




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/> 25626

To cite this version:

Mignot, Magali . *Étude rétrospective des anomalies des nuages de points leucocytaires des hémogrammes de chiens obtenus à partir du Sysmex XT-2000iV : Anomalies de fusion*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 34 p.

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

ANNEE 2019 THESE : 2019 – TOU 3 – 4041

ETUDE RETROSPECTIVE DES ANOMALIES DES NUAGES DE POINTS LEUCOCYTAIRES DES HEMOGRAMMES DE CHIENS OBTENUS A PARTIR DU SYSMEX XT-2000iV : ANOMALIES DE FUSION

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

MIGNOT Magali
Née, le 19/05/1993 à Martigues (13)

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 Géraldine**, *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

Liste des figures.....	2
Liste des tableaux.....	2
Liste des abréviations.....	3
Introduction.....	5
I- Etude bibliographique : le Sysmex XT-2000iV.....	6
A) fonctionnement du sysmex XT-2000iV.....	6
B) Validations et limites du Sysmex XT-2000iV.....	7
1. Validations et limites des analyseurs d'hématologie en médecine humaine.....	7
2. Validations et limites des analyseurs d'hématologie en médecine vétérinaire.....	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.....	10
3. Protocole de sélection des hémogrammes.....	10
4. Classement des hémogrammes.....	12
5. Délimitation du champ de cette étude.....	12
6. Critères d'évaluation et de compréhension des nuages de points anormaux.....	12
5. Etude statistique.....	14
B. Résultats.....	14
1. Etablissement des groupes de nuages leucocytaires anormaux.....	14
2. Les anomalies retrouvées dans les différents groupes.....	18
III. Discussion.....	25
1. Sous-profil 1.1 (« menhir avec base »).....	25
2. Sous-profil 1.2 (« menhir sans base »).....	26
3. Sous-profil 2 (fusion des nuages des monocytes et lymphocytes).....	27
4. Sous-profil 3 (fusion des nuages des neutrophiles et globules rouges non lysés).....	27
5. Sous-profil 4 (fusion des nuages des neutrophiles et des éosinophiles).....	28
6. Sous-profil 5 (déplacement du nuage des neutrophiles sur celui des lymphocytes).....	29
Conclusion.....	30
Annexes.....	31
Bibliographie.....	33

Liste des figures

Figure 1 : Calque de nuages de points normaux.

Figure 2 : Exemple de « menhir » avec base.

Figure 3 : Exemple de « menhir » sans base.

Figure 4 : Deux exemples de diagrammes montrant une fusion entre le nuage de points des lymphocytes et celui des monocytes.

Figure 5 : Exemple de diagramme montrant une fusion entre le nuage de points des globules rouges non lysés et celui des neutrophiles.

Figure 6 : Exemple de diagramme montrant une fusion entre le nuage de points des éosinophiles et celui des neutrophiles.

Figure 7 : Exemple de diagramme montrant une fusion entre le nuage de points des lymphocytes et celui des neutrophiles.

Figure 8 : Nuage de « menhir avec base » parue dans la publication de Lilliehöök *et al.* 2014

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anomalies des nuages « Menhir avec base ».

Tableau 2 : Anomalies des nuages « Menhir sans base ».

Tableau 3 : Anomalies des nuages « fusion monocytes-lymphocytes ».

Tableau 4 : Anomalies des nuages « fusion neutrophiles-globules rouges non lysés ».

Tableau 5 : Anomalies des nuages « fusion neutrophiles-éosinophiles ».

Tableau 6 : Anomalies des nuages « déplacement des neutrophiles sur les lymphocytes ».

Tableau 7 : Tableau récapitulatif du test ANOVA réalisé avec les différents profils de nuages de points.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différentes anomalies observables en pourcentage pour chaque profil.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

FSC : forward scatter

GB : globule(s) blanc(s)

GNB : granulocyte basophile

GNE : granulocyte éosinophile

GNN : granulocyte neutrophile

GR : globule(s) rouge(s)

MGG : May Grünwald-Giemsa

SFL : side fluorescence light

SSC : side scatter

PLQ : plaquette(s)

PNB : polynucléaire basophile

PNE : polynucléaire éosinophile

PNN : polynucléaire neutrophile

WBC : white blood cell

Introduction

Les globules blancs, ou leucocytes, sont des cellules nucléées assurant la défense immunitaire de l'organisme. Ils sont synthétisés dans la moelle osseuse puis rejoignent la circulation sanguine et lymphatique. Ils sont également présents au sein des organes lymphoïdes et des tissus conjonctifs de l'organisme. Ils représentent ce qu'on appelle la lignée blanche.

Il existe cinq catégories de globules blancs circulant dans le sang, répartis en deux familles. Le classement a été réalisé en fonction des caractéristiques visibles au microscope optique après coloration d'un étalement sanguin au May Grünwald-Giemsa (MGG). On observe le noyau qui peut être uni- ou plurilobé et le cytoplasme qui peut, selon le type cellulaire, contenir des granules (vésicules intra-plasmiques) aux diverses fonctions.

Les granulocytes, ou leucocytes polynucléés, sont des globules blancs d'une dizaine de micromètres de diamètre dont le noyau apparaît plurilobé (donnant l'impression de contenir plusieurs noyaux) et le cytoplasme contient des granulations. On distingue les neutrophiles (GNN) aux granulations neutres, non visibles chez le chien, les éosinophiles (GNE) aux granulations de couleur rose-orangée et les basophiles (GNB) aux granulations de couleur bleu violacé. On peut également distinguer les mastocytes qui sont essentiellement dans les tissus ; la forme circulante est rare. Enfin, parmi les neutrophiles on distinguera les Band Cells, jeunes neutrophiles avec un noyau peu lobé, en forme de fer à cheval.

Les agranulocytes sont des globules blancs dont le diamètre est plus variable (entre 6 et 30 μm de diamètre), au noyau unilobé et ne contenant que rarement des granulations au sein de leur cytoplasme. On distingue les lymphocytes, cellules de quelques micromètres à une dizaine de micromètres de diamètre et au rapport nucléoplasmique très élevé, et les monocytes, cellules d'une vingtaine de micromètres de diamètre avec un rapport nucléoplasmique moyen.

L'analyse des globules blancs dans le sang, appelé leucogramme, est une source précieuse d'informations pour les cliniciens. Son interprétation reste cependant délicate et malheureusement trop souvent partielle. L'une des raisons est les erreurs faites par les analyseurs. En conséquence, seule la concentration des leucocytes totaux est prise en compte. En effet, avant d'interpréter un résultat, il est nécessaire de passer par une étape de validation des graphiques obtenus par les analyseurs, ce qui est rarement réalisé.

L'objectif de notre étude a été d'analyser rétrospectivement les anomalies des nuages de points obtenus à l'aide du Sysmex XT 2000iV et notamment les anomalies caractérisées par l'observation de fusions anormales des différents nuages de points correspondants aux différentes populations leucocytaires.

Nous présenterons dans une première partie comment valider les résultats chiffrés fournis par les automates ainsi que les limites de l'interprétation des nuages de points. Nous envisagerons dans une deuxième partie les résultats de notre étude expérimentale rétrospective.

I- Etude bibliographique : le Sysmex XT-2000iV

A) fonctionnement du sysmex XT-2000iV

Le sysmex XT-2000iV est un analyseur validé chez le chien, le chat et le cheval (Lillihöök *et al.* 2009), inspiré du sysmex XT-2000i utilisé en médecine humaine. Il permet d'obtenir 30 variables différentes dont le comptage précis des hématies, des réticulocytes, des plaquettes et des leucocytes et de leurs différentes catégories (formule leucocytaire). Il allie trois principales technologies : la spectrophotométrie, l'impédance électronique et la cytométrie de flux :

- La spectrophotométrie sert à mesurer la concentration d'hémoglobine.
- L'impédance électronique permet de séparer les cellules en fonction de leur taille. Cela permet de détecter, grâce à 2 électrodes, la quantité d'électrolytes « liés » par des forces faibles à une cellule et donc déplacés en même temps que celle-ci lorsqu'elle passe entre ces 2 électrodes. Plus la cellule est grande et plus l'impulsion électrique au passage entre les 2 électrodes le sera aussi. Le sysmex XT-2000iV utilise cette technologie pour le comptage des globules rouges et des plaquettes.
- Pour la cytométrie de flux, les cellules (lignée rouge comme lignée blanche) passent une à une, via un liquide transporteur, devant un faisceau laser. Les rayons diffusés (réfléchis, réfractés ou diffractés) sont alors analysés par conversion des signaux optiques en signaux électroniques avant d'être numérisés pour les analyser sur ordinateur. C'est cette technologie qui permet de réaliser le comptage des réticulocytes et des globules blancs et que nous allons détailler maintenant.

Tout d'abord le spécimen sanguin est aspiré puis dilué. Il subit ensuite un traitement avec un agent tensio-actif visant à lyser et donc à supprimer les hématies et les plaquettes. Les leucocytes sont ainsi isolés, permettant au sysmex XT-2000iV d'analyser la formule leucocytaire en utilisant la fluorocytométrie de flux : les membranes plasmiques des leucocytes sont dans un premier temps perforées pour les rendre perméables à la polyméthine, un colorant fluorescent qui se lie aux acides nucléiques (ADN, ARN). Les leucocytes sont ensuite traversés uns à uns par un rayon laser à diode rouge. Les différents signaux optiques recueillis permettent d'obtenir différentes caractéristiques de chaque cellule :

- la diffusion frontale de la lumière (FSC : « forward scatter light») est corrélée à la taille de la cellule.
- la lumière diffusée sous un angle de 90° (diffusion latérale ou SSC : « side scatter light») est corrélée à la structure intracellulaire de la cellule (granulosité notamment).
- La fluorescence (SFL : « side fluorescence light ») indique la quantité d'acides nucléiques de chaque cellule.

Les données recueillies sont ensuite présentées sous forme de diagramme de dispersion (scattergram) appelé WBC-DIFF. Les cellules y sont disposées de la manière suivante:

- En abscisse (x) : leurs diffusions latérales de la lumière (structure interne), SSC

- En ordonnée (y) : leurs fluorescences (quantité d'acides nucléiques), SFL

Ainsi, les monocytes et les lymphocytes avec une teneur importante en ARN se retrouvent avec des valeurs en « y » élevées tandis que les éosinophiles qui ont une forte granulation cytoplasmique se retrouvent avec des valeurs en « x » élevées. On obtient au final des « nuages de points » identifiables sur le diagramme, qui correspondent chacun à un type cellulaire : GNN, GNE, monocytes, lymphocytes, globules rouges non lysés. Les GNB, eux, sont traités à part et les résultats apparaissent dans un diagramme différents (appelé WBC-BASO), que nous n'étudierons pas dans ce manuscrit ([2], [3], [4], [5]).

B) Validations et limites du Sysmex XT-2000iV

1. Validations et limites des analyseurs d'hématologie en médecine humaine

Comme dit précédemment, le sysmex XT-2000iV a pour origine le sysmex XT-2000i utilisé en médecine humaine. De manière plus générale, les formules leucocytaires obtenues par les analyseurs d'hématologie humaine sont exactes et précises tant que les hémogrammes sont normaux ou avec des variations quantitatives modérées (Zandecki *et al.* 2007). Cependant, diverses imprécisions de mesures et erreurs persistent:

- Erreurs de numération leucocytaire totale :

On peut retrouver de fausses diminutions du nombre de leucocytes en cas d'agglutination entre leucocytes ou avec des plaquettes (en présence d'EDTA notamment) ou inversement de fausses augmentations en cas de particules anormales en grand nombre : agrégats plaquettaires, macroplaquettes, érythroblastes, hématies non lysées, cryoglobulines, filaments de fibrine, lipides, tissu adipeux sous cutané ou micro-organismes. Enfin, en cas de remplissage excessif des tubes de prélèvement sous vide, une difficulté d'homogénéisation par l'absence de bulle d'air peut également créer des erreurs de numération.

