



Apport de l'imagerie en flux pour la recherche et la quantification des schizocytes par rapport aux techniques automatisées actuelles et intérêt du profil schizocytaire

Présenté par **Maëva Ghaleb** (interne en biologie médicale)

Travail de thèse d'exercice encadré par le Dr. Julien Demagny (PHU, CHU Amiens-Picardie)

Introduction

Objectif

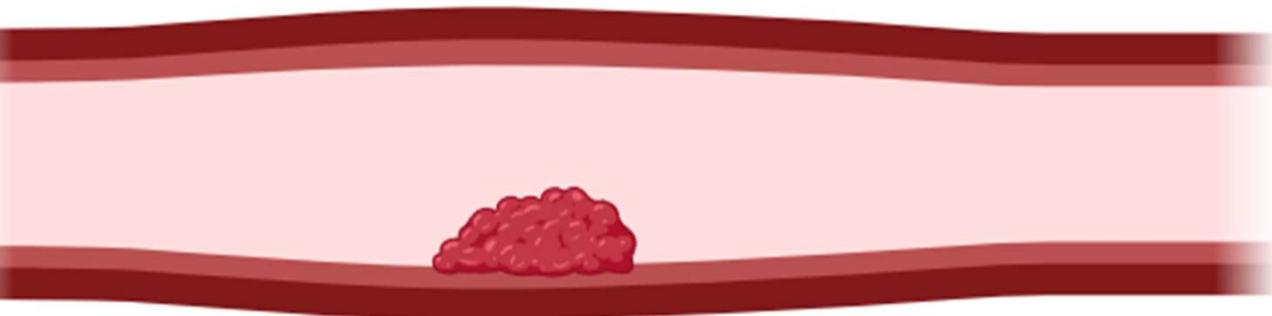
Matériel et méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

FORMATION DES SCHIZOCYTES



Introduction

Objectif

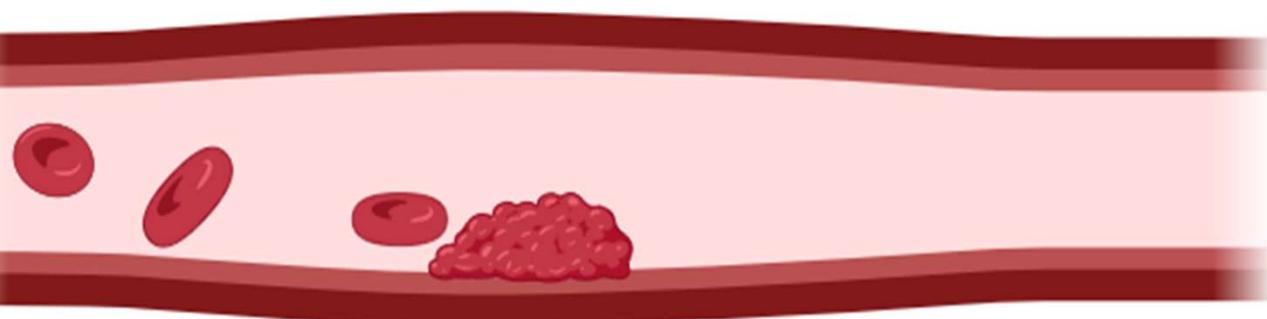
Matériel et méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

