




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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25625

To cite this version:

Maufras du Chatellier, Thomas . *Nuages de points provenant du canal « DIFF » du sysmex XT-2000iV à partir de sang de chien.* Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 30 p.

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

NUAGE DE POINTS PROVENANT DU CANAL « DIFF » DU SYSMEX XT-2000iV A PARTIR DE SANG DE CHIEN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

MAUFRAS DU CHATELLIER Thomas

Né, le 27/10/1995 à Mont Saint Aignan (76)

Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAÏDI

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

ASSESEURS :

Mr Jean-Pierre BRAUN

Professeur honoraire

Mme Laetitia Piane

Résidente en pathologie clinique et chargée de consultations au Laboratoire
Central de Biologie Médicale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur par intérim : Frédéric Bousquet

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

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*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Geraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- 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*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- 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*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- M. **TOUITOU Florent**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

A Madame la Professeure Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur à l'Université Paul Sabatier

Praticien hospitalier

Histologie, Cytologie – Embryologie

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

Hommages respectueux.

A Madame la Professeure Catherine TRUMEL

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie médicale Animale et Comparée

Pour vos conseils éclairés, votre patience et votre grande gentillesse,

Sincères remerciements.

A Madame la Professeure Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeure de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie

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

Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRAUN

Professeur Honoraire

Pour l'aide précieuse et avisée que vous nous avez apportée dans ce travail,

Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Vétérinaire Laetitia Piane

Résidente en Pathologie Clinique et chargée de consultation Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour votre soutien dans la réalisation de ce projet et vos conseils,

Sincères remerciements.

Table des matières

Table des figures	2
Table des tableaux	2
Liste des abréviations	3
Introduction	5
I. Etude bibliographique	7
A. Présentation des analyseurs d'hématologie.....	7
1. Analyse quantitative du buffy coat	7
2. Impédance électronique : technique de Coulter	7
3. Cytométrie de flux.....	8
4. Le Sysmex XT-2000iV	8
B. Validation des analyseurs d'hématologie.....	10
1. Validation et erreurs des analyseurs d'hématologie en médecine humaine	10
2. Validation et erreurs des analyseurs d'hématologie en médecine vétérinaire.....	12
II. Etude rétrospective.....	14
A. Matériel et méthode.....	14
1. Période de l'étude rétrospective	14
2. Personnes impliquées dans la réalisation de l'étude	14
3. Sélection des hémogrammes	14
4. Classement des hémogrammes.....	16
5. Délimitation du champ de cette étude	17
6. Critères d'évaluation des hémogrammes	17
B. Résultats	19
1. Etablissement des groupes de nuages leucocytaires anormaux.....	19
2. Résultats obtenus sur les globules rouges.....	19
3. Résultats obtenus pour les plaquettes	21
4. Résultats obtenus sur les leucocytes	22
C. Discussion.....	25
1. Observations sur les populations érythrocytaires.....	25
2. Observations sur les populations thrombocytaires.....	25
3. Observations sur les populations leucocytaires.....	26
Conclusion	27
Références.....	28

Table des figures

Figure 1 : Diagramme de dispersion obtenu par le SYSMEX XT-2000iV d'après un hémogramme de la banque de données du laboratoire de biologie médicale de l'ENVT 9

Figure 2 : Calque de nuages de points réalisés sur la base d'hémogrammes considérés normaux par deux personnes expertes et deux personnes naïves 15

Table des tableaux

Tableau 1 : Répartition des anomalies observées sur la lignée érythrocytaire 19

Tableau 2 : Résultats obtenus sur la population érythrocytaire 20

Tableau 3 : Répartition des anomalies observées sur les plaquettes 21

Tableau 4 : Résultats obtenus sur les plaquettes..... 21

Tableau 5 : Résultats obtenus sur les numérations des différentes populations leucocytaires..... 22

Tableau 6 : Répartition des anomalies observées sur la lignée blanche..... 23

Tableau 7 : Résultats obtenus sur les populations leucocytaires..... 24

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FSC : forward scatter

SFL : side fluorescence light

SSC : side scatter

Introduction

Le sang est un liquide biologique vital circulant dans le corps entier par les vaisseaux sanguins grâce à la pompe cardiaque. Il est constitué d'un fluide aqueux, le plasma, dans lequel circulent les cellules sanguines, réparties en trois groupes majoritaires : les hématies, ou globules rouges ; les thrombocytes, ou plaquettes ; et les leucocytes, ou globules blancs.

Les hématies sont des cellules anucléées chez les Mammifères contenant un pigment rouge donnant sa couleur au sang, l'hémoglobine. Ce pigment est une métalloprotéine contenant du fer permettant une fixation réversible de l'oxygène ainsi qu'une fraction de gaz carbonique. Les hématies ont ainsi un rôle prépondérant dans les échanges respiratoires entre l'air et les tissus.

De taille inférieure aux hématies, les plaquettes sont aussi des cellules anucléées non pigmentées chez les Mammifères, issues de la fragmentation des mégacaryocytes dans la moelle osseuse. Elles ont un rôle primordial dans l'hémostase primaire par la formation d'un clou plaquettaire permettant la colmatation d'éventuelles brèches vasculaires.

Les leucocytes, produits par la moelle osseuse, circulent à la fois dans le sang et dans la lymphe mais sont aussi présents dans les organes lymphoïdes et les tissus conjonctifs. Ceux-ci ont un rôle primordial dans le système immunitaire et notamment dans la défense de l'organisme contre une infection, une infestation ou une anomalie cellulaire. Ils sont distingués en deux catégories selon leurs propriétés macroscopiques : les granulocytes, anciennement polynucléaires, et les agranulocytes, ou leucocytes mononucléés. Les granulocytes comprennent les granulocytes neutrophiles, les granulocytes éosinophiles et les granulocytes basophiles et présentent des granulations cytoplasmiques à la microscopie photonique ainsi que des noyaux pluri-lobés. Les lymphocytes et les monocytes constituent les agranulocytes.

Les granulocytes neutrophiles représentent la proportion de leucocytes la plus importante et permettent la défense de l'organisme contre les micro-organismes, en première ligne contre les bactéries, en effectuant l'endocytose et la lyse de celles-ci. Les granulations des éosinophiles ont une action anti-parasitaire et les granulocytes basophiles, rarement rencontrés dans le compartiment vasculaire, jouent un rôle dans l'hypersensibilité immédiate ainsi que dans la médiation de l'inflammation ; les granulations basophiles ayant des propriétés vaso-actives et anti-coagulantes.

Les lymphocytes, divisés en lymphocytes T et B selon l'endroit de maturation, sont responsables des réactions immunitaires spécifiques à médiation immune ou humorale, via notamment la production d'anticorps pour ces derniers. Enfin, les monocytes se différencient en macrophages dans les tissus où ils agissent en conséquence à la pénétration de micro-organismes ou de matériel nécrotique : par phagocytose et destruction bactérienne, par destruction de cellules tumorales... Ils agissent également dans l'inflammation en activant d'autres leucocytes ou encore en présentant des antigènes aux lymphocytes.

