

# Recommandations pour l'analyse du liquide céphalorachidien au cours des leucémies aiguës

## Recommendations for cerebrospinal fluid examination in acute leukemia

Sandrine Girard<sup>1</sup>

Odile Fenneteau<sup>2</sup>

Fanélie Mestrallet<sup>1</sup>

Xavier Troussard<sup>3</sup>

Jean-François Lesesve<sup>4</sup>

Pour le Groupe francophone  
d'hématologie cellulaire (GFHC)

<sup>1</sup> Service d'hématologie biologique,  
Centre de biologie et pathologie Est,  
LBMMS, Hospices civils de Lyon,  
France  
<sandrine.girard@chu-lyon.fr>

<sup>2</sup> Laboratoire d'hématologie, AP-HP  
Robert Debré, Paris, France

<sup>3</sup> Laboratoire d'hématologie, CHU  
Côte de Nacre, Caen, France

<sup>4</sup> Service d'hématologie biologique,  
CHU de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy,  
France

**Résumé.** L'identification cytologique de blastes dans le liquide céphalorachidien (LCR) au cours des hémopathies aiguës, lymphoïdes ou myéloïdes, de l'adulte et de l'enfant, au diagnostic initial ou lors de leur évolution conduit au diagnostic d'infiltration blastique méningée. La mise en place de thérapeutiques basées sur un risque « méningé », selon une classification standard internationale, a permis de réduire le nombre de rechutes cérébro-méningées. Établie en 1993, cette classification permet, d'uniformiser les approches thérapeutiques en fonction du *status* de l'atteinte méningée. Basée sur la numération des hématies, des éléments nucléés, la présence de blastes, elle nécessite de disposer d'un mode opératoire uniforme pour obtenir des résultats d'analyse comparables entre laboratoires de biologie médicale. Afin d'améliorer la qualité d'analyse du LCR dans les leucémies aiguës, des recommandations préanalytiques (délai d'acheminement), analytiques (cyto-centrifugation, addition de sérum enrichi en protéine, vitesse et durée de cyto-centrifugation) et postanalytiques (durée de conservation) sont établies par le Groupe francophone d'hématologie cellulaire.

**Mots clés :** liquide cérébrospinal, leucémie aiguë, recommandation

**Abstract.** Cytological identification of blasts in cerebrospinal fluid in acute leukemia, lymphoid or myeloid, in adult and child, at diagnosis or during follow up lead to the diagnosis of leukemic meningitidis. Suitable CNS therapy based on a defined "CNS status" following an international standardized classification, lead to decrease cerebrospinal relapses. Established in 1993, this classification allows to treat patients based on their CNS status. Based on the red blood cells count, nucleated cells count and presence of blasts, it requires a standard technical procedure that guarantees the comparability of results coming from different medical laboratory. To improve the quality of cerebrospinal fluid analysis, in acute leukemias, preanalytical guidelines (turn around time), analytical guidelines (cyto-centrifugation, adding serum protein, speed and duration of cyto-centrifugation) and postanalytical guidelines (duration of conservation) are set by the *Groupe francophone d'hématologie cellulaire*.

**Key words:** cerebrospinal fluid, leukemia, recommendations

Article reçu le 11 juillet 2016,  
accepté le 29 juillet 2016

Le liquide céphalorachidien (LCR) est sécrété par les plexus choroïdes ventriculaires et, *a minima*, par l'épendyme ventriculaire et les vaisseaux sanguins des espaces sous-arachnoïdiens ; le LCR occupe les cavités ventriculaires cérébrales et les espaces arachnoïdiens. Le volume total de LCR est de 140 mL chez l'adulte, 100 mL chez l'enfant

de 10 ans et 50 mL chez le nourrisson. Il est produit par filtration et sécrétion active et est renouvelé 3 fois/jour. La résorption a lieu entre les espaces sous-arachnoïdiens et le sang veineux, par différence de pression au niveau des villosités de l'arachnoïde. Les échanges entre le LCR et le système nerveux central se font au niveau de la barrière méningo-encéphalique, et ceux entre le sang et le LCR au travers de la barrière hémato-méningée.

**Tirés à part :** S. Girard

Le LCR peut être le siège d'une atteinte tumorale au cours des hémopathies aiguës, au diagnostic initial ou lors de leur évolution. Au diagnostic de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), un envahissement méningé est identifié dans 3 à 5 % des cas chez l'enfant et 5 à 10 % des cas chez l'adulte, avec une plus grande fréquence au cours des LAL T et des formes hyperleucocytaires [1-7]. Dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), l'atteinte représente 10 % des cas chez l'enfant et moins de 5 % des cas chez l'adulte, et est plus fréquemment identifiée dans les LAM4 (FAB), LAM5 (FAB) et les formes hyperleucocytaires [5, 8-15]. L'identification d'une atteinte méningée blastique au diagnostic d'une LA est de mauvais pronostic. Lors des rechutes, l'atteinte méningée, isolée ou non, est surtout observée dans les LAL, en pédiatrie et chez l'adulte, avec des pourcentages variant entre 1 et 15 % des patients selon les études [9, 10, 16-18]. Le pronostic après rechute avec atteinte méningée est très péjoratif. Chez l'adulte, jusqu'à 15 % des rechutes ont une atteinte méningée [19]. Chez l'enfant, les séries actuelles font état d'une nette diminution de cette localisation représentant dans certains essais cliniques moins de 2 % des cas [20]. Ce progrès est la conséquence de la mise en place de thérapeutiques adaptées, telles que l'intensification de chimiothérapies intra-thécales basées sur un risque méningé défini au diagnostic selon une classification standard internationale. Établie en 1993 lors du *National cancer institute workshop*, puis suivie de quelques évolutions, cette classification prend en compte le nombre d'hématies, d'éléments nucléés par  $\text{mm}^3$  et la présence ou non de blastes trouvés sur les étalements de cytocentrifugation de LCR natif [21]. Les patients sont alors traités en fonction du *status* de leur atteinte méningée [22, 23].