- Erreurs de formule leucocytaire :

Le décompte des GNB et des monocytes reste moins précis que pour les autres globules blancs. En effet il a une mauvaise reproductibilité du nombre absolu de monocytes d'un automate à un autre (13 à 59% de différences). La présence de cellules anormales telles que les neutrophiles observés après chimiothérapies ou de lymphocytes activés peuvent aggraver ce pourcentage d'erreur. Pour les GNB, une sous-estimation de leur nombre existe en cas de basophilie. Une basophilie peut donc passer inaperçue. Une fausse augmentation des GNB est également possible en présence de cellules anormales (cellules à lymphome, blastes, lymphocytes activés, plasmocytes, neutrophiles ou monocytes géants).

Dans certaines affections, on peut aussi avoir des anomalies de numération des GNE. Des pigments retrouvés dans le sang peuvent dépolariser les faisceaux lasers de manière similaire aux granulations des GNE et donc provoquer une fausse éosinophilie. La présence de schizontes matures dans d'autres cellules sanguines peut aussi les faire passer pour des éosinophiles. Enfin, les leucémies myéloïdes et les myélodysplasies peuvent venir perturber le comptage des éosinophiles. Une

quantité importante d'érythroblastes peut, selon l'automate, interférer avec le comptage des lymphocytes, entraînant une fausse lymphocytose.

Enfin, lorsque la conservation des spécimens avant analyse dépasse 24h (voir 6h à 10h pour les monocytes), on peut avoir une diminution du nombre de neutrophiles et des éosinophiles, une augmentation du nombre de monocytes, des lymphocytes et des basophiles. Il est à noter que le nombre de monocytes peut également diminuer.

- Mauvaise détection de certaines cellules anormales :

La détection de cellules anormales telles des blastes, des cellules lymphomateuses ou des lymphocytes atypiques, est impossible lorsque leur nombre est faible (Zandecki *et al.* 2007).

2. Validations et limites des analyseurs d'hématologie en médecine vétérinaire

La validation des résultats du Sysmex XT-2000iV en médecine vétérinaire fait l'objet de plusieurs études comparant ses résultats à d'autres automates déjà validés tels que le CELL-DYN 3500 (Lilliehöök *et al.* 2009) ou l'ADVIA 2120 (Bauer *et al.* 2012) et aux comptages manuels réalisés sur des frottis sanguins.

- Numération leucocytaire totale

Le comptage total des leucocytes par le sysmex XT-2000iV est très bien corrélé avec le comptage du CELL-DYN 3500 et celui de l'ADVIA 2120 (coefficient de corrélation de Pearson $\geq 0,99$, noté « r »).

- Numération leucocytaire différentielle

Les nuages de points obtenus avec les spécimens de sang canin analysés par les 3 automates cités précédemment ne sont pas toujours bien individualisés, ce qui est une source d'erreur dans la numération de formule leucocytaire. Ainsi, la comparaison avec une méthode manuelle (méthode de référence pour the Clinical Laboratory Standards Institute) est nécessaire, en particulier en cas de mauvaise individualisation des différentes populations leucocytaires.

Lorsqu'on obtient un diagramme avec une bonne individualisation, on peut se fier en partie aux résultats obtenus.

Pour le comptage des GNN, une très bonne corrélation existe entre le sysmex XT-2000iV et le comptage manuel, le comptage du CELL-DYN 3500 et celui de l'ADVIA 2120 ($r \geq 95$). Cependant, des erreurs peuvent subvenir lorsque la population des band cells excède 10% des GNN ou encore lorsqu'il y a présence de GNN toxiques.

Une bonne corrélation existe entre le Sysmex XT-2000iV et l'ADVIA 2120 ($r = 0,96$) pour le comptage des lymphocytes (Bauer *et al.* 2012). En revanche, le Sysmex XT-2000iV donne systématiquement des résultats 10 à 26% supérieurs au comptage manuel ou à celui du CELL-DYN 3500 d'après l'étude de Lilliehöök *et al.* de 2009. Cette différence serait en partie due au fait que le Sysmex XT-2000iV identifie souvent un petit groupe de cellules situées au dessus des monocytes sur le diagramme de dispersion comme des lymphocytes. Toutefois le nombre de cellules de cette petite population

n'excède souvent pas $0,3 \times 10^3$ cellules/ μL et ne peut donc pas toujours expliquer à elle seule cette différence. On a aussi des diagrammes de dispersion (34% dans l'étude de Lilliehöök) qui manquent d'une claire séparation entre les monocytes et les lymphocytes et d'autres (5%) qui ont une erreur importante de non-séparation entre ces deux types cellulaires.

Pour le comptage des monocytes, on a une corrélation bonne à moyenne entre Sysmex XT-2000iV et le CELL-DYN ($r=0,89$). Le Sysmex sous estime le nombre de monocytes par rapport au CELL-DYN 3500 (de 10% en moyenne). La corrélation du comptage des monocytes est très moyenne entre le Sysmex XT-2000iV et l'ADVIA 2120 ($r=0,62$). Pour ce qui est de la corrélation entre le Sysmex XT-2000iV et le comptage manuel, une différence de résultats existe entre les deux études. Pour l'une (Lilliehöök *et al.* 2009), la corrélation serait bonne à moyenne ($r=0,85$) avec une surestimation par rapport au comptage manuel (de 26% en moyenne), tandis que pour l'autre (Bauer *et al.* 2012), la corrélation serait mauvaise ($r=0,50$).

L'identification des éosinophiles par le Sysmex XT-2000iV est satisfaisante, la séparation du nuage de points correspondant par rapport aux autres populations de cellules est bonne. Lorsqu'une forte différence de comptage existe entre le Sysmex et le CELL-DYN (comptage par le sysmex XT-2000iV 100% supérieur ou plus à celui du CELL-DYN 3500), la séparation des nuages des neutrophiles et des éosinophiles est mal définie dans le cas du CELL-DYN tandis que le comptage du sysmex XT-2000iV est bien corrélé au comptage manuel. Ainsi le CELL-DYN 3500 pourrait parfois sous-estimer le nombre d'éosinophiles par rapport au Sysmex XT-2000iV. Toutefois, aucun d'eux n'est capable de reconnaître des éosinophiles aux vacuoles grises (appelés grey eosinophils) visibles sur étalement sanguin (Lilliehöök *et al.* 2009). Le Sysmex XT-2000iV serait également plus performant que l'ADVIA 2120 pour le comptage des éosinophiles. Notons aussi qu'au-delà de 72h avant analyse, la distinction entre les éosinophiles et les neutrophiles n'est plus assurée (Bauer *et al.* 2012).

Les résultats obtenus par les automates d'hématologie vétérinaire en ce qui concerne les basophiles, sont non validés. Une basophilie avérée par comptage manuel sur étalement sanguin observé au microscope optique ne sera pas détectée par les automates. Inversement, la présence de mastocytes dans le sang circulant peut provoquer une fausse basophilie (Lilliehöök *et al.* 2009).

II- Etude rétrospective

A) Matériel et méthodes

1. Personnes impliquées dans la réalisation de l'étude

L'étude est effectuée et coordonnée par C. Trumel, L. Piane, J.-P. Braun, T. Méric, M. Mignot et T. Maufra 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. Maufra du Chatellier : 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 sanguins, comptes-rendus laboratoire)
- J.-P. Braun : traitement des données, analyses statistiques, interprétation des résultats

2. Période et durée de l'étude rétrospective

Du 01/01/2014 au 31/12/2016.

3. Protocole de sélection des hémogrammes

i. Critères d'inclusion

Les hémogrammes sélectionnés dans cette étude rétrospective doivent avoir été réalisés entre le 01/01/2014 et le 31/12/2016, doivent provenir de chiens, et doivent présenter au moins un nuage de points anormal sur le diagramme de dispersion de différenciation des leucocytes. Face à la difficulté de s'accorder sur les nuages de points normaux, les hémogrammes datant de l'année 2016 classés comme normaux par l'ensemble des deux experts (C. Trumel et L. Piane) et de trois personnes naïves (T. Méric, M. Mignot, T. Maufra du Chatellier) ont été considérées pour déterminer les amplitudes normales des différents nuages de points. Ces données ont permis de réaliser un calque dessinant les nuages de points définis comme normaux (voir ci-dessous), comme aide à la prise de décision pour classer de manière plus objective les nuages de points anormaux. Le calque est constitué de cadres définissant la position et la taille normale de chaque nuage de points. Sont considérés comme anormaux les diagrammes de dispersion dont les nuages de points leucocytaires présentent :

- Au moins un nuage surnuméraire
- Au moins une fusion de 2 nuages
- Au moins un nuage à morphologie anormale et/ou dépassant largement de son cadre du calque.

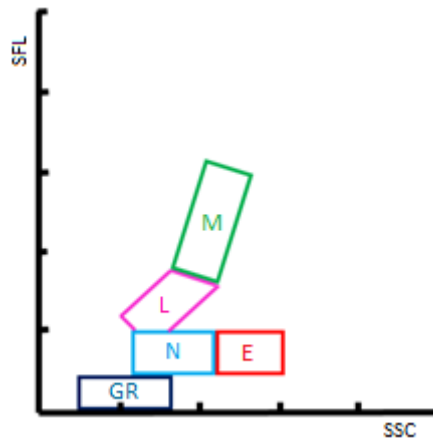


Figure 1: Calque de nuages de points normaux réalisés sur la base d'hémogrammes qualifiés de normaux par 2 experts et 3 personnes naïves. Les cadres représentent la position normale de chaque nuage de point. M : place des monocytes ; L : place des lymphocytes ; N : place des granulocytes neutrophiles ; E : place des granulocytes éosinophiles ; GR : place des globules rouges non lysés.

Les différentes anomalies recensées ont ensuite été caractérisées et classées en conséquence dans différentes catégories.

ii. Critères d'exclusion

Sont exclus de l'étude les hémogrammes suivants :

- 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)
- Face au grand nombre d'hémogrammes ne présentant qu'une unique anomalie, et à la difficulté d'interprétation des hémogrammes cumulant plus d'une anomalie, ces derniers ont été exclus de l'étude.
- Les hémogrammes ne représentant pas une difficulté d'analyse de la part du sysmex XT-2000iV. Il a été considéré que le sysmex XT-2000iV n'a pas eu de difficulté d'analyse lorsque celui-ci a su disposer les cellules sur le diagramme de dispersion sans superposition des nuages et séparation arbitraire entre les populations leucocytaires et sans forme ou position franchement anormale des nuages de points (plus de 80% du nuage de points est inclus dans son cadre avec des points peu distends du nuage de points principal). Les anomalies visibles sur ces diagrammes de dispersion sont plus ou moins interprétables. Il s'agit des hémogrammes suivants :
 - o Des nuages de points peu denses ou réduits (pouvant traduire une neutropénie, une éosinopénie, une lymphopénie, une monopénie ou encore une anémie lorsque que cela concerne le nuage des globules rouges non lysés).
 - o Des nuages de points très denses ou étalés (pouvant traduire une neutrophilie, une éosinophilie, lymphocytose et/ou une monocytose).
 - o Des nuages de points modérément étalés, dépassant modérément du cadre (moins de 20% avec des points peu distends du nuage principal), sans superposition avec d'autres nuages.