L'analyse des cellules sanguines est un examen complémentaire réalisé fréquemment en médecine humaine et vétérinaire au vu des informations potentiellement apportées par celle-ci. Cette analyse est usuellement réalisée avec des automates qui fournissent plusieurs informations : une numération des différentes populations, mais aussi des résultats sous forme de nuage de points ou de courbe. Cependant, il est fréquent chez les praticiens vétérinaires de ne regarder que les résultats sous forme de comptages cellulaires en laissant de côté les informations fournies par les nuages de points ou les courbes, alors que ces derniers peuvent être révélateurs d'erreurs d'interprétations des comptages cellulaires.

Cette étude exposera dans une première partie la réalisation de l'analyse des leucocytes par les automates d'hématologie puis la validation ainsi que les limites des analyseurs rapportées dans la littérature. La seconde partie abordera les résultats de notre étude, qui a eu pour objectif de comparer les comptages cellulaires et les nuages de points obtenus par le Sysmex XT-2000iV et d'aspect normal selon le fabricant aux frottis sanguins correspondants.

I. Etude bibliographique

A. Présentation des analyseurs d'hématologie

Les analyseurs d'hématologie actuels reposent sur trois technologies différentes, qui sont souvent jointes : les analyseurs réalisant une analyse quantitative du buffy coat après centrifugation, les analyseurs à variations d'impédance, utilisant le principe de Coulter et les analyseurs utilisant la cytométrie de flux [1].

1. Analyse quantitative du buffy coat

Cette première technologie repose sur le principe que les différentes cellules sanguines ont différentes densités : elles peuvent donc être réparties en différentes strates après centrifugation.

Pour cela, du sang est prélevé sur tube EDTA puis placé dans un tube à microhématocrite dont les parois sont recouvertes d'acridine orange, un tampon fluorescent qui colore sélectivement les acides nucléiques (ARN et ADN) et est également stocké dans les lysosomes. Sous lumière bleue, les hématies ne sont pas colorées, les granulocytes sont colorés en orangé, les lymphocytes et les monocytes apparaissent vert brillant et les plaquettes jaune pâle.

Un flotteur est ensuite ajouté dans le tube à microhématocrite d'une densité supérieure à celle du plasma mais inférieure à celle des globules rouges : la strate des leucocytes est donc étalée après centrifugation.

L'épaisseur des couches cellulaires obtenues après centrifugation et évaluées par différence de fluorescence permet d'effectuer un profil leucoplaquettaire qui indique alors une estimation du nombre de cellules : évaluation semi-quantitative de la numération leucocytaire totale, des granulocytes, des agranulocytes et des plaquettes ainsi qu'une mesure précise de l'hématocrite (exprimé en pourcentage) [1].

2. Impédance électronique : technique de Coulter

Les cellules sanguines, qui sont de faibles conducteurs d'électricité, sont placées dans une solution contenant des électrolytes et passées une par une entre deux électrodes. Quand une cellule passe au travers des électrodes, elle conduit un certain nombre d'électrolytes avec elle, ce nombre dépendant du volume de la cellule. Cela induit une variation de courant, proportionnel à la taille de la cellule.

La majorité des automates utilisant ce procédé ajoute des réactifs de lyse cellulaire pour permettre la distinction entre hématies et leucocytes. Le sang passe dans une première cuve où les petites cellules (plaquettes et hématies) sont séparées des plus grosses (leucocytes). Dans une deuxième cuve, un réactif est ajouté permettant la lyse des hématies, et parfois des plaquettes, et un comptage des leucocytes uniquement. Un procédé de spectrophotométrie permet de doser l'hémoglobine [1].

3. Cytométrie de flux

Les cellules sanguines sont ici passées individuellement à travers un faisceau de lumière laser. Ce rayon, à chaque passage de cellule est réfléchi, réfracté et diffracté : on obtient alors des informations sur le volume cellulaire, la surface cellulaire, la granularité cytoplasmique et les lobulations nucléaires par l'analyse des différentes déviations lumineuses. A cette technologie, peut être rajoutée de la cytochimie avec par exemple des agents fluorescents.

On obtient alors un nuage de points qui permet de différencier les populations de leucocytes et d'hématies [1].

4. Le Sysmex XT-2000iV [2] [3]

L'automate étudié dans cette étude utilise à la fois la variation d'impédance, plus précise pour les hématies et la cytométrie de flux, plus précise pour les leucocytes, et en fonction de l'espèce, la variation d'impédance ou la cytométrie pour les plaquettes en fonction de leurs caractéristiques spécifiques.

Le spécimen sanguin est initialement dilué. La seconde étape est de réaliser le comptage des globules rouges et des plaquettes par impédance, qui seront ensuite lysés par ajout d'un agent tensio-actif de façon qu'il ne reste que les leucocytes et quelques globules rouges non lysés. L'hémoglobine est ensuite dosée par spectrophotométrie.

Le spécimen est ensuite marqué par un fluorochrome à base de polyméthine qui se lie spécifiquement aux acides nucléiques. Les différentes cellules restantes sont illuminées par un laser semi-conducteur et trois signaux différents sont par la suite capable de séparer les cellules.

La diffusion frontale de la lumière (FSC : « forward scatter ») indique le volume de la cellule ; la diffusion latérale de la lumière (SSC : « side scatter ») fournit des informations sur le contenu de la cellule comme la taille du noyau ou les granulations et la fluorescence latérale de la lumière (SFL : « side fluorescence light ») fournit la quantité d'ADN ou d'ARN contenue par la cellule. Ces différentes données permettent de créer un diagramme de dispersion (« scattergram ») avec par exemple le SSC en abscisse et le SFL en ordonnées pour la différenciation des différents leucocytes. Les populations cellulaires ayant des propriétés physiques et chimiques similaires sont situées dans la même zone, formant des nuages de points identifiables sur le diagramme.

On obtient alors plusieurs nuages de points selon le type cellulaire : granulocytes neutrophiles, granulocytes éosinophiles, monocytes, lymphocytes et globules rouges non lysés. Le résultat obtenu est présenté figure 1. Les monocytes sont représentés par les points verts dans la partie haute, au-dessus du nuage des lymphocytes représentés par des points magenta. Ces derniers sont au-dessus du nuage des neutrophiles représentés par des points bleu turquoise. Dans la partie droite, on retrouve le nuage des éosinophiles représentés par des points rouges. Le dernier nuage, juxtaposé à l'abscisse, correspond au nuage des globules rouges non lysés et sont représentés par des points bleu foncé.

