



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 16075

To cite this version :

Mayaud, Marie-Lou. *Étude rétrospective sur les nuages de points plaquettaires anormaux chez le chien obtenus par le Sysmex XT-2000iV*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 33 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ETUDE RÉTROSPECTIVE SUR LES NUAGES DE POINTS PLAQUETTAIRES ANORMAUX CHEZ LE CHIEN OBTENUS PAR LE SYSMEX XT-2000iV

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MAYAUD Marie-Lou
Née, le 6 mars 1991 à Evreux (27)

Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENT :
Mme Monique COURTADE SAIDI Professeure à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Catherine TRUMEL Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Mme Nathalie BOURGES-ABELLA Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

A Madame la Professeure Monique COURTADE-SAÏDI,

Professeure des Universités

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Madame la Professeure Catherine TRUMEL,

Professeure de Biologie Médicale animale et comparée à l'ENVT

Pour m'avoir fait l'honneur d'être ma directrice de thèse. Pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Sincères remerciements

A Madame Laetitia PIANE

Résidente en pathologie clinique et chargée de consultation laboratoire central de biochimie médicale à l'ENVT,

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse.

Pour m'avoir guidée dans la réalisation de ce projet.

Pour votre soutien et vos encouragements constants

Sincères remerciements

Table des matières

Liste des figures et annexe	4
Introduction.....	7
I. Etude bibliographique : le Sysmex XT-2000iV	8
II. Etude rétrospective.....	10
A. Matériel et méthodes	10
1. Personnes impliquées dans la réalisation de l'étude	10
2. Période et durée de l'étude rétrospective	11
3. Protocole de sélection des hémogrammes.....	11
4. Classement des hémogrammes.....	12
5. Critères d'évaluation et de compréhension des nuages de points anormaux	13
B. Résultats : établissement de six groupes de nuages de points plaquettaires anormaux	13
1. Groupe A.....	14
2. Groupe B.....	15
3. Groupe C.....	15
4. Groupe D.....	15
5. Groupe E.....	16
6. Groupe F	17
C. Les affections retrouvées dans les différents groupes	17
1. Groupe A.....	17
2. Groupe B.....	17
3. Groupe C.....	18
4. Groupe D.....	19
5. Groupe E.....	19
6. Groupe F	20

III.	Discussion	20
A.	Groupe A : variation de densité du nuage plaquettaire	20
1.	Groupe A.1. : nuage plaquettaire avec un gradient de densité de points inversé ...	20
2.	Groupe A.2. : forme de « banane » respectée mais localisation du nuage anormale et présence de deux populations.....	22
B.	Groupe B : base tronquée	23
C.	Groupe C : présence d'un deuxième nuage ou de points anormaux dans le cadran inférieur droit du graphique	23
D.	Groupe D : fusion entre le nuage des plaquettes et celui des hématies sur la gauche du graphique.....	25
1.	Groupe D.1. : descente du nuage des hématies vers celui des plaquettes	25
2.	Groupe D.2. : remontée du nuage plaquettaire vers celui des hématies	27
E.	Groupe E : patch rond détaché de l'axe des abscisse et ordonnée	27
F.	Groupe F : fusion entre le nuage des plaquettes et celui des réticulocytes sur la droite du graphique.....	27
IV.	Conclusion	28
	Bibliographie	31

Liste des figures et annexe

Figure 1 : Courbe d'impédance pour les plaquettes chez un chien sain	9
Figure 2 : Nuage de points plaquettaires chez un chien sain (flèche rouge).....	10
Figure 3 : Nuage plaquettaire normal de chien en forme de « banane » (trait plein)	12
Figure 4 : Représentation des anomalies de nuages de points plaquettaires selon le protocole établi ; cercle noir : limite mal définie plaquettes/hématies ; cercle rouge : double nuage de points ; cercle pointillés : limite mal définie plaquettes/réticulocytes ; trait horizontal : base tronquée.....	12
Figure 5 : Nuage plaquettaire type du sous-profil A.1.....	14
Figure 6 : Nuage plaquettaire type du sous-profil A.2.....	14
Figure 7 : Nuage plaquettaire type du groupe B.....	15
Figure 8 : Nuage plaquettaire type du groupe C.....	15
Figure 9 : Nuage plaquettaire type du sous-profil D.1.....	16
Figure 10: Nuage plaquettaire type du sous-profil D.2.....	16
Figure 11 : Nuage plaquettaire type du groupe E	16
Figure 12 : Nuage plaquettaire type du groupe F	17
Figure 13 : Nuage plaquettaire type du groupe A.1. ; cercle noir : macroplaquettes.....	21
Figure 14 : Nuage plaquettaire de l'hémogramme 1 ; trait en pointillés : scissure entre les deux nuages de points ; trait plein : aspect d'un nuage plaquettaire normal en « forme de banane ».....	22
Figure 15 : Nuage plaquettaire type du groupe C ; cercle trait plein : babésies ; cercle trait pointillés : blastes, gouttelettes lipidiques.....	25
Figure 16 : Nuages plaquettaires types des hémogrammes de l'étude sur le vieillissement du sang. De gauche à droite : J1 J2 et J3 ; cercles noirs : hématies	26
Figure 17 : Nuage plaquettaire type du groupe D.1. ; cercle noir : hématies comptées comme des plaquettes.....	26
Figure 18 : Nuage plaquettaire type des hyperlipidémies du groupe D.2. ; cercle noir : gouttelettes lipidiques	27
Figure 19 : Nuage plaquettaire type du groupe G ; cercle : fusion entre macroplaquettes et petits réticulocytes.....	28

Annexe 1 : Classement des hémogrammes (1 à 61) en fonction de leur groupe (A à F) et indication des numérations plaquettaires ainsi que du diagnostic des anomalies des nuages plaquettaires pour chaque cas..... 33

Liste des abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

ARN Acide ribonucléique

CBC Complete blood cell count

CIVD Coagulation Intra-Vasculaire
Disséminée

CKC Cavalier King Charles

EOS Eosinophils

HGB Hemoglobin

HCT Hematocrit value

MPV Mean platelet volume

LYMPH Lymphocytes

MCH Mean corpuscular hemoglobin

MCHC Mean corpuscular hemoglobin
concentration

MCV Mean corpuscular volume

MONO Monocytes

NEUT Neutrophils

PCT Plateletcrit

PCV Packed cellular volume

PDW Platelet distribution width

P-LCR Platelet large cell ratio

PLT-I Platelets measured with impedance
method

PLT-O Platelets measured with optical
method

RBC-I Red blood cells measured with
impedance method

RBC-O Red blood cells measured with
optical method

WBC White blood cells

µm Micromètre

µl Microlitre

Introduction

L'hémogramme est un examen complémentaire fréquemment réalisé en pratique vétérinaire. Il est le plus souvent effectué par des analyseurs qui utilisent différentes méthodes pour réaliser une analyse quantitative des éléments figurés du sang. (Zandecki et al. 2007a). Les grands principes sont la cytométrie de flux, la variation d'impédance et l'analyse de l'anneau leuco-plaquettaire (ou buffycoat). Les automates utilisant la cytométrie en flux permettent d'obtenir les numérations des plaquettes, des hématies et leucocytes sous la forme de graphiques en nuage de points. Ces derniers doivent alors être évalués avant de valider ou non les résultats chiffrés fournis par l'automate. En effet, dans certaines situations, des nuages de points anormaux permettent alors de mettre en évidence et de comprendre une erreur de comptage (Zandecki et al. 2007a)

D'assez nombreuses études ont montré que certaines situations pouvaient entraîner de fausses thrombopénies ou au contraire de fausses thrombocytoses. En effet, de mauvaises conditions de prélèvement (Zandecki et al. 2007a) (tube trop rempli, délai entre prélèvement et analyse trop long), l'utilisation d'anticoagulants comme l'EDTA à l'origine d'agrégats de plaquettes ou d'agglutination de plaquettes autour des globules blancs (plaquettes « satellites » ou « en rosette ») ou encore des plaquettes de grande taille (Zandecki et al. 2007a) peuvent être à l'origine d'une sous-estimation de la numération plaquettaire. A l'inverse, la présence dans le sang de fragments de globules rouges ou de très petites hématies, de schizocytes, d'eccentrocytes ou d'hématies fantômes lors d'anémie sévère due à un déficit en fer (Zandecki et al. 2007a), de microangiopathie ou d'anémie hémolytique à médiation immune (Tvedten 2010), d'hématies jeunes nucléés (Zandecki et al. 2007b), de fragments de cellules nucléées (monoblastes, lymphocytes blastiques) (Zandecki et al. 2007a) chez les patients atteints de leucémie ou de lymphome, de microorganismes : bactéries, champignons tel *Candida glabrata* identifié chez un cas humain (Lesesve et al. 2009), de cryoglobulines ou cryofibrinogène (Zandecki et al. 2007a), d'une quantité augmentée de lipoprotéines (Zandecki et al. 2007a)(Gokcebay et al. 2011), en période post-prandiale (Zandecki et al. 2007a) ou chez les patients obèses (cas en humaine) (Ferreira et al. 2013), de transporteurs d'oxygène comme le perfluorocarbène (Cuignet et al.