4. Classement des hémogrammes

Groupe A : nuage surnuméraire.

Groupe B : extension des monocytes vers le haut.

Groupe C : extension des globules rouges non lysés vers la droite

Groupe D : extension des granulocytes éosinophiles vers le haut et vers la droite.

Groupe E : fusion de nuages de points.

- Sous profil 1 : « Menhir » ou fusion des granulocytes neutrophiles, lymphocytes et monocytes
 - o Sous profil 1.1 : « Menhir » avec fusion avec les globules rouges non lysés
 - o Sous profil 1.2 : « Menhir » sans fusion avec les globules rouges non lysés
- Sous profil 2 : fusion des lymphocytes et des monocytes
- Sous profil 3 : fusion des globules rouges non lysés et des granulocytes neutrophiles
- Sous profil 4 : fusion des granulocytes neutrophiles et des granulocytes éosinophiles
- Sous profil 5 : fusion des granulocytes neutrophiles et des lymphocytes

5. Délimitation du champ de cette étude

Ce manuscrit s'attache à présenter le groupe E (fusion de nuages de points). Les autres groupes ont été exposés dans une autre étude (Meric Tristan, Trumel Catherine. Etude rétrospective des anomalies de nuages de points leucocytaires issus du Sysmex XT-2000iV chez le chien. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2018, 32p.).

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

i. Critères cliniques

Espèce : chiens.

ii. Critères biologiques

Pour essayer de déterminer les raisons possibles aux fusions de nuages de points, un tableau reprenant l'ensemble des anomalies observables au frottis sanguin a été réalisé pour chaque type de fusion et pour chaque analyse. Les différentes morphologies cellulaires ont été répertoriées et pour chacune d'entre elles, une note (0, 0,5, 1, 2 ou 3) a été attribuée en fonction de leur quantité. Une numération des érythroblastes et des globules blancs a également été réalisée.

- Globules rouges :
 - o Morphologie (frottis sanguin) :
 - Présence d'érythroblastes (jeunes hématies contenant encore un noyau)
 - Anisocytose (hématies de différentes tailles), les microcytes (petites hématies) étant inclus dans cette catégorie.
 - Hématies à bord flou : membrane plasmique mal définie
 - Poïkilocytose : hématies déformées, de formes irrégulières. On y inclut :
 - Ovalocytes : forme d'ovale allongé

- Sphérocytes : forme de sphère
- Dacryocytes : forme de larme
- Codocytes : forme de cible
- Kératocytes : forme de feuille
- Acanthocytes : formation de quelques spicules au niveau de la membrane plasmique (2 à 12 spicules)
- Echinocytes : formation de nombreux spicules au niveau de la membrane plasmique (plus de 10 spicules)
- Skizocytes : fragments de globules rouges, à contours irréguliers, de formes très variables
- Polychromatophilie : hématies d'intensités de coloration différentes
- La présence d'un stress oxydatif inclut la présence de:
 - Blister Cells : hématies contenant une vacuole périphérique
 - Eccentrocytes : hémoglobine concentrée en périphérie de la cellule
 - Cristaux d'hémoglobines (en dehors des hématies)
 - Corps de Heinz : hémoglobine précipitée sous forme de méthémoglobine dans les hématies
 - Pycnocytes : la membrane plasmique des hématies forme des projections anormales.
- Présence de babésies dans les hématies (parasite intra érythrocytaire)
- Rouleaux d'hématies
- Ghost cells (hématies sans hémoglobine, dont on n'observe que les contours).
- Les inclusions incluent:
 - corps de Howell-Jolly (restes de chromatine),
 - sidérocytes (dépôts de ferritine, protéine permettant le stockage du fer autre que l'hème)
- Numération des érythroblastes
- Globules blancs :
 - Morphologie (frottis sanguin)
 - GNN :
 - présence de GNN hypersegmentés,
 - présence et numération des Band Cells
 - présence de neutrophiles toxiques
 - Lymphocytes : présence de lymphocytes réactionnels
 - Monocytes : présence de monocytes réactionnels ou de macrophages phagocytaires
 - GNE : présence de GNE dégranulés ou réactionnels.
 - GNB : présence de GNB réactionnels.
 - Numération totale et des sous-populations (manuelle et par l'automate)
 - Pourcentages des sous-populations (manuels et par l'automate)
- Plaquettes :
 - Morphologie (frottis sanguin) :
 - Anisocytose
 - Plaquettes nucléées
 - Macroplaquettes
 - Présence/absence agrégats plaquettaires (frottis sanguin)

- Fond du frottis sanguin

5. Etude statistique

Une autre thèse s'est intéressée aux nuages de points répondant parfaitement aux caractéristiques d'un nuage de points normal (à l'aide du calque de la *figure 1*). Les résultats des frottis sanguins ont été réunis de la même manière que pour les nuages anormaux. Une analyse de variance (ANOVA) a ensuite été réalisée en comparant le groupe des nuages normaux aux différents groupes des nuages anormaux.

B. Résultats

1. Etablissement des groupes de nuages leucocytaires anormaux.

Sur 3352 hémogrammes, 361 ont été sélectionnés comme étant anormaux et présentant un intérêt dans notre étude puis divisés en 5 catégories : A (2 diagrammes de dispersions), B (89 diagrammes), C (92 diagrammes), D (27 diagrammes) et E (151).

Dans ce manuscrit, comme dit précédemment, nous allons nous attarder sur la catégorie E. Dans cette catégorie des nuages ont fusionné. Cela peut concerner 2 populations de globules blancs ou plus. Une séparation nette et arbitraire est généralement faite par le Sysmex XT-2000iV mais les différentes populations qui ont fusionné ne représentent en réalité qu'un seul et même nuage non divisible.

La catégorie E a été divisée en 4 profils différents.

- Sous profil 1 : « Menhir » ou fusion des granulocytes neutrophiles, lymphocytes et monocytes (113 diagrammes)
 - o Sous profil 1.1 : « Menhir » **avec** fusion **au** nuage des globules rouges non lysés. On parlera de « **Menhir avec base** » (52 diagrammes).

Dans cette sous-catégorie, 5 animaux ont plusieurs hémogrammes (2 à 3). Ici, les nuages de points des neutrophiles, lymphocytes, monocytes et globules rouges non lysés ont fusionné. Les 4 nuages forment un « bloc » uni prenant la forme d'un menhir. On parle de « menhir avec base », à distinguer du « menhir sans base » où le nuage de points des globules rouges non lysés ne fusionne pas avec les autres nuages (sous-profil 1.2).

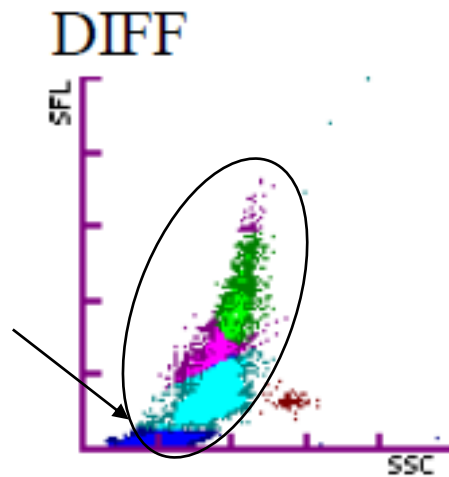


Figure 2: "Menhir" avec base. Les nuages de point des monocytes, lymphocytes, neutrophiles et des globules rouges non lysés, ne sont pas séparables et forment un seul et même "bloc" qui a la forme d'un menhir.

- Sous profil 1.2 : « Menhir » **sans** fusion aux globules rouges non lysés. On parlera de « **Menhir sans base** » (61 diagrammes).

Pour cette sous-catégorie on a 4 animaux qui ont plusieurs hémogrammes (2 à 3). Ici, les nuages de points des neutrophiles, lymphocytes et monocytes ont fusionné tout en étant distinguables du nuage de points des globules rouges non lysés. Les 3 nuages forment un « bloc » uni prenant la forme d'un menhir.

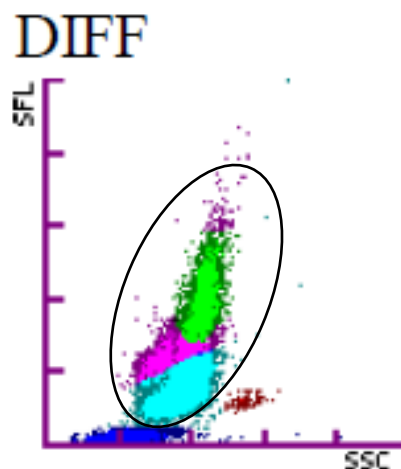


Figure 3: "Menhir" sans base. Les nuages de point des monocytes, lymphocytes et neutrophiles ne sont pas séparables et forment un seul et même "bloc" en forme de menhir. Le nuage de points des globules rouges est séparable du « Menhir ».

- Sous profil 2 : fusion des nuages des lymphocytes et des monocytes (23 diagrammes)

Dans cette catégorie, les nuages des monocytes et lymphocytes ne forment qu'un seul bloc, le Sysmex n'est pas arrivé à les différencier. Sur les 23 diagrammes, 2 font partie du même chien.

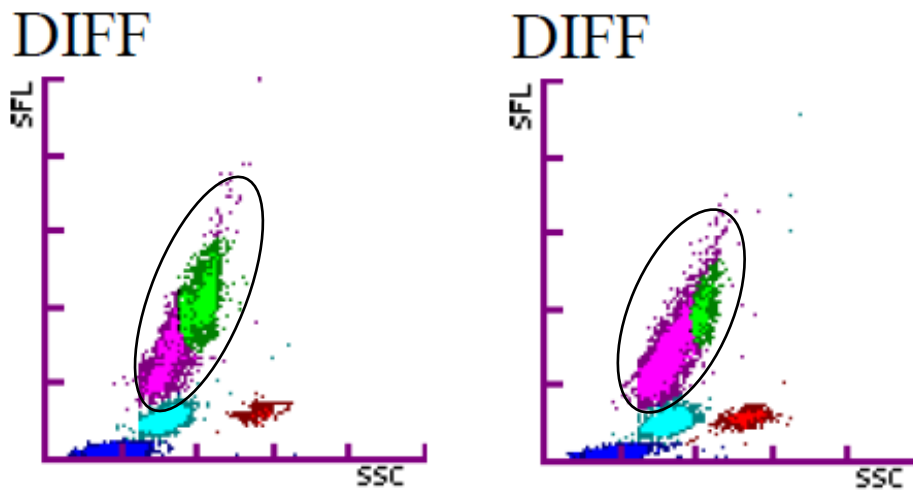


Figure 4: Deux diagrammes montrant la fusion du nuage de points des lymphocytes avec celui des monocytes.

- Sous profil 3 : fusion des globules rouges non lysés et des granulocytes neutrophiles (9 diagrammes)

Pour cette catégorie, les neutrophiles se retrouvent liés au nuage des globules rouges non lysés. Encore une fois, l'automate a réalisé une séparation nette et arbitraire entre les deux nuages. Ici, bien qu'il y ait 9 diagrammes différents, plusieurs hémogrammes appartiennent à un même animal.