FORMATION DES SCHIZOCYTES



Introduction

Objectif

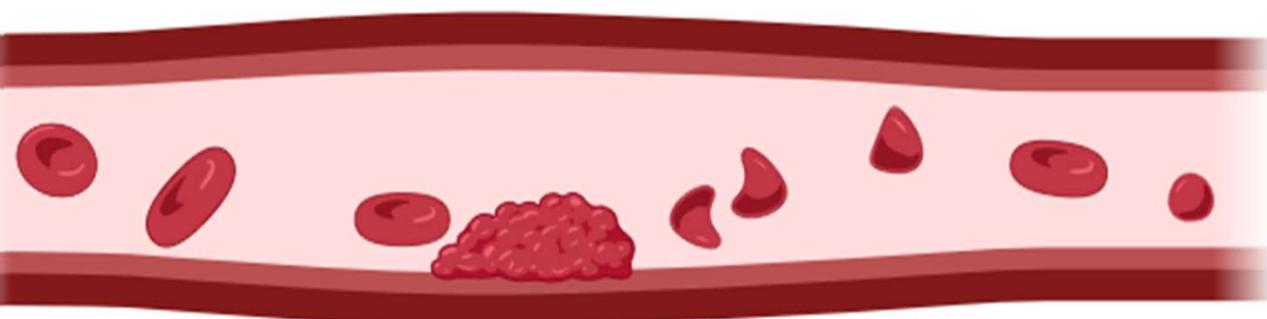
Matériel et méthodes

Résultats

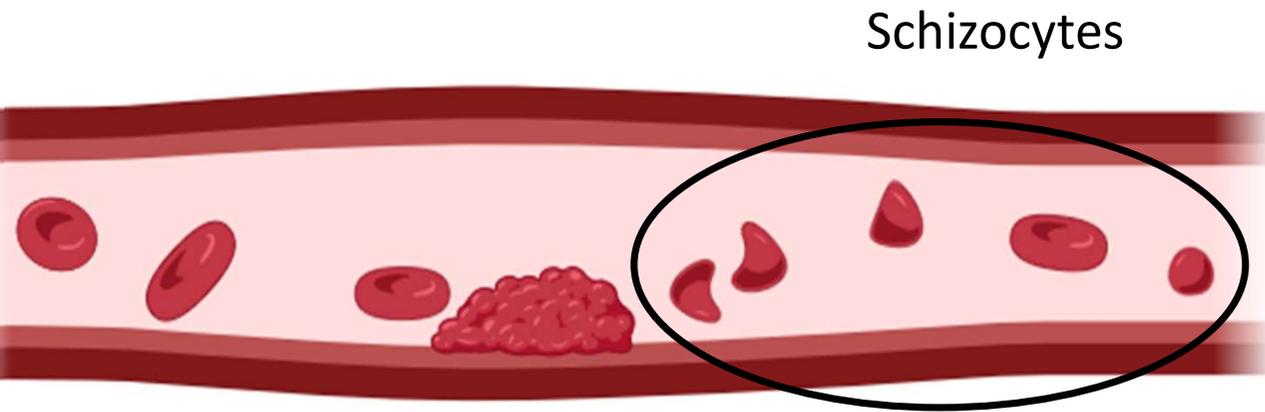
Discussion

Conclusion

FORMATION DES SCHIZOCYTES



FORMATION DES SCHIZOCYTES

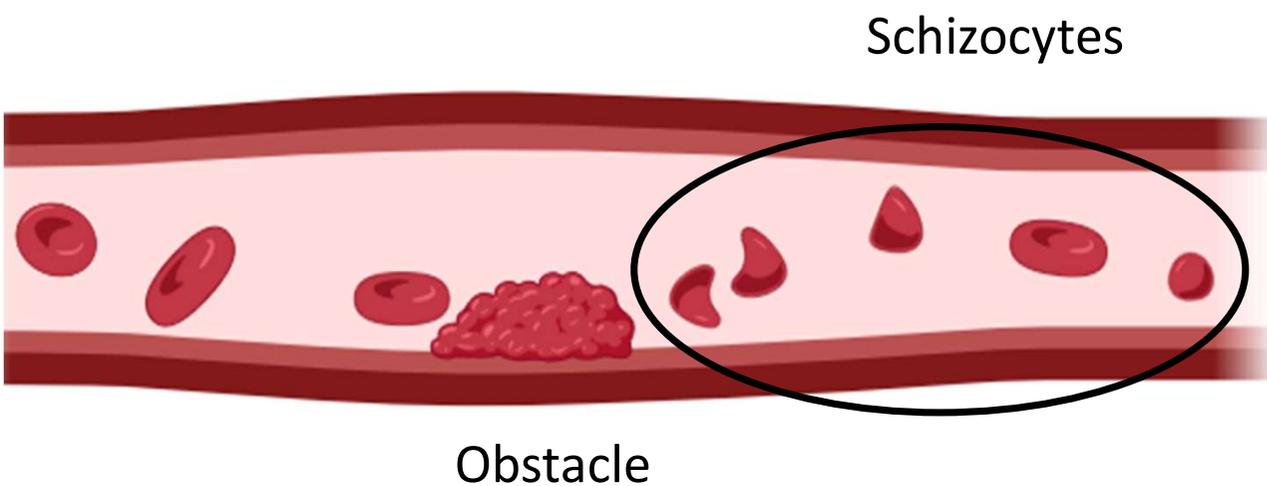


Obstacle



Thrombus plaquettaire ++
Métastase
Valve mécanique

FORMATION DES SCHIZOCYTES



➔ Mécanique/Thermique/Membranaire

➔ Très rare dans la population saine

Obstacle



Thrombus plaquettaire ++
Métastase
Valve mécanique

Introduction

Objectif

Matériel et méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

ETIOLOGIES

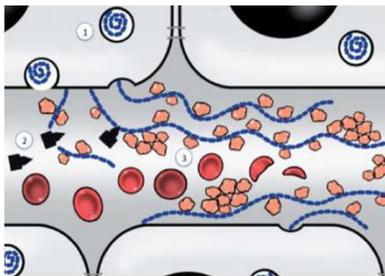
MAT

ETIOLOGIES

MAT

PTT

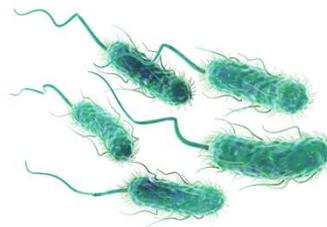
- Gravité +++
- 10 à 20 % de mortalité
- Déficit en ADAMTS 13



Adler et al, Rev Med Suisse, 2014

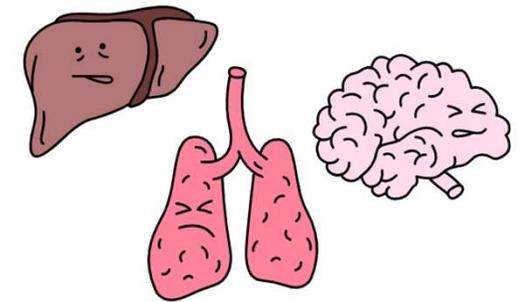
SHU

- « Typique » : Shigatoxine
- « Atypique » : Activation constante complément



MAT secondaire

- Cancer métastasé
- Greffes d'organes, CSH
- CIVD
- ...



SCHIZOCYTES : MANQUE D'HOMOGENÉITÉ DES RENDUS DE RÉSULTATS

Recommandation de l'ICSH (2012, 2021)

Frottis sanguin coloré au MGG

Minimum **1000 hématies**

Grossissement x100 ou x40

Anomalie morphologique majeure

Résultat rendu en pourcentage (**>1% MAT**)

SCHIZOCYTES : MANQUE D'HOMOGENÉITÉ DES RENDUS DE RÉSULTATS

Recommandation de l'ICSH (2012, 2021)

Frottis sanguin coloré au MGG

Minimum **1000 hématies**

Grossissement x100 ou x40

Anomalie morphologique majeure

Résultat rendu en pourcentage (**>1% MAT**)

Taille inférieure aux hématies normales

Décoloration centrale possible mais diminuée

Différentes formes bien définies

SCHIZOCYTES : MANQUE D'HOMOGENÉITÉ DES RENDUS DE RÉSULTATS

Recommandation de l'ICSH (2012, 2021)

Frottis sanguin coloré au MGG

Minimum **1000 hématies**

Grossissement x100 ou x40

Anomalie morphologique majeure

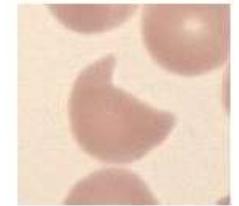
Résultat rendu en pourcentage (**>1% MAT**)

Taille inférieure aux hématies normales

Décoloration centrale possible mais diminuée

Différentes formes bien définies

Helmet-cells



SCHIZOCYTES : MANQUE D'HOMOGENÉITÉ DES RENDUS DE RÉSULTATS

Recommandation de l'ICSH (2012, 2021)

Frottis sanguin coloré au MGG

Minimum **1000 hématies**

Grossissement x100 ou x40

Anomalie morphologique majeure

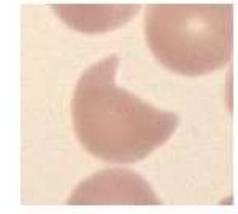
Résultat rendu en pourcentage (**>1% MAT**)

Taille inférieure aux hématies normales

Décoloration centrale possible mais diminuée

Différentes formes bien définies

Helmet-cells



Kératocytes



SCHIZOCYTES : MANQUE D'HOMOGENÉITÉ DES RENDUS DE RÉSULTATS

Recommandation de l'ICSH (2012, 2021)

Frottis sanguin coloré au MGG

Minimum **1000 hématies**

Grossissement x100 ou x40

Anomalie morphologique majeure

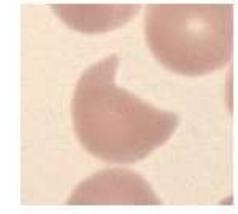
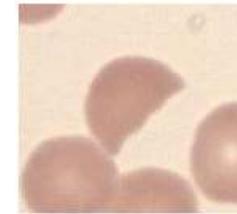
Résultat rendu en pourcentage (**>1% MAT**)

Taille inférieure aux hématies normales

Décoloration centrale possible mais diminuée

Différentes formes bien définies

Helmet-cells



Kératocytes



Triangles



SCHIZOCYTES : MANQUE D'HOMOGENÉITÉ DES RENDUS DE RÉSULTATS

Recommandation de l'ICSH (2012, 2021)

Frottis sanguin coloré au MGG

Minimum **1000** hématies

Grossissement x100 ou x40

Anomalie morphologique majeure

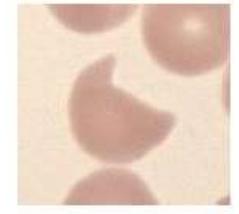
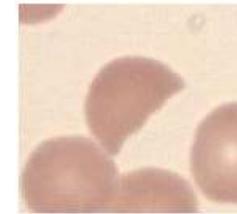
Résultat rendu en pourcentage (>1% MAT)

