

HÉMOGRAMMES ET CYTOMÉTRIE EN FLUX : PRÉSENTATION DES CYTOGRAMMES NORMAUX ET DE QUELQUES CYTOGRAMMES ANORMAUX CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT AVEC L'ANALYSEUR ADVIA 120

*HEMOGRAM BY FLOW CYTOMETRY: PRESENTATION OF THE
NORMAL CYTOGRAMS AND OF SOME MODIFIED CYTOGRAMS IN
DOG AND CAT WITH AN ADVIA 120 ANALYSER*

*Par Alexandra BRIEND-MARCHAL⁽¹⁾
(Communication présentée le 9 juin 2011)*

RÉSUMÉ

L'ADVIA® 120 (Siemens Diagnostics) est un automate d'hématologie utilisant la technologie de cytométrie en flux pour caractériser les cellules. Différents canaux d'analyse permettent des numérations complètes et des numérations/formules : les canaux hémoglobine, érythrocytes et plaquettes, réticulocytes, peroxydase et complexité nucléaire, ces deux derniers permettant le comptage et la classification des leucocytes.

L'hémoglobine est déterminée selon deux méthodes, par spectrophotométrie d'une part et par diffraction de la lumière d'un faisceau laser d'autre part. Le cytogramme RBC/VHC résume les données obtenues après analyse des hématies et permet une comparaison visuelle rapide avec les valeurs usuelles de l'espèce concernée.

Après lyse sélective des hématies et des plaquettes, les leucocytes sont colorés spécifiquement afin de déterminer leur activité peroxydasique. Chez le chien, les granulocytes neutrophiles et éosinophiles présentent une forte activité peroxydasique, les monocytes une activité peroxydasique modérée et les lymphocytes une activité peroxydasique de faible à nulle. Le cytogramme PEROX, spécifique d'espèce, illustre les données concernant la taille et l'activité peroxydasique des leucocytes et permet leur classification. Le cytogramme BASO permet de classer les leucocytes à partir de la complexité de leur noyau.

Des cytogrammes normaux et anormaux sont décrits chez le chien et le chat.

Mots-clés : cytogrammes Advia 120, sang, chien, chat.

(1) Laboratoire Vébiotel, 41 bis avenue Aristide Briand, 94117 Arceuil Cedex
Courriel : vebiotel@vebiotel.com

SUMMARY

ADVIA 120 (Siemens diagnostics) is a laboratory automater of hematology which use the flow cytometry technology to characterize cells. Several channels of analysis allow complete numeration and classification of red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), and reticulocytes, as well as hemoglobine determination.

Hemaglobinemia is determined by two methods: one is spectrophotometric and the other is based on the diffraction of a laser beam. Cytograms called RBC/VHC summarize these data for the RBC and compare them to the normal values for the considered species. Usual ranges of values are delimited by lines and areas which allow different possible classification of RBCs.

After lysis of RBC and platelets, white blood cells (WBC) are specifically stained in order to determine their peroxidase activity (correlated with the intensity of the peroxidase staining). All granulocytes stain with peroxidase but with a different degree: neutrophils and eosinophils express a high peroxidase activity, monocytes a moderate peroxidase activity and lymphocytes a very low peroxidase activity. The graph called PEROX, specific for each species, summarizes data concerning size and peroxidase activity of each population of WBC. The graph called BASO is another way to classify the WBC, based on their nuclear complexity.

Normal and some abnormal cytograms of dog and cat are presented here.

INTRODUCTION

La cytométrie en flux est une méthode aujourd'hui très utilisée en hématologie humaine mais encore émergente en médecine vétérinaire. L'ADVIA® 120 (Siemens Diagnostics) est un automate d'hématologie utilisant la technologie de cytométrie en flux pour caractériser les cellules. Différents canaux d'analyse permettent des numérations complètes et des numérations/formules : les canaux hémoglobine, érythrocytes et plaquettes, réticulocytes, peroxydase et complexité nucléaire, ces deux derniers permettant le comptage et la classification des leucocytes.