2000), utilisés lors de chirurgie cardiaque ou lors d'ischémie majeure peuvent être à l'origine d'une surestimation de la numération plaquettaire.

L'objectif de cette étude est d'identifier les nuages de points anormaux pour les plaquettes par comparaison avec une distribution normale obtenues sur les animaux sains et d'en comprendre les différentes causes en médecine vétérinaire.

Pour se faire, une étude rétrospective des hémogrammes réalisés par l'unité de Biologie Médicale Animale et Comparée de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse a été réalisée. Les hémogrammes de chiens disponibles entre septembre 2011 et septembre 2015 ayant des nuages de points plaquettaires anormaux ont été recherchés.

I. Etude bibliographique : le Sysmex XT-2000iV

Le Sysmex XT-2000iV est un analyseur automatisé validé pour les chiens, chats et chevaux et ayant pour origine le Sysmex XT-2000i utilisé en humaine (Lilliehöök, Tvedten 2009). Il permet, entre autre, l'obtention du comptage précis des hématies, des réticulocytes, des leucocytes et des plaquettes avec deux méthodes optique et d'impédance (Lilliehöök, Tvedten 2009). L'impédance permet de reconnaître les cellules par leur taille et la cytométrie en flux permet de reconnaître les cellules par leur structure interne et par la quantité d'ADN et d'ARN présente dans la cellule grâce à l'utilisation de colorant complémentaires ; en effet, les cellules sont marquées à la polyméthine, un colorant fluorescent qui se lie aux acides nucléiques (Lilliehöök, Tvedten 2009).

D'une part, les résultats sont rendus sous la forme de numérations prenant en compte la mesure par impédance et par cytométrie en flux, pour chaque type de cellule. En ce qui concerne les différents résultats fournis par l'analyseur, les variables RCB-I, HCT, PLT-I, PCT sont obtenus par impédance et MCV, MCH, MCHC, MPV PDW, P-LCR sont calculés à partir des comptages obtenus par impédance. En revanche, les variables RET, RCB-O, PLT-O, WBC, sont obtenus par méthode optique (Lilliehöök, Tvedten 2009). Il est alors possible de comparer les résultats numériques obtenus par les méthodes d'impédance et optique pour le comptage des plaquettes et des hématies puisque les deux méthodes sont utilisées pour ces deux populations.

Ainsi, les grosses plaquettes ne sont pas prises en compte avec la méthode d'impédance (PLT-I) tandis qu'elles le sont avec la méthode optique (PLT-O) (Lilliehöök, Tvedten 2009). Par ailleurs, avec la méthode d'impédance, le Sysmex XT-2000i est capable de différencier les plaquettes des petites hématies chez l'homme, ce qui n'est pas le cas du Sysmex XT-2000iV chez le chien (Lesesve et al. 2009).

D'autre part, les résultats obtenus avec le Sysmex XT-2000iV sont rendus sous la forme d'une courbe pour l'impédance donnant le nombre de cellules en fonction du volume, et de nuages de points pour la cytométrie en flux donnant le volume des cellules en fonction de leur granulosité, de leur fluorescence, de leur taille, selon les graphiques.

Chez un chien sain, la courbe obtenue par variation d'impédance pour les plaquettes (figure 1) a une forme de courbe de Gauss qui doit démarrer de zéro et revenir à zéro avant le trait de séparation pour pouvoir être validée, ce qui montre que le volume plaquettaire est uniforme et donc qu'il n'y a pas d'erreur de comptage (chaque plaquette comptée est réellement une plaquette).

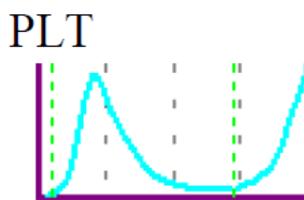


Figure 1 : Courbe d'impédance pour les plaquettes chez un chien sain

Chez le chien sain, le nuage de points plaquettaires a une forme logarithmique ou forme de « banane » et ne doit pas se confondre avec le nuage de points des hématies sur la gauche du graphique et des réticulocytes au-dessus et sur la droite du graphique (figure 2).

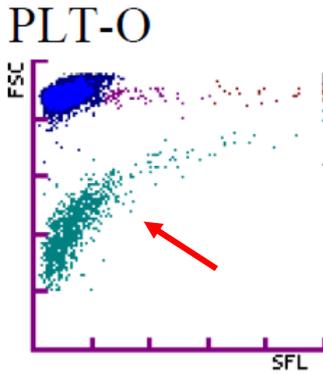


Figure 2 : Nuage de points plaquettaires chez un chien sain (flèche rouge)

Enfin, c'est grâce à la morphologie des courbes et des nuages de points ainsi qu'à des alarmes affichées par l'analyseur que l'opérateur saura s'il existe des anomalies de distribution « Abn distribution » et/ou des anomalies de nuages de points « Abnscattergram » pour chaque type de cellule sanguine.

II. Etude rétrospective

Les erreurs rencontrées sur la numération-formule des plaquettes sont à l'origine de surestimation du nombre de plaquettes (fausse thrombocytose ou normothrombocytémie) ou plus fréquemment de sous-estimation de ce nombre (fausse thrombopénie) ce qui peut conduire le clinicien à poser un diagnostic erroné et donc à mettre en place une démarche thérapeutique inadaptée. Il nous semblait donc important de réaliser une étude rétrospective visant à aider le biologiste et/ou le clinicien dans l'interprétation des graphiques des plaquettes obtenus avec le Sysmex XT-2000iV. Aussi, l'issue de cette étude pourrait potentiellement être la mise en place de nouvelles alarmes permettant de réduire au maximum ces erreurs de comptage (Zandecki et al. 2007a).

A. Matériel et méthodes

1. Personnes impliquées dans la réalisation de l'étude

L'étude est effectuée et coordonnée par C. Trumel, L. Piane, A. Greffé et ML. Mayaud :

- C. Trumel : préparation du protocole, sélection des hémogrammes, traitement des données et interprétation des résultats

- L. Piane : préparation du protocole, sélection des hémogrammes, traitement des données, recherche des comptes-rendus cliniques et hématologiques, des frottis sanguins et interprétation des résultats
- A. Greffé : sélection des hémogrammes, traitement des données et interprétation des résultats
- ML. Mayaud : préparation du protocole, sélection des hémogrammes, traitement des données, recherche des comptes-rendus cliniques et hématologiques, des frottis sanguins et interprétation des résultats
- Laboratoire de Biologie Médicale de l'ENVT : conservation des données (hémogrammes, frottis, comptes-rendus laboratoire)

Pour réduire au maximum le côté subjectif de la sélection des hémogrammes, quatre personnes sont intervenues : trois personnes expérimentées (C. Trumel, L. Piane et A. Greffé) et une personne « naïve » (ML. Mayaud).

2. Période et durée de l'étude rétrospective

Du 15 septembre 2011 au 17 septembre 2015.

3. Protocole de sélection des hémogrammes

a) Critères d'inclusion

Les hémogrammes évalués dans cette étude rétrospective doivent avoir été réalisés entre le 15 septembre 2011 et le 17 septembre 2015 et doivent provenir de chiens. Par ailleurs, le nuage de points concernant les plaquettes doit être anormal (figures 3 et 4). Sont considérés comme anormaux les graphiques dont les nuages de points plaquettaires ont :

- Un aspect différent du nuage de points plaquettaire normal en forme de « banane »
- Une base tronquée
- Une limite mal définie avec le nuage de points des hématies
- Une limite mal définie avec le nuage de points des réticulocytes
- Un double nuage de points avec des points anormalement localisés dans le cadran inférieur droit du graphique.