Taille inférieure aux hématies normales

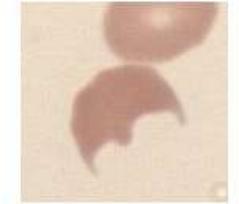
Décoloration centrale possible mais diminuée

Différentes formes bien définies

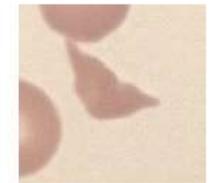
Helmet-cells



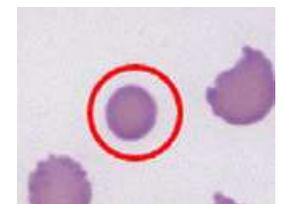
Kératocytes



Triangles



Croissants, microsphérocytes



Introduction

Objectif

Matériel et méthodes

Résultats

Discussion

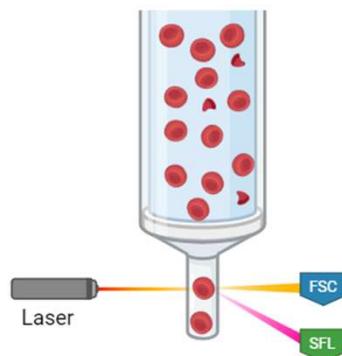
Conclusion

MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Fragmented Red blood Cell (FRC)

- Disponible sur la majorité des analyseurs (canal RET)
- Immédiat

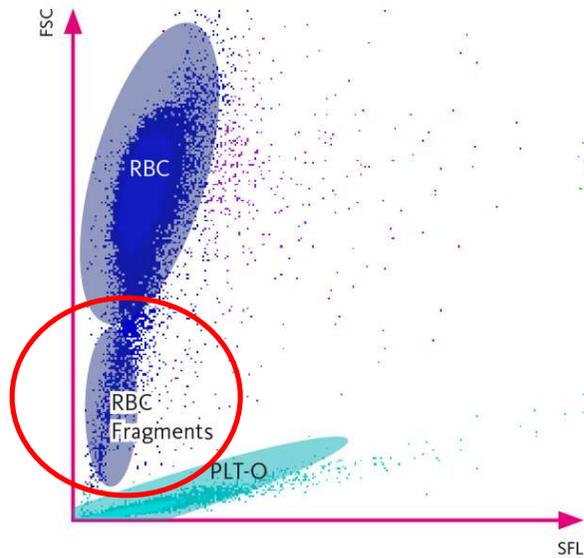


FSC : Forward scattergram
SFL : Side Fluorescent Light

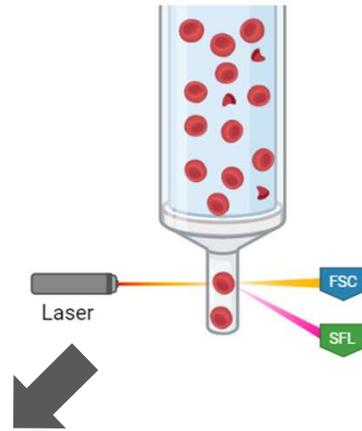
MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Fragmented Red blood Cell (FRC)

- Disponible sur la majorité des analyseurs (canal RET)
- Immédiat



Sysmex, globules rouges fragmentés

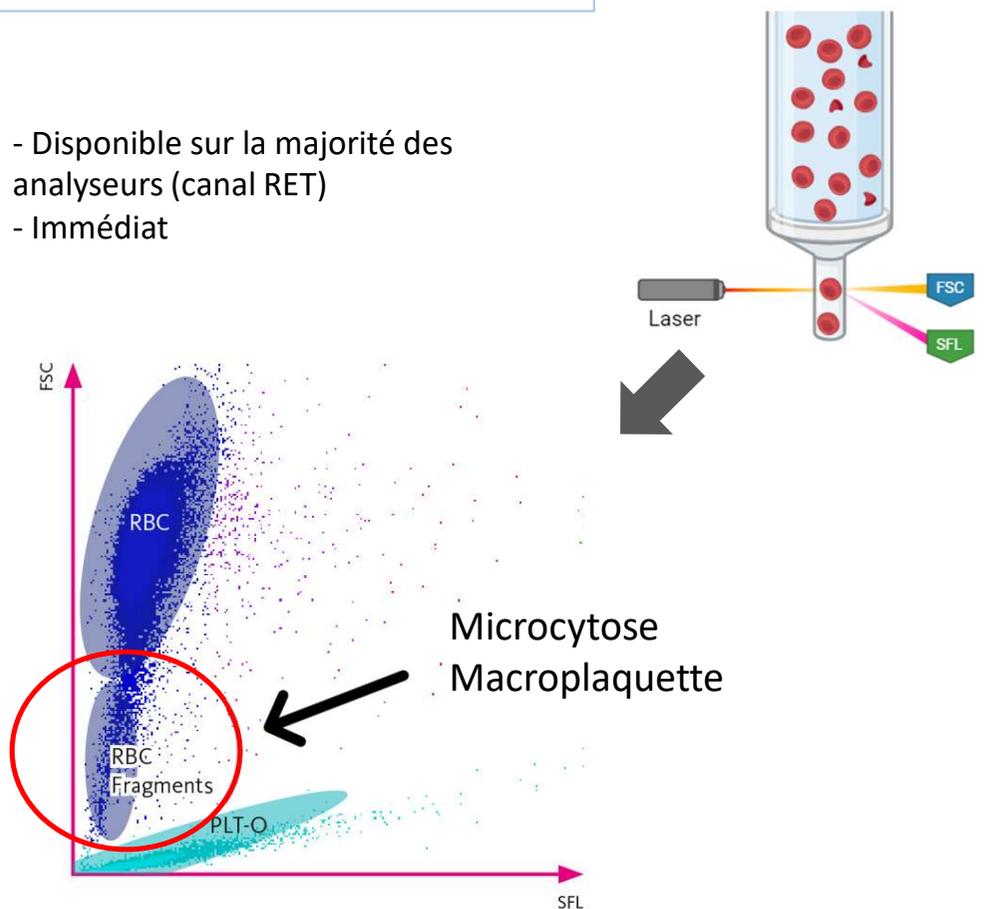


FSC : Forward scattergram
SFL : Side Fluorescent Light

MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Fragmented Red blood Cell (FRC)