Comparée aux méthodes plus classiques telles que l'impédancemétrie, la cytométrie en flux est une méthode plus précise de la mesure de chaque constituant de l'hémogramme. Pour chacun d'eux, l'automate effectue un certain nombre de mesures, le résultat de chacune d'elles étant représenté par un point. Le logiciel du cytomètre compile ensuite ces données et les restitue en un nuage de points dans un graphique (appelé cytogramme). Ces graphiques présentent les données du patient par rapport à un masque des valeurs usuelles spécifiques de chaque espèce et sont d'excellents supports visuels pour l'interprétation des données numériques. Les erreurs analytiques sont moins fréquentes car l'appareil utilise, pour la plupart des paramètres, deux méthodes de mesure différentes, en particulier pour l'hémoglobine et les leucocytes : les résultats sont automatiquement comparés par le logiciel qui génère une alerte lorsque des discordances apparaissent. Cette méthode ne dispense toutefois pas de l'examen concomitant d'un frottis sanguin dont le biologiste tire des informations souvent précieuses et complémentaires de celles fournies par les automates.

CONSTRUCTION DES GRAPHIQUES PAR L'ANALYSEUR ADVIA 120**Numération des hématies et mesure de l'hémoglobinémie**

Le sang total prélevé sur EDTA est acheminé vers deux cuves différentes, l'une dans laquelle seront lysés sélectivement les leucocytes et où aura lieu le comptage des hématies et des plaquettes, ainsi que la mesure de l'hémoglobinémie, et l'autre dans laquelle seront lysées sélectivement les plaquettes et les hématies et où aura lieu le comptage et la classification différentielle des leucocytes.

La détermination de l'hémoglobinémie est réalisée par deux méthodes de mesure :

- la spectrophotométrie : après lyse des hématies, l'hémoglobine présente dans la cuve forme, avec le réactif, un complexe cyan-hémoglobine dont on mesure pendant 15 à 18 secondes le spectre d'absorption à 546 nm. Cette mesure surestime l'hémoglobinémie lors de lipémie ou d'hémolyse marquée.
- la seconde est basée sur la diffraction de la lumière d'une source laser : grâce à un système de gaine coaxiale (avec passage de fluides sous pression permettant une individualisation cellulaire), et après une sphérisation isovolumétrique dans une solution de sulfate de sodium dodecyl (Moritz & Becker, 2010), chaque hématie passe individuellement devant le faisceau de lumière. Les rayons lumineux diffractés par la cellule illuminée sont analysés. La diffraction dans les petits angles est corrélée au volume de l'hématie et celle dans les grands angles est corrélée au contenu de l'hématie, c'est-à-dire à l'hémoglobinémie (Weiss & Wilkerson, 2010). Cette méthode n'est pas modifiée par la lipémie ou l'hémolyse (Bauer & Moritz, 2008 ; March *et al.* 2005). Le passage de chaque hématie devant le faisceau laser permet également de réaliser la numération globulaire dans un volume donné.

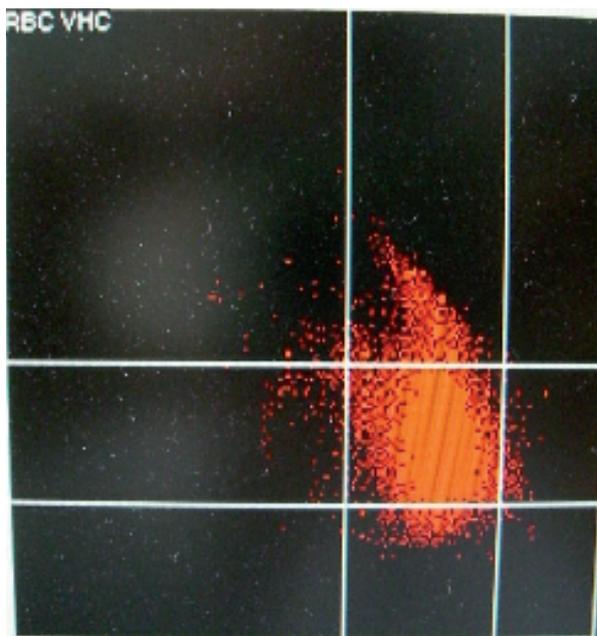


Figure 1 : Cytogramme RBC/VHC d'un chien normal: la concentration en hémoglobine des hématies est représentée sur l'axe des abscisses et leur volume sur celui des ordonnées. La majorité des points du nuage (constitué par les hématies sur ce graphique) est ici incluse dans le carré central délimité par les valeurs usuelles de cette espèce. La plupart des hématies sont donc normocytaires normochromes. Il existe toutefois une petite population qui est au-dessus de la ligne horizontale supérieure mais reste entre les deux lignes verticales: ces hématies sont donc macrocytaires normochromes.