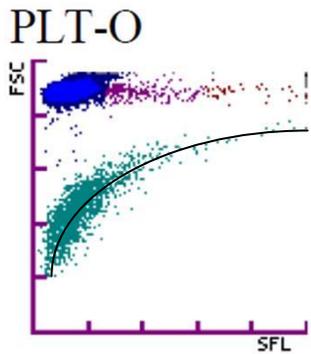


Figure 3 : Nuage plaquettaire normal de chien en forme de « banane » (trait plein)

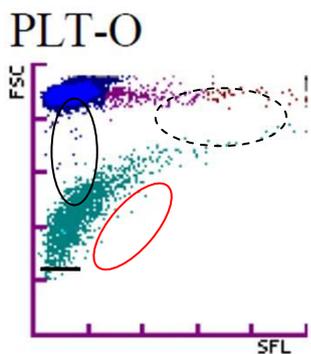


Figure 4 : Représentation des anomalies de nuages de points plaquettaires selon le protocole établi ; cercle noir : limite mal définie plaquettes/hématies ; cercle rouge : double nuage de points ; cercle pointillés : limite mal définie plaquettes/réticulocytes ; trait horizontal : base tronquée

b) Critères d'exclusion

Parmi les hémogrammes inclus dans l'étude, sont exclus :

- Ceux dont l'automate a mentionné le terme « Error »
- Ceux réalisés pour un contrôle externe
- Ceux réalisés à partir d'un autre liquide que le sang (exemple : épanchement)

4. Classement des hémogrammes

Au total, sur les quatre années de 2011 à 2015, 4713 hémogrammes de chiens ont été répertoriés. Les graphiques plaquettaires de chaque hémogramme ont ensuite été étudiés un par un et retenus ou non en fonction des critères d'inclusion et d'exclusion précisés précédemment. Plusieurs sessions de classement faisant intervenir les quatre personnes (C. Trumel, L. Piane, A. Greffé et ML. Mayaud) ont été nécessaires afin de définir

le plus objectivement possible les hémogrammes de chien ayant un nuage plaquettaire anormal et de les classer en fonction de la morphologie du nuage de points.

5. Critères d'évaluation et de compréhension des nuages de points anormaux

a) Critères cliniques

Les critères cliniques évalués sont :

- La race
- L'affection
- Le traitement

b) Critères biologiques

(1) Le frottis sanguin

Les critères évalués sur les frottis sanguins sont :

- Présence/Absence d'agrégats de plaquettes
- Présence/Absence d'agrégats de plaquettes en satellite autour des globules blancs
- Présence/Absence de fragments de globules rouges
- Présence/Absence de fragments de cellules nucléées
- Présence/Absence de globules gras, d'hématies à bords flous
- Présence/Absence de microorganismes
- Taille des éléments figurés (plaquettes, globules rouges et blancs, réticulocytes)
- Présence/Absence de cellules anormales, d'une hypochromie, d'une polychromatophilie, de corps de Heinz, de sphérocytes, de schizocytes, d'acanthocytes, d'hématies fantômes

B. Résultats : établissement de six groupes de nuages de points plaquettaires anormaux

Sur 4713 hémogrammes, 61 d'entre eux présentaient un nuage plaquettaire anormal selon les critères énoncés dans la première partie. Six groupes ont été créés en fonction des

profils plaquettaires identifiés, se différenciant par la forme, la densité du nuage de points des plaquettes ainsi que par sa relation avec les nuages des hématies et des réticulocytes. Le classement des hémogrammes en fonction de leur groupe, associé au diagnostic des anomalies de leur nuage plaquettaire, figure dans l'annexe 1.

1. Groupe A

Le premier profil (groupe A) correspond aux nuages de points ayant une anomalie de densité. Deux sous profils sont mis en évidence :

- Sous-profil 1 : le nuage de points plaquettaires a une densité de points inversée sur la courbe c'est-à-dire que la densité augmente avec l'axe des abscisses alors qu'elle devrait diminuer (gradient de densité sur la figure 5).

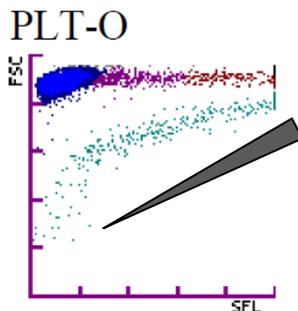


Figure 5 : Nuage plaquettaire type du sous-profil A.1.

- Sous-profil 2 : le nuage de points présente une forme de « banane » mais est anormalement localisé et est formé de deux populations de points (trait en pointillé sur la figure 6).

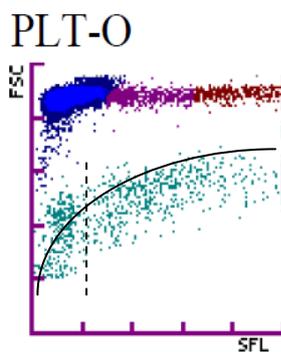


Figure 6 : Nuage plaquettaire type du sous-profil A.2

2. Groupe B

Le deuxième profil (groupe B) correspond aux nuages de points ayant une base tronquée (flèche sur la figure 7).

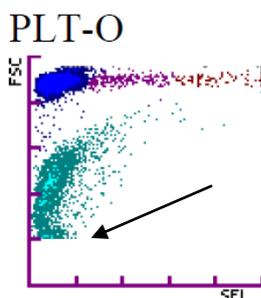


Figure 7 : Nuage plaquettaire type du groupe B

3. Groupe C

Le troisième profil (groupe C) correspond aux nuages de points :

- Avec une double population : une population normale et une deuxième population distincte se situant dans le cadran inférieur droit du graphique (deux cercles sur la figure 8)
- Ou
- Avec la présence de points anormalement situés dans le cadran inférieur droit du graphique.

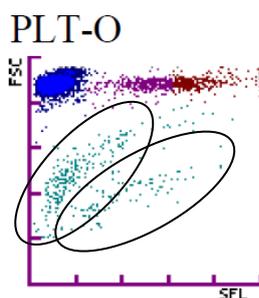


Figure 8 : Nuage plaquettaire type du groupe C

4. Groupe D

Le quatrième profil (groupe D) correspond aux nuages de points anormaux dans l'angle à gauche du graphique ayant une mauvaise séparation avec le nuage de point des globules rouges. Deux sous profils ont été identifiés.

- Sous profil 1 : les points anormaux descendent à partir du nuage de points des hématies et « tombent » dans celui des plaquettes avec une confusion entre les deux nuages (flèche sur la figure 9).

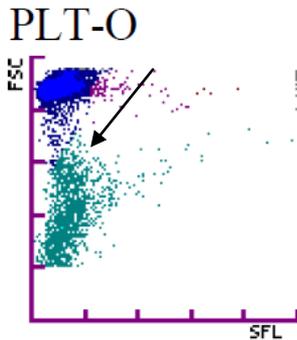


Figure 9 : Nuage plaquettaire type du sous-profil D.1.

- Sous profil 2 : les points anormaux remontent du nuage de points des plaquettes vers le nuage des hématies avec une confusion entre les deux nuages (flèche sur la figure 10).

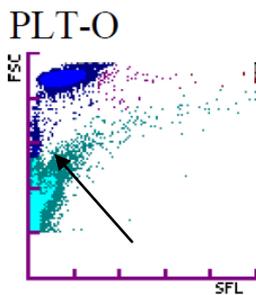


Figure 10: Nuage plaquettaire type du sous-profil D.2.

5. Groupe E

Le cinquième profil (groupe E) correspond à un nuage de point formant un patch rond détaché de l'axe des ordonnées (figure 11).

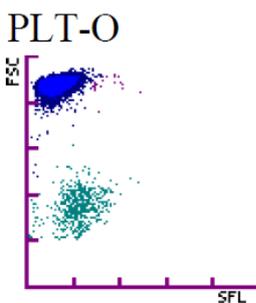


Figure 11 : Nuage plaquettaire type du groupe E

6. Groupe F

Le sixième profil (groupe F) correspond aux nuages de points plaquettaires fusionnant avec le nuage des réticulocytes au-dessus et à droite du graphique (cercle sur la figure 12).