- Disponible sur la majorité des analyseurs (canal RET)
- Immédiat



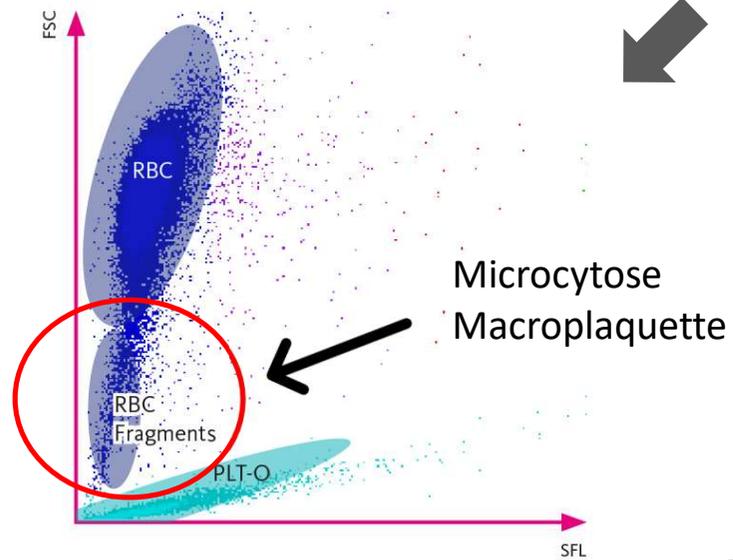
Sysmex, globules rouges fragmentés

FSC : Forward scattergram
SFL : Side Fluorescent Light

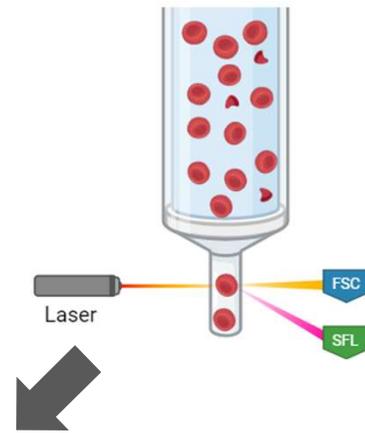
MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Fragmented Red blood Cell (FRC)

- Disponible sur la majorité des analyseurs (canal RET)
- Immédiat



Sysmex, globules rouges fragmentés



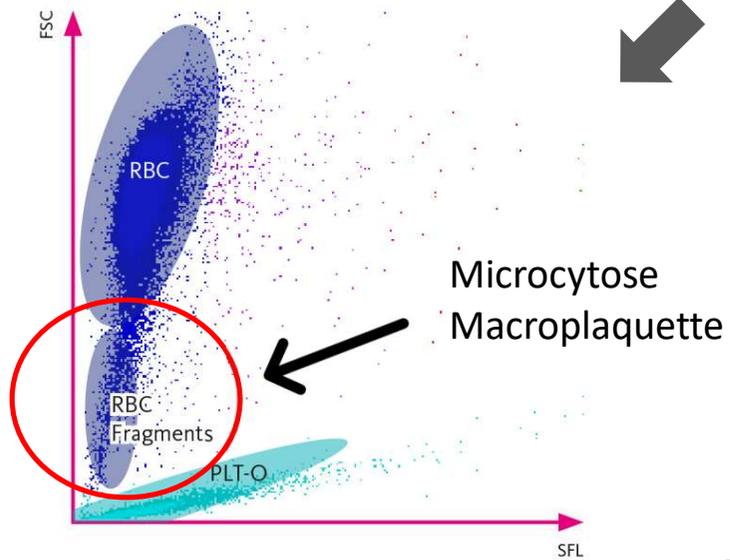
Microscopes automatisés

FSC : Forward scattergram
SFL : Side Fluorescent Light

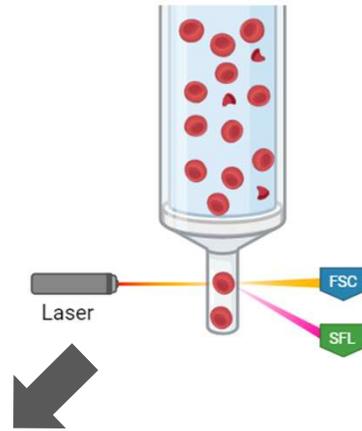
MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Fragmented Red blood Cell (FRC)

- Disponible sur la majorité des analyseurs (canal RET)
- Immédiat



Sysmex, globules rouges fragmentés



Microscopes automatisés

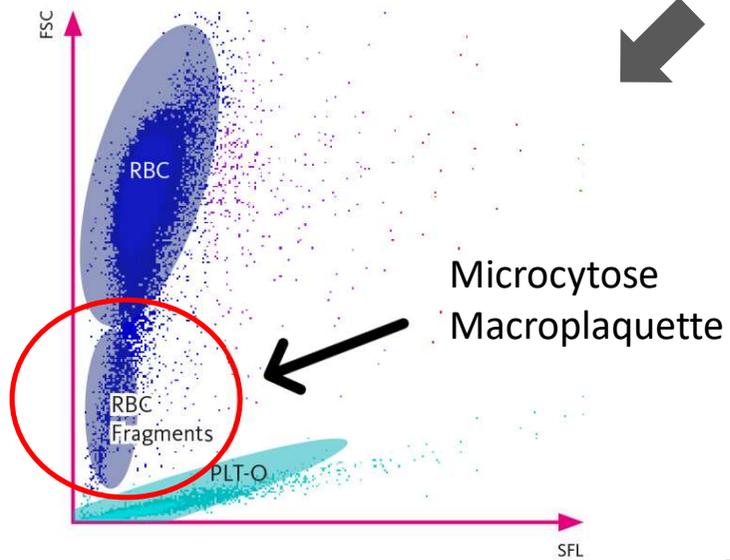


FSC : Forward scattergram
SFL : Side Fluorescent Light

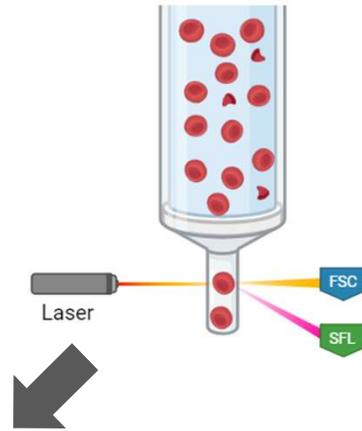
MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Fragmented Red blood Cell (FRC)

- Disponible sur la majorité des analyseurs (canal RET)
- Immédiat



Sysmex, globules rouges fragmentés



FSC : Forward scattergram
SFL : Side Fluorescent Light

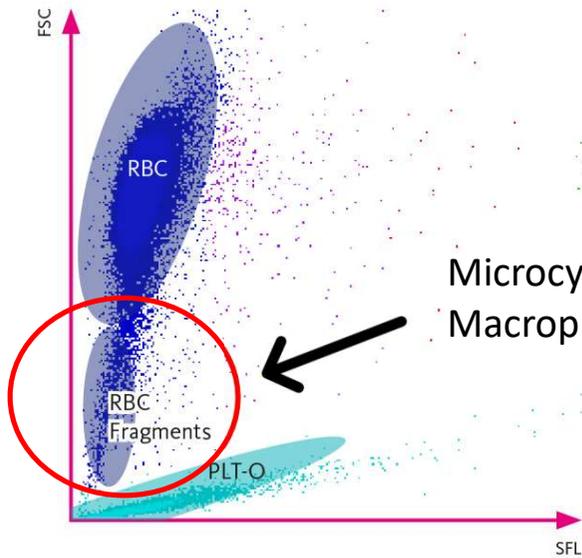
Microscopes automatisés



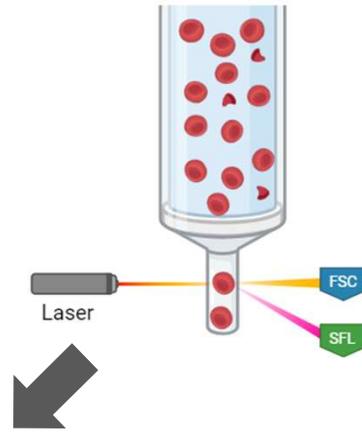
MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Fragmented Red blood Cell (FRC)