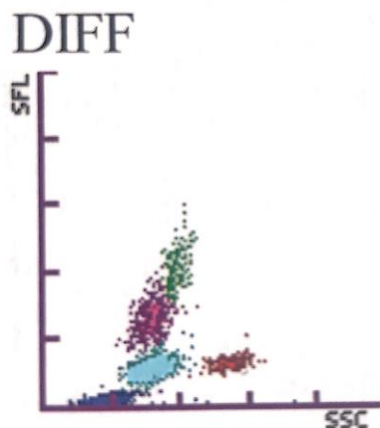


FIGURE 1 : DIAGRAMME DE DISPERSION OBTENU PAR LE SYSMEX XT-2000iV D'APRES UN HEMOGRAMME DE LA BANQUE DE DONNEES DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE DE L'ENVT

B. Validation des analyseurs d'hématologie

1. Validation et erreurs des analyseurs d'hématologie en médecine humaine

Les résultats obtenus par les analyseurs d'hématologie humaine sont exacts et précis pour des spécimens issus de sujets sains. Cependant, il existe des possibles biais d'origine pré-analytique, analytique ou encore pathologiques.

i. Numération leucocytaire faussement diminuée

Des agrégats de granulocytes neutrophiles ont été rapportés comme étant une cause de fausse leucopénie, modérée ou cliniquement significative. L'incidence est faible, certainement sous-estimée, entre 0.003% et 0.013% [4] [5]. Aucune affection particulière n'est associée à ce phénomène mais un contexte inflammatoire non spécifique, qu'il soit aigu ou chronique a cependant été évoqué [5] [6]. Ces agrégats se retrouvent à la fois chez les hommes et les femmes et peuvent être transitoires ou permanents [7].

Le mécanisme évoqué ici est exclusivement un phénomène in-vitro qui n'est pas entièrement élucidé mais serait principalement causé par la présence d'un anti-coagulant comme l'EDTA bien que des cas soient rapportés avec du citrate ou de l'héparine [4] [8]. Quelques cas d'agrégation de cellules lymphoïdes normales (non-malignes) ont également été rapportées avec usage d'EDTA notamment [8] [9].

La majorité des agrégats (de granulocytes neutrophiles ou de cellules lymphoïdes) sont le plus souvent négligés par les automates d'hématologie usuels puisque de taille trop importante pour être analysés ; seulement les plus petits peuvent être observés sur les diagrammes de dispersion [10]

ii. Numération leucocytaire faussement augmentée

Une fausse leucocytose peut avoir plusieurs origines possibles. Des agrégats plaquettaires ou des macro-plaquettes, suffisamment grands pour avoir la taille d'un leucocyte, peuvent être comptés en tant que tel par l'analyseur. La plupart des analyseurs actuels, dotés de diagramme de dispersion détectent cependant cette anomalie, et la signalent désormais quand ils sont en quantité importante : des points surajoutés dans la région des lymphocytes sont observés [10] [11] [12]

Il est aussi possible que certains globules rouges résistent aux agents de lyse de manière pathologique ou physiologique : ils seront alors considérés comme des leucocytes et observés dans la région des « petits » lymphocytes au diagramme de dispersion [13] [14]. Les érythroblastes présents dans le spécimen ont leurs noyaux toujours présents après réaction après les produits de lyses : ils seront également détectés comme des leucocytes par l'analyseur. Cependant, les analyseurs les plus récents utilisant des techniques de fluorescence comptent les érythroblastes séparément [10] [15].

Une autre origine de fausse leucocytose est la présence de cryoglobulines, qui augmentent à la fois le comptage leucocytaire mais également le comptage plaquettaire (jusqu'à 8 fois). En cristallisant, les cryoglobulines peuvent en effet fausser le comptage. Ce phénomène est moins retrouvé dans les analyseurs utilisant des réactifs préchauffés à 37°C [16] [17]. Des filaments de fibrine peuvent également se retrouver dans l'échantillon après une prise de sang laborieuse, augmentant le comptage plaquettaire et leucocytaire de 2 à 16 fois [18] [19].

Enfin, la présence de gouttelettes lipidiques suffisamment grandes peut interférer avec les comptages [10], de même que la présence de micro-organismes (bactéries ou champignons) [20] ou encore la présence de tissu adipeux lors de ponction à la veine fémorale [21]. Le fait de trop remplir les tubes sous vides altère également beaucoup de variables, dont les comptages [22].

iii. Anomalies de formule leucocytaire

Les comptages des lymphocytes et des granulocytes neutrophiles sont généralement fiables. Par contre, le comptage des monocytes est peu fiable, à peine acceptable : la reproductibilité est faible, avec des écarts de résultats entre 13 et 59% [23]. Le comptage des monocytes est également dépendant du temps de conservation, avec une altération de ce dernier dès 6-10h après le prélèvement et ce quelque soit la température de conservation. [24]

Le comptage des granulocytes basophiles est également problématique. Les automates fournissent une estimation en deçà de la valeur observée au frottis lors de basophilie avérée chez l'homme. De même, une augmentation du nombre de granulocytes basophiles peut être le résultat d'une pseudobasophilie : l'analyseur confond d'autres cellules (comme des lymphocytes lors d'immunodéficience humaine, ou des blastes lors de leucémies) avec des basophiles, perturbant alors le comptage basophilique total. Enfin, une conservation de plus de 24h tend à augmenter la numération des basophiles [23] [24]. En médecine vétérinaire, aucun analyseur ne fournit une numération de basophiles fiable.

Lors de phénomène pathologique comme le paludisme chez l'homme, des pigments sont retrouvés dans le sang et phagocytés par les granulocytes neutrophiles et les monocytes. Ces pigments ont des propriétés dépolarisantes similaires à celles des granulations des éosinophiles, ce qui peut alors fausser le compte : il en résulte une fausse augmentation du nombre d'éosinophiles. Des globules rouges parasités, résistants à la lyse, peuvent également former un nuage de point proche de celui des éosinophiles chez l'homme [25]. Une conservation de plus de 24h induira également une diminution de la numération des éosinophiles [23].

2. Validation et erreurs des analyseurs d'hématologie en médecine vétérinaire

i. Comptage des leucocytes totaux

Le Sysmex XT-2000iV présente des comptages de leucocytes totaux très bien corrélés avec les comptages obtenus par le CELL-DYN 3500, automate déjà validé [26] [27]. Les comptages de leucocytes totaux sont également très bien corrélés avec d'autres automates comme le ADVIA 2120 [28] [29].

ii. Comptage différentiel des leucocytes [30] [31]

Les différentes populations leucocytaires chez les chiens ne sont pas aussi bien séparées sur le diagramme de dispersion en comparaison avec des spécimens humains ou équins.

La corrélation entre le comptage manuel et le comptage fourni par le Sysmex XT-2000iV est excellente pour les neutrophiles et bonne pour les lymphocytes. En effet, pour ces derniers, le Sysmex XT-2000iV donne un comptage de 10 à 26% supérieur au comptage manuel ou celui du CELL-DYN 3500. Des lymphocytes peuvent se retrouver au-dessus du nuage des monocytes et seront alors identifiés par le Sysmex XT-2000iV comme des monocytes, ce qui cause l'absence d'une claire séparation entre le nuage des monocytes et des lymphocytes dans 34%, jusqu'à une erreur importante de séparation dans 5% des cas.

