-26,4	10-20	15-25	21,9-45,9	22,2-48,8
Polynucléaires éosinophiles	0-2	1,1-5,2	1-3	0-1	0,3-4,2	0,2-3,4
Polynucléaires basophiles	0-2	0-0,2	0-1	0-1	0-0,4	0-0,6
Lignée monocytaire						
Monocytes	0-5	0-0,6		0-3	0-2,6	0,2-4,6
Macrophages					0-1,3	0-5,1
Lignée érythroblastique	8-30	15-36,2	10-30	15-30	13-40,1	14,7-32,6
Proérythroblastes	0-2		0-2	0-2		
Érythroblastes basophiles	0-4		2-4	1-3		0,1-8,2
Érythroblastes polychromatophiles	2-20		4-8	5-15		
Érythroblastes acidophiles	2-10		3-6	5-10		10,7-28,2
Lignée lymphoïde						
Lymphocytes	5-12	8,6-23,8	5-20	5-15	6-20	6-26,2
Plasmocytes	0-2	0-3,5	0-3	0-3	0-1,2	0-3,8

RÉFÉRENCES	(13)	(17)	(9)	(11)	(10)	Société Française d'Hématologie 2014
Nombre de témoins	12		22		104	
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*					0-0,2	1-2
Lignée granuleuse	33,6-73,6			30-80	46,8-74,8	
Myéloblastes	0,1-1,7	0,5-5	0-5	0,5-3	0,1-1,1	2-3
Promyélocytes	1,9-4,7	0-7,5	5-16	1-5	0,5-3,7	4-8
Myélocytes neutrophiles	8,5-16,9	5-25	11,7-29	5-20	2,6-13,5	10-15
Myélocytes éosinophiles	0,2-1,4			0,5-3	0-1,9	
Myélocytes basophiles						
Métamyélocytes neutrophiles	7,1-24,7	5-20		8-20	5,8-20,8	15-20
Métamyélocytes éosinophiles	0,2-2,2			0-2		
Métamyélocytes basophiles						
Polynucléaires neutrophiles	13,2-26,4	5,5-40		20-50	18,6-58,2	20-30
Polynucléaires éosinophiles	0-3,8	1-7		0,5-3	0,1-3,2	1-4
Polynucléaires basophiles	0-0,2	0-1		0-1	0-0,6	0,5-1
Lignée monocytaire						
Monocytes	0-0,6	0,5-3		0,5-3	0,6-3,6	2-3
Macrophages				0,1-2		
Lignée érythroblastique	15-36,2		53-82	10-40	11,9-48,4	
Proérythroblastes	0,1-1,1			1-5	0-1	1-2
Érythroblastes basophiles	0,4-2,4	0,5-7,5		2-8	0,1-3,2	4-8
Érythroblastes polychromatophiles	13,1-30,1			5-15	4,2-12,8	6-10
Érythroblastes acidophiles	0,3-3,7	7-40		5-15	6,6-33,4	4-10
Lignée lymphoïde						
Lymphocytes	8,6-23,8	2,5-15		5-15	3,4-17	5-15
Plasmocytes	0-3,5	0,5-3		0,5-3	0,1-1,6	1-3

* Le GFHC recommande le terme « blastes ».

Tableau II. Valeurs de référence chez le nourrisson et l'enfant.