La cytologie du LCR, qui permet d'identifier la présence de blastes au microscope, reste donc le *gold standard* dans la détection des envahissements neuro-méningés, et ce malgré les progrès de l'imagerie (IRM), et le développement de techniques non cytologiques telles que l'immunophénotypage par cytométrie en flux, l'hybridation fluorescente *in situ*, la PCR, ou la recherche de marqueurs protéomiques [24-26]. Il est donc important de disposer d'une technique optimale pour réaliser les étalements puis l'identification cytologique éventuelle des blastes.

### Définition de l'atteinte méningée dans les hémopathies aiguës et le *central nervous system status*

Les atteintes méningées des leucémies aiguës (LA) correspondent à la présence de foyers de cellules pathologiques

situés le plus souvent au niveau de la dure-mère, de l'arachnoïde ou du parenchyme cérébral [27-30]. La diffusion dans ces espaces des cellules blastiques est d'origine vasculaire, par embolies hématogènes. La présence d'une cellule blastique par  $\text{mm}^3$  dans le LCR correspond approximativement à la présence de  $10^5$  cellules blastiques dans l'ensemble de l'espace intra-thécal.

Avant les années 1980, le diagnostic d'infiltration blastique neuro-méningée dans les hémopathies aiguës était affirmé en morphologie après identification de blastes dans le LCR comportant en valeur absolue plus de 10 leucocytes/ $\text{mm}^3$  [31]. En 1985, lors du *Rome leukemia workshop*, la valeur absolue des leucocytes a été abaissée à  $5/\text{mm}^3$  [21]. Puis au cours des années 1990, l'équipe du St Jude Children's Hospital observa un risque élevé de rechute méningée chez des enfants dont le LCR était blastique avec une valeur absolue des leucocytes inférieure à  $5/\text{mm}^3$  [1]. Une révision de la définition de l'atteinte méningée fut alors réalisée tenant compte de la proportion des leucocytes et la classification du *Central nervous system (CNS) status* (CNS status) fut adoptée en 1993 lors du *National cancer institute workshop* (tableau 1).

Dès 1996, les ponctions lombaires traumatiques, contaminées par des éléments du sang périphérique et notamment comportant plus de 10 hématies par  $\text{mm}^3$  et des blastes étaient considérées comme « contaminées » [22, 32].

En 2003, la description dans plusieurs études cliniques de ponctions traumatiques (*traumatic lumbar puncture* : TLP) avec plus de 10 hématies par  $\text{mm}^3$  infiltrées ou non par des blastes (respectivement TPL + et TLP -), a permis de faire à nouveau évoluer le *CNS status* [23] (tableau 2).

Appliquée initialement dans les LA pédiatriques, cette classification, établie en 2003, est aujourd'hui utilisée également chez les patients adultes. L'utilisation de ce *CNS status* a pour but de permettre une meilleure comparaison entre les études cliniques et d'harmoniser les attitudes thérapeutiques lors des atteintes méningées. Elle est basée sur le résultat de la numération des leucocytes et des hématies à l'hématimètre, méthode de comptage de référence, et sur l'identification ou non de blastes sur l'étalement cytocentrifugé du LCR natif homogénéisé. Elle nécessite, dans le cadre des bilans d'extension et de suivi des hémopathies, d'avoir un protocole technique d'analyse du LCR standardisé, commun entre les centres [33]. L'immunophénotypage par cytométrie en flux du LCR, qui a pour but de confirmer les résultats de l'analyse cytologique, n'entre pas dans la définition du risque méningé puisque la classification est basée sur des données cytologiques de présence ou d'absence d'infiltration blastique. Par ailleurs, certaines études ont révélé la mauvaise corrélation entre la numération en valeur absolue des leucocytes obtenue par la méthode de référence à l'hématimètre et celle obtenue par cytométrie en flux [34]. Cette technique peut

**Tableau 1.** Classification du *CNS status* selon le *NCI Workshop* 1993.

CNS-1	GB < 5/mm <sup>3</sup>	GR < 10/mm <sup>3</sup>	Pas de blastes
CNS-2	GB < 5/mm <sup>3</sup>	GR < 10/mm <sup>3</sup>	Blaste(s) présent(s)
CNS-3	GB ≥ 5/mm <sup>3</sup>	GR < 10/mm <sup>3</sup>	Blaste(s) présent(s)
	Masse cérébrale/paralysie des nerfs crâniens		

CNS : *central nervous system* ; GB : leucocytes ; GR : hématies.

**Tableau 2.** Classification du *CNS status* utilisée depuis 2003.

CNS-1	GB < 5/mm <sup>3</sup>	GR < 10/mm <sup>3</sup>	Pas de blastes
CNS-2	GB < 5/mm <sup>3</sup>	GR < 10/mm <sup>3</sup>	Blaste(s) présent(s)
CNS-3	GB ≥ 5/mm <sup>3</sup>	GR < 10/mm <sup>3</sup>	Blaste(s) présent(s)
	Masse cérébrale/paralysie des nerfs crâniens		
TLP -		GR > 10/mm <sup>3</sup>	Pas de blastes
TLP +		GR > 10/mm <sup>3</sup>	Blaste(s) présent(s)

CNS : *central nervous system* ; GB : leucocytes ; GR : hématies ; TLP : *traumatic lumbar puncture*.

donc être utilisée pour vérifier la nature blastique d'élément difficile à classer mais ne doit pas être utilisée pour appliquer la classification du *CNS status*. En effet d'une part, la numération des leucocytes peut être différente de celle de l'hématimètre et, d'autre part, la détection de blastes plus fréquente puisque plus sensible et spécifique.