L'automate compile les données obtenues sur une large population d'hématies et construit le cytogramme RBC/V/HC⁽²⁾ présentant le volume des globules rouges (axe des abscisses) en fonction de leur concentration en hémoglobine (axe des ordonnées) (**figure 1**). Le masque de valeurs usuelles à neuf fenêtres, appliqué sur les valeurs obtenues, dépend étroitement de l'espèce animale (celle-ci est choisie par l'opérateur avant le passage du tube) et permet de délimiter des aires d'hyperchromie, normochromie et hypochromie, ainsi que des aires de macrocytose, normocytose et microcytose et donc, de caractériser visuellement la population d'hématies du patient (Moritz *et al.* 2004). Plusieurs populations d'hématies peuvent ainsi être clairement mises en évidence sur un même cytogramme: par exemple, une population d'hématies normales normocytaires normochromes, associée à une population de réticulocytes macrocytaires et légèrement hypochromes et à une population de sphérocytes discrètement microcytaires et hyperchromes (Furtanello *et al.* 2006).

Numération plaquettaire

Les plaquettes sont comptées dans la même cuve que celle des hématies. Après une sphérisation isovolumétrique dans une solution de sulfate de sodium dodecyl, elles sont canalisées par le

système de gaine coaxiale (avec passage de fluide sous pression, permettant une individualisation cellulaire) ; elles passent une à une devant un faisceau laser dont la lumière est diffractée selon un petit angle corrélé au volume de la plaquette et selon un grand angle corrélé au contenu (donc à la granulosité) de la plaquette.

Numération réticulocytaire

Dans la même cuve de comptage que celle des hématies matures et des plaquettes, après une sphérisation isovolumétrique, on ajoute un colorant des acides nucléiques, l'oxazine 750, à l'échantillon. Plus les réticulocytes contiennent d'ARN, plus ils fixent l'oxazine 750 et moins ils sont matures. Canalisés, ils passent ensuite un à un devant le faisceau de lumière ; les caractéristiques de diffraction selon un petit angle (light SCATter) et l'absorbance de chaque cellule sont mesurées (ABS). Le cytogramme RTC/SCAT/ABS (**figure 2**) fournit ainsi des informations sur le volume des réticulocytes et la proportion de chaque catégorie de réticulocytes, des plus jeunes aux plus matures. Les réticulocytes sont en effet différenciés des hématies matures par leur absorbance plus élevée, conséquence de la fixation du colorant sur les résidus d'ARN présents dans leur cytoplasme.

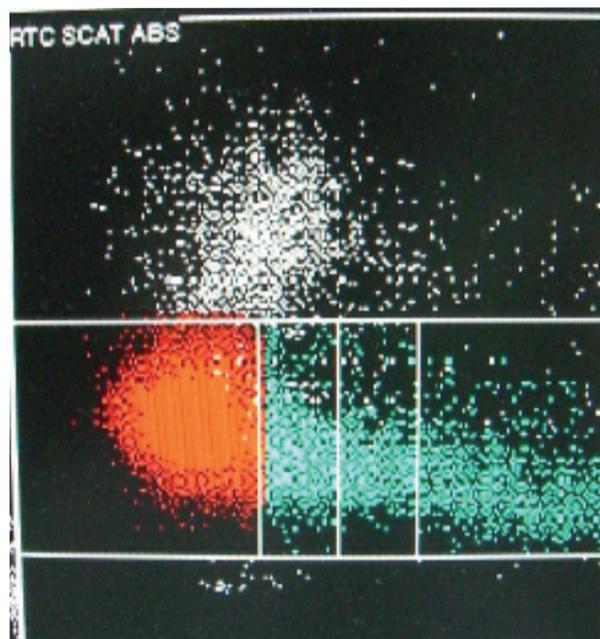


Figure 2 : Le cytogramme RTC/SCAT/ABS fournit des informations sur la proportion de chaque catégorie de réticulocytes (l'absorbance de l'oxazine 750 est représentée sur l'axe des abscisses ; axe des ordonnées : néant). Il traduit ici une anémie régénérative : le nuage de points le plus dense, ici en rouge, représente les hématies matures ; celui de points verts, qui s'étend en queue de comète, représente les réticulocytes. Plus ces derniers sont jeunes et plus ils sont situés à droite sur l'image. Plus ils sont matures et plus ils se rapprochent du nuage de points rouges vers la gauche de l'image.