- Disponible sur la majorité des analyseurs (canal RET)
- Immédiat

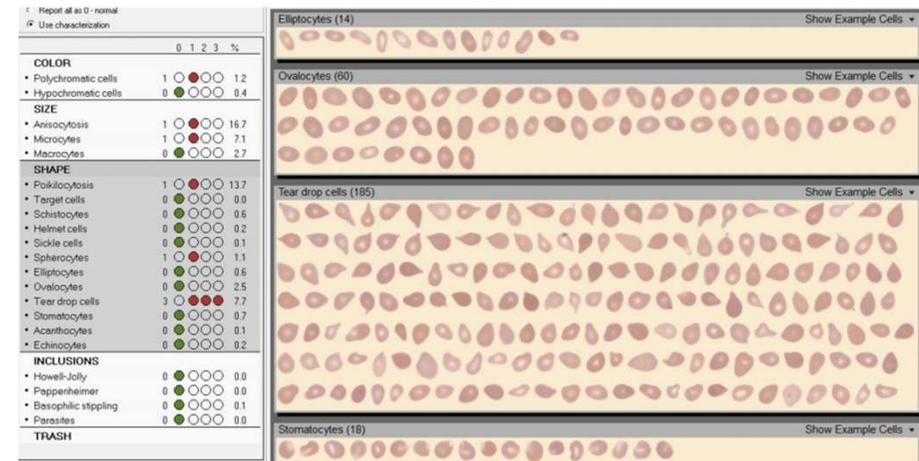


Sysmex, globules rouges fragmentés



FSC : Forward scattergram
 SFL : Side Fluorescent Light

Microscopes automatisés



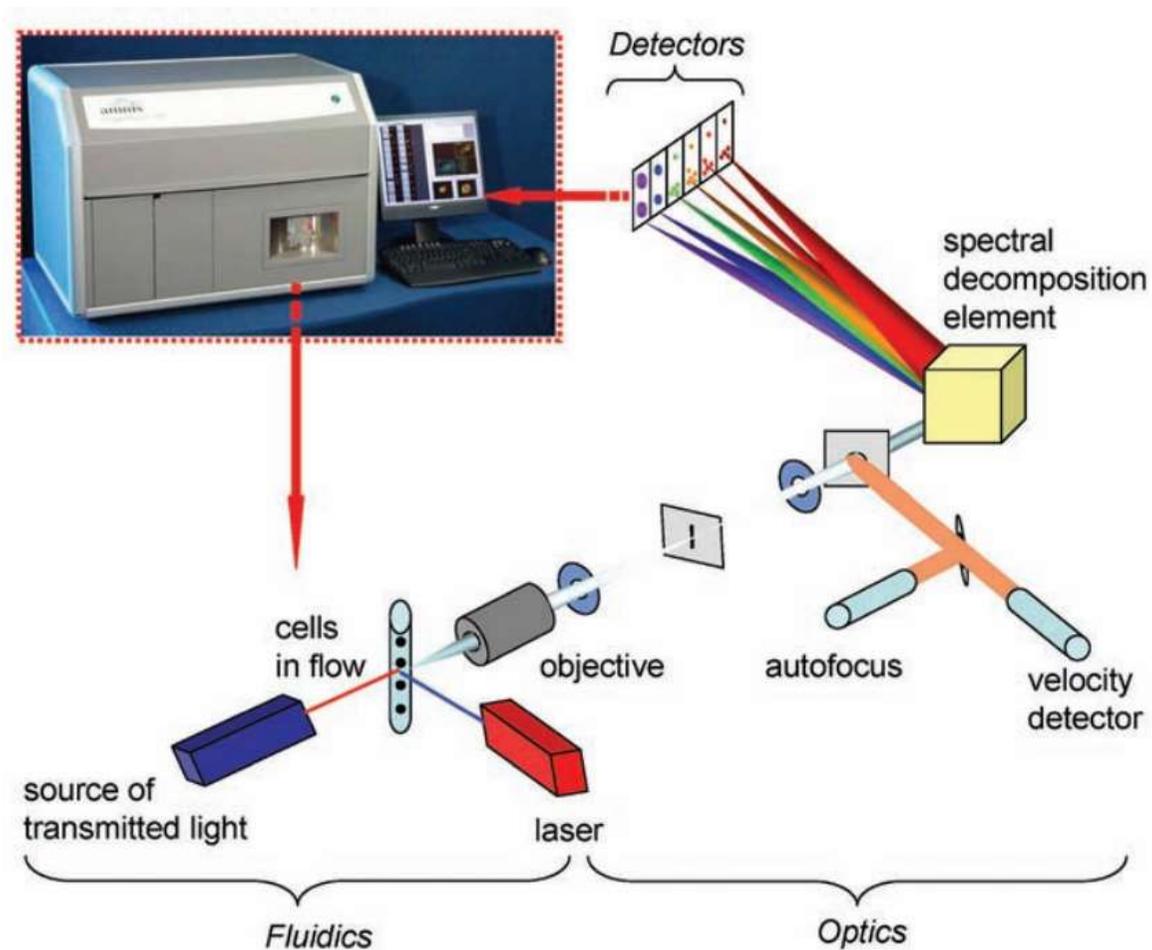
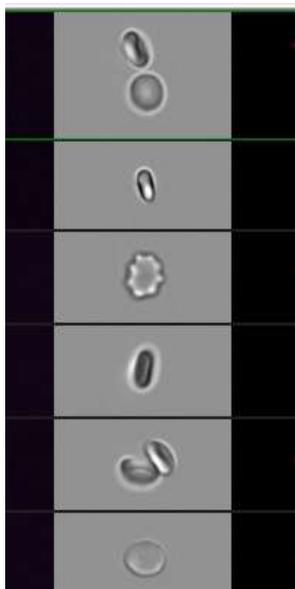
Criel et al. Int J Lab Hematol, 2016

MÉTHODES AUTOMATISÉES : AUGMENTATION DE LA STANDARDISATION ?