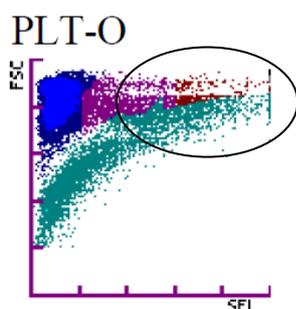


Figure 12 : Nuage plaquettaire type du groupe F

C. Les affections retrouvées dans les différents groupes

1. Groupe A

Dans le groupe A, 8 chiens (numéros 1 à 8) ont été retenus et tous présentent une thrombopénie. Par ailleurs, un chien du groupe F (numéro 61) présente des caractéristiques appartenant au groupe A.

Au sein du groupe A, deux sous-profil se distinguent. Dans le groupe A.1., 8 chiens ont été retenus (hémogrammes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 61). Tous les hémogrammes du groupe A.1 proviennent de chiens ayant des macroplaquettes visibles au frottis sanguin. Les numéros 4 et 7, réalisés à un mois et demi d'intervalle, proviennent d'un même chien ayant une leishmaniose. Les numéros 2 et 3 proviennent de chiens ayant respectivement une parvovirose et une leishmaniose. Le numéro 61 provient d'un chien avec une leucémie aiguë. Les numéros 5, 6 et 8 proviennent de chiens de race Cavalier King Charles. Dans le groupe A.2, un chien avec une trypanosomose a été retenu (hémogramme 1). Ce chien avait 73000 plaquettes/ μ l d'après la numération plaquettaire optique mais le frottis sanguin a mis en évidence de très rares plaquettes et de nombreux hémoparasites (trypanosomes).

2. Groupe B

Dans le groupe B, 20 chiens (numéros 9 à 28) ont été retenus dont 5 également classés dans le groupe D (numéros 11, 21, 24, 25 et 27) et deux classés dans le groupe C

(numéros 18 et 26). 13 hémogrammes (9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 26 et 28) proviennent de chiens ayant une hyperlipémie avec des hématies à bords flous au frottis sanguin sans autre anomalie observée. 4 hémogrammes (11, 21, 22 et 25) proviennent de sang prélevé un à trois jours avant l'analyse. Pour ces cas-là, le frottis sanguin n'était pas disponible. Les hémogrammes 18, 23 et 27 proviennent de chiens ayant respectivement une leucémie chronique, une thrombocytose sévère ($>1.10^6$ plaquettes) et une envenimation ophidienne. Pour le chien avec une leucémie chronique, le frottis sanguin a mis en évidence des blastes circulants. Pour le chien avec une thrombocytose sévère, le frottis sanguin a mis en évidence une poïkylocytose avec la présence de schizocytes. Pour le chien avec une envenimation ophidienne, le frottis sanguin a mis en évidence de nombreuses hématies fantômes et nombreux fragments de leucocytes.

Par ailleurs, 3 hémogrammes du groupe C (42, 43 et 44) et 7 hémogrammes du groupe D (46, 47, 48, 52, 55, 56 et 57) ont des caractéristiques appartenant au groupe B. Parmi ces 10 chiens, 4 présentent une hyperlipémie (43, 46, 47 et 48) avec des hématies à bords flous au frottis sanguin. Les hémogrammes 55 et 56 proviennent de tubes de sang prélevés un à trois jours avant l'analyse. Deux autres chiens (hémogrammes 42 et 57) avec respectivement une leucémie aiguë et une anémie hémolytique à médiation immune présentent des fragments de leucocytes ou des hématies fantômes sur le frottis sanguin. Pour les hémogrammes 44 et 52, aucune explication n'a été apportée par la lecture du frottis sanguin.

3. Groupe C

Dans le groupe C, 17 chiens (numéros 29 à 45) ont été retenus dont 3 également placés dans le groupe B (42, 43 et 44). Les hémogrammes 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 et 41 proviennent de chiens atteints de piroplasmose avec de nombreuses hématies parasitées au frottis sanguin. Les hémogrammes 39, 40 et 42 proviennent de chiens leucémiques avec de nombreux blastes circulants et fragments de globules blancs au frottis sanguin. Les hémogrammes 31 et 43 proviennent de chiens ayant une hyperlipémie et des hématies à bords flous au frottis associés à des schizocytes et des sphérocytes pour le numéro 43. Aucune explication n'a été identifiée sur le frottis pour l'hémogramme 44. L'hémogramme 45 provient d'un chien ayant des cristaux d'hémoglobine visibles sur le frottis sanguin.

Par ailleurs, deux chiens du groupe B (hémogrammes 18 et 26) dont respectivement un avec une leucémie chronique et des blastes circulants et un avec une hyperlipémie et des hématies à bords flous, et un chien du groupe D (hémogramme 51) avec une hyperlipémie et des hématies à bords flous présentent également des caractéristiques appartenant au groupe C.

4. Groupe D

Dans le groupe D, 12 chiens (numéros 46 à 57) ont été retenus dont 7 appartenant également au groupe B (46, 47, 48, 52, 55, 56, 57) et l'hémogramme 51 appartenant également au groupe C. Parmi ces 12 chiens, 5 (hémogrammes 46, 47, 48, 50 et 51) présentent une hyperlipémie avec des hématies à bords flous au frottis sanguin. Les hémogrammes 55 et 56 proviennent de sang prélevé un à trois jours avant l'analyse. Les numéros 49, 53, 54 et 57 proviennent de chiens dont le frottis montre une anisocytose marquée, une poïkilocytose avec schizocytes et acanthocytes ou des hématies fantômes. Aucune cause n'a été identifiée pour l'hémogramme 52.

Par ailleurs, 5 hémogrammes (11, 21, 24, 25 et 27) appartenant au groupe B ont des caractéristiques appartenant au groupe D. Trois d'entre eux (11, 21 et 25) proviennent de sang prélevé un à trois jours avant l'analyse. L'hémogramme 24 provient d'un chien ayant une hyperlipémie et l'hémogramme 27 provient d'un chien avec une envenimation ophidienne et des fragments de globules blancs ainsi que des hématies fantômes au frottis.

De plus, au sein du groupe D, deux sous-types de profils se distinguent. Dans le groupe D.1., 11 chiens (numéros 11, 21, 25, 27, 49, 52, 53, 54, 55, 56 et 57) ont été retenus. Les numéros 11, 21, 25, 55 et 56 proviennent de sang prélevé un à trois jours avant (5 cas sur 11). Les numéros 27, 49, 53, 54 et 57 proviennent de chiens dont le frottis montre une poïkilocytose, une anisocytose marquée ou des hématies fantômes au frottis (5 cas sur 11). Dans le groupe D.2., 6 chiens ont été retenus (24, 46, 47, 48, 50 et 51) et ont tous une hyperlipémie avec des hématies à bords flous aux frottis.

5. Groupe E

Le groupe E n'est constitué que d'un seul hémogramme (hémogramme 58). Des caillots de fibrine ont été observés au frottis sanguin. Le chien avait un sertolinome unilatéral avec septicémie et coagulopathie intravasculaire disséminée (CIVD).

6. Groupe F

Dans le groupe F, 3 chiens (59, 60 et 61) ont été retenus dont un appartenant également au groupe A (hémogramme 61). Les hémogrammes 59 et 60 proviennent de chiens ayant une anémie microcytaire très régénérative due à des pertes sanguines (saignements digestifs pour le 59). Dans ces 2 cas, le frottis sanguin a mis en évidence une polychromatophilie marquée et la présence de macroplaquettes. L'hémogramme 61 provient d'un chien avec une leucémie aiguë et la présence de cellules blastiques circulantes et de macroplaquettes au frottis sanguin.

III. Discussion

Au regard des résultats obtenus, certains nuages plaquettaires anormaux sont associés à des hyperlipémies (20 cas sur 61), à des piroplasmoses (10 cas sur 61), à des effets du vieillissement du sang (6 cas sur 61) et à des trypanosomoses (1 cas sur 61).

A. Groupe A : variation de densité du nuage plaquettaire

Au sein du groupe A, les anomalies les plus fréquemment rencontrées sont des thrombopénies (9 cas sur 9). Deux sous-groupes avaient été établis : le groupe A.1. pour lequel la densité du nuage de points augmente avec l'axe des abscisses au lieu de diminuer (hémogrammes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 61) et le groupe A.2. pour lequel il existe une double population de nuage plaquettaire (hémogramme 1).