RÉFÉRENCES		(7)		(14)			
Catégorie d'âge Nombre de témoins		< 2 jours	1 mois - 2 ans	1 jour - 1 mois 57	1 mois 71	2 mois 48	3 mois 24
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*		1-2	2-4	0-0,62	0,12-1,12	0,08-1,08	0,03-1,23
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile				51,71-69,03	24,67-40,03	23,04-37,58	22,06-45,96
	Myéloblastes	0,5-1					
	Promyélocytes	1-2		0,12-1,7	0,11-1,41	0,1-1,46	0,04-1,56
	Myélocytes neutrophiles	5-10	3-6	1,02-6,88	1,02-3,98	0,89-3,17	0,54-3,94
	Métamyélocytes neutrophiles	15-20	5-15	14,53-24,21	7,75-14,93	7,89-14,65	1,16-25,02
	Polynucléaires neutrophiles	30-50	15-20	24,06-48,46	10,14-25,34	9,06-23,38	8,92-27,24
	Basophiles	0,5-1		0,08-0,32	0,09-0,23	0,02-0,18	0-0,18
	Myélocytes basophiles						
	Métamyélocytes basophiles						
	Polynucléaires basophiles						
	Éosinophiles	1-4		1,43-3,97	1,21-4,01	0,72-3,72	1,08-4
	Myélocytes éosinophiles						
	Métamyélocytes éosinophiles						
	Polynucléaires éosinophiles						
Lignée monocytaire	Monocytes	0,5-2		0,03-1,73	0,12-1,9	0,08-1,74	0,12-1,24
	Macrophages						
Lignée érythroblastique				7,24-21,72	3,04-13,04	10,84-18,56	8,38-15,42
	Proérythroblastes	0,5-2		0,04-0,08	0,04-0,24	0,06-0,32	0,03-0,23
	Érythroblastes basophiles	1-4	1-3	0,01-0,49	0,01-0,67	0,16-0,98	0,07-0,73
	Érythroblastes polychromatophiles	5-10	5-8	6,28-19,84	2,45-11,35	9,58-16,54	7,12-13,9
	Érythroblastes acidophiles	6-10		0,04-1,42	1,34-2,42	0,16-1,48	0,17-1,57
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes	10-18	30-50	8,88-19,96	37,81-56,29	34,78-50,58	31,8-55,46
	Plasmocytes	0	000	0-0,02	0,04-0,08	0,04-0,07	0-0,02

RÉFÉRENCE		(14)					
Catégorie d'âge Nombre de témoins		4 mois 19	5 mois 22	6 mois 22	9 mois 16	12 mois 18	15 mois 12	18 mois 19
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*		0,03-1,09	0,13-0,87	0,08-1,04	0,08-0,92	0,04-0,7	0,14-0,78	0,02-0,88
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile		25,6-42,82	24,78-41,46	25,72-39,78	24,58-39,58	25,03-42,58	30,44-45,08	28,66-4346
	Myéloblastes							
	Promyélocytes	0,08-1,1	0,07-1,67	0,01-1,33	0,07-0,75	0,02-1,4	0,09-1,25	0,05-1,23
	Myélocytes neutrophiles	0,73-3,91	0,88-4,55	0,97-3,47	0,87-3,27	1,18-3,46	1,54-3,42	1,1-3,88
	Métamyélocytes neutrophiles	2,41-9,67	8,65-15,13	7,9-14,14	7,9-15,7	7,28-14,92	5,03-19,93	8,27-16,57
	Polynucléaires neutrophiles	9,38-27,02	9,92-25,76	11,58-26,12	11,23-24,87	10,87-28,47	14,03-30,19	11,37-29,65
	Basophiles	0,03-0,25	0,04-0,22	0,03-0,23	0,02-0,24	0,02-0,28	0,1-0,64	0,02-0,22
	Myélocytes basophiles							
	Métamyélocytes basophiles							
	Polynucléaires basophiles							
	Éosinophiles	1,76-6,5	1,12-2,84	0,92-3,24	0,66-2,82	0,83-3,01	1,48-5,3	0,54-4,86
	Myélocytes éosinophiles							
	Métamyélocytes éosinophiles							
	Polynucléaires éosinophiles							
Lignée monocytaire	Monocytes	0-1,5	0,23-2,35	0,2-2,22	0,2-2,14	0,06-2,98	0,59-2,77	0,53-3,71
	Macrophages							
Lignée érythroblastique		5,06-10,18	6,01-11,39	3,94--12,56	5,38-12,06	3,55-12,07	5,23-9,13	4,5-11,92
	Proérythroblastes	0,05-0,15	0,03-0,17	0,03-0,21	0,02-0,16	0,02-0,06	0,05-0,19	0,05-0,21
	Érythroblastes basophiles	0-0,48	0,14-0,8	0,08-0,56	0,07-0,55	0,05-0,55	0,01-0,75	0,16-0,84
	Érythroblastes polychromatophiles	4,26-9,42	5,2-9,9	3,7-10,9	4,32-11,12	3,08-10,58	4,48-7,6	3,41-10,53
	Érythroblastes acidophiles	0,04-0,64	0,05-0,97	0,18-0,94	0,09-0,87	0,14-0,88	0,15-1,15	0,05-0,93
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes	38,29-55,83	37,26-57,12	39,67-55,43	40,65-56,87	35,79-58,43	33,83-51,71	34,99-52,11
	Plasmocytes	0,02-0,04	0,06-0,16	0,04-0,1	0,02-0,04	0,04-0,1	0,05-0,19	0,02-0,14