Le comptage des monocytes du Sysmex XT-2000iV est bien corrélé au comptage du CELL-DYN 3500 même si le premier est inférieur au comptage du CELL-DYN 3500 et supérieur au comptage manuel.

Les éosinophiles sont bien identifiés par le Sysmex XT-2000iV avec une séparation plus franche du nuage de points des éosinophiles que pour les autres automates. Il arrive cependant que le comptage du Sysmex XT-2000iV soit supérieur de plus de 100% à celui du CELL-DYN 3500 dans 15% des spécimens ; la séparation entre les neutrophiles et les éosinophiles est moins évidente et engendre donc une erreur. Le Sysmex XT-2000iV ne parvient pas à reconnaître et classer les éosinophiles gris visibles au comptage manuel.

Dans 13% des spécimens provenant de sang canin, le Sysmex XT-2000iV indique une différenciation incomplète voire nulle, souvent corrélé avec la présence de neutrophiles toxiques ou d'un left shift marqué avec une concentration en band cells supérieure à 10%. De plus, le Sysmex XT-2000iV, tout comme l'ensemble des analyseurs vétérinaires, n'est pas capable d'identifier les basophiles observés au frottis sanguin comme mentionné précédemment.

Les comptages des leucocytes par le Sysmex sont relativement stables avec un temps de conservation de 72h à 4°C excepté pour les monocytes, qui montrent une diminution modérée dès 36h de conservation. A un stockage à température ambiante, le nombre de granulocytes neutrophiles fourni par le Sysmex augmente significativement tandis que le nombre de monocytes et de lymphocytes diminue significativement, ce dès 6 à 12h de conservation.

II. Etude rétrospective

A. Matériel et méthode

1. Période de l'étude rétrospective

Les hémogrammes sélectionnés doivent avoir été réalisés entre le 01/01/2014 et le 31/12/2016.

2. Personnes impliquées dans la réalisation de l'étude

L'étude a été effectuée et coordonnée par C. Trumel, L. Piane, J-P Braun, T. Méric, M. Mignot et T. Maufras du Chatellier :

- C. Trumel, L. Piane : préparation du protocole, sélection des hémogrammes, traitement des données et interprétation des résultats
- L. Piane, T. Méric, M. Mignot, T. Maufras du Chatellier : préparation du protocole, sélection des hémogrammes, recherche des comptes-rendus cliniques et hématologiques des frottis sanguins et interprétation des résultats
- J-P Braun : traitement des données, analyses statistiques, interprétation des résultats
- Laboratoire de Biologie Médicale de l'ENVT : conservation des données (hémogrammes, frottis sanguins, comptes-rendus laboratoire)

3. Sélection des hémogrammes

i. Inclusion des hémogrammes

La totalité des hémogrammes réalisés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse sur des chiens ayant été réalisés entre le 1^{er} janvier 2014 et le 31 décembre 2016 (n=3352) ont été récupérés pour analyse par 2 personnes expertes (C. Trumel et L. Piane) ainsi que 2 personnes naïves (T. Méric et M. Mignot). Premièrement, une séparation entre les hémogrammes dits « normaux » sur le diagramme de dispersion de différenciation des leucocytes par le Sysmex XT-2000iV et les hémogrammes dits « anormaux » a été effectuée. Afin de faciliter cette classification, les hémogrammes classés comme normaux de l'année 2016 par les 2 personnes expertes et les deux personnes naïves ont permis de réaliser un calque dessinant les nuages de points définis comme normaux, présenté figure 2.

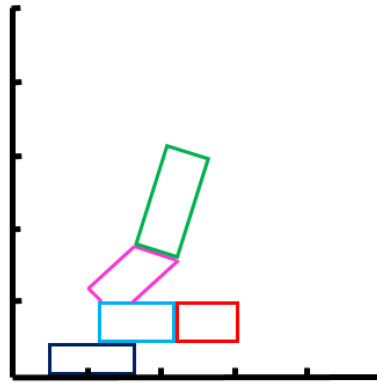


FIGURE 2 : CALQUE DE NUAGES DE POINTS REALISES SUR LA BASE D'HEMOGRAMMES CONSIDERES NORMAUX PAR DEUX PERSONNES EXPERTES ET DEUX PERSONNES NAÏVES

A partir de ce calque, une séparation entre hémogrammes dits « normaux » et dits « anormaux » a été effectuée. Les hémogrammes dits « anormaux » sont alors ceux présentant au moins une des anomalies citées ci-dessous :

- Un nuage de points réduit
- Un nuage surnuméraire
- Une fusion d'au moins 2 nuages
- Un nuage à morphologie anormale

Parmi les hémogrammes dits « anormaux », un classement conséquent à l'anomalie observée a ensuite été effectué.

Les hémogrammes dits « normaux » ont ensuite été revus par une personne experte (C. Trumel) et une personne naïve (T. Maufra du Chatellier) afin de ne conserver uniquement les hémogrammes dits « parfaitement normaux » en comparaison avec le calque. Ces hémogrammes présentaient alors l'ensemble des critères ci-dessous :

- 5 nuages de points parfaitement distincts
- Nuages de points correspondant au calque avec absence de points dépassant des zones délimitées

ii. Critères d'exclusions

Les hémogrammes suivants ont été exclus de l'étude :

- Présence d'une mention « Error » par l'automate
- Hémogrammes réalisés dans le cadre d'un contrôle externe
- Hémogrammes réalisés à partir d'un autre liquide que le sang (épanchement par exemple)
- Hémogrammes comprenant plus d'une anomalie selon la classification effectuée, au vu du nombre important d'hémogrammes ne présentant qu'une anomalie et de la difficulté d'interprétation statistique des hémogrammes présentant plusieurs anomalies
- Hémogrammes avec des nuages de points présentant une densité augmentée ou diminuée sans autre anomalie de forme ou de position notable, qui s'expliquent uniquement par une numération augmentée ou diminuée par le Sysmex XT-200iV
- Hémogrammes ne comprenant pas d'anomalie selon la classification effectuée mais ne correspondant pas aux critères des hémogrammes dits « parfaitement normaux ».

4. Classement des hémogrammes

Les hémogrammes ainsi obtenus (dits « anormaux » et dits « parfaitement normaux ») ont été catégorisés en différentes catégories :

- Fusion de nuages de points
 - Groupe A : Fusion des granulocytes neutrophiles, lymphocytes et monocytes (« Menhir ») sans fusion avec les globules rouges non lysés
 - Groupe B : « Menhir » avec fusion avec les globules rouges non lysés
 - Groupe C : Fusion des globules rouges non lysés et des granulocytes neutrophiles
 - Groupe D : Fusion des granulocytes neutrophiles et des lymphocytes
 - Groupe E : Fusion des lymphocytes et des monocytes
 - Groupe F : Fusion des granulocytes neutrophiles et des granulocytes éosinophiles

- Anomalies de position des nuages de points
 - Groupe G : Extension des monocytes vers le haut
 - Groupe H : Extension des globules rouges non lysés vers la droite
 - Groupe I : Extension des granulocytes éosinophiles vers le haut et vers la droite
 - Groupe J : Nuage surnuméraire
- Groupe K : Nuages dits « parfaitement normaux »

5. Délimitation du champ de cette étude

Cette étude expose le groupe K uniquement. Une étude conjointe s'intéresse au groupe A à F et une troisième est consacrée au groupe G à J.