Imageur en flux

Avantage de la cytométrie en flux et de la microscopie optique

Analyse morphologique des cellules



QUANTIFICATION DES SCHIZOCYTES À L'ISX

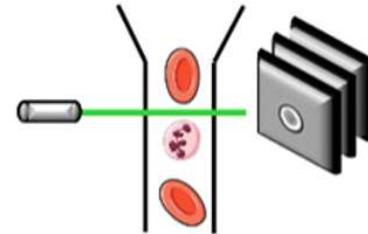


Image Stream X

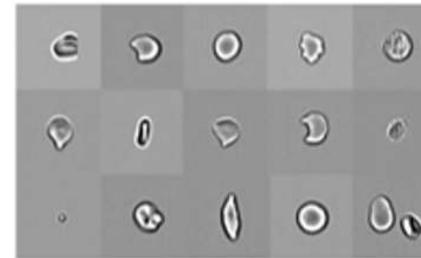
Sample acquisition



Images acquisition by IFC



Images
categorised
in 29 items



Images tagging



eBioMedicine

Part of THE LANCET Discovery Science

Volume 83, September 2022, 104209

Articles
Combining imaging flow cytometry and machine learning for high-throughput schistocyte quantification: A SVM classifier development and external validation cohort

Julien Demagny^{a,b}, Camille Roussel^{c,d}, Maïlys Le Guyader^b, Eric Guiheneuf^b,
Véronique Harrivel^b, Thomas Boyer^{a,b}, Momar Diouf^f, Michaël Dussiot^g,
Véronique Demagny^{b1}, [ORCID](#) [ORCID](#) [ORCID](#) [ORCID](#) [ORCID](#) [ORCID](#)



- Technique mise en place au CHU Amiens Picardie
- Acquisition de 135 045 images
- Machine learning → Algorithme de classification
- Précision de classification des schizocytes : 89%

Problématique

Chronophage :

- Etalement et coloration
- Temps de lecture (1000 GRs)

Variabilité inter-laboratoire, inter-observateur :

- Analyse subjective
- Formation

Objectifs

Comparer les performances
des différentes techniques
automatisées

Etudier les différents profils schizocytaires
et évaluer la relation de ce profil en
fonction de l'étiologie

Introduction

Objectif

Matériel et méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

Etude prospective, monocentrique

Critères d'exclusion :

- Manque d'au moins 1 décompte sur une des techniques
- Echantillons arrivés le week end

Cohorte principale

Novembre 2022 – Janvier 2023

136 patients – 208 échantillons

TOUTES les demandes de recherche de schizocytes

Etude prospective, monocentriqueCritères d'exclusion :

- Manque d'au moins 1 décompte sur une des techniques
- Echantillons arrivés le week end

Cohorte principale

Novembre 2022 – Janvier 2023

136 patients – 208 échantillons

TOUTES les demandes de recherche de schizocytes



Lecture du frottis



% de schizocytes ISX



Obtention du FRC



% schizocytes DI-60

Etude prospective, monocentrique**Cohorte élargie**

Juin 2018 – Avril 2023

75 patients – 225 échantillons

Uniquement les prélèvements avec schizocytes > 1%



Lecture du frottis



% de schizocytes ISX

Critères d'exclusion :

- Manque d'au moins 1 décompte sur une des techniques
- Echantillons arrivés le week end

Cohorte principale

Novembre 2022 – Janvier 2023

136 patients – 208 échantillons

TOUTES les demandes de recherche de schizocytes



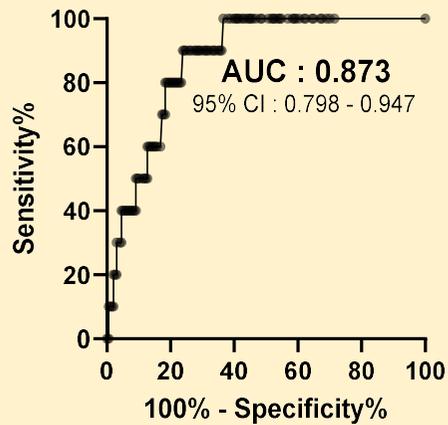
Obtention du FRC



% schizocytes DI-60

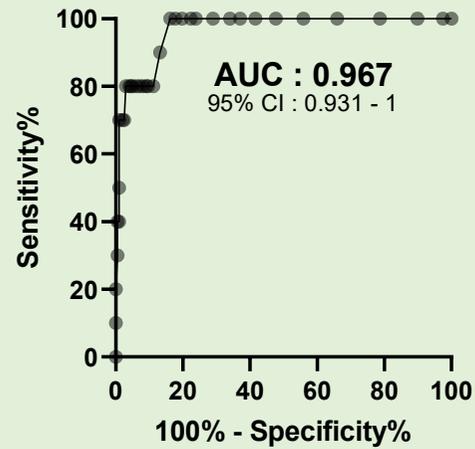
PERFORMANCES POUR UN SEUIL DE POSITIVITÉ DE 1%

FRC



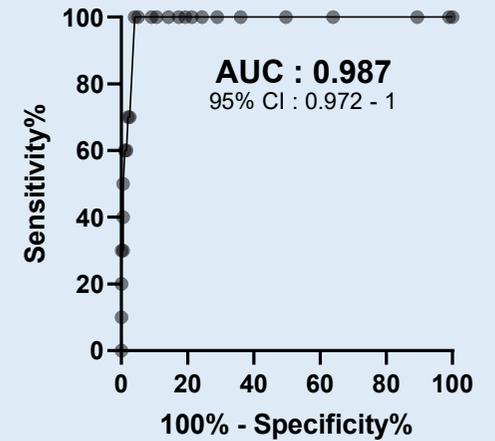
- Sensibilité : 80%
- Spécificité : 77,2%

DI-60



- Sensibilité : 100%
- Spécificité : 76,1%

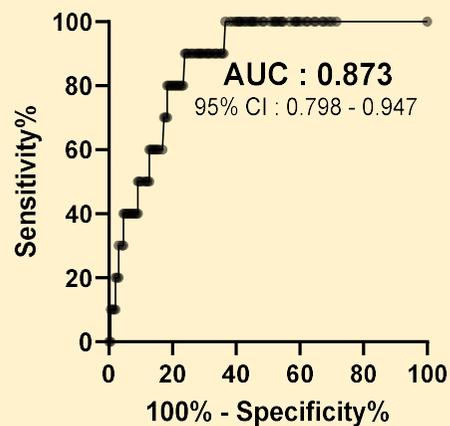
ISX



- Sensibilité : 100%
- Spécificité : 85,8%

PERFORMANCES

FRC

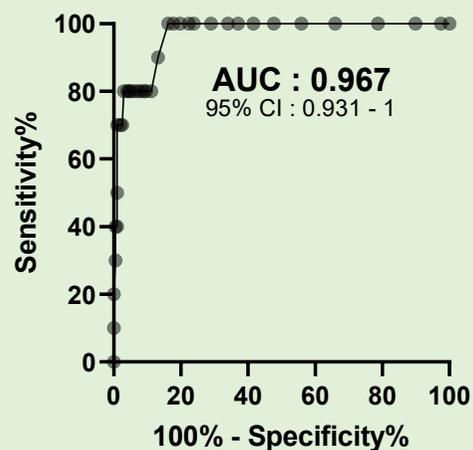


- Sensibilité : 80%
- Spécificité : 77,2%



48 lames à relire

DI-60

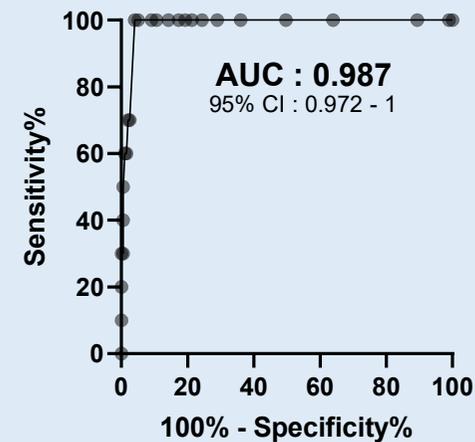


- Sensibilité : 100%
- Spécificité : 76,1%



48 lames à relire

ISX



- Sensibilité : 100%
- Spécificité : 85,8%



28 lames à relire

PERFORMANCES

FRC

- Mauvaise performance
- Risque de sur ou de sous-estimation
- Ne prend pas en compte la forme des schizocytes