RÉFÉRENCE		(5)				
Catégorie d'âge Nombre de témoins		0-24 H 19	3-5 jours 23	8-10 jours 23	26-33 jours / 1 mois 19	55-62 jours / 2 mois 8
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*		0	0	0	0	0
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile						
	Myéloblastes	0,5-2	0-2,5	0-3	0-2	0,5-5
	Promyélocytes	0,5-5	0,5-9	0,5-7	0-4	0-3
	Myélocytes neutrophiles	1-9	3-15	1-11	1,5-13	2-12
	Métamyélocytes neutrophiles	4,5-25	4-32	7-35	4-31	3-17
	Polynucléaires neutrophiles	10-40	15-38	11-45	2-27	8-19
	Basophiles	0-1,5	0-1,5	0-1	0	0-0,5
	Myélocytes basophiles	0-0,5	0-0,5	0-0,5	0	0
	Métamyélocytes basophiles	0-0,5	0-0,5	0-0,5	0	0-0,5
	Polynucléaires basophiles	0-0,5	0-0,5	0	0	0
	Éosinophiles	1-8	0-9,8	0-6	0-3	0-6
	Myélocytes éosinophiles	0,2-5	0-2	0-2	0-1	0-2
	Métamyélocytes éosinophiles	0-2,5	0-2,5	0-2	0-1	0-2
	Polynucléaires éosinophiles	1-3	0,5-3	0-2	0-1	0-2
Lignée monocytaire	Monocytes Macrophages	0-2,5	0-3	0-3	0-6,5	0-0,5
Lignée érythroblastique		23-70	0-34	0-20,5	1-20,5	6,5-37
	Proérythroblastes	0-1	0-0,5	0	0-0,5	0-1
	Érythroblastes basophiles	0,5-9	0-2	0-0,5	0-1,5	0,5-10
	Érythroblastes polychromatophiles	5-19	0-8,5	0-5	0-3,5	1,5-13
	Érythroblastes acidophiles	18-41	0-23	0-15	1-15	4,5-13
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes Plasmocytes	4-22,5 0	8-36,5 0	20-65,5 0	27,5-76 0	15-61,5 0

RÉFÉRENCES			(6)			(12)
Catégorie d'âge Nombre de témoins		82-99 jours / 3 mois 12	0-1 mois 42	2-12 mois 17	1 an-20 ans 92	0-15 jours
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*		0	1,86	1,11	0-4	
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile			62,78	54,38	47-77	60-80
	Myéloblastes	0-4	1,65	1,92	0-3,25	
	Promyélocytes	1,5-5	3,77	0,68	0-4,5	
	Myélocytes neutrophiles	0,5-16	18,14	16,73	8,5-25,25	
	Métamyélocytes neutrophiles	3-33	25,64	23,92	14-34,25	
	Polynucléaires neutrophiles	2-24	9,33	7,25	4,5-29	
	Basophiles	0-0,5			0-0,75	
	Myélocytes basophiles	0				
	Métamyélocytes basophiles	0-0,5				
	Polynucléaires basophiles	0				
	Éosinophiles	0-6			1-9	
	Myélocytes éosinophiles	0-2				
	Métamyélocytes éosinophiles	0-2				
	Polynucléaires éosinophiles	0-2				
Lignée monocytaire	Monocytes Macrophages	0-1				
Lignée érythroblastique		3,5-33,5	16,82	19,78	6,4-38,25	15-35
	Proérythroblastes	0-1	0,78	0,59	0-1,5	
	Érythroblastes basophiles	0-3,5	1,88	2,08	0,25-4,8	
	Érythroblastes polychromatophiles	1-7	12,59	14,49	4,8-34	
	Érythroblastes acidophiles	2,5-22	1,57	2,53	0-7,75	
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes Plasmocytes	31-86,5 0	19,74	25,38	4,75-35,75	10