6. Critères d'évaluation des hémogrammes

i. Critères cliniques

- Espèce

ii. Critères biologiques

- Globules rouges :
 - Morphologie (frottis sanguin) :
 - Anisocytose : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Hématies à bords flous : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Poïkilocytose : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Polychromatophilie : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Stress oxydatif : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Babésie : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Rouleaux : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Ghost cells : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Inclusion : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Numération des érythroblastes pour 100 leucocytes comptés

- Globules blancs :
 - Morphologie (frottis sanguin)
 - Granulocytes neutrophiles toxiques : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Granulocytes neutrophiles hypersegmentés : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Band cells : présence/absence
 - Lymphocytes réactionnels : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Macrophages phagocytaires : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Monocytes réactionnels : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Granulocytes éosinophiles dégranulés : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Granulocytes éosinophiles réactionnels : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Mastocytes circulants : présence/absence
 - Numération totale et des sous-populations (manuelle et par l'automate) :
 - Globules blancs totaux (automate)
 - Granulocytes neutrophiles (automate et manuel)
 - Band cells (automate et manuel)
 - Lymphocytes (automate et manuel)
 - Monocytes (automate et manuel)
 - Granulocytes éosinophiles (automate et manuel)
 - Granulocytes basophiles (manuel)
 - Pourcentages des sous-populations (manuels et par l'automate) :
 - Granulocytes neutrophiles (automate et manuel)
 - Band cells (automate et manuel)
 - Lymphocytes (automate et manuel)
 - Monocytes (automate et manuel)
 - Granulocytes éosinophiles (automate et manuel)
 - Granulocytes basophiles (manuel)

- Plaquettes :
 - o Morphologie (frottis sanguin) :
 - Anisocytose : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Plaquettes nucléées : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - Plaquettes de grande taille : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
 - o Agrégats plaquettaires (frottis sanguin) : 0, 0.5, 1, 2, 3 ou 4 selon l'intensité
- Fond de frottis sanguin

B. Résultats

1. Etablissement des groupes de nuages leucocytaires anormaux

Parmi les 3352 hémogrammes de chien recensés entre 2014 et 2016, 46 correspondaient aux critères des hémogrammes dits « parfaitement normaux ». 210 hémogrammes ont présenté une uniquement anomalie de position et 146 une anomalie de fusion.

2. Résultats obtenus sur les globules rouges

TABLEAU 1 : REPARTITION DES ANOMALIES OBSERVEES SUR LA LIGNEE ERYTHROCYTAIRE

Nuage K	0	0,5	1	1,5	2	3	Total gnl
Nombre de cas présentant de l'anisocytose	14	11	20	0	1	0	46
Nombre de cas ayant des globules rouges à bords flous	23	9	5	0	7	2	46
Nombre de cas présentant de la poïkilocytose	25	9	8	0	4	0	46
Nombre de cas présentant de la polychromatophilie	20	15	7	2	2	0	46
Nombre de cas présentant des signes de stress oxydatif	42	3	1	0	0	0	46
Nombre de cas présentant des inclusions	41	0	5	0	0	0	46

La grande majorité des hémogrammes ne présentent pas d'anomalie en quantité significativement augmentée. 69.6% des hémogrammes présentent une anisocytose, mais elle est cependant faible dans 67.4% des cas (score inférieur ou égal à 1). La moitié des frottis montrent des globules rouges à bords flous, en quantité importante dans 9.6% des cas (score supérieur ou égal à 2).

Une poïkilocytose est observée en quantité importante dans 8.6% des frottis et rapportée dans 45% des cas, tandis qu'une polychromatophilie est observée dans 56.5% des cas, mais majeure dans 2 hémogrammes soit 4.3%.

Très peu d'hémogrammes ont montré des signes en faveur de stress oxydatif ou d'inclusions : seulement 8.6% des hémogrammes avaient des signes de stress oxydatif et 10.9% des inclusions. De plus, ces deux anomalies sont retrouvées en petites quantités sur les frottis.

Il n'a été observé des érythroblastes que dans 4 frottis sur 46, avec cependant un frottis avec 7 érythroblastes pour 100 globules blancs. Aucune babésie n'a été retrouvée sur les frottis et aucune ghost cell n'a été observée.

TABLEAU 2 : RESULTATS OBTENUS SUR LA POPULATION ERYTHROCYTAIRE

Nuage de points		« Normal »
n		46
Anisocytose (0-2 score)	% abnormal (≥ 2)	2.2
	median (min-max)	0.5 (0-2)
GR Bords flous (0-3 score)	% abnormal (≥ 2)	9.6
	median (min-max)	0.3 (0-3)
Poikilocytose (0-3 score)	% abnormal (> 2)	8.7
	median (min-max)	0 (0-2)
Polychromatophilie (0-3 score)	% abnormal (≥ 2)	4.3
	median (min-max)	0.5 (0-2)
Stress oxydatif (0-2 score)	% abnormal (≥ 2)	0
	median (min-max)	0 (0-1)
Rouleaux (0-3 score)	% abnormal (> 0)	4.3
	median (min-max)	0 (0-1)
Ghost cells (0-3 score)	% abnormal (> 0)	0
	median (min-max)	0 (0-0)
Inclusions (0-2 score)	% abnormal (> 0)	10.9
	median (min-max)	0 (0-1)
Erythroblastes (n per 100 RBC)	% abnormal (> 1)	4.3
	median (min-max)	0 (0-7)

3. Résultats obtenus pour les plaquettes

TABLEAU 3 : REPARTITION DES ANOMALIES OBSERVEES SUR LES PLAQUETTES

Nuage K	0	0,5	1	1,5	2	3	Total gnl
Nombre de cas présentant de l'anisocytose plaquettaire	12	4	23	1	6	0	46
Nombre de cas présentant des grandes plaquettes	38	1	6	0	1	0	46
Nombre de cas présentant des agrégats plaquettaires	26	7	10	1	2	0	46

Les frottis étudiés dans ce groupe ne présentent pas significativement de grandes plaquettes, présentes dans 17.4% des frottis et seulement dans un frottis (soit 4.3%) en quantité significativement augmentée. L'anisocytose plaquettaire est retrouvée dans 73.9% des frottis. Elle est cependant majeure dans 13% des frottis uniquement. Des agrégats plaquettaires ont été retrouvés dans 43.5% des frottis et dans 6.5% en quantité importante. Aucune plaquette nucléée n'a été observée.