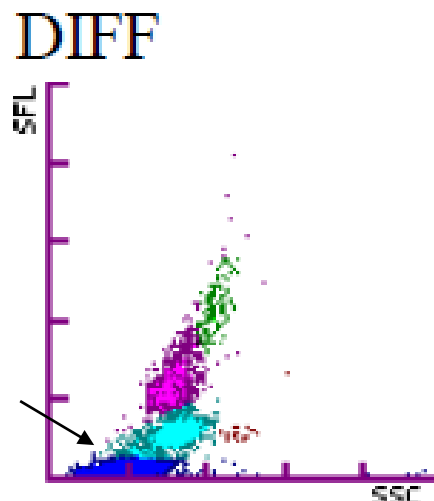


Figure 5: Fusion entre le nuage de points des globules rouges non lysés et celui des neutrophiles.

- Sous profil 4 : fusion des granulocytes neutrophiles et des granulocytes éosinophiles (5 diagrammes)

Dans cette catégorie les éosinophiles sont déportés sur la gauche et sont accolés aux neutrophiles. Tous les diagrammes appartiennent à des animaux différents.

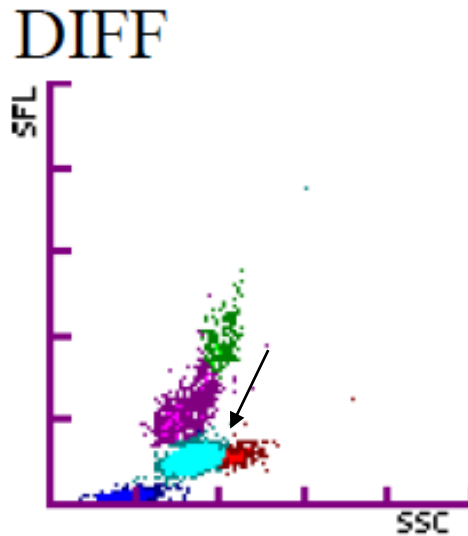


Figure 6: Fusion entre le nuage de points des éosinophiles et celui des neutrophiles

- Sous profil 5 : fusion des granulocytes neutrophiles et des lymphocytes (6 diagrammes)

Pour cette catégorie les neutrophiles sont déportés vers le haut et fusionnent avec le nuage de points des lymphocytes. Cette catégorie est constituée de 6 diagrammes dont 2 qui appartiennent au même animal.

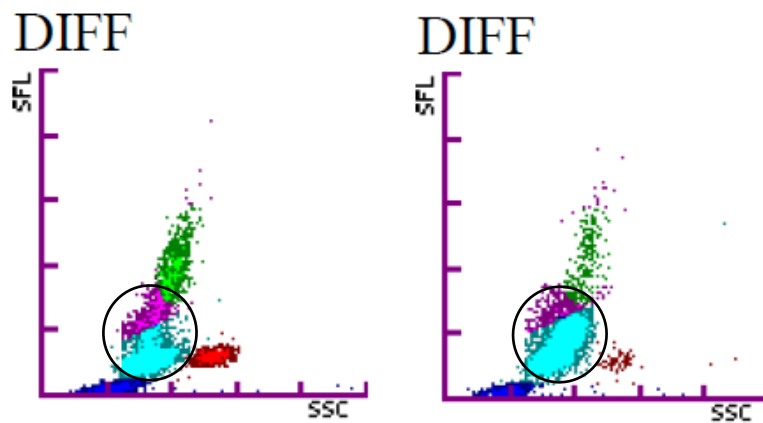


Figure 7: Deux diagrammes montrant une fusion entre le nuage de points des lymphocytes et celui des neutrophiles.

2. Les anomalies retrouvées dans les différents groupes

i. Sous-profil 1.1 (« menhir avec base »)

La plupart des hémogrammes présentent une leucocytose modérée à sévère (44 hémogrammes soit 85%). L'un des hémogrammes compte même 146 225 globules blancs/ μL . Cette leucocytose est le plus souvent accompagnée d'une neutrophilie modérée à sévère (43 frottis des 44 avec leucocytose) pouvant aller jusqu'à 81 157 GNN/ μL . Cette neutrophilie est presque toujours accompagnée d'une quantité de bands cells supérieure à la normale (35 frottis sur 43 frottis neutrophiliques soit 81%). En tout, 27 frottis sur les 52 (52%) ont un pourcentage de band cells supérieur à 10% (entre 11 et 39%). On trouve également sur 2 frottis des métamyélocytes et des promyélocytes (précurseurs des neutrophiles, normalement localisés uniquement dans la moelle osseuse). On retrouve également des neutrophiles toxiques (sur 18 frottis soit 35%) et hypersegmentés (sur 15 frottis soit 29%).

Pour les lymphocytes, on retrouve quelques lymphopénies (12/52 soit 23%) et lymphocytoses (7/52 soit 13%). On retrouve régulièrement des lymphocytes activés (30/52 soit 58%), et sur certains frottis on observe des populations lymphoïdes atypiques et hétérogènes. Il s'agit de cellules blastiques de tailles moyennes à grandes, avec un fort rapport nucléoplasmique, un noyau très irrégulier à chromatine réticulée et des nucléoles volumineux avec un cytoplasme basophile et des vacuoles de tailles hétérogènes optiquement vides. Sur d'autres frottis, on peut trouver des cellules de Mott, des blastes, des lymphocytes basophiles, à grains ou à vacuoles.

Une grande proportion des frottis présente une monocytose (37/52 soit 71%). On observe de nombreux monocytes réactionnels, 30 frottis (58%) étant concernés. Des macrophages phagocytaires sont retrouvés sur 8 frottis.

Une légère éosinophilie est retrouvée pour 3 frottis et des éosinophiles activés sont visualisés sur 2 frottis. Des basophiles sont visibles sur 4 frottis, témoignant d'une basophilie. Aucun basophile réactionnel n'est observé.

Pour les globules rouges on observe également un grand nombre d'anomalies : 45 frottis présentent de l'anisocytose (87%), 44 présentent une polychromatophilie (84%), 37 présentent une poïkilocytose (71%), 22 présentent des inclusions (42%), 15 présentent des hématies à bords flous (29%), 10 présentent des agglutinats et/ou des rouleaux d'hématies, 3 présentent des signes de stress oxydatif et 2 présentent des hématies fantômes. Des érythroblastes sont très souvent observés : 40 frottis révèlent la présence d'érythroblastes (81%). Pour 12 d'entre eux, on a plus de 10 érythroblastes (entre 11 et 111) pour 100 globules blancs.

Pour les plaquettes, 38 frottis présentent de l'anisocytose (73%), 22 présentent des macroplaquettes (42%) et 15 présentent des agrégats plaquettaires (29%).

Les différentes anomalies retrouvées sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Anomalies des nuages "Menhir avec base". Pour chaque anomalie on a une note pouvant aller de 0 à 3, donnée de manière subjective par la personne lisant les frottis sanguins. « 0 » correspond à une anomalie non observée tandis que « 3 » correspond à une anomalie observée en grande quantité.

Sous-profil 1.1	0	0,5	1	1,5	2	3	Total
Nb <u>anisocytose</u>	7	3	16	2	24	0	52
Nb GR bords flous	37	2	8	0	5	0	52
Nb <u>polychrom</u>	8	5	10	2	27	0	52
Nb stress ox	48	1	3	0	0	0	52
Nb <u>inclusions</u>	30	2	13	0	7	0	52
Nb <u>GB tox</u>	34	3	14	0	1	0	52
Nb GB hyperseg	37	0	10	1	4	0	52
Nb <u>band cells</u>	8	0	27	0	17	0	52
Nb lympho reac	22	6	18	0	6	0	52
Nb <u>mono reac</u>	22	1	21	2	6	0	52
Nb eosino reac	50	1	1	0	0	0	52
Nb <u>plq Gdes</u>	28	2	14	0	8	0	52
Nb plq agreg	37	4	9	0	2	0	52

En utilisant une analyse de variance (test ANOVA) permettant de comparer les résultats des frottis appartenant aux hémogrammes du profil 1.1 avec les résultats des frottis appartenant aux hémogrammes normaux, les hémogrammes du sous-groupe 1.1 ont été significativement associés à une numération plus grande de globules blancs ($p < 0,001$) par le Sysmex XT-2000iV en comparaison au groupe « normal » défini précédemment. Associé à cela, on a une numération manuelle augmentée en neutrophiles ($p=0$) et en monocytes ($p=0$). On trouve également une présence plus grande en neutrophiles toxiques ($p=0,002$), en band cells ($p=0$) et en monocytes réactionnels ($p=0$). Le nombre de macrophages phagocytaires est aussi augmenté ($p=0$). Concernant les globules rouges, on a significativement plus d'anisocytose ($p=0$), de poïkilocytose ($p=0$) et de polychromatophilie ($p=0$). Le nombre d'inclusions érythrocytaires est également significativement augmenté ($p=0$). Concernant les plaquettes, on a significativement plus de plaquettes géantes ($p=0,019$).

Inversement on retrouve des pourcentages en lymphocytes et en éosinophiles obtenus manuellement diminués de façon significative ($p=0$ pour les deux).

L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau situé en annexe (tableau récapitulatif de toutes les anomalies).

ii. Sous-profil 1.2 (« Menhir sans base »)

Un grand nombre de ces hémogrammes présente une leucocytose modérée à sévère (47/61 soit 77%) avec un nombre de globules blancs variant de $18 \times 10^3/\mu\text{L}$ à $58 \times 10^3/\mu\text{L}$. Cette leucocytose est très souvent accompagnée d'une neutrophilie modérée à sévère (42 des hémogrammes avec une leucocytose présentent aussi une neutrophilie soit 89%), le nombre de GNN variant de 12×10^3 GNN/ μL à 57×10^3 GNN/ μL . Associé à cela un pourcentage important (entre 10 et 46%) de band cells est observé sur 20 frottis (33%). On trouve aussi un certain nombre d'hémogrammes avec des neutrophiles hypersegmentés (72%) et des neutrophiles toxiques (46%). Enfin, 2 frottis présentent quelques neutrophiles avec des inclusions.

Concernant les lymphocytes, on trouve une lymphopénie sur 11 frottis (soit 20%) avec une quantité de lymphocytes variant de 207 lymphocytes/ μ L à 832 lymphocytes/ μ L. Inversement, on retrouve une lymphocytose sur 2 frottis (5 358/ μ L et 8 124/ μ L). On observe des lymphocytes réactionnels sur 36 frottis (59%).

Pour les monocytes, on a une monocytose sur 70% des frottis, le nombre pouvant aller jusqu'à 11 691 monocytes/ μ L. Cette monocytose est accompagnée dans 72% des cas de monocytes réactionnels. On peut aussi parfois avoir des monocytes réactionnels sans monocytose (4 cas). On observe des monocytes réactionnels sur 35 frottis (57%). On retrouve également des macrophages phagocytaires sur 3 frottis.

Les éosinophiles ne présentent presque aucune anomalie. Le Sysmex tout comme le comptage manuel ne révèlent jamais ni d'éosinopénie ni d'éosinophilie. On retrouve tout de même quelques éosinophiles réactionnels sur 4 frottis.

Des basophiles ont été observés sur 12 frottis. La basophilie est avérée pour au moins 4 d'entre eux.

Des mastocytes circulants sont observés sur 3 frottis.

Concernant les plaquettes, on retrouve de l'anisocytose sur 46 frottis (75%), des macroplaquettes sur 25 frottis (41%), des agrégats sur 19 frottis (31%) et des plaquettes nucléées sur 1 frottis.

Enfin concernant les hématies, on retrouve de l'anisocytose sur 42 frottis (69%), de la polychromatophilie sur 39 frottis (64%), de la poïkilocytose sur 22 frottis (36%), des hématies à bords flous sur 14 frottis (23%), des signes de stress oxydatif sur 9 frottis, des rouleaux et agrégats sur 7 frottis et des inclusions sur 7 frottis. On retrouve également des érythroblastes sur 27 frottis (44%), supérieur à 10 érythroblastes pour 100 globules blancs pour 6 d'entre eux. On retrouve sur 2 frottis appartenant au même animal (T10-2851) plus de 100 érythroblastes pour 100 globules blancs.