(2) V et HC respectivement pour *volume* et *hemoglobin* concentration

Numération et classification différentielle des leucocytes

Après lyse sélective des hématies et des plaquettes, les leucocytes sont dénombrés et classés en cinq populations différentes selon deux méthodes.

La première consiste à déterminer l'activité peroxydasique de chaque catégorie de leucocytes par réaction cytochimique avec le 4-chloro-1-naphtol. Les cellules leucocytaires passant devant un faisceau lumineux (généralisé par une lampe au tungstène) sont d'une part, comptées une à une et d'autre part, classées en fonction de l'intensité de leur activité peroxydasique (Moritz & Becker, 2010). Chez le chien, les granulocytes neutrophiles et éosinophiles présentent une forte activité peroxydasique, les monocytes une activité peroxydasique modérée et les lymphocytes une activité peroxydasique faible à nulle. Chez le chat, les granulocytes éosinophiles présentent une activité peroxydasique moins marquée que celle du chien.

Le cytogramme PEROX, spécifique d'espèce (figures 3A et 4), résume les données concernant la taille et l'activité peroxydasique des leucocytes et permet leur identification rapide. La répartition des différentes catégories de leucocytes sur ce graphique est nettement identifiable en fonction de l'espèce. Ainsi, un examen rapide du graphique permet de vérifier qu'aucun erreur n'a été commise concernant l'espèce choisie au moment du passage du tube. Dans le cas où un tube aurait été mal iden-

tifié, identifié par exemple comme provenant d'un chat, alors qu'il s'agit d'un chien, (figure 5), les populations leucocytaires seront mal positionnées sur le graphique puisque le logiciel aura sélectionné un masque PEROX de chien, alors qu'il s'agit d'un chat (Papasouliotis *et al.* 2006 ; Welles *et al.* 2009).

La seconde méthode consiste à lyser la membrane des leucocytes, à l'exception de celle des basophiles, par un bain à l'acide phtalique. Les cellules débarrassées de leur cytoplasme passent ensuite une à une devant un faisceau laser, ce qui permet d'une part leur comptage et d'autre part, leur classification en fonction des caractéristiques de diffraction de la lumière, selon un petit angle et un grand angle corrélés respectivement à la taille du noyau et à sa structure (densité chromatinienne, lobation). Le cytogramme BASO rend ainsi compte de la classification des leucocytes en fonction de leur complexité nucléaire : les cellules à noyaux ronds (comme les lymphocytes) se trouvent le plus à gauche. Les cellules à noyaux un peu moins simples (comme les monocytes et les jeunes neutrophiles) se retrouvent au centre. Les cellules à noyaux complexes (tels les neutrophiles et les éosinophiles matures) sont situées le plus à droite sur le graphique (figure 3B).

La double méthode de comptage et de classification des leucocytes permet un contrôle interne au sein de l'automate puisque les valeurs obtenues sont automatiquement comparées entre elles et que le logiciel génère une alerte lorsque des discordances apparaissent.