Au diagnostic, le risque méningé est alors défini par le *CNS status* initial. Si une infiltration blastique méningée est détectée initialement (cas des status CNS-2, TLP + et CNS-3), celle-ci sera contrôlée quelques jours tard selon les indications du protocole de traitement et ce jusqu'à disparition du clone blastique.

## Une harmonisation des modes opératoires techniques est nécessaire

Afin de pouvoir utiliser la classification du *CNS status* et obtenir des résultats d'analyse du LCR comparables entre les laboratoires de biologie médicale, il est nécessaire d'uniformiser le mode opératoire technique de cette analyse dans les hémopathies aiguës.

Puisque les indications des protocoles de traitement sont limitées ou absentes, il était nécessaire, avant d'établir cette harmonisation, de réaliser dans un premier temps, un état des lieux des pratiques nationales de 25 centres hospitalo-universitaires prenant en charge cette analyse.

Les questions de l'enquête, réalisée par mailing, portaient sur le délai d'acheminement du prélèvement au laboratoire, la description des étapes de la technique, le matériel utilisé, le volume de LCR étudié, les caractéristiques de la vitesse et du temps de la cyto centrifugation, l'addition ou

non de sérum enrichi en protéine avant cyto centrifugation avec précision du volume ajouté. La synthèse des réponses a permis de mettre en évidence la grande variabilité des modes opératoires et le manque de comparabilité entre les centres (*tableau 3*).

Par ailleurs, il a été constaté que les protocoles d'analyses proposés par la société Shandon (Thermo Shandon Pittsburgh, PA, USA), qui est le fournisseur principal des cyto centrifugeuses des CHU évalués, n'étaient pas respectés. Pour information, le constructeur conseille la cyto centrifugation d'un volume compris entre 200 et 500 µL de LCR avec addition d'environ 50 µL d'albumine et une centrifugation de 5 à 15 minutes à 54 g [35].

Dans un second temps, un protocole d'analyse a été établi dans deux centres hospitalo-universitaires à fort recrutement en hématologie pédiatrique (Assistance publique des hôpitaux de Paris (AP-HP) et Hospices civils de Lyon). Un travail collaboratif a été entrepris entre les laboratoires de biologie de l'Hôpital Robert Debré de l'AP-HP (Dr Odile Fenneteau) et le Laboratoire de biologie médicale multi-sites des Hospices civils de Lyon (Dr Sandrine Girard). Plusieurs études comparatives ont été menées dont les résultats ont permis de proposer des recommandations techniques d'analyse du LCR chez l'enfant au cours du diagnostic et du suivi des hémopathies aiguës, applicables à l'ensemble des laboratoires.

Entre octobre 2010 et mars 2012, des échantillons de LCR de patients leucémiques (âge < 18 ans) en cours de diagnostic ou en cours de suivi (< 2 ans du diagnostic initial) ont été analysés. Le matériel utilisé était composé de cyto centrifugeuses cytospin Shandon. Dans chaque chambre de cyto centrifugation était dispensé un volume final de 350 µL

**Tableau 3.** Enquête sur les modes opératoires d'étude cytologique du LCR au cours des hémopathies aiguës dans 25 centres hospitalo-universitaires français. Enquête réalisée entre le 21/02/11 et le 09/05/2011.

Centre	Délai acheminement exigé	Préphase	Centrifugeuse	Volume analysé (µL)	Vitesse de cyto-centrifugation (g)	Vitesse de cyto-centrifugation (tr/min)	Temps de cyto-centrifugation (min)	Adjuvant
AP-HP Necker	Immédiat	Non	Shandon cytospin	400	27	500	10	Non
AP-HP RDB	< 30 min	Non	Shandon cytospin	450	54	700	10	Albumine
AP-HP Trousseau	2 h	Non	Shandon cytospin 3	40 à 120	27	500	5	SVF
Besançon	4 h	Non	Shandon cytospin 3	300	22	450	8	Non
Bordeaux	Aucun	Non	Shandon cytospin 3	150 à 200	70	800	4	Non
Brest	4 h	Non	Shandon cytospin 3	300 à 600	39	600	8	Non
Caen	< 4 h	Non	Shandon cytospin	200	27	500	10	Non
Clermont-Ferrand	30 min-1 h	Non	Shandon cytospin 4	150 à 350	70	800	8	Non
Dijon	/	Non	Shandon cytospin 3	150	10	300	5	Non
Grenoble	Le plus vite possible	Non	Shandon cytospin 4	100 à 200	18	400	5	Non
Lille	/	Non	Shandon cytospin 3	200	54	700	5	SVF
Limoges	1 h	Non	Shandon cytospin 3	400	10	300	12	Non
Lyon	2-3 h	Non	Shandon cytospin 3	180	39	600	6	SVF
Marseille	1 h	non	Shandon cytospin 4	300	27	500	10	Non
Montpellier	< 2 h	Non	Shandon cytospin 4	300	39	600	10	Non
Nancy	< 1 h	Non	Shandon cytospin 3	100 à 150	29	500	5	Non
Nantes	Pas d'exigence	Non	Shandon cytospin 3	100 à 200	27	500	5	Plasma frais déleucocyté
Nice	2 h	Non	Shandon cytospin 3	150	70	800	10	Non
Poitiers	12 h	Non	Shandon cytospin 4	100	54	700	7	Non
Reims	2-3 h	Non	Shandon cytospin 3	100 à 200	54	700	10	Non
Rouen	6 h	Non	Shandon cytospin 2	300	70	800	10	Non
Saint-Étienne	/	Oui	Shandon cytospin	Totalité	39	600	6	Albumine
Strasbourg	1 h	Non	Shandon cytospin 4	100 à 200	27	500	5	Non
Toulouse	< 20 min	Non	Shandon cytospin	500	89	900	10	Non
Tours	Immédiat	Non	Shandon cytospin 3	300	54	700	10	Non