Ces différentes anomalies sont résumées sur le tableau suivant (tableau 2).

Tableau 2 : Anomalies des nuages "Menhir sans base". Pour chaque anomalie on a une note pouvant aller de 0 à 3, donnée de manière subjective par la personne lisant les frottis sanguins. « 0 » correspond à une anomalie non observée tandis que « 3 » correspond à une anomalie observée en grande quantité.

Sous-profil 1.2	0	0,5	1	1,5	2	3	Total
Nb anisocytose	19	15	14	1	12	0	61
Nb GR bords flous	46	4	7	1	3	0	61
Nb polychrom	22	15	14	1	9	0	61
Nb stress ox	52	1	7	0	1	0	61
Nb inclusions	54	1	4	0	2	0	61
Nb GB tox	33	2	16	1	9	0	61
Nb GB hyperseg	16	1	25	0	19	0	61
Nb band cells	43	1	13	0	4	0	61
Nb lympho reac	25	6	24	0	6	0	61
Nb mono reac	26	7	18	2	8	0	61
Nb eosino reac	57	3	1	0	0	0	61
Nb plq Gdes	36	3	21	0	1	0	61
Nb plq agreg	42	4	12	0	3	0	61

Statistiquement (test ANOVA), les diagrammes de dispersion du sous-groupe 1.2 ont été significativement associés à une numération plus grande de globules blancs par le Sysmex XT-2000iV en comparaison au groupe « normal » défini précédemment ($p < 0,001$). Associé à cela, on a une numération manuelle augmentée en neutrophiles ($p=0$) et en monocytes ($p=0$). Les pourcentages en monocytes obtenus manuellement sont également significativement augmentés ($p=0$). On trouve également une présence plus grande en neutrophiles toxiques ($p=0$), en band cells ($p=0,028$), en neutrophiles hypersegmentés ($p=0$) et en monocytes réactionnels ($p=0$).

Inversement, on retrouve des pourcentages en lymphocytes et en éosinophiles obtenus manuellement diminués de façon significative ($p=0$ pour les deux).

Aucune différence significative n'existe en ce qui concerne la lignée rouge.

iii. Sous-profil 2 (fusion des nuages des monocytes et lymphocytes)

Pour un bon nombre de frottis sanguins, on peut retrouver une quantité anormale de lymphocytes et de monocytes. En particulier, deux frottis présentent 51% et 96% de lymphocytes avec un nombre total respectif de lymphocytes de 10 225 lymphocytes/ μ L et 63 860 lymphocytes/ μ L. Cette lymphocytose marquée à sévère est aussi repérée par le Sysmex. Un frottis, qui présentait une lymphocytose sévère, contient de nombreux lymphocytes de petite à moyenne taille dont des lymphocytes à grains et à vacuoles (lymphocytes réactionnels). On y trouve également de rares blastes lymphoïdes. On observe ces lymphocytes réactionnels sur 16 frottis (70%), le nombre étant marqué pour 4 frottis. On repère également des monocytes réactionnels sur 12 frottis (52%). Des macrophages phagocytaires sont présents sur 2 frottis.

Sur un frottis de cette catégorie, on retrouve de nombreuses anomalies en plus des lymphocytes et monocytes réactionnels et des macrophages phagocytaires : pseudo macrophages, cellules lymphoïdes à chromatine finement réticulée, lymphocytes hyperbasophiles (type plasmocytes), quelques grands blastes, présence d'érythroblastes et surtout présence de piroplasmies. L'ensemble des anomalies observées sont résumées dans le tableau 3

Tableau 3 : Anomalies des nuages "fusion monocytes-lymphocytes". Pour chaque anomalie on a une note pouvant aller de 0 à 3, donnée de manière subjective par la personne lisant les frottis sanguins. « 0 » correspond à une anomalie non observée tandis que « 3 » correspond à une anomalie observée en grande quantité.

Sous-profil 2	0	0,5	1	1,5	2	3	Total
Nb anisocytose	6	5	10	0	2	0	23
Nb GR bords flous	15	1	5	0	2	0	23
Nb polychrom	13	6	3	0	1	0	23
Nb stress ox	14	4	4	0	1	0	23
Nb inclusions	21	2	0	0	0	0	23
Nb GB tox	21	2	0	0	0	0	23
Nb GB hyperseg	21	1	1	0	0	0	23
Nb band cells	19	1	2	0	1	0	23
Nb L reac	7	5	7	0	4	0	23
Nb mono reac	11	7	4	0	1	0	23
Nb eos reac	23	0	0	0	0	0	23
Nb plq Gdes	13	6	3	0	1	0	23
Nb plq agreg	14	6	2	0	1	0	23

Statistiquement (test ANOVA), les diagrammes de dispersion du sous-groupe 2 ont été significativement associés à un nombre manuel de lymphocytes augmenté ($p=0,001$). On retrouve également significativement plus de globules rouges présentant un stress oxydatif ($p=0,005$). Il est également à noter une augmentation du nombre de frottis présentant des piroplasmes ($p = 0,002$).

Aucune anomalie n'est significative concernant les plaquettes.

iv. Sous-profil 3 (fusion des nuages des neutrophiles et globules rouges non lysés)

Une leucocytose modérée neutrophilique n'est observée que pour un frottis (17×10^3 GNN/ μL pour 19×10^3 globules blancs/ μL).

On retrouve des neutrophiles toxiques sur 3 frottis sanguin. On a également des neutrophiles hypersegmentés sur 2 frottis. Deux frottis ont une quantité relativement élevée en band cells (12% à 13%). La totalité des frottis sanguins possèdent des lymphocytes réactionnels tandis que 8 frottis sur 9 ont des monocytes réactionnels. Enfin, un frottis présente des leucocytes agglutinés.

Des érythroblastes sont observés sur 4 frottis (4/9).

L'ensemble des anomalies sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Anomalies des nuages "fusion neutrophiles-globules rouges non lysés". Pour chaque anomalie on a une note pouvant aller de 0 à 3, donnée de manière subjective par la personne lisant les frottis sanguins. « 0 » correspond à une anomalie non observée tandis que « 3 » correspond à une anomalie observée en grande quantité.

Sous-profil 3	0	0,5	1	1,5	2	3	Total
Nb <u>anisocytose</u>	0	2	1	0	6	0	9
Nb GR bords flous	6	1	1	0	1	0	9
Nb polychrom	2	2	2	0	3	0	9
Nb stress ox	8	0	1	0	0	0	9
Nb inclusions	7	1	1	0	0	0	9
Nb GB tox	6	2	1	0	0	0	9
Nb GB hyperseg	4	4	1	0	0	0	9
Nb band cells	7	0	2	0	0	0	9
Nb L reac	1	4	3	0	1	0	9
Nb mono reac	2	2	5	0	0	0	9
Nb eos reac	8	0	1	0	0	0	9
Nb <u>plq Gdes</u>	3	0	3	1	2	0	9
Nb <u>plq agreg</u>	4	0	1	0	4	0	9

D'un point de vue statistique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence concernant la lignée blanche. Pour les globules rouges, on retrouve significativement plus de ghost cells ($p=0$), d'anisocytose ($p=0$) et de poikilocytose ($p=0,001$). On retrouve également plus de grandes plaquettes ($p=0,014$).

v. Sous-profil 4 (fusion des nuages des neutrophiles et des éosinophiles)

L'observation des frottis au microscope optique révèle un pourcentage d'éosinophiles compris entre 0 et 14%. L'un d'eux met en évidence une éosinophilie sévère (2 290/ μ L) associé à des lymphocytes et monocytes réactionnels ainsi que des cellules de Mott (cellules lymphoplasmocytaires avec des inclusions grises ou rosées dans le cytoplasme).

On trouve également sur un frottis des éosinophiles activés associés à une éosinophilie et sur un autre frottis des éosinophiles à vacuoles grises (associé à des GNN toxiques et des cellules lymphoïdes réactionnelles).

L'ensemble des anomalies sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Anomalies des nuages "fusion neutrophiles-éosinophiles". Pour chaque anomalie on a une note pouvant aller de 0 à 3, donnée de manière subjective par la personne lisant les frottis sanguins. « 0 » correspond à une anomalie non observée tandis que « 3 » correspond à une anomalie observée en grande quantité.

Sous-profil 4	0	0,5	1	1,5	2	3	Total
Nb anisocytose	3	1	1	0	0	0	5
Nb GR bords flous	5	0	0	0	0	0	5
Nb polychrom	3	2	0	0	0	0	5
Nb stress ox	5	0	0	0	0	0	5
Nb inclusions	5	0	0	0	0	0	5
Nb GB tox	4	1	0	0	0	0	5
Nb GB hyperseg	3	0	2	0	0	0	5
Nb band cells	2	2	1	0	0	0	5
Nb L reac	2	1	1	0	1	0	5
Nb mono reac	2	1	1	0	1	0	5
Nb eos reac	4	0	1	0	0	0	5
Nb plq Gdes	5	0	0	0	0	0	5
Nb plq agreg	5	0	0	0	0	0	5

Statistiquement, une augmentation du nombre d'éosinophiles dégranulés a pu être mise en évidence.

vi. Sous-profil 5 (déplacement du nuage des neutrophiles sur le nuage des lymphocytes)

Une leucocytose modérée (17 730/ μ L et 23 847/ μ L) est notée par le Sysmex pour deux hémogrammes. L'observation du frottis sanguin nous donne dans 4 cas sur 6 une neutrophilie dont une marquée (31 0580/ μ L pour un frottis) associée à de nombreux band cells (6% soit 2 0480/ μ L), une lymphopénie (680/ μ L) et une basophilie (un basophile trouvé au frottis sanguin) et une neutrophilie plus modérée (13 031 GNN/ μ L) associée à une lymphopénie (314/ μ L) et une basophilie (un basophile observé). Une monocytose est observée sur 3 frottis. Une éosinophilie est observée sur un seul frottis. Sur un frottis, on observe une quantité importante de band cells (29% soit 5 7354 band cells/ μ L) associé à une basophilie sévère (3 basophiles observés). En résumé, on a 4 cas de neutrophilie, 2 cas de lymphopénie, 3 cas de monocytose, 1 cas d'éosinophilie et 3 cas de basophilie. On a également la présence de nombreux band cells dans 5 cas, la quantité allant de 415/ μ L à 5 7354/ μ L.

L'ensemble des anomalies observées sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Anomalies des nuages "déplacement des neutrophiles sur les lymphocytes". Pour chaque anomalie on a une note pouvant aller de 0 à 3, donnée de manière subjective par la personne lisant les frottis sanguins. « 0 » correspond à une anomalie non observée tandis que « 3 » correspond à une anomalie observée en grande quantité.