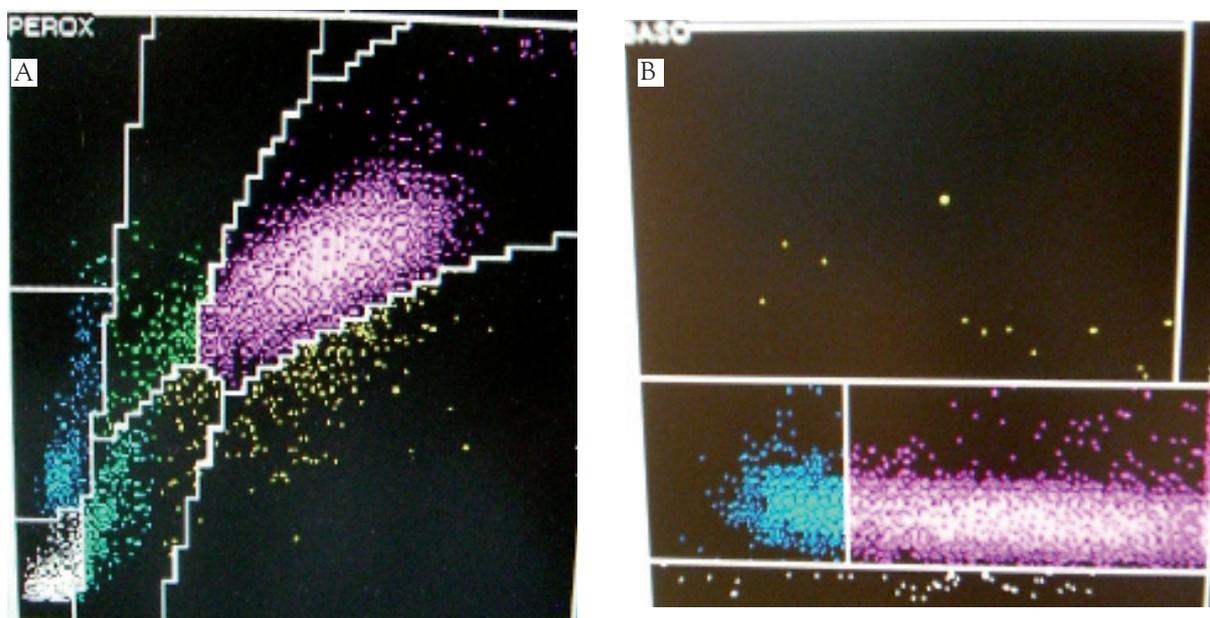


Figure 3 : Représentation des leucocytes chez un chien normal. **A** : Cytogramme PEROX, l'activité peroxydasique cellulaire est représentée sur l'axe des abscisses et le volume cellulaire, sur celui des ordonnées : noter l'aspect étalé vers la droite de l'image des nuages de points. Les points bleus représentent les lymphocytes ; les points verts, les monocytes ; les points roses, les polynucléaires neutrophiles et les points jaunes, les polynucléaires éosinophiles. En bas à gauche, le nuage de points blancs correspond au « bruit de fond », c'est-à-dire aux hématies et aux plaquettes lysées. **B** : Cytogramme BASO, les cellules à noyaux ronds (comme les lymphocytes) se trouvent le plus à gauche. Les cellules à noyaux un peu moins simples (comme les monocytes et les jeunes neutrophiles) se retrouvent au centre. Les cellules à noyaux complexes (tels les neutrophiles et les éosinophiles matures) sont situées le plus à droite sur le graphique.



Figure 4 : Cytogramme PEROX d'un chat normal. Noter l'aspect plus ramassé vers la gauche de l'image des nuages de points. L'activité peroxydasique leucocytaire est représentée sur l'axe des abscisses et le volume leucocytaire, sur celui des ordonnées. Les points bleus représentent les lymphocytes ; les points verts, les monocytes ; les points roses, les neutrophiles. Par rapport au chien, on ne note pas sur ce cytogramme de points jaunes correspondant aux éosinophiles. En bas à gauche, le nuage de points blancs correspond au « bruit de fond », c'est-à-dire aux hématies et aux plaquettes lysées.



Figure 5 : Erreur de manipulation pré-analytique. Le sang d'un chien a été introduit dans le cytomètre mais le manipulateur a indiqué par erreur à l'automate qu'il s'agissait de celui d'un chat. On note immédiatement visuellement qu'il existe un problème sur le cytogramme PEROX : en effet, que le masque PEROX correspond à celui d'un chat. Or les nuages de points sont répartis sur le cytogramme comme ceux d'un chien (ici en particulier, le nuage de points blancs au milieu de l'image représente les neutrophiles de chien, le masque « chat » n'encadre donc pas correctement ce nuage).

PRÉSENTATION DES GRAPHIQUES NORMAUX CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT

Quotidiennement, avant de passer les échantillons de sang des patients, le passage d'un contrôle de qualité interne est indispensable pour vérifier que l'automate fournit bien des valeurs proches de celles attendues (c'est-à-dire comprises généralement entre la valeur cible du Contrôle Qualité ± 2 écarts-types pour un paramètre donné). À cette seule condition, l'analyse du sang des patients peut commencer.

Physiologiquement, la population d'hématies est homogène en volume et en concentration en hémoglobine : on parle de population normocytaire normochrome. Le cytogramme RBC/V/HC représente donc un nuage unique de points concentrés dans le carré central qui délimite les valeurs normales de la concentration en hémoglobine des hématies (axe des abscisses) et de leur volume (axe des ordonnées) (*figure 1*).