de LCR. Il s'agissait soit de LCR pur comportant moins de 500 GB/mm<sup>3</sup> et/ou moins de 500 GR/mm<sup>3</sup>, soit de LCR dilué dans une solution saline pour les prélèvements plus leucocytaires et/ou hématiques. Chez 76 patients, a été testée l'addition de 30 ± 10 µL de sérums enrichis en protéines (sérum de veau foetal (SVF) 1 % ou albumine 30 %) versus LCR pur. Les paramètres de cyto centrifugation ont été testés avec variations du temps et de la vitesse dans les limites des indications du constructeur. Les étalements obtenus ont été observés par 2 biologistes hématologistes cellulaires spécialisés dans l'étude morphologique du LCR (Odile Fenneteau et Sandrine Girard). Leurs observations sont à l'origine des propositions développées ensuite. L'étude portant sur les paramètres de cyto centrifugation a été réalisée dans le centre du Dr Odile Fenneteau. L'étude avec ajout ou non de sérum enrichi en protéine a été réalisée dans le centre du Dr Sandrine Girard. Les analyses cytologiques ont été réalisées sur chaque site indépendamment avec une première lecture assurée par les biologistes du site et une seconde lecture à l'aveugle par l'hématologiste cellulaire spécialisée dans l'étude du LCR du site concerné.

L'étude cytologique et le rendement cellulaire ont été vérifiés dans une série de 76 LCR de patients atteints de leucémie prélevés au diagnostic ou au cours de leur suivi (*tableau 4*). Deux cyto centrifugations ont été réalisées pour chaque LCR avec et sans addition de sérum enrichi en protéine (SVF ou albumine).

Parmi ces 76 échantillons, 38 ont été analysés avec ou sans ajout de SVF et 38 avec ou sans ajout d'albumine. Les résultats obtenus ont été comparés. Les cytopins du groupe « ajout de sérum enrichi en protéine » comportaient en moyenne 4 fois plus de leucocytes dont 3 fois plus de polynucléaires neutrophiles, 4 fois plus de lymphocytes et 7 fois plus de monocytes (*tableau 4*) que ceux du groupe « sans ajout de sérum enrichi en protéine ». Cette différence de composition a confirmé que l'ajout de sérum enrichi en protéine, SVF ou albumine, améliorait l'adhérence cellulaire et permettait d'obtenir des cytopins de densité cellulaire plus riche et donc contribuait à augmenter la sensibilité de détection de l'infiltration blastique. Aucune différence notable n'a été décelée entre les 2 sérums enrichis en protéine utilisés, SVF et sérum albumine ( $p = 0,71$ ).

L'analyse comparative a permis également de déceler la présence de blastes chez 4 patients du groupe « ajout de sérum enrichi en protéine » (status CNS-2 ou TLP+), tandis qu'aucun blaste n'était détecté sur le culot de centrifugation obtenu sans ajout de sérum.

Nous avons testé les préconisations de durée de cyto centrifugation en comparant le nombre et l'aspect des éléments présents sur les lames après centrifugation durant 8 et 10 minutes. Aucune différence notable n'a été identifiée sur ce critère.

Nous avons établi une grille de correspondance entre la numération cellulaire en mm<sup>3</sup> obtenue après comptage à l'hématimètre et le nombre de cellules qu'il est attendu d'obtenir sur la lame cyto centrifugée (*tableau 5*). Cette correspondance permet de s'assurer de l'absence de problèmes techniques au moment de la cyto centrifugation.

## Recommandation technique d'analyse du LCR en hématologie pédiatrique

### Phase préanalytique

Le LCR doit être prélevé dans un tube stérile. L'ordre de distribution du LCR dans les différents tubes de conditionnement destinés aux analyses biochimiques, bactériologiques et cytologiques est à respecter. Ainsi le dernier tube de prélèvement est réservé à l'analyse cytologique. Dans le cas d'un prélèvement en très faible quantité, ne permettant de ne recueillir qu'un seul tube, l'analyse cytologique est à privilégier. Les 4 premières gouttes ne doivent pas être recueillies puisque contaminées par du sang périphérique issu de l'effraction.

Les échantillons sont à acheminer au laboratoire de biologie médicale le plus rapidement possible après le prélèvement, à température ambiante, idéalement dans un délai inférieur à 2 heures et toléré jusqu'à 4 heures. En effet, l'altération des cellules nucléées et des hématies apparaît dès la première heure suivant le prélèvement [36]. Cependant, jusqu'à 4 h, l'identification des cellules y compris blastiques est possible.

Dans le cas d'un transport avec un délai d'acheminement supérieur à 4 heures, le prélèvement est à conserver et à transporter à +4 °C durant 24 heures maximum [33].