TABLEAU 4 : RESULTATS OBTENUS SUR LES PLAQUETTES

Scattergram		« Normal »
N=		46
AnisoPlt (0-3 score)	% abnormal (≥2)	13.0
	median (min-max)	1.0 (0-2.0)
Plt Grandes (0-3 score)	% abnormal (≥2)	2.2
	median (min-max)	0 (0-2.0)
Agreg Plt (0-4 score)	% abnormal (>2)	0
	median (min-max)	0 (0-2.0)

4. Résultats obtenus sur les leucocytes

i. Comptage total et différentiel des leucocytes [32]

TABLEAU 5 : RESULTATS OBTENUS SUR LES NUMERATIONS DES DIFFERENTES POPULATIONS LEUCOCYTAIRES

Scattergram		«Normal»
N		46
WBC (10⁹/L)	% abnormal (<5.5)	17.4
	(>20.4)	0
	median (min-max)	7.3 (3.3-14.5)
Neutrophiles (10⁹/L)	% abnormal (<2.9)	6.5
	(>13.6)	0
	median (min-max)	5.1 (2.0-12.8)
Band cells (10⁹/L)	% abnormal (≥0.3)	0
	median (min-max)	0 (0-0.3)
Lymphocytes (10⁹/L)	% abnormal (<1.1)	26.1
	(>5.3)	0
	median (min-max)	1.5 (0.4-4.4)
Monocytes (10⁹/L)	% abnormal (<0.4)	52.2
	(>1.6)	0
	median (min-max)	0.4 (0-1.2)
Eosinophiles (10⁹/L)	% abnormal (<3.0)	17.4
	(>10.0)	0
	median (min-max)	0.3 (0-2.0)
Basophiles (10⁹/L)	% abnormal (≥0)	6.5
	median (min-max)	0(0-0.1)

Le comptage leucocytaire total médian est de $6,95 \times 10^9/L$ avec des valeurs allant de $3,31 \times 10^9/L$ jusqu'à $14,52 \times 10^9/L$. 8 hémogrammes sur 46 (soit 17.4%) présentent une leucopénie légère à modérée (comptage inférieur à $5,5 \times 10^9/L$).

3 hémogrammes sur 46, soit 6.5%, présentent une légère neutropénie (nombre inférieur à $2,9 \times 10^9/L$) et le reste des hémogrammes se situe dans les intervalles de référence. Des band-cells ont été observés sur certains frottis, mais toujours dans les intervalles de références ($<0,3 \times 10^9/L$).

On retrouve des lymphopénies modérées dans 23.9% des cas à sévères (numération inférieure à $0,5 \times 10^9/L$) dans 2.2% des cas. Les hémogrammes restants sont dans les intervalles de référence.

Concernant les monocytes, 52.2% des frottis présentent une monocytopenie modérée (entre $0,4 \times 10^9/L$ et $1,6 \times 10^9/L$), les 47.8% restants étant dans les intervalles de référence.

82.6% des frottis montrent une numération en éosinophiles dans les intervalles de référence (entre $0.1 \times 10^9/L$ et $3.1 \times 10^9/L$), les autres frottis (17.4%) présentant une éosinopénie.

Enfin, la totalité des frottis étudiés ne présentent pas de basophilie, la numération étant toujours inférieure à $0.3 \times 10^9/L$.

ii. Anomalies des leucocytes

TABLEAU 6 : REPARTITION DES ANOMALIES OBSERVEES SUR LA LIGNEE BLANCHE

Nuage K	0	0,5	1	1,5	2	3	Total gnl
Nombre de cas présentant des neutrophiles toxiques	44	2	0	0	0	0	46
Nombre de cas présentant des neutrophiles hypersegmentés	39	2	4	0	1	0	46
Nombre de cas ayant des band cells	41	5	0	0	0	0	46
Nombre de cas présentant des lymphocytes réactionnels	21	11	14	0	0	0	46
Nombre de cas présentant des monocytes réactionnels	33	7	6	0	0	0	46
Nombre de cas présentant des éosinophiles réactionnels	43	3	0	0	0	0	46
Nombre de cas présentant des éosinophiles dégranulés	45	1	0	0	0	0	46

Très peu d'anomalies des leucocytes sont observées. 2 frottis sur 46 (4.3%) ont présenté des neutrophiles toxiques en faible proportion. Des neutrophiles hypersegmentés ont été observés dans 15% des frottis mais dans un unique frottis en quantité importante (score supérieur à 2).

Comme observé aux numérations, quelques frottis (10.8%) montrent des band-cells mais en quantité non significative.

Les lymphocytes réactionnels sont les cellules anormales les plus observées avec une présence dans 54% des frottis. La quantité est cependant non significativement augmentée avec un score inférieur ou égal à 1 dans les 54% des cas.

Quelques monocytes réactionnels ont également été retrouvés sur les frottis à une proportion de 28.3%, mais similairement aux résultats précédents, uniquement dans des quantités non significatives.

3 frottis sur 46 (6.5%) ont quelques éosinophiles réactionnels en faible proportion, et seulement 1 (2.2%) a présenté des éosinophiles dégranulés.

Aucun macrophage phagocytaire, aucun basophile réactionnel ni mastocyte circulant n'a été retrouvé sur les frottis de l'échantillon.

TABLEAU 7 : RESULTATS OBTENUS SUR LES POPULATIONS LEUCOCYTAIRES

Scattergram		« Normal »
n		46
Leucocytes toxiques (0-2 score)	% abnormal (≥ 2)	0
	median (min-max)	0 (0-0.5)
Leucocytes hypersegmentés (0-3 score)	% abnormal (≥ 2)	2.2
	median (min-max)	0 (0-2.0)
L réactifs (0-3 score)	% abnormal (> 1)	0
	median (min-max)	0.5 (0-1.0)
Monos Réac (0-2 score)	% abnormal (> 1)	0
	median (min-max)	0.5 (0-1.0)
Macroph phagocyt (0-2 score)	% abnormal (> 0)	0
	median (min-max)	0 (0-0)
Eo dégran (0-1 score)	% abnormal (> 0)	2,2
	median (min-max)	0 (0-1.0)
Eo Réac (0-2 score)	% abnormal (> 1)	0
	median (min-max)	0 (0-0.5)
S Baso (0-1 score)	% abnormal (> 0)	0
	median (min-max)	0 (0-0)
Baso Reac (0-1 score)	% abnormal (> 0)	0
	median (min-max)	0 (0-0)
Masto Circ (0-1 score)	% abnormal (> 0)	0
	median (min-max)	0 (0-0)

C. Discussion

Les nuages de points provenant des hémogrammes étudiés ici sont considérés « parfaitement normaux », avec des nuages de points bien distincts les uns des autres et sans anomalie de positions de points qu'elle quelle soit. Le Sysmex XT-2000iV a donc identifié à la perfection chaque cellule du spécimen sanguin et a permis de la placer dans un nuage de point spécifique au diagramme de dispersion. Aucune incertitude ne semble présente.

1. Observations sur les populations érythrocytaires

Peu d'anomalies sont répertoriées sur les populations érythrocytaires. Lorsque ces anomalies sont présentes, elles le sont en faible nombre.