Dans le cas où il n'y a ni perte de sang ni hémolyse, le renouvellement des hématies est régulier et la réticulocytose reste faible. Le cytogramme RTC/SCAT/ABS ne présente donc pas un nuage de points abondants en « queue de comète », comme lors d'érythropoïèse accrue (*figure 2*) mais seulement un nuage discret dominé par les réticulocytes les plus matures.

Physiologiquement chez le chien et le chat, la proportion de granulocytes neutrophiles est un peu plus importante que celle des

lymphocytes. Les monocytes et les polynucléaires éosinophiles sont également présents mais en nombre restreint. Le cytogramme PEROX se présente donc sous la forme de nuages de neutrophiles et de lymphocytes marqués et facilement identifiables compte tenu des différences de taille et de l'activité peroxydasique de ces deux populations, auxquels s'ajoutent de petits nuages de monocytes et, chez le chien, d'éosinophiles (*figures 3A et 4*).

Sans foyer inflammatoire ou infectieux actif, la majorité des polynucléaires neutrophiles du chien et du chat, présentant un noyau plurilobé, apparaissent sous forme d'un nuage à droite du cytogramme BASO, tandis que le nuage de lymphocytes, mononucléés, se situe à gauche de ce même cytogramme. Le petit nombre de jeunes neutrophiles et les monocytes forment la population intermédiaire. (*figure 3B*).

PRÉSENTATION BRÈVE DE QUELQUES GRAPHIQUES MODIFIÉS CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT

Les cytogrammes rendus par l'ADVIA 120 viennent souvent corroborer et préciser les valeurs numériques rendues sur l'héogramme. Il est également indispensable de contrôler la morphologie des cellules sanguines en réalisant un frottis sanguin qui permettra de contrôler les valeurs chiffrées de l'héogramme et peut-être également d'affiner les hypothèses diagnostiques.

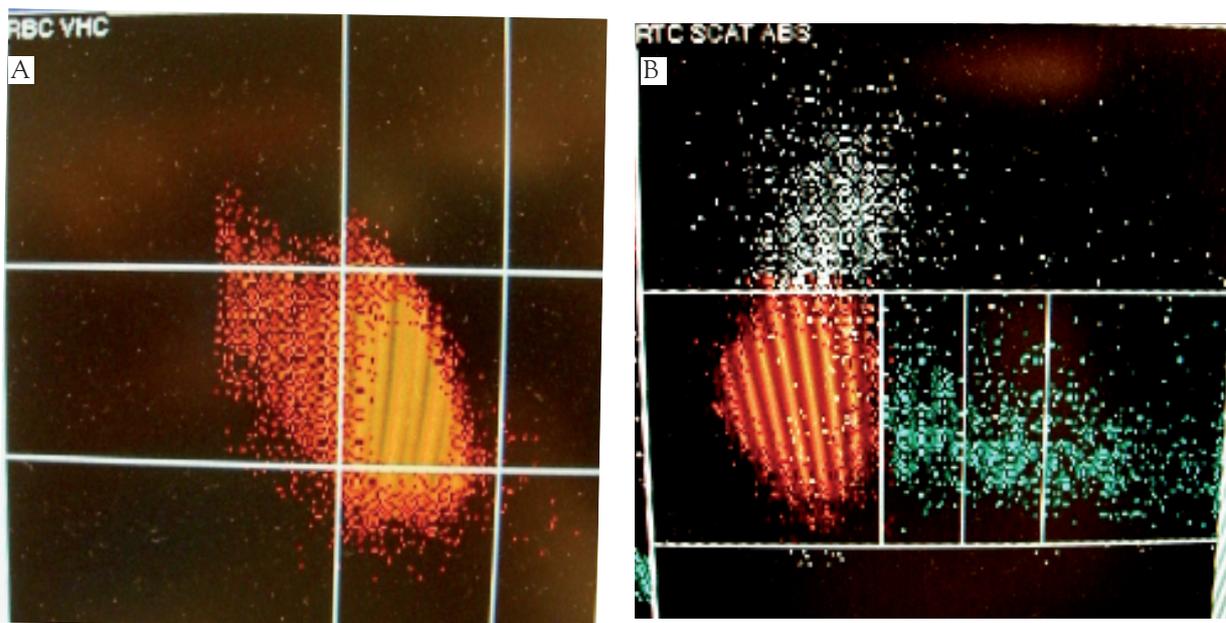


Figure 6 : Diagnostic d'une anémie régénérative. **A :** le cytogramme RBC/VHC est caractérisé par une excoissance du nuage de points formés par les hématies dans l'aire située en haut à gauche qui correspond à la zone macrocytaire hypochrome dans laquelle se situent les réticulocytes. **B :** le cytogramme RTC/SCAT/ABS présente un nuage de points abondants en "queue de comète", correspondant aux réticulocytes (l'absorbance de l'oxazine 750 est représentée sur l'axe des abscisses).