### Phase analytique

L'analyse cytologique nécessite le prélèvement d'un minimum de 500 µL de LCR. Ce volume minimum est important à respecter puisqu'il conditionne la proportion de faux négatifs. En effet, le taux de faux négatifs diminue lorsque le volume analysé augmente [37]. Les volumes prélevés pour l'analyse cytologique dans le cadre des bilans d'extension et suivi des hémopathies aiguës adultes ou pédiatriques étant inférieurs à 2 mL, la technique de concentration de choix est la cyto centrifugation directe [38]. Après réception au laboratoire, l'échantillon est traité le plus rapidement possible. Le LCR natif est homogénéisé par une dizaine de retournements manuels lents. Les hématies et éléments nucléés sont comptés par méthode manuelle selon la méthode du laboratoire : du LCR natif est introduit dans un hématimètre conventionnel réutilisable (cellule de Nageotte, cellule de Malassez) ou à usage unique (C-CHIP). Avant comptage des hématies et des éléments nucléés, il convient de laisser

**Tableau 4.** Étude comparative du rendement cellulaire de la cyto centrifugation avec et sans ajout de sérum enrichi en protéine (volume de 350 µL de LCR additionné ou non de 30 ± 10 µL de SVF 1 % ou albumine 30 %).

Identification patient	Sans SVF						Avec SVF							
	GR/mm <sup>3</sup>	GB/mm <sup>3</sup>	Statut	Polynucléaires neutrophiles	Lym-phocytes	Mono-cytes	Blastes	GB (/mm <sup>3</sup> )	Statut	Polynucléaires neutrophiles	Lym-phocytes	Mono-Blastes cytes		
1	3	<2	1	CNS-1	0	1	0	0	8	CNS-1	0	6	2	0
2	<2	<2	2	CNS-1	0	2	0	0	55	CNS-2	0	17	23	15
3	8	4	0	CNS-1	0	0	0	0	100	CNS-1	0	31	69	0
4	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	12	CNS-1	5	7	0	0
5	3	6	66	CNS-1	1	12	53	0	264	CNS-1	0	30	234	0
6	142	<2	16	TLP-	1	9	6	0	85	TLP-	4	46	36	0
7	192	<2	5	TLP-	2	2	2	0	51	TLP-	33	7	10	0
8	6	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	2	CNS-1	0	1	1	0
9	<2	<2	2	CNS-1	0	2	0	0	23	CNS-1	0	15	8	0
10	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	53	CNS-1	0	22	31	0
11	975	<2	14	TLP-	11	2	1	0	69	TLP-	43	14	12	0
12	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	2	CNS-1	0	2	0	0
13	110	<2	13	TLP-	5	7	1	0	58	TLP-	24	23	11	0
14	23360	8	28	TLP-	24	1	3	0	46	TLP-	41	4	1	0
15	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	1	CNS-1	0	1	0	0
16	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	8	CNS-1	0	5	3	0
17	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	7	CNS-1	0	3	4	0
18	<2	<2	2	CNS-1	0	2	0	0	14	CNS-1	0	8	6	0
19	<2	<2	3	CNS-1	0	3	0	0	14	CNS-1	1	12	1	0
20	<2	<2	5	CNS-1	1	3	1	0	47	CNS-1	1	41	5	0
21	5	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	4	CNS-1	0	4	0	0
22	<2	<2	6	CNS-1	0	2	4	0	12	CNS-1	0	4	8	0
23	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	1	CNS-1	0	1	0	0
24	<2	<2	2	CNS-1	0	2	0	0	2	CNS-1	0	2	0	0
25	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	3	CNS-1	0	2	1	0
26	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	30	CNS-1	0	19	11	0
27	<2	2	62	CNS-1	23	36	2	0	109	CNS-1	76	16	11	0
28	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	1	CNS-1	0	0	1	0
29	1200	<2	3	TLP-	0	3	0	0	14	TLP-	8	4	2	0
30	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	1	CNS-1	0	1	0	0
31	20	<2	2	TLP-	0	0	2	0	9	TLP-	1	1	7	0
32	5	<2	6	CNS-1	0	6	0	0	5	CNS-1	1	2	2	0
33	9	<2	6	CNS-1	0	6	0	0	17	CNS-1	0	17	0	0
34	7	<2	1	CNS-1	0	1	0	0	7	CNS-1	0	4	3	0
35	10	<2	4	TLP-	0	2	2	0	23	TLP-	0	3	20	0
36	<2	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	6	CNS-1	1	5	0	0
37	25120	6	38	TLP-	35	2	1	0	41	TLP-	35	4	2	0
38	3	<2	0	CNS-1	0	0	0	0	4	CNS-1	0	4	0	0

Tableau 4. (Suite)

