



HAL
open science

Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic en médecine vétérinaire

Lola Melin

► **To cite this version:**

Lola Melin. Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic en médecine vétérinaire. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03822887

HAL Id: dumas-03822887

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03822887v1>

Submitted on 20 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2022

**APPORTS DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC EN
MÉDECINE VÉTÉRINAIRE**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 18 janvier 2022

par

Lola, Marie, Anne MELIN

—

Sous la direction de

Delphine LE ROUX

JURY :

Président du jury :	M. Sylvain BELLIER	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Delphine LE ROUX	Maître de Conférences à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Nathalie CORDONNIER	Maître de Conférences à l'EnvA

Liste des personnes intervenant dans l'enseignement



Directeur : Pr Christophe Degueurce
Directeur des formations : Pr Henry Chateau
Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Professeurs émérites : Pr Pascal Fayolle, Pr Bernard Paragon
Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint** : Pr Blot Stéphane

<p>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs - Pr Verwaerde Patrick</p> <p>Discipline : cardiologie - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier contractuel</p> <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie - Dr Pignon Charly, Ingénieur de recherche - Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : dermatologie - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Discipline : ophtalmologie - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de clinique équine - Pr Audigie Fabrice - Dr Bertoni Léila, Maître de conférences - Dr Coudry Virginie, Praticienne hospitalier contractuelle - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Ingénieure de recherche-Praticienne hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tallaj Amélie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel</p>	<p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale - Dr Benckroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Maurey-Guénéec Christelle, Maître de conférences - Dr Mortier Jérémy, Maître de conférences associé</p> <p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Fontbonne Alain - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Manassero Mathieu - Dr Maurice Emeline, Assistante d'Enseignement et de Recherche Contractuelle - Pr Viateau-Duval Véronique*</p>
--	---

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint** : Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments - Dr Bolnot François, Maître de conférences* - Pr Carlier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mtimet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle</p> <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Dr Guétin Poirier Valentine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier contractuel - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences</p>	<p>Unité pédagogique de reproduction animale - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Maufré Vincent, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences* - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew</p> <p>Rattachée DPASP - Dr Wolgust Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle</p>
--	--

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - **Adjoint** : Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline*</p> <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Jouvion Grégory, Professeur associé - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences*</p> <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Épidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marniac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée</p>	<p>Unité de parasitologie, mycologie - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Pr Guillot Jacques - Dr Polack Bruno, Maître de conférences* - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences</p> <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie - Dr Kohlhauser Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud</p> <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticienne hospitalier contractuelle</p> <p>Rattachée DSBP - Mme Dalaine Stéphanie, Professeur agrégée (Sciences de la Vie et de la Terre)</p>
---	--

* responsable d'unité pédagogique

Remerciements

Au Professeur Sylvain Bellier,
Président du Jury de cette thèse et Professeur à l'EnvA,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommage respectueux.

Au Docteur Delphine Le Roux,
Directrice de thèse et maître de conférences à l'EnvA,
Pour m'avoir proposé ce sujet, pour son investissement, son soutien, sa patience et sa
bienveillance tout au long de ce travail,
Sincères remerciements.

Au Docteur Nathalie Cordonnier,
Maître de conférences à l'EnvA,
Pour avoir accepté d'être mon assesseur et m'avoir guidé dans ce travail,
Sincères remerciements.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations	9
Introduction	13
Première partie : CYTOMETRIE EN FLUX : PRINCIPES ET FONCTIONNEMENT	19
A- Principes de fonctionnement	19
1- Composition d'un cytomètre	19
a- Le système fluïdique	20
b- Le système optique	21
c- Le système électronique	22
2- Les différents signaux optiques cellulaires collectés	22
3- Analyse des résultats	23
4- Le tri cellulaire	24
B- Les différents modèles de cytomètres	25
C- Avantages et limites de la CF	26
1- Vitesse d'analyse	26
2- Types de prélèvement	27
3- Résultats fournis par la CF	28
4- Le coût d'analyse	28
Deuxième partie : CYTOMÉTRIE EN FLUX ET ONCOLOGIE	31
A- Pour le diagnostic des lymphomes et leucémies chez le chien et le chat	31
1- Généralités	31
a- Hématopoïèse	31
b- Définition des hémopathies malignes : lymphomes et leucémies.	43
c- Classification des différentes hémopathies malignes	43
2- Processus diagnostique	53
a- Symptômes	53
b- Hémogramme et frottis sanguin	56
c- Autres examens sanguins	59
d- Cytologie et histologie	59
e- Immunomarquage	62