2. Observations sur les populations thrombocytaires

Une anisocytose plaquettaire est retrouvée dans une majorité des frottis, et en quantité significative dans 13% de ceux-ci. Leur présence n'induit donc pas d'anomalies du diagramme de dispersion : cette anisocytose n'interfère donc pas avec la répartition des différentes populations leucocytaires.

De la même façon que les hématies, les plaquettes sont dénombrées par la technique d'impédance puis lysées par un agent tenso-actif. L'anisocytose plaquettaire ne semble donc pas avoir d'influence sur la lyse plaquettaire puisque celle-ci n'est pas retrouvée sur le diagramme de dispersion.

Aucune plaquette nucléée n'a été retrouvée sur les frottis étudiés, et les agrégats plaquettaires et les macroplaquettes n'ont pas été retrouvés de manière significative. Ce résultat est en accord avec la littérature ; en effet, les agrégats plaquettaires peuvent interférer avec les nuages de points en étant confondus avec des leucocytes [33].

3. Observations sur les populations leucocytaires

Concernant les comptages totaux et différentiels, il n'est retrouvé que des numérations inférieures aux intervalles de référence : absence de leucocytose, de neutrophilie, de monocytose, d'éosinophilie ou de lymphocytose tandis que des leucopénies, des neutropénies, des éosinopénies, des monocytopénies et des lymphopénies ont été observées au comptage par le Sysmex XT-2000iV et au comptage manuel.

Ce résultat paraît assez logique avec la méthodologie utilisée. En effet, chaque cellule est représentée par un point sur les diagrammes de dispersion. Ainsi, plus la numération est élevée, plus il y a de chance que les points débordent du cadre pré-établi pour sélectionner nos cas (cf. figure 2).

Très peu d'anomalies de populations leucocytaires ont été retrouvées. On n'a noté aucun macrophage phagocytaire, aucun basophile réactionnel ou aucun mastocyte circulant tandis que certaines cellules réactionnelles (leucocytes toxiques, band cells, leucocytes hypersegmentés, lymphocytes réactionnels, éosinophiles réactionnels ou dégranulés, monocytes réactionnels) ont été retrouvés dans des quantités insuffisantes pour être significatives.

Ainsi, les différents leucocytes passés à la cytométrie de flux n'ont pas eu d'incidence sur la répartition sur le diagramme de dispersion. Ces leucocytes ont donc des quantités d'acides nucléiques et de granulations cytoplasmiques dans les valeurs usuelles de chaque population, ce qui est cohérent avec l'absence d'anomalie leucocytaire observée. Afin d'étudier les implications des différentes anomalies leucocytaires, ces résultats seront à comparer avec les études sur les anomalies des nuages de points. En effet, une population leucocytaire anormale ou en quantité augmentée dans un des autres groupes sera très probablement corrélée à une anomalie sur un nuage de point.

Conclusion

46 hémogrammes de chien sur les 3352 réalisés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse sur les années 2014 à 2016 avec l'automate Sysmex XT-2000iV étaient considérés comme parfaitement normaux sur le diagramme de dispersion, avec l'absence d'une anomalie de position ou de fusion. Les frottis correspondants aux hémogrammes ont été étudiés et chaque anomalie, si présente, était quantifiée. Ces frottis étudiés présentaient des anomalies en faible quantité. Les anomalies observées les plus fréquemment et en quantité importante sont des numérations cellulaires faibles (leucopénies, lymphopénies, monocytopénies, neutropénies, éosinopénies), ces dernières n'ayant donc pas d'influence sur le diagramme de dispersion. L'absence des autres anomalies ou leur présence en trop faible quantité ne permet pas de conclure à une influence sur le nuage de point. Ces résultats servent néanmoins de point de comparaison statistique pour d'autres études sur les anomalies aux nuages de points.

Cependant, la présence de certaines anomalies en quantité faible sur des nuages de points parfaitement normaux invite à ne pas négliger la lecture et l'interprétation du frottis sanguin, qui peut donc être source d'informations cliniquement primordiales même si le diagramme de dispersion est normal.

Références

- [1] : WEISS, D., Wardrop, J. (2010) *Schalm's Veterinary Hematology, 6th edition*. Oxford : Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-813-81798-9
- [2] : Fluoro-cytométrie en flux – Sysmex France. Disponible à l'adresse : www.sysmex.fr/academie/technologie/fluoro-cytometrie-en-flux.html
- [3] : Tvedten H., Lilliehook I. (2011) Canine differential leukocyte counting with the CellaVision DM96Vision, Sysmex XT-2000iV, and Advia 2120 hematology analyzers and a manual method. *Veterinary Clinical Pathology*, **40/3**, 324-339
- [4] : Epstein H.D. & Kruskall M.S. (1988) Spurious leukopenia due to *in vitro* granulocyte aggregation. *American Journal of Clinical Pathology* **89**, 652– 655.
- [5] : Lesesve J.F., Haristoy Y., Thouvenin M., Latger-Cannard V., Buisine J. & Lecompte T. (2000) Pseudoleucopénie par leuco-agglutination *in vitro* des polynucléaires neutrophiles : expérience d'un laboratoire, revue de la littérature et conduite proposée. *Annales de Biologie Clinique* **58**, 417– 424.
- [6] : Imbing F.D. Jr, Adegboyega P.A., McLucas E. & Elghetany T. (1996) EDTA-associated leukoagglutination. *American Journal of Clinical Pathology* **105**, 133–134.
- [7] : Schinella M., Kojikara P. & Curci V. (1995) Prevention of polymorphonuclear leukocyte agglutination *in vitro*. *Haematologica* **80**, 196–197.
- [8] : Deol I., Hernandez A. & Pierre R.V. (1995) Ethylenediamine tetraacetic acid-associated leukoagglutination. *American Journal of Clinical Pathology* **103**, 338–340.
- [9] : Lesesve J.F., Haristoy X., Fisher B., Goupil J.J. & Lecompte T. (2001) Agglutination *in vitro* EDTA-dépendante des lymphocytes. *Annales de Biologie Clinique* **59**, 497–501.
- [10] : Zandecki M., Genevieve F., Gerard J., Godon A. (2007) Spurious counts and spurious results on haematology analysers : a review. Part II : white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *International journal of laboratory hematology* **29/1**, 21-41
- [11] : Solanki D.L. & Blackburn B.C. (1983) Spurious leukocytosis and thrombocytopenia. A dual phenomenon caused by clumping of platelets *in vitro*. *Journal of the American Medical Association* **250**, 2514–2515.
- [12] : Schrezenmeier H., Muller H., Gunsilius E., Heimpel H. & Seifried E. (1995) Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thrombosis Haemostasis* **73**, 506–513.