Sous-profil 5	0	0,5	1	1,5	2	3	Total
Nb anisocytose	4	0	2	0	0	0	6
Nb GR bords flous	3	0	1	0	2	0	6
Nb polychrom	3	1	0	0	2	0	6
Nb stress ox	4	1	1	0	0	0	6
Nb <u>inclusions</u>	2	0	3	0	1	0	6
Nb GB tox	4	1	1	0	0	0	6
Nb <u>GB hyperseg</u>	1	0	2	0	3	0	6
Nb band cells	6	0	0	0	0	0	6
Nb L reac	2	2	2	0	0	0	6
Nb mono reac	4	0	1	1	0	0	6
Nb eos reac	5	0	1	0	0	0	6
Nb plq Gdes	4	0	1	0	1	0	6
Nb plq agreg	3	0	3	0	0	0	6

Statistiquement, les frottis de ce type de diagrammes présentent significativement plus de neutrophiles hypersegmentés ($p=0$) ainsi qu'une augmentation du nombre et du pourcentage de basophiles ($p=0$ et $p=0,001$ respectivement). Il y a également plus d'inclusions érythrocytaires ($p=0,001$). Inversement il comprend moins de pourcentages de lymphocytes obtenus manuellement ($p=0,044$). Aucune différence n'est à noter concernant les plaquettes.

III. Discussion

1. Sous-profil 1.1 (« menhir avec base »)

Pour les diagrammes de dispersion du sous-profil 1.1 l'automate n'a pas su différencier correctement les différents groupes cellulaires, ces derniers semblant former un continuum dans leurs caractéristiques granulométriques et quantité d'acides nucléiques. Cela peut notamment s'expliquer par la présence d'une **leucocytose neutrophilique** observable sur les différents frottis sanguins. En effet, l'augmentation du nombre de cellules d'une population peut augmenter les chances d'observer des points « aberrants » en quantité normalement négligeable. Par exemple, les **band cells** et les **granulocytes neutrophiliques toxiques**, normalement en quantité négligeables, se retrouvent sur-représentés ici (signe d'une inflammation sévère et aigüe). On peut alors supposer que ces deux types de cellules n'aient pas tout à fait les mêmes caractéristiques granulométriques et de fluorescence que les granulocytes neutrophiliques plus « classiques », ces cellules venant ainsi se superposer aux autres nuages des différentes populations de globules blancs. En effet, les neutrophiles toxiques notamment peuvent présenter dans leur cytoplasme des corps de Döhle (inclusions cytoplasmiques), des vacuoles, une basophilie du cytoplasme ou encore un noyau avec une forme irrégulière pouvant venir modifier les caractéristiques granulométriques et de fluorescence par rapport à un neutrophile normal. Il en est de même pour les **monocytes** qui sont retrouvés en quantité anormalement élevée sur les frottis sanguins associés le plus souvent à la présence de **monocytes activés** : il se peut que les caractéristiques de fluorescence et granulométriques soient plus diversifiées et ainsi difficilement différenciables des autres leucocytes. En effet, les monocytes activés présentent dans leur cytoplasme de nombreuses vacuoles claires et un noyau en circonvolution pouvant venir modifier ces caractéristiques. Par exemple, ce type de diagramme a déjà été observé dans une étude ([14]) comme représenté sur la figure 8 (voir sous-profil 5). La fusion entre les nuages serait dans cette étude liée à la présence d'une population cellulaire venant s'insérer entre les nuages de points des neutrophiles et des lymphocytes, celle-ci étant essentiellement des basophiles retrouvés en nombre anormalement important. Cependant l'étude mentionne tout de même d'autres populations cellulaires pouvant s'insérer dans cette zone telle que de neutrophiles toxiques ou immatures.

Les lymphopénies et éosinopénies observées sont à mettre en relation avec les neutrophilies et monocytoses. Les frottis du sous-profil 1.1 présentent des formules de stress corticoïde.

Enfin, il a été trouvé sur la plupart des frottis sanguins la présence de **plaquettes géantes**, pouvant en partie expliquer les anomalies de nuages observées. En effet certaines plaquettes géantes d'une part peuvent échapper à la lyse et d'autre part, sont suffisamment fluorescentes pour être confondues avec des globules blancs par l'automate. Ces plaquettes géantes peuvent en théorie venir se superposer aux nuages de points et ainsi « lier » les différents nuages entre eux participant à la formation du « Menhir » (Zandacki *et al.*). Notons par ailleurs que ces plaquettes géantes ne sont pas autant retrouvées sur les « menhir sans base ». On peut ainsi supposer que ces macroplaquettes seraient responsables de la fusion entre les nuages leucocytaires et le nuage des globules rouges non lysés. Il en est de même pour les **globules rouges anormaux** retrouvés en quantité anormalement élevée : ces globules rouges anormaux pourraient ne pas être aussi bien détruits par les agents de

lyse que les globules rouges normaux et pourraient ainsi augmenter la taille du nuage de points des globules rouges non lysés venant ainsi fusionner avec le nuage des neutrophiles.

Par ailleurs, bien que cela n'ait pas été démontré statistiquement, la plupart des frottis (81%) présentent des **érythroblastes**, parfois en grande quantité. Or, lors de la dilution dans le canal « formule leucocytaire », les agents de lyse des globules rouges agissent également sur les érythroblastes en détruisant leur membrane mais respectent leur noyau. Ainsi, les anomalies du décompte leucocytaire peuvent être liées à la présence de ces noyaux d'érythroblastes qui peuvent venir se superposer aux nuages leucocytaires (Zandecki *et al.*).

Enfin, des macrophages phagocytaires, des blastes, des métamyélocytes, des promyélocytes, des cellules de Mott et des lymphocytes réactionnels ont également été retrouvés sur quelques frottis, pouvant également venir perturber le leucogramme.

2. Sous-profil 1.2 (« menhir sans base »)

Pour les diagrammes de dispersion du sous-profil 1.2 l'automate n'a pas su, comme pour le profil 1.1 différencier correctement les différents groupes cellulaires mis à part pour le nuage des globules rouges non lysés qui reste bien séparé du « continuum leucocytaire ». Cela peut notamment s'expliquer, comme pour le sous-profil 1.1, par une **leucocytose neutrophilique et monocyttaire** associés à des **neutrophiles toxiques**, des **band cells** et des **monocytes réactionnels**. Comme pour le sous-profil 1.1, l'augmentation numérique de ces différents types cellulaires peuvent venir augmenter la diversité granulométrique et de fluorescence leucocytaire d'où l'impossibilité pour l'automate de séparer correctement différents nuages de points. Une basophilie pourrait également venir perturber l'individualisation entre le nuage des neutrophiles et celui des lymphocytes comme décrit pour le profil 1.1, avec une population de cellules venant s'insérer entre le nuage des neutrophiles et celui des lymphocytes.

Notons que contrairement au profil 1.1, on a aussi ici une augmentation significative des **neutrophiles hypersegmentés**. Cette hypersegmentation se traduit par la présence de 5 lobes nucléaires ou plus et correspond au vieillissement de la cellule par le prolongement de son temps de transit dans le sang. Une hypersegmentation des neutrophiles peut être observée lors d'une exposition prolongée des neutrophiles à l'EDTA avant la réalisation du frottis sanguin, à une infection chronique, une déficience en vitamine B12 ou en folate ou encore à une réduction de la diapédèse dans les tissus causée par exemple par les corticoïdes ou un déficit en intégrine bêta2 chez le Setter irlandais (provoquant des infections récurrentes associées à une neutrophilie persistante). Ici, ces neutrophiles hypersegmentés peuvent participer à la diversification des caractéristiques granulométriques et de fluorescence et donc à l'incapacité de l'automate à présenter des nuages de points bien séparés. Cependant, cela n'a jamais été mentionné dans la littérature.

Sur certains frottis on retrouve aussi des mastocytes circulants, des plaquettes nucléées et des érythroblastes parfois en grande quantité pouvant aussi venir perturber l'automate dans le décompte des globules blancs.

3. Sous-profil 2 (fusion des nuages des monocytes et lymphocytes)

La présence d'une fusion entre le nuage de points des monocytes et celui des lymphocytes est significativement associée à un **nombre plus élevé en lymphocytes** sur le frottis. Comme précédemment, on peut penser que l'augmentation numérique d'un type cellulaire augmente la diversité granulométrique et de fluorescence, avec des lymphocytes se rapprochant des caractéristiques des monocytes. L'automate a alors pu confondre ces deux types de cellules.

Sur certains des frottis de cette catégorie, des **piroplasmes** ont été observés. On peut ainsi se demander si la présence de parasites sanguins pourrait venir perturber les résultats obtenus par le Sysmex. Il a notamment été rapporté en humaine que la présence de microorganismes sanguins pouvait venir perturber l'héмограмme. Des études *in vitro* au cours desquelles de grandes quantités de microorganismes ont été rajoutées aux échantillons sanguins humains ont montré qu'ils peuvent s'auto-agglutiner et provoquer une augmentation de la numération leucocytaire et des modifications de la formule leucocytaire automatisée (Zanddecki *et al.* 2012). Par exemple, la présence de plasmodiums dans les hématies, agents de paludisme, provoque des modifications dans les nuages de points du Sysmex XT-2000i [15]. Parmi les différentes anomalies observées en cas de Malaria on ne retrouve cependant pas de sous-profil similaire à celui-ci. Par ailleurs, il est plus probable que ce soit des modifications des leucocytes suite à la piroplasmose qui expliquent les graphiques. En effet, la lymphocytose, la présence de lymphocytes activés (notamment lymphocytes à grains) sont classiquement observés dans les maladies vectorielles comme la piroplasmose.

Il a également été décrit un décalage des monocytes sur les lymphocytes au-delà de 24h de stockage de l'échantillon sanguin à température ambiante dans le noir (Bourgès-Abella *et al.* 2014 [16]). Cependant, ici les conditions de stockage n'ont pas été relevées.

4. Sous-profil 3 (fusion des nuages des neutrophiles et globules rouges non lysés)

Les frottis associés à cette anomalie de nuages de points montrent de manière significative la présence de **macroplaquettes**. Il a déjà été rapporté en médecine humaine une modification possible du nuage de points leucocytaire associée à des agrégats plaquettaires ou des macroplaquettes [13]. Cela se manifeste par la présence d'une extension du nuage des globules rouges non lysés vers le haut et vers la droite. Une autre thèse vétérinaire (Meric Tristan, Trumel Catherine - ENVT, 2018) met également cette anomalie en évidence associée à des agrégats plaquettaires chez le chien. On peut ainsi supposer que la présence de macroplaquettes peut modifier le nuage de point des globules rouges non lysés par une extension vers le haut, le faisant ainsi fusionner avec le nuage de points des leucocytes. Le fait que l'on ait trouvé de manière significative la présence de macroplaquettes sur les frottis associés à des nuages de points « en menhir avec base » (sous-profil 1.1) mais pas sur les frottis associés à des nuages de points « en menhir sans base » (sous-profil 1.2) va également dans le sens de cette hypothèse. En effet, dans le cas du « menhir avec base », une fusion entre le nuage des neutrophiles et celui des globules rouges non lysés existe également et est associé avec la présence de macroplaquettes. Pour le « menhir sans

base » où la fusion entre les nuages de points des neutrophiles et des globules rouges non lysés n'existe pas, on ne retrouve pas de macroplaquettes en quantité significative.

Enfin, les frottis de ce sous-groupe présentent de nombreuses **anomalies au niveau de la lignée rouge (ghost cells, poïkilocytose, anisocytose, érythroblastes)**. Ces globules rouges anormaux pourraient réagir différemment à l'agent de lyse des globules rouges et ainsi venir grossir le nuage de points des globules rouges non lysés qui se retrouverait fusionné avec celui des neutrophiles, comme déjà mentionné pour le sous-profil 1.1.

5. Sous-profil 4 (fusion des nuages des neutrophiles et des éosinophiles)

Il a été mis en évidence de manière significative la présence plus importante **d'éosinophiles dégranulés**. Cette dégranulation entraîne une granulation moins importante dans le cytoplasme des éosinophiles. Cela a logiquement pour conséquence un déplacement du nuage des éosinophiles vers la gauche entraînant secondairement une fusion avec le nuage des neutrophiles.