Counter	Question assessed	Number and type of patients	Center	FRC %	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
ADVIA 2120	Occurrence of TAM	69, post BMT	Nancy	0.25	1	0.734	0.227	1
	Presence of schistocyte on the blood smear/TAM	131, unselected	Nancy	1	0.80	0.953	0.571	0.984
				0.25	1	0.171	0.23	1
	Presence of schistocyte on the blood smear	100, unselected	Roma	0.2	0.918	0.576	0.639	0.968
XE-2100	Presence of schistocyte on the blood smear	300, unselected	Paris	0.5	0.925	0.457	0.268	0.966
	Presence of schistocyte on the blood smear	574, suspicion of TAM	Paris	0.5	0.952			0.987
	Presence of schistocyte on the blood smear	831, unselected	Paris	0.5	0.967			0.993

PERFORMANCES

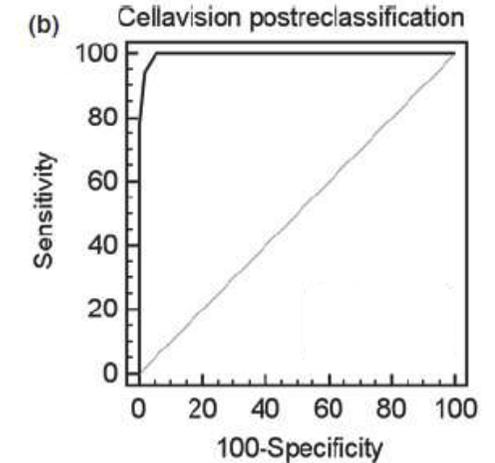
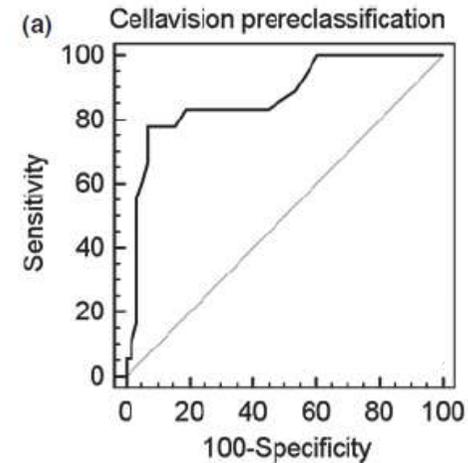
FRC

- Mauvaise performance
- Risque de sur ou de sous-estimation
- Ne prend pas en compte la forme des schizocytes

DI-60

- Nécessite une post-classification
- Chronophage

Counter	Question assessed	Number and type of patients	Center	FRC %	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
ADVIA 2120	Occurrence of TAM	69, post BMT	Nancy	0.25	1	0.734	0.227	1
				1	0.80	0.953	0.571	0.984
	Presence of schistocyte on the blood smear/TAM	131, unselected	Nancy	0.25	1	0.171	0.23	1
				1	0.885	0.876	0.639	0.968
	Presence of schistocyte on the blood smear	100, unselected	Roma	0.2	0.918	0.576		
XE-2100	Presence of schistocyte on the blood smear	300, unselected	Paris	0.5	0.925	0.457	0.268	0.966
	Presence of schistocyte on the blood smear	574, suspicion of TAM	Paris	0.5	0.952			0.987
	Presence of schistocyte on the blood smear	831, unselected	Paris	0.5	0.967			0.993



PERFORMANCES

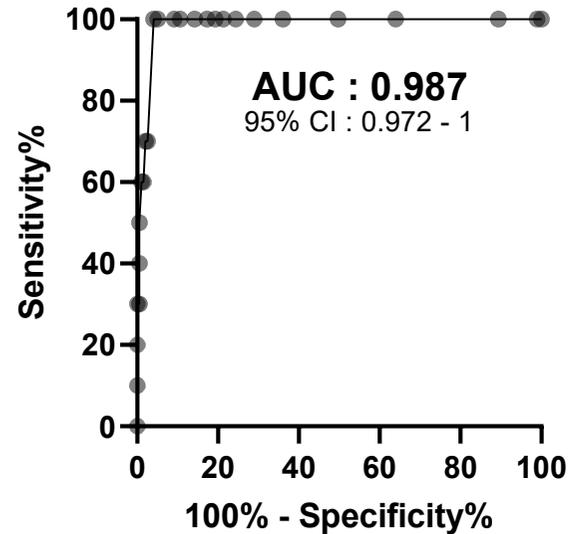
ISX

Avantages :

Meilleures performances
Rapidité d'utilisation
Faible coût

Perspectives :

Intégration aux analyseurs
Aide pour l'analyse de routine → Alarmes plus ciblées
Reconnaissance d'autres anomalies morphologiques

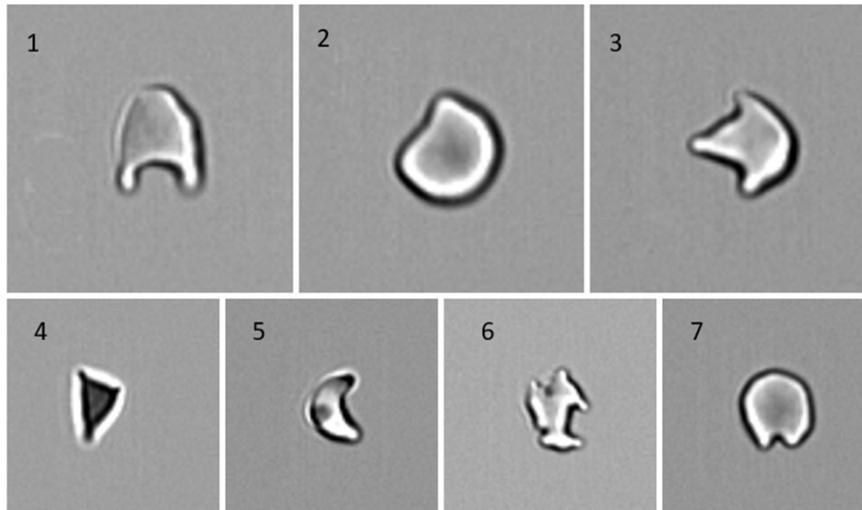


Au seuil de positivité de 1%

→ Sensibilité : 100%
→ Spécificité : 85,8%



CLASSIFICATION AUTOMATISÉE DES DIFFÉRENTES MORPHOLOGIES DE SCHIZOCYTE



7 formes :