1. Groupe A.1. : nuage plaquettaire avec un gradient de densité de points inversé

Au sein du groupe A.1., tous les hémogrammes (numéros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 61) ont des macroplaquettes visibles au frottis sanguin. Parmi ces hémogrammes, trois d'entre eux proviennent de chiens de race Cavalier King Charles (numéros 5, 6 et 8). Or, certaines races de chiens sont prédisposées aux désordres plaquettaires. En effet, des macroplaquettes (Cowan et al. 2004)(Olsen et al. 2001) peuvent être observés de manière physiologique dans le sang des Cavalier King Charles. Ces anomalies physiologiques sont à l'origine d'une fausse thrombocytopénie mesurée par l'analyseur (Eksell et al. 1994). En effet, les macroplaquettes ou les petits amas plaquettaires sont de grande taille et ont une quantité d'ARN plus importante, ceci entraînant leur classement en haut à droite sur le graphique correspondant

au nuage plaquettaire. Par ailleurs, le Schnauzer géant (Vargo, Taylor, Haines 2007) et d'autres races (Berger Allemand, Fox Terrier à poils dur, Golden et Labrador Retriever, Whest Highland White Terrier, Cocker Spaniel, Boxer, Yorkshire Terrier) (Botsch et al. 2009) sont également sujets à présenter des anomalies plaquettaires susceptibles de créer des nuages plaquettaires anormaux.

Par ailleurs, au sein du groupe A.1., 2 hémogrammes sur 8 (numéros 4 et 7), réalisés à un mois et demi d'intervalle, proviennent d'un unique chien ayant une leishmaniose. Ils présentent tous les deux une thrombopénie sévère avec macroplaquettes visibles au frottis sanguin. Les hémogrammes 2 et 3 proviennent de chiens respectivement atteints de leishmaniose et de parvovirose et ayant des macroplaquettes en grande quantité visibles sur le frottis sanguin. Ces macroplaquettes entraînent la remontée du nuage plaquettaire ainsi que l'augmentation de la densité plaquettaire à droite du graphique (figure 13). La présence de macroplaquettes peut s'expliquer par la régénération plaquettaire en cours en réponse à la thrombopénie et/ou suite au traitement contre la leishmaniose ou la parvovirose. En effet, la moelle osseuse régénère de nouvelles « jeunes » plaquettes qui sont de taille plus élevée et qui ont une quantité d'ARN plus importante.

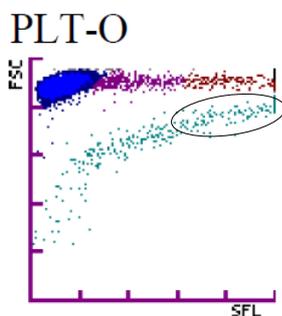


Figure 13 : Nuage plaquettaire type du groupe A.1. ; cercle noir : macroplaquettes

En synthèse, le déplacement de densité plaquettaire vers la droite expliquant un nombre élevé de grosses plaquettes peut être justifié par la présence physiologique de macroplaquettes chez le Cavalier King Charles, par la présence de jeunes plaquettes plus grosses régénérées par la moelle osseuse lors de processus infectieux ou tumoral.

2. Groupe A.2. : forme de « banane » respectée mais localisation du nuage anormale et présence de deux populations

Au sein du groupe A.2., l'hémogramme 1 présente un nuage plaquettaire « en forme de banane » mais anormalement localisé et est formé de deux populations. L'hémogramme 1 provient d'un chien ayant une trypanosomose. Une plaquette mesure entre 2 et 5 μm de diamètre environ et a une taille qui varie entre 5 et 10 μm (Bessis 1977a). Une plaquette est considérée comme grande si elle mesure plus de 3 μm et de géante si elle mesure plus de 6 μm (Cowan et al. 2004). Or les trypanosomes sont des parasites protozoaires extracellulaires mesurant entre 10-25 μm de longueur et 3-12 μm de largeur en fonction de leur stade (Euzéby 1986). De plus, ces parasites ont un noyau formé d'ADN et ont dans leur cytoplasme des granulations contenant de l'ARN (Euzéby 1986). Ainsi, elles ressemblent parfois, si l'on n'y prête pas réelle attention, à de grosses plaquettes. Sur le frottis de l'hémogramme 1, des trypanosomes sont visualisés mais en regardant attentivement, de très rares plaquettes ont été observées. Le nuage plaquettaire de cet hémogramme respecte la forme en « banane » du nuage plaquettaire normal même s'il est anormalement localisé et présente deux populations de points. Celles-ci pourraient représenter deux populations de trypanosomes de tailles différentes (figure 14). Il est donc possible que l'analyseur ait compté les trypanosomes comme des plaquettes expliquant la localisation et la composition anormale du nuage de points.

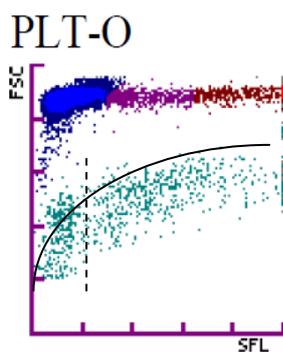


Figure 14 : Nuage plaquettaire de l'hémogramme 1 ; trait en pointillés : scissure entre les deux nuages de points ; trait plein : aspect d'un nuage plaquettaire normal en « forme de banane »

En conclusion pour le groupe A, la variation de densité au sein du nuage plaquettaire est majoritairement liée à la présence de macroplaquettes, à la présence d'éléments de taille et de fluorescence comparables à celles des plaquettes comme les trypanosomes qui sont alors comptés, par l'analyseur, comme des plaquettes.

B. Groupe B : base tronquée

Au sein du groupe B, les anomalies les plus fréquemment rencontrées sont les hyperlipémies (17 cas sur 30), le vieillissement du sang (6 cas sur 30), les leucémies (2 cas sur 30) et les fragments d'hématies et de leucocytes (2 cas sur 30).

D'après une étude précédente, les chylomicrons, présents en grande quantité lors d'hyperlipidémie, peuvent atteindre un diamètre de 1.5 à 3.5 μm correspondant à la taille d'une plaquette (Osamu et al, 1999). De plus, les lipides possèdent un indice de fluorescence comparable à celui des plaquettes (Zandecki et al. 2007b). Il est alors probable que l'analyseur puisse compter des gouttelettes lipidiques comme des plaquettes. Cependant, l'analyseur ne compte pas les éléments ayant une taille inférieure à une certaine valeur, c'est-à-dire qu'une plaquette doit avoir une taille minimum pour être comptée par l'automate. Ainsi, il est envisageable que des gouttelettes lipidiques de taille correspondant aux plus petites des plaquettes mais ayant une fluorescence comparable, soient comptées comme des plaquettes, ceci créant une ligne horizontale dense de points traçant la limite de taille des plaquettes, et correspondant aux gouttelettes lipidiques. Ainsi, il est possible, dans le cas d'hyperlipidémie, d'être dans une situation de thrombopénie cachée en raison d'un comptage plaquettaire faussement augmenté (Zandecki et al. 2007b). En effet, en médecine humaine, une étude avait montré qu'une concentration élevée en cholestérol et en triglycérides entraînait des variations de numération plaquettaire (Ferreira et al. 2013) et plus précisément une élévation de cette numération à cause du biais de comptage des chylomicrons. La turbidité du specimen analysé est un indice d'hyperlipidémie indiquant l'existence d'un risque de biais lors du comptage plaquettaire par cytométrie en flux (numération plaquettaire augmentée de 47% selon l'étude de Canderò et al. 1996). Ce comptage doit alors être réévalué manuellement pour éviter les erreurs diagnostiques (Canderò et al. 1996).

C. Groupe C : présence d'un deuxième nuage ou de points anormaux dans le cadran inférieur droit du graphique

Au sein du groupe C, les anomalies les plus fréquemment rencontrées sont les piroplasmoses (10 cas sur 20), les leucémies (4 cas sur 20) et les hyperlipémies (4 cas sur 20).