Identification patient	Sans albumine				Avec albumine						
	GR/mm <sup>3</sup>	GB/mm <sup>3</sup>	GB Statut (/mm <sup>3</sup> )	Polynucléaires Lym-phocytes	Mono-cytes	Blastes	GB Statut (/mm <sup>3</sup> )	Polynucléaires Lym-phocytes	Mono-Blastes cytes		
39	< 2	3	9 CNS-1	0	3	0	100 CNS-1	0	18	82	0
40	1 970	< 2	0 TLP-	0	0	0	1 TLP-	0	0	1	0
41	5	2	8 CNS-1	0	8	0	100 CNS-1	1	95	4	0
42	20	< 2	7 TLP-	0	4	3	22 TLP-	1	7	14	0
43	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	60 CNS-1	2	45	13	0
44	82	< 2	0 TLP-	0	0	0	9 TLP+	0	6	0	3
45	216	< 2	25 TLP-	5	17	3	32 TLP-	3	27	2	0
46	437	< 2	23 TLP-	12	7	4	41 TLP-	16	18	7	0
47	4	< 2	0 CNS-1	0	0	0	61 CNS-1	49	12	0	0
48	< 2	< 2	7 CNS-1	0	6	1	14 CNS-1	1	13	0	0
49	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	10 CNS-1	0	9	1	0
50	87	< 2	5 TLP-	0	5	0	42 TLP-	1	40	1	0
51	388	2	3 TLP-	0	1	2	4 TLP-	0	2	2	0
52	< 2	< 2	1 CNS-1	0	1	0	3 CNS-1	0	3	0	0
53	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	11 CNS-1	0	4	7	0
54	4	2	82 CNS-2	7	65	1	44 CNS-2	1	18	5	20
55	525	5	0 TLP-	0	0	0	11 TLP-	8	2	1	0
56	< 2	< 2	4 CNS-1	0	3	1	19 CNS-1	0	19	0	0
57	< 2	< 2	10 CNS-1	10	0	0	17 CNS-1	17	0	0	0
58	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	1 CNS-1	0	0	1	0
59	3	< 2	1 CNS-1	0	1	0	46 CNS-2	0	40	5	2
60	2	2	1 CNS-1	0	1	0	60 CNS-1	3	45	12	0
61	7	< 2	1 CNS-1	0	1	0	8 CNS-1	0	8	0	0
62	38	< 2	0 TLP-	0	0	0	5 TLP-	0	4	1	0
63	5	7	61 CNS-3	0	4	0	187 CNS-3	2	9	2	174
64	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	13 CNS-1	0	13	0	0
65	2	< 2	44 CNS-1	9	32	3	51 CNS-1	8	42	1	0
66	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	1 CNS-1	0	1	0	0
67	< 2	< 2	1 CNS-1	0	1	0	14 CNS-1	9	5	0	0
68	< 2	2	10 CNS-1	8	2	0	64 CNS-1	8	54	2	0
69	< 2	< 2	2 CNS-1	0	2	0	9 CNS-2	0	7	0	2
70	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	4 CNS-1	0	3	1	0
71	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	4 CNS-1	0	4	0	0
72	< 2	< 2	1 CNS-1	0	1	0	5 CNS-1	1	4	0	0
73	< 2	< 2	1 CNS-1	0	1	0	6 CNS-1	0	6	0	0
74	< 2	< 2	0 CNS-1	0	0	0	26 CNS-1	0	18	8	0
75	< 2	< 2	1 CNS-1	0	1	0	7 CNS-1	0	6	1	0
76	< 2	< 2	1 CNS-1	0	1	0	5 CNS-1	0	3	2	0

CNS : central nervous system ; TLP : traumatic lumbar puncture ; GB : globules blancs.

se déposer les éléments dans la chambre de comptage durant 3 à 5 minutes en chambre humide. Les systèmes d'analyse automatique actuels ne sont pas performants en termes de seuil de sensibilité, notamment pour les GR, et ne peuvent donc être une alternative à la numération des éléments par la méthode de référence manuelle en cellule de comptage [39].

Une cytocentrifugation directe est ensuite réalisée ; 30 ± 10 µL de sérum enrichi en protéine (sérum albumine 30 % ou, à défaut, de SVF 1 %) sont préalablement introduits dans le dispositif de centrifugation suivi d'un volume défini de LCR natif. Ce volume de LCR à cytocentrifuger dans chaque dispositif varie selon la proportion d'éléments nucléés et d'hématies, et conditionne le nombre de cytopins à obtenir. En effet, plus l'échantillon est hématique et/ou hyperleucocytaire, plus il devra être dilué et le nombre de cytopins augmentera (2 au lieu de 1 en cas de dilution au 1/2). Il n'a pas été noté d'incidence de la variation du volume de sérum enrichi en protéine ajouté sur le résultat de la cytocentrifugation lorsque celui-ci était compris entre 20 et 50 µL.

Cependant, l'addition de ce sérum permet d'obtenir une concentration protéique qui optimise l'adhérence cellulaire sur la lame de verre, et diminue les phénomènes de distor-

sion cellulaire provoqués par la force de centrifugation (qui modifie la morphologie des cellules).

Au final, le volume de LCR natif à cytocentrifuger par lame dépend du compte en éléments nucléés et hématies et doit être au final le même pour tous les patients, selon le *tableau 6*.

L'échantillon (± la solution saline en cas de dilution) est introduit dans le dispositif de dispensation de la cytocentrifugeuse après le sérum enrichi en protéine. Le volume total à introduire quel que soit le nombre d'éléments nucléés et d'hématies est toujours de 380 µL.

L'homogénéisation de l'équipement utilisé dans les laboratoires réalisant cette analyse contribue à améliorer la comparabilité des résultats. Il est préférable d'utiliser un même type de cytocentrifugeuse. Le volume maximal total à introduire dans le dispositif de dispensation correspondant à la capacité maximale d'absorption du filtre est de 500 µL, tandis que le volume minimal est de 200 µL. Le volume total préconisé dans les recommandations étant de 380 µL, nous sommes dans les conditions optimales d'utilisation du dispositif de dispensation puisque nous distribuons 350 µL de LCR natif et 25 ± 5 µL de sérum enrichi en protéine. Les paramètres de cytocentrifugation suivent les préconisations du fournisseur, à savoir une vitesse de centrifugation comprise entre 700 ± 100 rpm (soit entre 39 à 70 g) durant 11 ± 3 minutes, avec sélection d'une accélération « LOW » puisque le LCR est habituellement paucicellulaire. Une fois la cytocentrifugation terminée, les lames sont séchées à l'air libre puis colorées au May-Grünwald-Giemsa, méthode de coloration de référence de l'hématologie. À défaut, le Wright-Giemsa peut être utilisé. La lecture cytologique est réalisée au microscope optique ou peut être automatisée par utilisation de systèmes d'analyses d'image. Lorsque le prélèvement est