RÉFÉRENCE		(12)						
Catégorie d'âge Nombre de témoins		1 mois	3 mois	6 mois	1 an	3 ans	6 ans	12 ans
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*								
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile		30-40	30-40	30-40	35-45	40-50	40-70	40-80
	Myéloblastes							
	Promyélocytes							
	Myélocytes neutrophiles							
	Métamyélocytes neutrophiles							
	Polynucléaires neutrophiles							
	Basophiles							
	Myélocytes basophiles							
	Métamyélocytes basophiles							
	Polynucléaires basophiles							
	Éosinophiles							
	Myélocytes éosinophiles							
	Métamyélocytes éosinophiles							
	Polynucléaires éosinophiles							
Lignée monocytaire	Monocytes Macrophages							
Lignée érythroblastique		15-35	15-35	15-35	15-35	15-35	15-35	15-35
	Proérythroblastes							
	Érythroblastes basophiles							
	Érythroblastes polychromatophiles							
	Érythroblastes acidophiles							
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes Plasmocytes	20-55	20-55	20-55	20-55	20-40	20-30	15-20

RÉFÉRENCE		(2)				
Catégorie d'âge Nombre de témoins		Roose Naissance 57	Gairdner 0-24 H 19	Gairdner 8-10 jours 23	Gairdner 3 mois 12	Roose 3 mois 24
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*						
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile						
	Myéloblastes	0,3	0,5-2	0-3	0-4	0,6
	Promyélocytes	0,8	0,5-5	0,5-7	1,5-5	0,8
	Myélocytes neutrophiles	4	1-9	1-11	0,5-16	2
	Métamyélocytes neutrophiles	19	4,5-25	7-35	3-33	12
	Polynucléaires neutrophiles	36	10-40	11-45	2-24	18,5
	Basophiles	0,12	0-1,5	0-1	0-0,5	0,1
	Myélocytes basophiles					
	Métamyélocytes basophiles					
	Polynucléaires basophiles					
	Éosinophiles	2,7	1-8	0-6	0-6	2,5
	Myélocytes éosinophiles					
	Métamyélocytes éosinophiles					
	Polynucléaires éosinophiles					
Lignée monocytaire	Monocytes Macrophages	0,9	0-2,5	0-3	0-1	0,7
Lignée érythroblastique		14,5	23,5-70	0-20,5	3,5-33,5	12
	Proérythroblastes					
	Érythroblastes basophiles					
	Érythroblastes polychromatophiles					
	Érythroblastes acidophiles					
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes Plasmocytes	15 0	4-22 0	20-62 0	31-81 0	44 0

RÉFÉRENCE						(8)
Catégorie d'âge Nombre de témoins		Roose 1 an 12	Roose 18 mois 19	Diwany 2-6 ans 12	Jacobsen 2-9 ans 13	2-5 ans 6
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*						
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile						
	Myéloblastes	0,5	0,4	1	0,7-1,8	0,95-1,45
	Promyélocytes	0,7	0,6	0,5	0,8-4,8	2,4-3
	Myélocytes neutrophiles	2	2,5	17	18-35	16,7-30,45
	Métamyélocytes neutrophiles	11	12	20	15,7-29	15,9-23,2
	Polynucléaires neutrophiles	20	20	21	3,5-22	7,35-18,85
	Basophiles	0,1	0,1	nc	0	
	Myélocytes basophiles					0-0,3
	Métamyélocytes basophiles					
	Polynucléaires basophiles					0-0,15
	Éosinophiles	2	3	6	0-2,5	
	Myélocytes éosinophiles					0,8-2,65
	Métamyélocytes éosinophiles					0,5-3,05
	Polynucléaires éosinophiles					0,6-2,4
Lignée monocytaire	Monocytes	1,5	2	0,4	0	0,45-1,95
	Macrophages					
Lignée érythroblastique		8	8	13	9,5-22,3	
	Proérythroblastes					0,35-1,3
	Érythroblastes basophiles					1,15-5,15
	Érythroblastes polychromatophiles					3,95-13,35
	Érythroblastes acidophiles					
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes	49	46	21	8,5-28	16,45-29,1
	Plasmocytes	0,03	0,06	nc	0,05-0,41	0-0,05