Parmi les 10 cas de piroplasmose (hémogrammes 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37 et 38), tous ont des babésies visibles sur le frottis sanguin. Les babésies affectant l'espèce canine comme *Babesia canis* sont des parasites intra-érythrocytaires mesurant entre 3 et 7 µm de long. Elles sont injectées sous la forme de sporozoïtes avec la salive d'une tique lors d'une piqûre (Miodrag, Ristic 1988). Chez *Babesia canis*, un sporozoïte mesure 2.5 µm sur 1.5 µm (Schein, Mehlhorn, Voigt 1979). Ils circulent dans le sang et deviennent des mérozoïtes ou babésies adultes pour pénétrer dans l'hématie. Il est donc envisageable que certains sporozoïtes de babésies soient comptés comme des plaquettes lors de l'analyse par cytométrie en flux. De plus, proportionnellement à l'augmentation de leur taille, la quantité d'ADN et d'ARN présente au sein des sporozoïtes évolue au cours du temps. Ceci laisse supposer que la fluorescence est variable d'un sporozoïte à un autre. Par ailleurs, une étude précédente a montré que le Sysmex XT-2000iV pouvait confondre l'ARN contenu dans les babésies parasitant des hématies avec celui contenu dans les réticulocytes, ceci entraînant l'apparition de nuages réticulocytaires anormaux (Piane et al. 2014). Ainsi, il est envisageable, par analogie avec cette étude et aux correspondances de taille et fluorescence des sporozoïtes avec les plaquettes, que la présence de babésies libres entraîne l'apparition d'un second nuage de points en-dessous du nuage plaquettaire normal (figure 15).

Parmi les 4 cas de leucémie, 3 aiguës (hémogrammes 39, 40 et 42) et une chronique (hémogramme 18), tous ont des blastes visibles sur le frottis sanguin. Une étude récente a montré que des fragments de blastes pouvaient être comptés comme des réticulocytes par le Sysmex XT-2000iV en raison de leurs tailles et leurs quantités d'ARN semblables (Novacco et al. 2015). Par ailleurs, il avait déjà été montré que la présence de fragments de blastes lors de leucémie aiguë pouvaient faussement augmenter le comptage plaquettaire et ainsi empêcher le diagnostic de thrombopénie (Zandecki et al. 2007b). Ainsi, par analogie avec cette étude, il est envisageable que certains fragments de blastes aient été comptés comme des plaquettes chez ces patients leucémiques (figure 15).

Les 4 cas d'hyperlipémie (hémogrammes 26, 31, 43 et 51) ont des hématies à bords flous visibles sur le frottis sanguin. Comme expliqué précédemment pour les hémogrammes du groupe A, les gouttelettes lipidiques peuvent être faussement comptées comme des plaquettes par l'analyseur. L'apparition d'un second nuage plaquettaire peut en être la conséquence (figure 15).

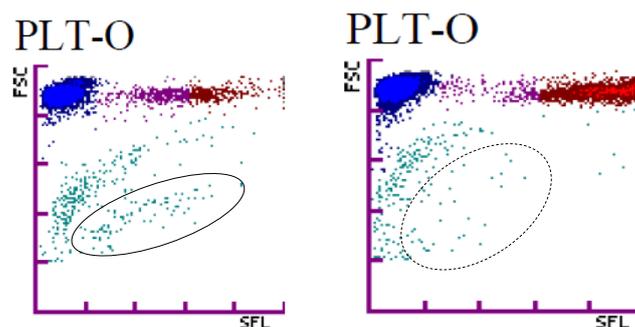


Figure 15 : Nuage plaquettaire type du groupe C ; cercle trait plein : babésies ; cercle trait pointillés : blastes, gouttelettes lipidiques

En conclusion pour le groupe C, la présence d'une double population de nuage plaquettaire ou de points dans le cadran inférieur droit est majoritairement liée à la présence de babésies libres sanguines lors de piroplasmose, à la présence de chylomicrons lors d'hyperlipidémie ou à la présence de fragments de blastes lors de leucémies. Ces éléments sont comptés par erreur comme des plaquettes par l'analyseur.

D. Groupe D : fusion entre le nuage des plaquettes et celui des hématies sur la gauche du graphique

Au sein du groupe D, les anomalies les plus fréquemment rencontrées sont les hyperlipémies (6 cas sur 17), le vieillissement du sang (5 cas sur 17) et la poïkilocytose ou la présence de fragments d'hématies (5 cas sur 17). Deux sous-groupes avaient été établis : le groupe D.1. pour lequel les points anormaux descendent à partir du nuage des hématies, celui-ci étant presque confondu avec le nuage plaquettaire (hémogrammes 11, 21, 25, 27, 49, 52, 53, 54, 55, 56 et 57) et le groupe D.2. pour lequel les points anormaux montent du nuage plaquettaire vers le nuage des hématies avec une partie du nuage des hématies séparé de son nuage normal (hémogrammes 24, 46, 47, 48, 50 et 51).

1. Groupe D.1. : descente du nuage des hématies vers celui des plaquettes

Au sein du groupe D.1., 11 chiens (numéros 11, 21, 25, 27, 49, 52, 53, 54, 55, 56 et 57) ont été retenus. Les numéros 11, 21, 25, 55 et 56 proviennent de l'étude sur le vieillissement du sang (5 cas sur 11). Les hémogrammes 21 et 25, proviennent d'un même chien et ont été analysés respectivement deux et trois jours après le prélèvement. Il en est de même pour les hémogrammes 55 et 56. D'après une étude récente, la conservation du

tube de sang à température ambiante pendant 24 à 48 heures entraînerait l'observation d'un effondrement du nuage des hématies vers celui des plaquettes (Bourgès-Abella et al. 2014) (figure 16).

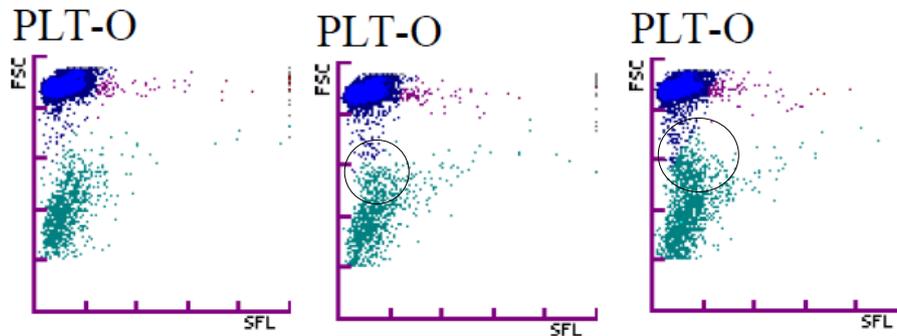


Figure 16 : Nuages plaquettaires types des hémogrammes de l'étude sur le vieillissement du sang. De gauche à droite : J1 J2 et J3 ; cercles noirs : hématies

Les numéros 27, 49, 53, 54 et 57 proviennent de chiens ayant une poïkilocytose avec des microcytes, des schizocytes et/ou acanthocytes ou ayant des hématies fantômes visibles sur le frottis sanguin. D'après une étude précédente, des fragments d'hématies ou des petites hématies ont une taille et un indice de fluorescence comparable à celui des plaquettes et ne peuvent pas être différenciés par le Sysmex XT-2000iV (Zandecki et al. 2007b). Ainsi, les points anormaux descendant vers le nuage plaquettaire sont des fragments d'hématies ou petites hématies comptées par erreur comme des plaquettes (figure 17).

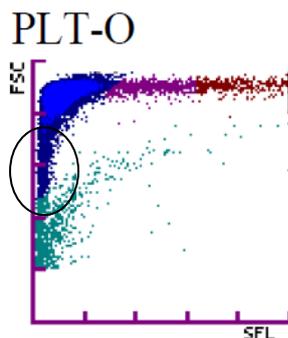


Figure 17 : Nuage plaquettaire type du groupe D.1. ; cercle noir : hématies comptées comme des plaquettes

En synthèse, l'observation de points anormaux descendant à partir du nuage des hématies jusqu'à se confondre avec le nuage plaquettaire peut être justifiée par la présence de petites hématies ou de fragments d'hématies comptées comme des plaquettes ou suite à la conservation du sang à température ambiante pendant 24 à 48 heures.

2. Groupe D.2. : remontée du nuage plaquettaire vers celui des hématies

Au sein du groupe D.2., 6 chiens (24, 46, 47, 48, 50 et 51) ont été retenus. Tous présentent une hyperlipémie avec des hématies à bords flous visibles sur le frottis sanguin. Comme expliqué précédemment (hémogrammes du groupe C), l'hyperlipidémie entraîne la présence de gouttelettes lipidiques libres dans le sang. Il est possible que ces gouttelettes aient été comptées comme des plaquettes par le Sysmex XT-2000iV (figure 18).