**Tableau 5.** Correspondance entre numération cellulaire et nombre de cellules sur la lame cytocentrifugée.

Nombre d'éléments nucléés (par mm <sup>3</sup> )	Nombre de cellules attendues sur la lame cytocentrifugée
< 2	0-70
2-5	70-180
> 5	> 180

**Tableau 6.** Recommandation concernant le volume d'échantillon à analyser.

Nombre d'éléments nucléés (par mm <sup>3</sup> )	Si les hématies et les éléments nucléés sont < 500/mm <sup>3</sup>	Si les éléments nucléés sont > 500/mm <sup>3</sup> : séparer le tube primaire en 2 tubes secondaires et faire une dilution *par exemple pour une dilution au 1/10	Si les hématies sont > 500/mm <sup>3</sup> : séparer le tube primaire en 2 tubes secondaires et faire une dilution *par exemple pour une dilution au 1/2
Volume de LCR à centrifuger (µL)	350	35	175
Volume de sérum enrichi en protéine (µL)	25 ± 5	25 ± 5	25 ± 5
Volume de solution saline à 9‰ (µL)	0	315	175
Nombre de lames à cytocentrifuger	1	10	2

\* Une dilution appropriée doit être choisie afin de minimiser la contamination en hématies. Le volume final de chaque tube de LCR dilué doit toujours être de 350 µL.



hémorragique et qu'une dilution de l'échantillon de LCR natif est effectuée, l'ensemble des lames de cyto centrifugation obtenues doit être analysé en continuité.

### Phase post-analytique

Après analyse microscopique, les échantillons de LCR sont conservés au moins 24 h à +4 °C tout en notant qu'ils ne sont plus analysables après 4 h à température ambiante et 24 h à +4 °C. La conservation des lames obéit au code de la santé publique R 6211-44 modifié par le décret n° 2007-1131 du 23 juillet 2007. Leur délai de conservation est de dix ans. Cependant, la durée de conservation des résultats étant au minimum de vingt ans selon l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, modifié par l'arrêté du 26 avril 2002, nous recommandons de conserver les cytopins d'intérêt au moins 20 ans.

### Conclusion

L'analyse cytologique du LCR permet de déceler une infiltration blastique méningée des hémopathies aiguës et d'en suivre l'évolution au cours du traitement. La stratification des patients, l'apparition de nouvelles thérapeutiques (aracytine liposomale par exemple), l'adaptation du traitement avec, notamment la diminution voire la disparition de l'indication des irradiations crâniennes, et l'adéquation du traitement par injection intrathécale avec le risque méningé (*CNS status*) ont permis de diminuer considérablement la proportion des rechutes méningées au cours des LA. Il était donc nécessaire que des recommandations techniques de l'analyse cytologique du LCR soient établies dans le but d'obtenir des résultats homogènes, fiables et reproductibles. Nos propositions ont pour but d'améliorer la qualité de cette analyse et de tenter d'harmoniser les pratiques.

**Remerciements.** Les auteurs tiennent à remercier pour leur participation active à l'enquête sur les modes opératoires d'étude cytologique du LCR au cours des hémopathies aiguës : V. Augis (Bordeaux), F. Bailly (Dijon), C. Bret (Montpellier), C. Brouzes (AP-HP Necker), M.P. Callat (Rouen), S. Daliphard (Reims), E. Duchayne (Toulouse), M. Eveillard (Nantes), C. Ferraro-Vacher (Nice), C. Fossat (Marseille), M. Fournier (Lille), F. Genevieve (Angers), H. Lapillone (AP-HP Trousseau), V. Latger-Cannard (Nancy), F. Lellouche (Poitiers), M. Malet (Caen), G. Mareynat (Clermont-Ferrand), V. Marion (Brest), A. Petit (Tours), F. Schillinger (Besançon), F. Trimoreau† (Limoges), C. Vasselon (Saint-Étienne), C. Vettier (Grenoble), E. Zink† (Strasbourg).

**Liens d'intérêts :** Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

### Références

1. Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, Krance RA, Kun LE, Behm FG, *et al.* Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 314-9.
2. Cherlow JM, Sather H, Steinherz P, Gaynon P, Tubergen D, Trigg M, *et al.* Craniospinal irradiation for acute lymphoblastic leukemia with central nervous system disease at diagnosis: a report from the Children's Cancer Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996 ; 36 : 19-27.
3. Pullen J, Boyett J, Schuster J, Crist W, Land V, Frankel L, *et al.* Extended triple intrathecal chemotherapy trial for prevention of CNS relapse in good risk and poor risk patients with B-progenitor acute lymphoblastic leukemia: a pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1993 ; 11 : 839-49.
4. Reman O, Pigneux A, Huguet F, Vey N, Delannoy A, Fegueux N, *et al.* Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and/or at first relapse: results from GELT-LALA group. *Leuk Res* 2008 ; 32 : 1741-50.
5. Lazarus HM, Richards SM, Chopra R, Litzow MR, Burnett AK, Wiernick PH, *et al.* Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII /ECOG E2993. *Blood* 2006 ; 108 : 465-72.
6. Petersdorf SH, Kopecky KJ, Head DR, Bold DH, Balcerzak SP, Wun T, *et al.* Comparison of the L10M consolidation regimen to an alternative regimen including escalating methotrexate/L-asparaginase for adult acute lymphoblastic leukemia: a Southwest Oncology Group Study in adults. *Leukemia* 2001 ; 15 : 208-16.
7. Hoelzer D, Thiel E, Löffler H, Büchner T, Ganser A, Heil G, *et al.* Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 1988 ; 71 : 123-31.
8. Rees JK, Gray RG, Swirsky D, Hayhoe FG. Principal results of the Medical Research Council's 8th acute myeloid leukaemia trial. *Lancet* 1986 ; 2 : 1236-41.
9. Fiere D, Lepage E, Sebban C, Boucheix C, Gisselbrecht C, Vernant JP, *et al.* Adult acute lymphoblastic leukemia: a multicentric randomized trial testing bone marrow transplantation as post-remission therapy. *J Clin Oncol* 1993 ; 11 : 1990-2001.
10. Odom LF, Wilson H, Cullen J, Bank J, Blake M, Jamieson B. Significance of blasts in low-cell-count cerebrospinal fluid specimens from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1990 ; 66 : 1748-54.
11. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, *et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2009 ; 113 : 1875-91.
12. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010 ; 115 : 453-74.
13. Johnston DL, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Woods WG. The presence of central nervous system disease at diagnosis in pediatric acute myeloid leukemia does not affect survival: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* 2010 ; 55 : 414-20.