RÉFÉRENCE							(4)
Catégorie d'âge Nombre de témoins		6-9 ans 7	2-9 ans 13	10-14 ans 5	15-19 ans 7	10-19 ans 12	2-6 ans 12
Hémoblastes / cellules souches / cellules indifférenciées*							
Lignée granuleuse Lignée granuleuse neutrophile							
	Myéloblastes	0,85-1,95	0,85-1,95	1-1,6	0 8-1,85	0,8-1,85	1,05
	Promyélocytes	1,4-5,7	1,4-5,7	2,4-3,25	1,35-2,25	1,35-3,25	0,52
	Myélocytes neutrophiles	20,55-28,95	16,7-30,45	17,25-22,85	18,3-23	17,25-23	16,83
	Métamyélocytes neutrophiles	18,25-25,35	15,9-25,35	16,8-21,75	14,7-22,4	14,7-22,4	20,04
	Polynucléaires neutrophiles	7,6-20,1	6,65-21,7	9,5-29,3	12,95-26,7	9,5-29,3	20,86
	Basophiles						0,08
	Myélocytes basophiles	0,05-0,15	0-0,3	0,05-0,1	0-0,1	0-0,1	
	Métamyélocytes basophiles						
	Polynucléaires basophiles	0-0,25	0-0,25	0-0,2	0,05-0,2	0-0,2	
	Éosinophiles						
	Myélocytes éosinophiles	1,2-3,15	0,8-3,15	1,25-2,85	0,35-2,10	0,35-2,85	3,1
	Métamyélocytes éosinophiles	0,5-2	0,5-3,05	0,4-1,4	0,3-0,85	0,3-1,4	0,92
	Polynucléaires éosinophiles	0,4-2,65	0,4-2,65	0,95-2,65	0,55-1,2	0,55-2,65	2
Lignée monocytaire	Monocytes	0,6-1,15	0,45-1,95	0,6-1,15	0,65-1,45	0,6-1,45	0,37
	Macrophages						
Lignée érythroblastique							12,91
	Proérythroblastes	0,35-1,1	0,35-1,3	0,6-1,25	0,55-1,3	0,55-1,3	
	Érythroblastes basophiles	1,55-5,45	1,15-5,45	2,45-8,25	2,7-6,9	2,45-8,25	
	Érythroblastes polychromatophiles	4,7-15,6	3,95-15,8	7,45-18,25	10-18,6	7,45-18,6	
	Érythroblastes acidophiles						
Lignée lymphoïde	Lymphocytes/lymphoblastes	10,6-19,55	10 6-29 1	7,6-16,65	11,6-19,1	7,6-19,1	21,25
	Plasmocytes	0,1-0,4	0-0,4	0,25-0,85	0,05-0,5	0,25-0,85	

* Le GFHC recommande le terme « blastes ».

Références Bibliographiques

(1) Bain BJ. The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Haematol* 1996 ; **94** : 206-9.

(2) Bain BJ, Clark DM, Wilkins BS. Chapter 1, The normal bone marrow. *In* Bone Marrow Pathology, 4th *Wiley-Blackwell* Hoboken (NJ) ; 2010 : 1-53.

(3) den Ottolander GJ. The bone marrow aspirate of healthy subjects. *Br J Haematol* 1996 ; **95** : 574-5.

(4) Diwany M. Sternal marrow puncture in children. *Arch Dis Child* 1940 ; **15** : 159-70.

(5) Gairdner D, Marks J, Roscoe JD. Blood formation in infancy. Part I. The normal bone marrow. *Arch Dis Child* 1952 ; **27** : 128-33.

(6) Glaser K, Limarzi LR, Poncher HG. Cellular composition of the bone marrow in normal infants and children. *Pediatrics* 1950 ; **6** : 789-824.

(7) Hematocell (CHU Angers) ; www.hematocell.fr/

(8) Jacobsen KM. Untersuchungen über das Knochenmarkspunktat bei normalen Individuen verschiedener Alterkalssen. *Acta Med Scand* 1941 ; **56** : 417-46.

(9) Lee SH, Ho SJ, Thomas DT, Giri P, Lee H, Sia H, *et al.* A partial nucleated differential cell count of the bone marrow aspirate that is independent of peripheral blood dilution. *Int J Lab Hematol* 2008 ; **30** : 473-9.