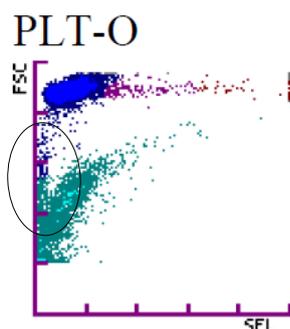


Figure 18 : Nuage plaquettaire type des hyperlipidémies du groupe D.2. ; cercle noir : gouttelettes lipidiques

E. Groupe E : patch rond détaché de l'axe des abscisse et ordonnée

Au sein du groupe E, l'unique hémogramme (numéro 58) montrait des caillots de fibrine au frottis sanguin. Il est possible que des débris de fibrine aient été comptés comme des plaquettes, ceci créant un nuage anormal en patch au centre du graphique.

En synthèse, lors de l'analyse par cytométrie en flux par le Sysmex XT-2000iV, la présence de débris de fibrine dans le sang peut être à l'origine de l'apparition d'un nuage plaquettaire anormal caractérisé par des points regroupés en patch rond au centre du graphique.

F. Groupe F : fusion entre le nuage des plaquettes et celui des réticulocytes sur la droite du graphique

Au sein du groupe F, les anomalies les plus fréquemment rencontrées sont une hémorragie (2 cas sur 3) et une leucémie avec une réticulocytose et des macroplaquettes visibles sur le frottis sanguin (1 cas sur 3).

Parmi les deux cas d'hémorragie (hémogrammes 59 et 60), tous ont une anémie microcytaire régénérative visible sur le frottis sanguin par l'observation d'une polychromatophilie marquée expliquant la présence de réticulocytes (Hodges, Christopher 2011) (Collicutt, Grindem, Neel 2012) et par l'observation d'hématies de petite taille. Il a été montré que, lors de microangiopathie ou d'anémie microcytaire ferriprive, des hématies et/ou réticulocytes de petite taille peuvent être comptés comme des plaquettes et donc augmenter le comptage plaquettaire (Zandecki et al. 2007b). De plus, des macroplaquettes sont visibles sur le frottis sanguin des hémogrammes 59 et 61, ceci accentuant la remontée du nuage plaquettaire vers le nuage des réticulocytes. La fusion des plaquettes avec les réticulocytes sur le nuage plaquettaire s'explique donc par un comptage erroné de petites hématies et de petits réticulocytes comme des plaquettes et par la présence de macroplaquettes.

L'hémogramme 61 provient d'un chien leucémique. Ce chien avait déjà présenté un nuage plaquettaire anormal l'année précédente (hémogramme 42), classé dans le groupe C. A l'époque, de nombreux blastes et fragments de blastes étaient visibles sur le frottis sanguin, expliquant l'apparition de points anormaux dans le cadran inférieur droit du graphique. Sur le frottis de l'hémogramme 61, aucun blaste n'a été observé mais des macroplaquettes ainsi qu'une polychromatophilie sont visibles, ceci expliquant la fusion entre le nuage des plaquettes et celui des réticulocytes.

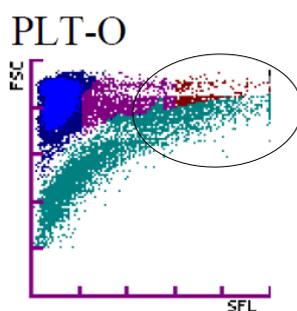


Figure 19 : Nuage plaquettaire type du groupe G ; cercle : fusion entre macroplaquettes et petits réticulocytes

IV. Conclusion

Parmi les 4713 hémogrammes de chiens répertoriés entre 2011 et 2015 au laboratoire de Biologie Médicale de l'ENVT, 61 présentaient un nuage plaquettaire anormal

selon le protocole établi. Leur classement entre différents groupes (A à F) en fonction de leurs anomalies a mis en lumière des affections communes dans chacun des groupes. La piroplasmose, l'hyperlipémie, les leucémies aiguës ou encore le vieillissement du sang semblent être à l'origine d'anomalies de nuages plaquettaires et d'une potentielle erreur de comptage plaquettaire par le Sysmex XT-2000iV. Des alarmes pourraient être alors mises en place afin de prévenir le biologiste du possible biais existant.

A la lumière de cette étude, l'hyperlipémie semble être une des anomalies les plus fréquemment responsables d'anomalie de nuage plaquettaire chez le chien. Une étude prochaine pourrait s'intéresser plus particulièrement aux cas d'hyperlipémie avec notamment la vérification des numérations plaquettaires obtenues par le Sysmex XT-2000iV et des comptages manuels ou par des méthodes de cytométrie en flux avec anticorps anti-plaquettaires spécifiques.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Catherine TRUMEL, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **MAYAUD Marie-Lou** intitulée « **Etude rétrospective sur les nuages de points plaquettaires anormaux chez le chien obtenus par le Sysmex XT 2000iV.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 30 mai 2016
Professeure Catherine TRUMEL
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



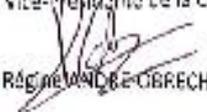
Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITTELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeure Monique COURTADE-SAÏDI



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation.
La Vice-Présidente de la CPVU


RÉGINE WÄNDLE-OBRECHT



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Bibliographie

BESSIS, Marcel, 1977. Thrombocytic Series. In : *Blood Smears Reinterpreted* . Springer Berlin Heidelberg. pp. 129- 144.

BOURGÈS-ABELLA, Nathalie H., GEFFRÉ, Anne, DESHUIILLERS, Pierre L., BRAUN, Jean-Pierre D. et TRUMEL, Catherine, 2014. Changes in hematology measurements in healthy and diseased dog blood stored at room temperature for 24 and 48 hours using the XT-2000iV analyzer. *Veterinary Clinical Pathology*. mars 2014. Vol. 43, n° 1, pp. 24- 35.

COLLICUTT, Nancy B., GRINDEM, Carol B. et NEEL, Jennifer A., 2012. Comparison of manual polychromatophilic cell and automated reticulocyte quantification in evaluating regenerative response in anemic dogs. *Veterinary Clinical Pathology*. juin 2012. Vol. 41, n° 2, pp. 256- 260.

CUIGNET, Olivier Y., WOOD, Brent L., CHANDLER, Wayne L. et SPIESS, Bruce D., 2000. A second-generation blood substitute (perfluorodichlorooctane emulsion) generates spurious elevations in platelet counts from automated hematology analyzers. *Anesthesia & Analgesia*. 2000. Vol. 90, n° 3, pp. 517–522.

FERREIRA, Lisianny Camilla C. do Nascimento, SILVA, Humberto José Gomes da, LINS, Tatiana Acioli et PRADO, Wagner Luiz do, 2013. Relationship between lipid and hematological profiles with adiposity in obese adolescents. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2013.

GOKCEBAY, D. G., AZIK, F. M., ISIK, P., BOZKAYA, I. O., KARA, A., TAVIL, E. B., YARALI, N. et TUNC, B., 2011. Complete blood count using VCS (volume, conductivity, light scatter) technology is affected by hyperlipidemia in a child with acute leukemia: VCS TECHNOLOGY AFFECTED BY HYPERLIPIDEMIA. *International Journal of Laboratory Hematology*. décembre 2011. Vol. 33, n° 6, pp. 651- 655.

HODGES, Joanne et CHRISTOPHER, Mary M., 2011. Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2011. Vol. 238, n° 11, pp. 1452–1458.

LESEVE, J. F., KHALIFA, M. A., DENOYES, R. et BRAUN, F., 2009. Peripheral blood candidosis infection leading to spurious platelet and white blood cell counts. *International Journal of Laboratory Hematology*. octobre 2009. Vol. 31, n° 5, pp. 572 - 576.

LILLIEHÖÖK, Inger et TVEDTEN, Harold, 2009. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Veterinary Clinical Pathology*. juin 2009. Vol. 38, n° 2, pp. 163 - 174.

MIODRAG, RISTIC, 1988. Babesiosis of domestic animals and man. 255 pp.

NOVACCO, Marilisa, MARTINI, Valeria, GRANDE, Carmen et COMAZZI, Stefano, 2015. Analytic errors in Sysmex-generated hematology results in blood from a dog with chronic lymphocytic leukemia. *Veterinary Clinical Pathology*. septembre 2015. Vol. 44, n° 3, pp. 337 - 341.