14. Bommer M, Von Harsdorf S, Döhner H, Bunjes D, Ringhoffer M. Neoplastic meningitis in patients with acute myeloid leukemia scheduled for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010; 95: 1969-72.
15. Webb DK, Harrison G, Stevens RF, Gibson BG, Hann IM, Wheatley K. Relationships between age at diagnosis, clinical features, and outcome of therapy in children treated in the medical research council. AML10 and 12 trials for acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1714-20.
16. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G, *et al.* Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients: results and conclusions of the multicentre trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994; 84: 3122-33.
17. Kantarjian HM, Walters RS, Smith TL, Keating MJ, Barlogie B, McCredie KB, *et al.* Identification of risk groups for development of central nervous system leukemia in adults with acute lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 72: 1784-9.
18. Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol* 2008; 9: 257-68.
19. Thomas X, Payan L, Le QH. Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte avec envahissement du système nerveux central : mise au point. *Bull Cancer* 2008; 95: 707-15.
20. Pui CH, Thiel E. Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol* 2009; 36: S2-16.
21. Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A, Riccardi R, Sather H, D'Angio G. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic bases for staging, stratification, and treatment. *Med Pediatr Oncol* 1986; 14: 191-4.
22. Pui CH, Mahmoud HH, Riviera GK, Hancock ML, Sandlund JT, Behm FG, *et al.* Early intensification of intrathecal chemotherapy virtually eliminates central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 92: 411-5.
23. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, Kühl J, Löning L, Riehm H, *et al.* Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol* 2003; 21: 184-8.
24. Loeb KR, Cherian S, Becker PS, Walter RB, Pagel JM, Abkowitz JL, *et al.* Comparative analysis of flow cytometry and morphology for the detection of acute myeloid leukemia cells in cerebrospinal fluid. *Br J Haematol* 2016; 172: 134-6.
25. Inukai T, Akahane K, Nemoto A, Kuroda I, Noguchi S, Hirose K, *et al.* Revision of the cytological diagnosis of CNS relapse into aseptic meningitis in a patient with TEL-AML1+ acute lymphoblastic leukemia by FISH analysis of mononuclear cells in cerebrospinal fluid. *Histopathology* 2007; 50: 947-9.
26. Scrideli CA, Queiroz RP, Takayanagui OM, Bernardes JE, Tone LG. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid cells in suspected leptomeningeal involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison to cytomorphological analysis. *Diagn Mol Pathol* 2003; 12: 124-7.
27. Price RA, Johnson WW. The central nervous system in childhood leukemia. I. The arachnoid. *Cancer* 1973; 31: 520-33.
28. Bleyer WA, Coccia PF, Sather HN, Level C, Lukens J, Niebrugge DJ, *et al.* Reduction in central nervous system leukemia with a pharmacokinetically derived intrathecal methotrexate dosage regimen. *J Clin Oncol* 1983; 1: 317-25.
29. Azzarelli B, Mirkin LD, Goheen M, Muller J, Crockett C. The leptomeningeal vein. A site of re-entry of leukemic cells into systemic circulation. *Cancer* 1984; 54: 1333-43.
30. Pinkel D, Woo S. Prevention and treatment of meningeal leukemia in children. *Blood* 1994; 84: 355.
31. Evans A, Gilbert ES, Zandstra R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. *Cancer* 1970; 26: 404-9.
32. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996; 14: 18-24.
33. Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, Cobb J, Mills P, Lekos A, *et al.* Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer* 1998; 82: 733-9.
34. Craig FE, Ohoi P, Gorrill TS, Swerdlow S. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 22-34.
35. Operators manual for Cytospin 3 (74010121 GB - appendix 1) and 4 (A 78310250 - appendix B) SHANDON « Use of the Cytospin for hematology and other clinical microscopy specimens » Appendix 1 (cytospin 3) and appendix B (cytospin 4). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/>. (consulté le 13 mai 2017)
36. Steele RW, Marmer DJ, O'Brien M, Tyson ST and Steele CR. Leukocyte survival in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 965-6.
37. Gajjar A, Harrison PL, Sandlund JT, Rivera GK, Ribeiro RC, Rubnitz JE, *et al.* Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 3381-4.
38. Ranchere-Vince D, Vielh P. Diagnostic pitfalls in CSF cytology. *Ann Pathol* 1999; 19: 450-6.
39. Paris A, Nhan T, Cornet E, Perol JP, Malet M, Troussard X. Performance evaluation of the body fluid mode on the platform Sysmex XE-5000 series automated hematology analyser. *Int J Lab Hematol* 2010; 32: 539-47.