Lors d'anémie régénérative, la moelle osseuse hématopoïétique fabrique et libère dans le sang circulant de jeunes hématies. Le cytogramme RBC/V/HC est alors caractérisé par une excoissance du nuage de points formés par les hématies dans l'aire située en

haut à gauche qui correspond à la zone macrocytaire hypochrome dans laquelle se situent les réticulocytes. Le cytogramme RTC/SCAT/ABS présente un nuage de points abondants en "queue de comète", correspondant aux réticulocytes (**figure 6**).

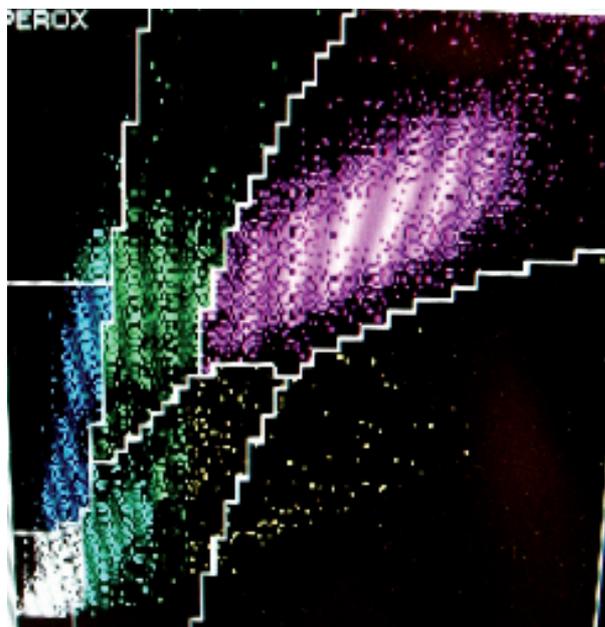


Figure 7 : Hyperneutrophilie chez un chien : noter la forte densité du nuage de points sur le cytogramme PEROX dans la région correspondant aux polynucléaires neutrophiles (points roses).

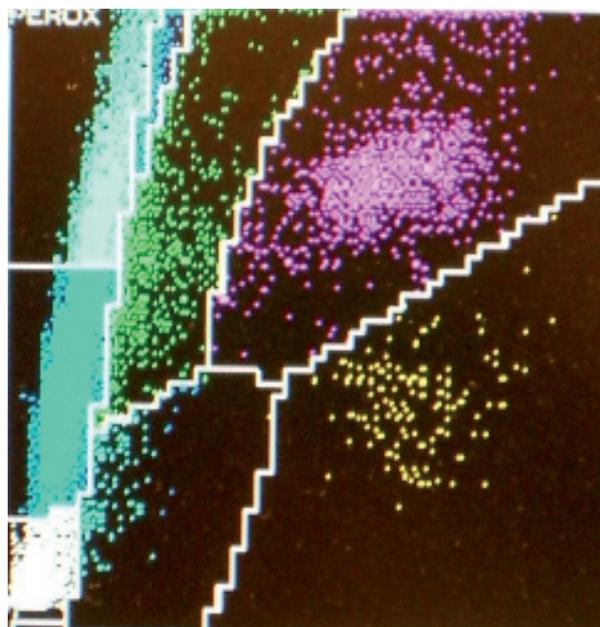


Figure 8 : Leucémie aiguë chez un chien : Noter la densité importante du nuage de points sur le cytogramme PEROX dans la région correspondant aux lymphocytes (points bleus) et aux LUC (points turquoise): lymphocytose majeure avec présence de blastes circulants.