- [13] : Cornbleet J. (1983) Spurious results from automated hematology cell counters. *Laboratory Medicine* **14**, 501–514.
- [14] : Mellors I. & McArdle B. (1995) Improved cell counting in osmotically resistant erythrocytes. *International Journal of Laboratory Hematology* **17**, 23–30.
- [15] : Wang F.S., Itose Y., Tsuji T., Hamagushi Y., Hirai K. & Sakata T. (2003) Development and clinical application of nucleated red blood cell counting and staging on the automated haematology analyser XE-2100. *International Journal of Laboratory Hematology* **25**, 17–23
- [16] : Zandecki M., Dupriez B., Fenaux P., Jude B., Watel A., Dracon M., Demory J.L. & Cosson A. (1989) Cytological and ultrastructural assessment of free crystals or precipitates associated with pseudoleukocytosis and pseudothrombocytosis in cryoglobulinemia. *Nouvelle Revue Francaise D Hematologie* **31**, 397–402.
- [17] : Fohlen-Walter A., Jacob C., Lecompte T. & Lesesve J.F. (2002) Laboratory identification of cryoglobulinemia from automated blood cell counts, fresh blood samples, and blood films. *American Journal of Clinical Pathology* **117**, 606–614.
- [18] : Gulliani G.L., Hyun B.H. & Gabaldon H. (1977) Falsely elevated automated leukocyte counts on cryoglobulinemic and/or cryofibrinogenemic blood samples. *Laboratory Medicine* **8**, 14–16.
- [19] : Corberand J.X., Laharrague P.F., Fillola G., Charlet J.P. & Cambus J.P. (1991) Discovery of unsuspected pathological states using a new haematology analyser. *Medical Laboratory Sciences* **48**, 80–83.
- [20] : Marshall B.A., Theil K.S. & Brandt J.T. (1990) Abnormalities of leukocyte histograms resulting from microorganisms. *American Journal of Clinical Pathology* **93**, 526–532.
- [21] : Whiteway A.J. & Bain B.J. (1999) Artefactual elevation of an automated white cell count following femoral vein puncture. *International Journal of Laboratory Hematology* **21**, 65–68.
- [22] : Pewarchuk W., VanderBoom J. & Blajchman M.A. (1992) Pseudopolycythemia, pseudothrombo-cytopenia, and pseudoleukopenia due to overfilling of blood collection vacuum tubes. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **116**, 90–92.
- [23] : Genevieve F., Godon A., Marteau-Tessier A., Zandecki M. (2012) Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. Partie 2. Numération et formule leucocytaires. *Annales de biologie clinique*, **70(2)**, 141-154

- [24] : Ducrest S., Meier F., Tschopp C., Pavlovic R., Dahinden CA. (2005) Flowcytometric analysis of basophil counts in human blood and inaccuracy of hematology analyzers. *Allergy*, **60**, 1446-1450.
- [25] : Hänscheid T., Egan T., Grobusch M. (2007) Haemozoin : from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infectious Diseases*, **7**, 675-685
- [26] : Kieffer, J., Winkler, G., Van Hove, L. et al. (1999) Evaluation of the CELL-DYN® 3500 haematology instrument for the analysis of the mouse and rat blood. *Comparative Haematology International* **9:92**, 92-106
- [27] : Lilliehook I., Tvedten H. (2009). Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets and total leukocytes counts. *Veterinary Clinical Pathology*, **32/2**, 163-174
- [28] : Bauer, N., Nakagawa, J., Dunker, C., Failing, K., & Moritz, A. (2011). Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV™ compared to the ADVIA® 2120 for its use in dogs, cats, and horses: part I—precision, linearity, and accuracy of complete blood cell count. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*(6), 1168–1180
- [29] : Harris N., Jou JM., Devoto G., Lotz J. (2005) Performance evaluation of the ADVIA 2120 Hematology Analyzer : an international multicenter clinical trial. *Laboratory Hematology*, **11(1)**, 62-70
- [30] : Lilliehook I., Tvedten H. (2009). Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte count. *Veterinary Clinical Pathology*, 2009, **38(2)**, 175-182
- [31] : Bauer N., Nakagawa J., Dunker, C. et al. (2012) Evaluation of the automated hematology analyser Sysmex XT-2000iV compared to the ADVIA 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II : Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **24(1)**, 74-89
- [32] : Bourgès-Abella N., Geffré A., Concordet D., Braun JP., Trumel C. (2011) Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Veterinary Clinical Pathology*, **40(3)**, 303-315
- [33] : Godon A., Genevieve F., Marteau-Tessier A., Zandecki M. (2010) Automated hematology analysers and spurious counts. Part 1. Platelets. *Annales de biologie clinique*, **68/4**, 393-407

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 **Thomas MAUFRAS DU CHATELLIER** intitulée « **Nuages de points provenant du canal « DIFF » du Sysmex XT-2000iV à partir de sang de chien** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 26 Août 2019
Professeure Catherine TRUMEL
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

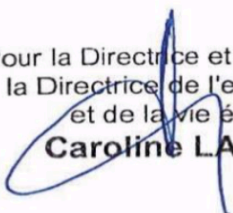


Vu :
Le Président du jury :
Professeure Monique COURTADE-SAÏDI



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

Pour la Directrice et par délégation,
la Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante
Caroline LACROUX



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 CFVU


Régine ANDRE-OBRECHT



AUTEUR : MAUFRAS DU CHATELLIER Thomas

TITRE : Nuages de points provenant du canal « DIFF » du Sysmex XT-2000iV à partir de sang de chiens

DIRECTRICE DE THESE : TRUMEL Catherine

RESUME : L'hémogramme est un examen complémentaire de première intention, couramment utilisé par les praticiens vétérinaires, mais dont l'interprétation se cantonne fréquemment à la lecture des résultats chiffrés, conduisant à une analyse incomplète voire erronée. La présente étude s'est consacrée à étudier, à l'appui de 46 hémogrammes parmi 3352 hémogrammes de chiens réalisés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, les corrélations pouvant exister entre des nuages de points parfaitement normaux et les frottis sanguins correspondants. Peu d'anomalies biologiques ont été retrouvées en quantité significative sur les frottis correspondants hormis des populations leucocytaires diminuées. Ces résultats seront à confronter avec les études portant sur les nuages de points anormaux.

Mots-clés : leucocyte, chien, hémogramme, nuage de points, frottis sanguin, Sysmex XT-2000iV

TITLE : Leukocyte scattergram of the dog obtained by the « DIFF » canal of the Sysmex XT-2000iV

ABSTRACT : The complete blood count is commonly used by veterinarians, but their interpretation is often limited to the differential count of the leukocyte population and leads to incomplete if not false results. This study aimed to take perfectly normals scattergrams, meaning 46 out of 3352 complete blood counts which were realized between 2014 and 2016 in the National Veterinary School of Toulouse, and look at the corresponding blood draw. There was no biological abnormality observed in significantly quantity to take any conclusions, if not some low leukocyte populations, but this study is a start for studying abnormal scattergrams and try to correlate these with biologicals abnormalities.

Key-words : leukocyte, dog, complete blood count, scattergram, blood draw, Sysmex XT-2000iV