L'étude statistique n'a pu mettre en évidence d'autres d'anomalies significatives entre les frottis des nuages de points normaux et ceux des nuages avec une fusion entre les neutrophiles et des éosinophiles. Cependant, seulement 5 nuages de points représentaient ce sous-profil ce qui ne permet pas de réellement conclure. Notamment, la présence d'une fusion entre ces deux nuages a déjà été rapportée dans une précédente étude lors de la présence d'éosinophiles présentant dans leur cytoplasme des vacuoles optiquement vides appelés « grey eosinophils ». Ces « grey eosinophils » se retrouvent majoritairement chez les Greyhound et n'ont a priori aucune signification clinique. Cependant, ces cellules sont difficilement reconnues comme des éosinophiles par l'automate qui les classe le plus souvent parmi les neutrophiles. Le nombre d'éosinophiles se retrouve ainsi sous-estimé [12]. La lecture des 5 frottis de ce sous-profil a mis en évidence une fois des éosinophiles à vacuoles grises. Un autre frottis a également mis en évidence des éosinophiles activés aux propriétés granulométriques pouvant être légèrement différentes des éosinophiles normaux.

En médecine humaine, la fusion entre ces deux nuages par le sysmex XT-2000i est également rapportée lors d'infestation par *plasmodium spp*, agent du paludisme, conséquence de la présence d'éléments riches en hémozoïne, pigment obtenu suite à l'utilisation de l'hémoglobine par l'agent de paludisme, pouvant être contenus dans des globules rouges ou dans les GNN et provoquant une anomalie de polarisation de la lumière ([15], [6]). Ainsi on peut supposer que d'autres types d'inclusions intracytoplasmiques, d'origine parasitaires ou non, pourraient avoir les mêmes effets bien que cela n'ait pas été observé ici.

Enfin, une fusion entre les nuages neutrophiliques et éosinophiliques est rapporté en médecine vétérinaire lors de stockage de plus de 24h de l'échantillon sanguin à température ambiante dans le noir (Bourgès-Abella *et al.* 2014 [16]). Cependant, ici les conditions de stockage n'ont pas été relevées.

6. Sous-profil 5 (déplacement du nuage des neutrophiles sur celui des lymphocytes)

Un déplacement des neutrophiles vers le haut, fusionnant avec le nuage des lymphocytes est associé à la présence de **neutrophiles hypersegmentés**. L'axe des ordonnées correspondant à la quantité d'acide nucléique contenu dans les cellules, on peut supposer que les neutrophiles hypersegmentés se retrouvent avec une quantité d'acides nucléiques plus importante que les neutrophiles « classiques », voir une quantité d'acides nucléiques proche de celle des lymphocytes et se retrouvent ainsi insérés entre les deux types de nuages.

De plus, il a été mis en évidence une **quantité de basophiles augmentée** par rapport à la normale (en nombre absolu et en pourcentage). Les basophiles de chiens se retrouvent, lorsqu'ils sont présents, entre le nuage de points des neutrophiles et des lymphocytes [14] comme représenté sur la figure 8 provenant d'une précédente étude [14]. Cela a été observé lors de basophilie (>5% de basophiles sur la lecture de frottis réalisé sur 11 chiens). Il avait été supposé que les basophiles de chiens avaient des caractéristiques granulométriques proches des neutrophiles avec une fluorescence légèrement augmentée, les faisant apparaître entre le nuage de point des neutrophiles et des lymphocytes. Ils avaient alors été classés soit en tant que lymphocytes soit en tant que neutrophiles par le Sysmex XT-2000iV. Cela n'était pas accompagné d'anomalie sur le nuage des basophiles (Canal « WBC-BASO »). L'étude mentionne également le fait que ce type de nuage serait également observé en présence de neutrophiles toxiques et immatures qui se retrouveraient dans la zone entre les neutrophiles et les lymphocytes.

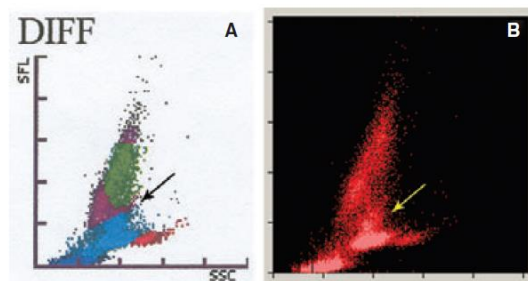


Figure 8: Image de "Menhir avec base" parue dans la publication de Lilliehöök et al. 2014 [14]

Conclusion

Au cours des années 2014 à 2016, 210 hémogrammes de chiens parmi les 3352 réalisés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse sur l'automate Sysmex XT- 2000iV présentaient une unique anomalie de position d'un nuage de points sur le diagramme de dispersion. L'analyse statistique, bien que parfois le nombre d'hémogrammes représentant un type d'anomalie soit faible, a permis malgré tout de dégager des corrélations significatives entre anomalies graphiques et anomalies biologiques.

Une leucocytose neutrophilique et monocyttaire, la présence de neutrophiles toxiques ou hypersegmentés, la présence de band cells, de monocytes ou de lymphocytes réactionnels, d'éosinophiles dégranulés, de basophiles en grand nombre ou encore la présence de macroplaquettes, de globules rouges anormaux ou d'érythroblastes sont susceptibles de modifier la topographie habituelle des nuages de points de leucocytes; la détection de ces anomalies graphiques doit donc faire partie de l'interprétation d'un hémogramme par le clinicien, puisqu'elle peut apporter des informations supplémentaires et complémentaires à l'analyse chiffrée. La rétrospectivité de cette étude ne permet pas de mesurer les performances diagnostiques de ces anomalies graphiques, mais les études prospectives notamment réalisées en médecine humaine donnent une sensibilité limitée et invitent le clinicien à ne pas s'affranchir de la lecture et l'interprétation des frottis sanguins.

Annexes

Tableau 7: Tableau récapitulatif du test ANOVA réalisé avec les différents profils de nuages de points. Les différences significatives (P VS $K < 0,05$ pour $P < 0,05$) ont été surlignées.

Profil Nuage		Normal (K)	1.1	1.2	2	3	4	5	Test Anova
quantité		46	52	61	23	9	5	6	P
Anisocytose	moyenne	0,60	1,32	0,77	0,72	1,56	0,30	0,33	<0,001
Anisocytose	P vs K	-	0,000	0,883	0,999	0,000	0,986	0,989	
GR Bords flous	moyenne	0,64	0,37	0,27	0,41	0,39	0,00	0,83	0,013
GR Bords flous	P vs K	-	0,619	0,155	0,955	0,992	0,620	1,000	
Poikilocytose	moyenne	0,45	1,16	0,42	0,65	1,44	1,20	0,67	<0,001
Poikilocytose	P vs K	-	0,000	1,000	0,961	0,001	0,263	0,999	
Polychromatophilie	moyenne	0,47	1,34	0,67	0,35	1,00	0,20	0,75	<0,001
Polychromatophilie	P vs K	-	0,000	0,761	0,999	0,295	0,995	0,986	
Stress oxydatif	moyenne	0,08	0,18	0,16	0,15	0,17	0,00	0,00	0,006
Stress oxydatif	P vs K	-	1,000	0,771	0,005	1,000	1,000	0,888	
Babesia	moyenne	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,007
Babesia	P vs K	-	1,000	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000	
Rouleaux	moyenne	0,17	0,16	0,17	0,11	0,40	0,17	0,22	0,148
Rouleaux	P vs K	-	-	-	-	-	-	-	
Ghost cells	moyenne	0,06	0,00	0,00	0,44	0,00	0,00	0,00	<0,001
Ghost cells	P vs K	-	0,965	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	
Inclusions	moyenne	0,18	0,14	0,15	0,07	0,00	0,00	0,00	<0,001
Inclusions	P vs K	-	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	
Erythroblastes	moyenne	0,24	8,83	9,98	0,09	2,33	0,00	3,83	0,005
Erythroblastes	P vs K	-	0,268	0,095	1,000	1,000	1,000	1,000	
WBC Smx	moyenne	8,20	43,95	29,06	13,63	11,60	14,34	21,46	<0,001
WBC Smx	P vs K		<0,001	<0,001	0,776	0,999	0,988	0,273	
Toxic WBC	moyenne	0,022	0,337	0,598	0,043	0,222	0,100	0,250	<0,001
Toxic WBC	P vs K		0,002	0,000	1,000	0,917	1,000	0,936	
WBC hypersegmented	moyenne	0,15	0,38	1,04	0,07	0,33	0,40	1,33	<0,001
WBC hypersegmented	P vs K		0,585	0,000	1,000	0,996	0,994	0,000	
Band cells	moyenne	0,05	1,17	0,35	0,20	0,22	0,40	0,00	<0,001
Band cells	P vs K		0,000	0,028	0,970	0,992	0,843	1,000	
N# Manuel	moyenne	5,59	30,45	20,23	7,02	8,84	10,32	16,06	<0,001
N# Manuel	P vs K		0,000	0,000	1,000	0,992	0,981	0,161	
N% Manuel	moyenne	66,48	73,67	70,43	61,26	74,78	73,60	74,67	0,002
N% Manuel	P vs K		0,166	0,874	0,866	0,772	0,979	0,914	
L réactifs	moyenne	0,42	0,63	0,64	0,76	0,78	0,70	0,50	<0,001
L réactifs	P vs K		0,801	0,740	0,496	0,859	0,995	1,000	
L# Man	moyenne	1,73	2,56	2,44	5,48	1,30	1,99	1,38	0,002
L# Man	P vs K		0,973	0,989	0,001	1,000	1,000	1,000	
L% Man	moyenne	22,61	7,97	9,44	27,91	14,44	12,00	7,33	<0,001
L% Man	P vs K		0,000	0,000	0,674	0,570	0,561	0,044	
Monos Réac	moyenne	0,21	0,70	0,66	0,41	0,67	0,70	0,42	<0,001
Monos Réac	P vs K		0,000	0,000	0,873	0,317	0,596	0,996	
M# Manuel	moyenne	0,44	2,93	2,65	0,72	0,44	0,82	1,26	<0,001
M# Manuel	P vs K		0,000	0,000	0,997	1,000	1,000	0,887	
M% Manuel	moyenne	5,57	7,55	9,64	6,91	4,44	6,20	7,00	<0,001
M% Manuel	P vs K		0,378	0,000	0,964	0,999	1,000	0,999	
Macrophages phag	moyenne	0,0	0,20	0,04	0,07	0,00	0,00	0,00	<0,001
Macrophages phag	P vs K		0,000	0,991	0,966	1,000	1,000	1,000	
Eo dégran	moyenne	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	<0,001