Lors d'anémie ferriprive, le manque de fer ne permet plus à la moelle osseuse de synthétiser correctement et suffisamment d'hémoglobine et une hypochromie des hématies s'installe. Le cytogramme RBC/V/HC est alors caractérisé par une excroissance du nuage de points formés par les hématies dans l'aire située au milieu à gauche, qui correspond à la zone normocytaire hypochrome dans laquelle se situent les hématies dont le contenu en hémoglobine est bas. Si la carence en fer persiste, les hématies synthétisées par la moelle deviennent plus petites que les hématies normales et le nuage de points progresse vers l'aire située en bas à gauche, qui correspond à la zone microcytaire hypochrome (Prins *et al.* 2009).

Lors d'infection purulente, la myélopoïèse est activée et de jeunes polynucléaires neutrophiles, peu lobés (*band cells*), se trouvent expulsés dans le sang circulant pour affluer vers le site de l'infection. Le cytogramme PEROX se caractérise alors par une densification des points situés dans l'aire des neutrophiles (*figure 7*) et le cytogramme BASO par une densification du nuage le plus à gauche correspondant aux noyaux peu complexes (où se retrouvent les jeunes neutrophiles).

Lors de leucopénie, la destruction ou le défaut de production médullaire d'une ou plusieurs catégorie(s) de leucocytes vont entraîner un déficit de points sur les différents nuages corres-

pondant aux différentes populations leucocytaires. Une diminution plus marquée de la densité du nuage de points sur l'une des populations va pouvoir orienter visuellement vers une neutropénie, une lymphopénie et venir corroborer les données rendues sur l'hémogramme.

Lors de leucémie aiguë, la libération dans le sang de cellules très immatures, dites blastiques, génère une densification du nuage de points dans l'aire correspondant au LUC (*Large Unstained Cells*). En effet, du fait de leur immaturité, les blastes ne présentent généralement qu'une activité péroxydasique très faible, voire nulle, et leur grande taille les place au dessus du nuage de points correspondant classiquement aux lymphocytes (*figure 8*).

CONCLUSION

Avec un peu d'entraînement, les graphiques générés par l'Advia 120 pour chaque population de cellules sanguines sont de bons outils d'appréciation visuelle des données chiffrées rendues par ailleurs sur l'hémogramme. L'examen morphologique des cellules sur le frottis sanguin vient ensuite confirmer et affiner les renseignements fournis par les automates.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Serge Rosolen, pour son dynamisme intellectuel et son investissement scientifique.

BIBLIOGRAPHIE

- Bauer, N. & Moritz, A. 2008. Evaluation of three methods for measurement of hemoglobin and calculated hemoglobin parameters with the ADVIA 2120 and ADVIA 120 in dogs, cats, and horses. *Vet Clin Pathol.* 37: 173–179.
- Furtanello, T., Tasca, S., Caldin, M., Carli, E., Patron, C., Tranquillo, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L. 2006. Artefactual changes in canine blood following storage detected using the ADVIA 120 hematology analyzer. *Vet Clin Pathol.* 35: 42–46.
- March, H., Barger, A., McCullough, S., Schaeffer, D., Macwilliams, P. 2005. Use of the ADVIA 120 for differentiating extracellular and intracellular hemoglobin. *Vet Clin Pathol.* 34: 106–109.
- Moritz, A. & Becker, M. 2010. Automated hematology systems. In Schalm's Veterinary Hematology, (eds. D.J Weiss & K.J. Wardrop), pp. 1054-1066. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA.
- Moritz, A., Fickenscher, Y., Meyer, K., Failing, K., Weiss, D.J. 2004. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol.* 33:32–38.
- Papsouliotis, K., Cue, S., Crawford, E., Pinches, M., Dumont, M., Burley, K. 2006. Comparison of white blood cell differential percentages determined by the in-house LaserCyte hematology analyzer and a manual method. *Vet Clin Pathol.* 35: 295–302.
- Prins, M., van Leeuwen, M.W., Teske, E. 2009. Stability and reproducibility of ADVIA 120-measured red blood cell and platelet parameters in dogs, cats, and horses, and the use of reticulocyte haemoglobin content (CH(R)) in the diagnosis of iron deficiency. *Tijdschr Diergeneeskd.* 134 : 272–278.
- Weiss, D.J. & Wilkerson, W.J. 2010. Flow Cytometry. In Schalm's Veterinary Hematology (eds. D.J Weiss & K.J. Wardrop), pp.1074-1081. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA.
- Welles, E.G., Hall, A.S., Carpenter, D.M. 2009. Canine complete blood counts: a comparison of four in-office instruments with the ADVIA 120 and manual differential counts. *Vet Clin Pathol.* 38: 20–29.