OSAMU et al, 1999. Effects of hypertriglyceridemia on platelet counts in automated hematologic analysis. 2 March 1999. *Annals of Internal Medicine*, Vol. 130, n° 5

SCHEIN, E., MEHLHORN, H. et VOIGT, W. P., 1979. Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Tropica*. septembre 1979. Vol. 36, n° 3, pp. 229 - 241.

TVEDTEN, Harold, 2010. What is your diagnosis? Discrepancy in platelet counts determined using a Sysmex XT-2000 iV hematology analyzer: Discrepant platelet counts in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*. septembre 2010. Vol. 39, n° 3, pp. 395 - 396.

ZANDECKI, M., GENEVIEVE, F., GERARD, J. et GODON, A., 2007a. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Clinical and Laboratory Haematology*. février 2007. Vol. 29, n° 1, pp. 4 - 20.

ZANDECKI, M., GENEVIEVE, F., GERARD, J. et GODON, A., 2007b. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *Clinical and Laboratory Haematology*. février 2007. Vol. 29, n° 1, pp. 21 - 41.

	N° dossier	N° labo	A	B	C	D	E	F	DIAGNOSTIC DES ANOMALIES DU NUAGE PLAQUETTAIRE	PLT-O (10 ³)	PLT manuel (10 ³)	PLT-I (10 ³)
1	T09-1818	15-4788	x						trypanosome	73		16
2	T13-2134	13-2345	x						macroplaquettes (leishmaniose)	58	206	6
3	T13-2719	13-3028	x						macroplaquettes (parvovirose)	88		17
4	T14-6408	15-50	x						macroplaquettes (leishmaniose)	34	42	2
5	T15-3842	15-4643	x						macroplaquettes (CKC)	72	73	5
6	T13-4755	13-4891	x						macroplaquettes (CKC)	47		9
7	T14-6408	14-6711	x						macroplaquettes (leishmaniose)	44	64	7
8	T11-6452	11-5979	x						macroplaquettes (CKC)			12
9	T06-2371	14-6155		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)	787	510	630
10	T11-5297	11-5011		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)	637		708
11	T14-2128 J3	14-2213 J3		x		x			vieillessement du tube			217
12	T12-5810	13-39		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)			396
13	T12-3687	13-3921		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)			400
14	T13-6233	13-6203		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)			551
15	T11-1351	15-4948		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)	343		383
16	T12-919	12-871		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)			496
17	T12-4774	14-5116		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)	490	460	884
18	T14-2460	14-2623		x	x				blastés (leucémie chronique)			235
19	T15-3756	15-4531		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)	558		576
20	T09-2261	12-2642		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)	645		489
21	T14-750 J2	14-2181 J2		x		x			vieillessement du tube			323
22	T14-750 J1	14-2181 J1		x					vieillessement du tube			390
23	T13-2502	13-2723		x					poikilocytose (schizocytes)			1076
24	T11-1909	11-4520		x		x			hématies à bords flous (hyperlipémie)			460
25	T14-750 J3	14-2181 J3		x		x			vieillessement du tube			317
26	T14-480	15-1284		x	x				hématies à bords flous (hyperlipémie)	608		550
27	T13-2808	13-3004		x		x			fragments de leucocytes, hématies fantômes (envenimation)		140	463
28	T13-3465	13-4344		x					hématies à bords flous (hyperlipémie)			719
29	T05-509	13-3142			x				piroplasmose	44		29
30	T02-3625	12-4424			x				piroplasmose	61		32
31	T09-1161	14-49			x				hématies à bords flous (hyperlipémie)	68	55	57
32	T06-3053	14-6382		x					piroplasmose	49	45	26
33	T11-5518	13-1551		x					piroplasmose	25		6
34	T08-3201	11-5896			x				piroplasmose	28	30	22
35	T12-674	12-659			x				piroplasmose	15		8
36	T15-1236	15-3648			x				piroplasmose			10
37	T12-6284	13-5473			x				piroplasmose	36		24
38	T13-2005	13-2190			x				piroplasmose	8		2
39	T14-959	14-983			x				blastés (leucémie aiguë)	21	10	15
40	T12-5063	12-4251			x				blastés (leucémie aiguë)	22		24
41	T04-629	11-5528			x				piroplasmose	20		12
42	T12-5884	12-4948		x	x				blastés (leucémie aiguë)	105		71
43	T11-5251	11-5880		x	x				hématies à bords flous (hyperlipémie)	124	105	82
44	T10-4225	12-4070		x	x				cause inconnue			285
45	T14-1310	14-1348			x				cristaux d'hémoglobine		62	79
46	T09-2261	11-5065		x		x			hématies à bords flous (hyperlipémie)			517
47	T01-2723	12-2539		x		x			hématies à bords flous (hyperlipémie)			746
48	T12-3381	12-3297		x		x			hématies à bords flous (hyperlipémie)			227
49	T15-2308	15-2832				x			poikilocytose (schizocytes, acanthocytes, microcytes)	78	25	125
50	T14-226	15-1440				x			hématies à bords flous (hyperlipémie)	278		142
51	T07-953	13-5723			x	x			hématies à bords flous (hyperlipémie)			272
52	T13-5412	13-5470		x		x			cause inconnue	215		96
53	T12-1717	12-1642				x			poikilocytose		675	454
54	T13-5396	13-5462				x			hématies fantômes	626		46
55	T14-1946 J2	14-2039 J2		x		x			vieillessement du tube			242
56	T14-1946 J3	14-2039 J3		x		x			vieillessement du tube			328
57	T11-6374	11-5875		x		x			anisocytose, hématies fantômes +++, sphérocytes	93	75	67
58	T13-3629	13-3909					x		caillot de fibrine		13	3
59	T11-1859	13-6066						x	petits réticulocytes et macroplaquettes (anémie microcytaire régénérative)	437		90
60	T04-5355	14-5613						x	petits réticulocytes et macroplaquettes (anémie microcytaire régénérative)	552		201
61	T12-5884	13-1376	x					x	macroplaquettes (leucémie aiguë)	105		75

Annexe 1 : Classement des hémogrammes (1 à 61) en fonction de leur groupe (A à F) et indication des numérations plaquettaires ainsi que du diagnostic des anomalies des nuages plaquettaires pour chaque cas

AUTEUR : MAYAUD Marie-Lou

TITRE : Etude rétrospective sur les nuages de points plaquettaires anormaux chez le chien obtenus par le Sysmex XT-2000iV

DIRECTRICE DE THESE : TRUMEL Catherine

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Ranguel, le 29 juin 2016

L'hémogramme obtenu par des automates est un examen complémentaire très couramment réalisé par les vétérinaires. Il peut arriver que leur lecture soit sujette à de mauvaises interprétations si l'on se réfère uniquement aux résultats chiffrés sans vérification des nuages de points. Dans cette étude, nous nous sommes attachées à mettre en évidence les nuages de points plaquettaires anormaux afin d'en déterminer les causes possibles dans le but de mettre en place des alarmes marquant la présence de ces anomalies. Parmi 4713 hémogrammes de chiens disponibles de 2011 à 2015 au Laboratoire Central de Biologie Médical de l'ENVT, nous en avons répertorié 61 présentant un nuage de points plaquettaires anormal. Nous avons alors pu mettre en évidence des causes similaires chez plusieurs chiens ayant le même type de nuage anormal. Les affections les plus rencontrées sont les hyperlipémies, la babésiose et le vieillissement du sang.

Mots-clés : Plaquettes, chien, hémogramme, Sysmex XT-2000iV, nuage de points, hyperlipémie, babésiose, leucémie aiguë, pré-analytique

TITLE: Retrospective study on abnormal platelet scatter graph of the dog obtained by the Sysmex-XT 2000iV

The complete blood count obtained by automations is a further investigated usually used by the veterinarians. It can arrive that their reader is subject to bad interpretations if we refer only to the results calculated without visualizing the scatter graph. In this study, we attempted to highlight the abnormal platelet scatter graph to determine possible causes with the aim of setting up alarms showing the presence of these anomalies. Among 4713 blood counts of available dogs from 2011 until 2015 in the Central Laboratory of Medical Biology of the ENVT, we listed 61 presenting an abnormal platelet scatter graph. We were then able to highlight common similar causes to several dogs with the same type of abnormal scatter graph. The most met pathologies are hyperlipemias, babesiosis and ageing of the blood.

Key-words : platelets, dog, blood count, Sysmex XT-2000iV scatter graph, hyperlipemia, babesiosis, acute leukemia, pre-analytical.