<i>Eo dégran</i>	<i>P vs K</i>		0,956	0,991	0,999	0,000	1,000	0,987	
<i>Eo Réac</i>	moyenne	0,03	0,03	0,04	0,00	0,11	0,20	0,17	0,054
<i>Eo Réac</i>	<i>P vs K</i>		-	-	-	-	-	-	
<i>Eo# Manuel</i>	moyenne	0,38	0,35	0,25	0,35	0,24	0,96	0,51	0,014
<i>Eo# Manuel</i>	<i>P vs K</i>		1,000	0,811	1,000	0,995	0,073	0,999	
<i>Eo% Manuel</i>	moyenne	4,98	1,19	1,11	3,17	2,22	6,20	3,00	<0,001
<i>Eo% Manuel</i>	<i>P vs K</i>		0,000	0,000	0,381	0,282	0,998	0,896	
<i>Baso# Manuel</i>	moyenne	0,01	0,03	0,05	0,00	0,05	0,00	0,22	
<i>Baso# Manuel</i>	<i>P vs K</i>		0,959	0,101	1,000	0,902	1,000	0,000	
<i>Baso% Manuel</i>	moyenne	0,07	0,13	0,25	0,04	0,33	0,00	1,00	0,001
<i>Baso% Manuel</i>	<i>P vs K</i>		1,000	0,719	1,000	0,911	1,000	0,001	
<i>S Baso</i>	moyenne	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,001
<i>S Baso</i>	<i>P vs K</i>		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
<i>Baso Réac</i>	moyenne	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>Baso Réac</i>	<i>P vs K</i>		-	-	-	-	-	-	
<i>Masto Circ</i>	moyenne	0,00	0,09	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,066
<i>Masto Circ</i>	<i>P vs K</i>		-	-	-	-	-	-	
<i>AnisoPlt</i>	moyenne	0,09	0,10	0,09	0,16	0,29	0,24	0,26	0,144
<i>AnisoPlt</i>	<i>P vs K</i>		-	-	-	-	-	-	
<i>Plt Grandes</i>	moyenne	0,18	0,60	0,40	0,35	0,94	0,00	0,50	0,001
<i>Plt Grandes</i>	<i>P vs K</i>		0,019	0,674	0,986	0,014	1,000	0,966	
<i>Agreg Plt</i>	moyenne	0,41	0,29	0,33	0,30	1,00	0,00	0,50	<0,001
<i>Agreg Plt</i>	<i>P vs K</i>		0,998	1,000	1,000	0,475	0,975	1,000	
<i>Plt nucl</i>	moyenne	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,771
<i>Plt nucl</i>	<i>P vs K</i>		-	-	-	-	-	-	

Tableau 8: Tableau récapitulatif des différentes anomalies observables en pourcentage pour chaque profil.

Profil	%ge anisocitose		%ge GR bord flou		%ge polychrom		%ge stressox		%ge d'inclusion	
	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	négatifs
1.1	86,5	13,5	28,8	71,2	84,6	15,4	7,7	92,3	42,3	57,7
1.2	68,9	31,1	24,6	75,4	63,9	36,1	14,8	85,2	11,5	88,5
2	73,9	26,1	34,8	65,2	43,5	56,5	39,1	60,9	8,7	91,3
3	100,0	0,0	33,3	66,7	77,8	22,2	11,1	88,9	22,2	77,8
4	40,0	60,0	0,0	100,0	40,0	60,0	0,0	100,0	0,0	100,0
5	33,3	66,7	50,0	50,0	50,0	50,0	33,3	66,7	66,7	33,3
Normal (K)	69,6	30,4	50,0	50,0	56,5	43,5	8,7	91,3	10,9	89,1

Profil	%ge GB Tox		%ge GR Hypersegmentés		%ge Band cells		%ge L réac		%ge Mono réac		%ge Eo réac	
	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs
1.1	34,62	65,38	28,85	71,15	84,62	15,38	57,7	42,3	57,7	42,3	3,8	96,2
1.2	45,90	54,10	73,77	26,23	29,51	70,49	59,0	41,0	57,4	42,6	6,6	93,4
2	8,70	91,30	8,70	91,30	17,39	82,61	69,6	30,4	52,2	47,8	0,0	100,0
3	33,33	66,67	55,56	44,44	22,22	77,78	88,9	11,1	77,8	22,2	11,1	88,9
4	20,00	80,00	40,00	60,00	60,00	40,00	60,0	40,0	60,0	40,0	20,0	80,0
5	33,33	66,67	83,33	16,67	0,00	100,00	66,7	33,3	33,3	66,7	16,7	83,3
Normal (K)	4,35	95,65	15,22	84,78	10,87	89,13	54,3	45,7	28,3	71,7	6,5	93,5

Profil	%ge de plq aniso		%ge de plq Gdes		%ge plq agreg	
	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs	Négatifs
1.1	73,1	26,9	46,2	53,8	28,8	71,2
1.2	75,4	24,6	41,0	59,0	31,1	68,9
2	69,6	30,4	43,5	56,5	39,1	60,9
3	77,8	22,2	66,7	33,3	55,6	44,4
4	60,0	40,0	0,0	100,0	0,0	100,0
5	83,3	16,7	33,3	66,7	50,0	50,0
Normal (K)	73,9	26,1	17,4	82,6	43,5	56,5

Bibliographie

- [1] WEISS, Douglas and WARDROP, Jane. *Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition*. Oxford : Wiley Blackwell, 2010. ISBN 978-0-813-81798-9
- [2] Fluoro-cytométrie en flux – Sysmex France [consulté en septembre 2018]. Disponible à l'adresse : www.sysmex.fr/academie/technologie/fluorocytometrie-en-flux.html
- [3] TVEDTEN, Harold et LILLIEHOOK, Inger. *Canine differential leukocyte counting with the CellaVision DM96Vision, Sysmex XT-2000iV, and Advia 2120 analyzers and a manual method*. *Veterinary Clinical Pathology*, 2011. 40/3, pp. 324-339.
- [4] BAUER N., NAKAGAWA J., DUNKER C., FAILING K., MORITZ A. *Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iVTM capered 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*. 2012. Vol. 23, n° 6, pp. 1168-1180.
- [5] BAUER N., NAKAGAWA J., DUNKER C., FAILING K., MORITZ A. *Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iVTM capered to the ADVIA®2120 for its use in dogs, cats, and horses: part II: Acuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2012. Vol. 24, n° 1, pp. 74-89. E-pub ahead of print: DOI: 10.1177/1040638711436243
- [6] ZANDECKI, Marc, GENEVIEVE, Franck, GERARD, Justin et GODON, Alban. *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*, 2007. 29/1, pp. 21-41.
- [7] LILLIEHOOK, Inger et TVEDTEN, Harold. *Validation of the Sysmex XT- 2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts*. *Veterinary Clinical Pathology*, 2009. 38/2, pp. 163- 174.
- [8] LILLIEHOOK, Inger. *Evaluation of CELL-DYN 3500, a haematological instrument adapted for testing animal samples*. *Sven Veterinartidning*, 1998. 50, pp. 643-648.
- [9] LILLIEHOOK, Inger et TVEDTEN, Harold. *Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts*. *Veterinary Clinical Pathology*, 2009. 38/2, pp. 175-182.
- [10] GODON, Alban, GENEVIEVE, Franck, MARTEAU-TESSIER, Anne, ZANDECKI, Marc. *Automated hematology analysers and spurious counts. Part 3. Haemoglobin, red blood cells, cell count and indices, reticulocytes*. *Annales de biologie clinique*, 2012. 70/2, pp. 155-168.

[11] GODON, Alban, GENEVIEVE, Franck, MARTEAU-TESSIER, Anne, ZANDECKI, Marc. *Automated hematology analysers and spurious counts. Part 1. Platelets*. Annales de biologie clinique, 2010. 68/4, pp. 393-407.

[12] GIORI Luca, GIRONI Sara, SCARPA Paola, ANSELMI Angelo, GUALTIERI Massimo, PALTRINIERI Saverio, *Grey eosinophils in sighthounds: frequency in 3 breeds and comparison of eosinophil counts determined manually and with 2 hematology analyzers*, Veterinary Clinical Pathology 40/4 2011, pp. 475-483.

[13] SASSI, M, DIBEJ, W, ABDI, B, ABDERRAZAK, F, HASSINE, M et BABBA, H. *Diagnostic performance of graphical anomalies in the detection of large platelets and platelets clumps*. Pathologie Biologie, 2015.

[14] LILLIHOOK Inger, TVEDTEN Harold W., *Errors in basophil enumeration with 3 veterinary hematology systems and observations on occurrence of basophils in dogs*, Veterinary Clinical Pathology, 40/4 2011, pp. 450-458.

[15] SUNITA SHARMA, NEHA SETHI, MUKTA PUJANI, SHIVANI KUSHWAHA & SHIVALI SEHGAL (2013) *Abnormal WBC scattergram : a clue to the diagnosis of malaria*, Hematology, 18:2, pp. 101-105.

[16] BOURGES-ABELLA Nathalie H. GEFRE Anne, DESHUIILLERS Pierre L. BRAUN Jean-Pierre D., TRUMEL Catherine, *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 43/1 2014, pp. 24-35.

[17] Meric, Tristan, Trumel Catherine . *Étude rétrospective des anomalies de nuages de points leucocytaires issus du Sysmex XT- 2000iV chez le chien*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 32 p.

[18] DENIS Brice, CORDONNIER Nathalie, *Variations physiologiques et pathologiques des lignées leucocytaires chez les carnivores domestiques: étude rétrospective sur l'année 2002 (banque de données du laboratoire d'hématologie de l'ENVA)*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort – ENVA, 2006, 166p.

[19] Site internet du laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.hematocell.fr>

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 **Magali MIGNOT** intitulée « **Etude rétrospective des anomalies des nuages de points leucocytaires des hémogrammes de chiens obtenus à partir du SYSMEX XT-2000iV : anomalies de fusion** » 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 :
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

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



Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRE-OBRECHT



AUTEUR : MIGNOT Magali

TITRE : Étude rétrospective des anomalies de nuages de points leucocytaires issus du Sysmex XT-2000iV chez le chien : anomalies de fusion

DIRECTRICE DE THÈSE : TRUMEL Catherine

RÉSUMÉ : L'hémogramme est un examen complémentaire couramment utilisé par les praticiens vétérinaires, mais leur interprétation souvent restreinte à la lecture des résultats chiffrés conduit à une analyse incomplète si ce n'est erronée. La présente étude s'est efforcée, à l'appui de 210 parmi les 3352 hémogrammes de chiens réalisés entre 2014 et 2016 à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, de dégager différentes anomalies de fusion des nuages de points des diagrammes de dispersion. Ces anomalies graphiques ont été analysées statistiquement, et corrélées à des anomalies biologiques variées comme la présence d'une leucocytose neutrophilique avec neutrophiles toxiques ou hypersegmentés, la présence de band cell, de basophiles ou d'éosinophiles dégranulés ou encore la présence de plaquettes géantes.

Mots-clés : leucocyte, chien, hémogramme, nuage de points, Sysmex XT-2000iV, fusion, neutrophiles toxiques, neutrophiles hypersegmentés, band cell, monocytes réactionnels, lymphocytes réactionnels, piroplasmose, macroplaquettes, basophilie, érythroblastes, éosinophiles à vacuole grise, éosinophiles dégranulés

TITLE: Retrospective study on abnormal leukocyte scattergrams of the dog obtained by the Sysmex XT-2000iV : fusion WBC scattergram abnormality

ABSTRACT: The complete blood count is commonly used by veterinarians, but their interpretation is often limited to the analysis of the figures and leads to incomplete if not false results. We attempted in this study, from 210 out of the 3352 complete blood counts which were available between 2014 and 2016 in the National Veterinary School of Toulouse, to present different categories of abnormal scattergrams. These graphic abnormalities were statistically investigated, and correlated to diverse biological anomalies such as neutrophilic leukocytosis, toxic neutrophils, hypersegmented neutrophils band cells, basophils, degranulated eosinophils or macroplatelets.

Key-words: leukocyte, dog, complete blood count, scattergram, Sysmex XT-2000iV, fusion, toxic neutrophils, hypersegmented neutrophils, band cell, reactive monocytes, reactive lymphocytes, macroplatelets, basophils, erythroblast, degranulated or grey eosinophils.