(10) Lewandowski K, Kowalik MM, Pawlaczyk R, Rogowski J, Hellmann A. Microscopic examination of bone marrow aspirate in healthy adults – comparison of two techniques of slide preparation. *Int J Lab Hematol* 2012 ; **34** : 254-61.

(11) Maj S. Badania diagnostyczne w haematologii. Normy haematologiczne. *In* : Podstawy Haematologii. A. Dmoszyska & T. Robak (Eds), *Czelej*, Lublin ; 2008 : 123-61.

(12) Pages MP. Myélogramme normal chez l'enfant : indications techniques de prélèvement, valeurs usuelles, aspect cytologique normal. *EM Consulte* 2013 [90-15-0098-G].

(13) Perkins SL. Examination of the blood and bone marrow (Chapter I). *In* : Wintrobe's Clinical Haematology, 11th edition. J.P. Greer J. Foerster J.N. Lukens G.M. Rodgers F. Paraskevas & B. Glader (Eds), *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia ; 2003 : 5-25.

(14) Rosse C, Kraemer MJ, Dillon TL, McFarland R, Smith NJ. Bone marrow cell populations of normal infants; the predominance of lymphocytes. *J Lab Clin Med* 1977 ; **89** : 1225-40.

(15) Teillet F, Lortholary P. Cytologie médullaire normale. *Encycl Med Chir*, Hématologie 1971 ; 13000 M90-1.

(16) Sebahoun G, Sainty D, Horschowski N. Ponction médullaire et biopsie médullaire. Éditions Techniques. *Encycl Med Chir (Paris)* Hématologie 1991 ; 13000 A30 : 7 pages.

(17) Theml H, Diem H, Haferlach T. Color Atlas of Haematology: *Pratical Microscopic and Clinical Diagnostic* (2nd revised edition). *Thieme*, Stuttgart ; 2004 : 1-198.

(18) Zittoun R, Samama MM, Marie JP. Généralités sur les éléments du sang, sous-chapitre 6 « Méthodes d'investigation de la fonction médullaire ». *In* Manuel d'Hématologie. *Doin* Paris ; 1988 : 18-9.

Et aussi

Friebert SE, Shepardson LB, Shurin SB, Rosenthal GE, Rosenthal NS. Pediatric bone marrow cellularity: are we expecting too much? *J Ped Hematol Oncol* 1998 ; **20** : 439-43.

Hartsock RJ, Smith EB, Petty CS. Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest. A study made from 177 cases of sudden death examined by necropsy. *Am J Clin Pathol* 1965 ; **43** : 326-31.

Proytcheva M. Bone marrow evaluation for pediatric patients. *Int J Lab Hematol* 2013 ; **35** : 283-9.

Vaughan SL, Brockmyr F. Normal bone marrow as obtained by sternal puncture. *Blood* 1947 ; special issue : 54-9.

Conclusion

V. BARDET[1]

Ce travail de synthèse sur le myélogramme est une grande première ! Il est le fruit de la participation de tous, de l'implication de plus de cent collègues et de l'engagement de plusieurs membres du bureau du GFHC dans un travail de plus de deux années. Que chacun(e) en soit vivement remercié(e) !

Grâce à cette participation soutenue, le GFHC a pu émettre des recommandations sur les différentes phases de cet examen afin de proposer un référentiel pour accompagner la démarche d'accréditation. Vous avez pu découvrir dans ce numéro spécial des *Feuillets de Biologie,* ce nouveau témoignage de l'engagement du GFHC à accompagner les hématologistes cellulaires.

D'autres actions restent à effectuer concernant le myélogramme : encadrement de la formation des plus jeunes, valorisation des réseaux d'interprétation (ANDRAL en particulier), développement des EEQ…

Et bien d'autres perspectives de travaux collaboratifs s'ouvrent : analyses cytochimiques, interprétation des adénogrammes, des liquides…

Le GFHC fera appel à toutes les bonnes volontés pour poursuivre ce type d'expertise.

Bonnes lectures de frottis… et des *Feuillets de Biologie !*

[1] Présidente du Groupe Francophone d'Hématologie Cellulaire. Service d'Hématologie-Immunologie-Transfusion, Hôpitaux Universitaires de Paris Île-de-France-Ouest, Boulogne-Billancourt.