1. Kératocytes
2. Helmet cells
3. Tricornes
4. Triangles
5. Croissants
6. Formes autres
7. Bite cells

	Référence							
	1	2	3	4	5	6	7	
Prédiction	1	51,69	6,50	20,00	2,22	7,05	3,30	6,80
	2	12,92	82,93	0,00	8,89	5,77	4,40	10,54
	3	2,25	0,54	46,15	0,00	2,56	4,40	0,00
	4	0,00	0,27	0,00	42,22	1,28	4,40	0,00
	5	10,11	1,08	10,77	6,67	74,36	10,99	1,70
	6	7,30	1,08	18,46	40,00	7,05	68,68	1,70
	7	15,73	7,59	4,62	0,00	1,92	3,85	79,25

Précision : 71%

CLASSIFICATION AUTOMATISÉE DES DIFFÉRENTES MORPHOLOGIES DE SCHIZOCYTE

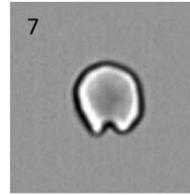
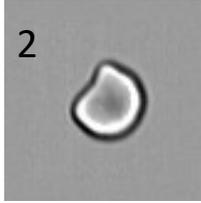
Bonne précision mais à améliorer
Faible nombre de formes disponible à l'entraînement

	Référence							
	1	2	3	4	5	6	7	
Prédiction	1	51,69	6,50	20,00	2,22	7,05	3,30	6,80
	2	12,92	82,93	0,00	8,89	5,77	4,40	10,54
	3	2,25	0,54	46,15	0,00	2,56	4,40	0,00
	4	0,00	0,27	0,00	42,22	1,28	4,40	0,00
	5	10,11	1,08	10,77	6,67	74,36	10,99	1,70
	6	7,30	1,08	18,46	40,00	7,05	68,68	1,70
	7	15,73	7,59	4,62	0,00	1,92	3,85	79,25

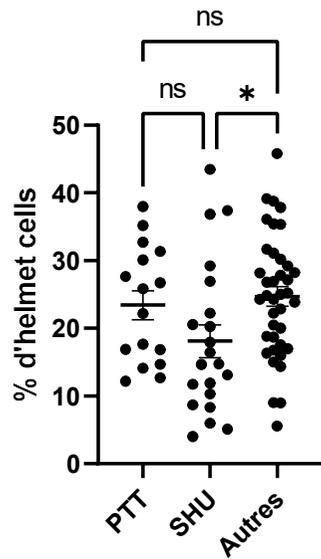
Perspective :
Entraînement de l'IA

Kératocytes (1)	Helmet cells (2)	Tricornes (3)	Triangles (4)
710	1473	257	180
Croissants (5)	Formes autres (6)	Bite cells (7)	Total
621	726	1172	5139

PROFIL SCHIZOCYTAIRE EN FONCTION DES ÉTIOLOGIES



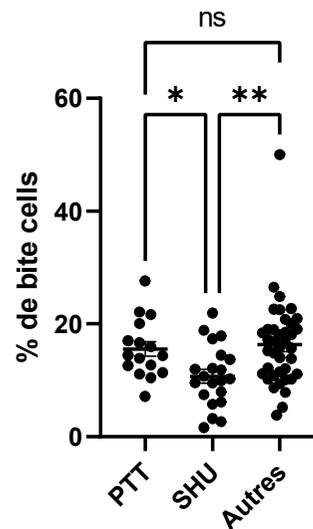
% d'helmet cells par étiologie



* $p = 0,0337$

+

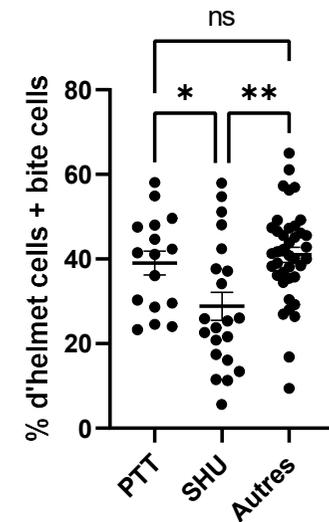
% de bite cells par étiologie



* $p = 0,0432$
** $p = 0,0056$



% d'helmet cells et de bite cells par étiologie



* $p = 0,0404$
** $p = 0,0015$

PROFIL SCHIZOCYTAIRE EN FONCTION DES ÉTIOLOGIES

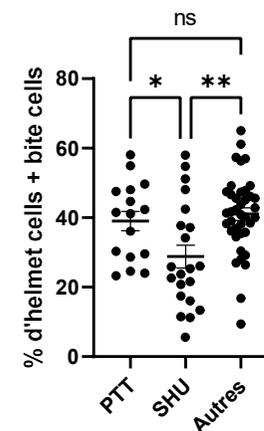
Moins d'helmet cells et de bite cells dans les SHU

Perspective :

Etudier la relation du profil schizocytaire et les atteintes d'organes ?

Approche par clustering?

% d'helmet cells et de bite cells
par étiologie





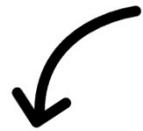
Importance de la quantification de schizocytes



Méthodes d'automatisation d'analyse peu utilisées en routine



ISX : outil prometteur



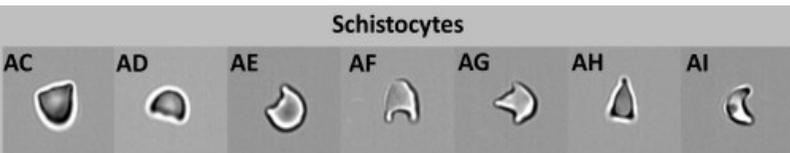
Très bonnes performances



Ouvre un champ d'étude aux sous classes de schizocyte



Aide pour le biologiste





Merci pour votre attention

eBioMedicine

Part of THE LANCET *Discovery Science*

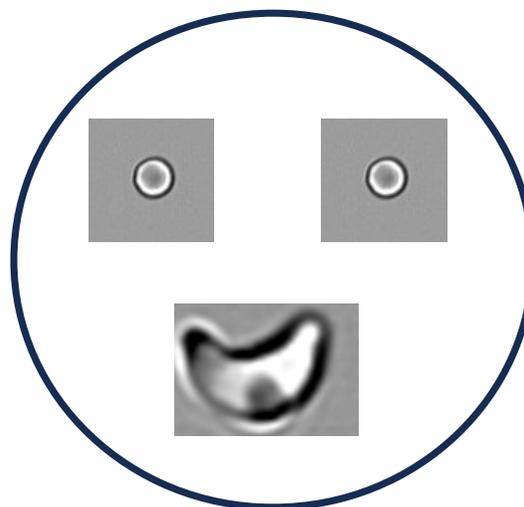
Volume 83, September 2022, 104209



Articles

Combining imaging flow cytometry and machine learning for high-throughput schistocyte quantification: A SVM classifier development and external validation cohort

Julien Demagny^{a b}, Camille Roussel^{c d e}, Mailys Le Guyader^b, Eric Guiheneuf^b,
Véronique Harrivel^b, Thomas Bover^{a b}, Momar Diouf^f, Michaël Dussiot^{g h},
Yohann Demont^{b 1}  , Loïc Garçon^{a b 1}  



Contact : demagny.julien@chu-amiens.fr