3- Les apports de la cytométrie en flux	62
a- Précision du diagnostic	62
b- Rapidité d'analyse	67
c- Affinage du pronostic	68
d- De nouvelles pistes de traitement	70
e- Suivi de la maladie résiduelle minimale	73
B- Pour la recherche de nouveaux biomarqueurs	75
1- Généralités	75
2- Les MDSC : cellules myéloïdes suppressives (Myeloid Derived Suppressor Cells)	76
a- Que sont ces cellules ?	76
b- Phénotypes et marqueurs	76
c- Avancées récentes en oncologie vétérinaire	78
TROISIÈME PARTIE : CYTOMÉTRIE EN FLUX ET MALADIES AUTO-IMMUNES TOUCHANT DES ÉLÉMENTS FIGURÉS DU SANG.	81
A- Anémie hémolytique auto-immune	81
1- Généralités	81
a- Erythropoïèse et érythrolyse	81
b- Etiopathogénie des anémies auto-immunes	83
c- Classification des anémies auto-immunes	84
2- Processus diagnostic	86
a- Symptomatologie	86
b- Hématologie	87
c- Immunologie	89
3- La cytométrie de flux	90
a- Possibilités apportées par la CF	91
b- Limites de la technique	93
B- Thrombocytopénie auto-immune	94
1- Généralités	94
a- Morphologie et données numériques	94
b- Thrombopoïèse et destruction des thrombocytes	94
c- Pathogénie des thrombopénies auto-immunes	96
d- Epidémiologie des thrombopénies auto-immunes	97
2- Processus diagnostique	97
a- Signes cliniques	98
b- Hématologie	98
c- Immunologie	100
3- Possibilités apportées par la CF et ses limites	103
a- Test performant dans la détection des APA	103
b- Echantillons moins contraignants	104
c- Caractère régénératif de la thrombopénie	104
d- Réponse au traitement	105
e- Distinction thrombopénie à médiation immune primaire ou secondaire	105

Conclusion

107

Liste des références bibliographiques

109

Liste des figures

Figure 1 : Détail de la chambre d'hydrofocalisation (Crosland-Taylor, 1953)	14
Figure 2: Diagramme de l'appareil (Kamentsky et al., 1965). AMP : photoamplificateur, PMT : photomultiplicateur, d/dt : circuit différentiel, X et Y : entrées du signal, Z : Modulateur d'intensité.	15
Figure 3: Résultats obtenus après l'analyse de cellules métastatiques, kératinisées à pH 2,1 d'un carcinome épidermoïde(a), les mêmes cellules à un pH 3,8 (b), cellules épithéliales saines du colon (c), cellules épithéliales vaginales saines (d) et des cellules d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus (e). L'absorption est représentée en ordonnée et la taille de la cellule en abscisse (Kamentsky et al., 1965).	15
Figure 4: Composants principaux du FACS (Herzenberg et al., 1976)	16
Figure 5: Composition d'un cytomètre en flux (Nicoletti, 2013)	19
Figure 6: Le point d'interrogation ou "focus point" : lieu de rencontre entre le faisceau lumineux et le flux de cellules (Nicoletti, 2013)	20
Figure 7: Principe d'hydrofocalisation (Nicoletti, 2013)	20
Figure 8: Banc optique du FACScalibur™ de BD Biosciences® (Nicoletti et al., 2013)	21
Figure 9: Définition du FSC et du SSC (Adan et al., 2017)	22
Figure 10 : Création d'un histogramme mono-paramétrique représentant l'intensité de fluorescence de la sonde FITC à partir des résultats présents dans le tableau (Duperray, 2020)	23
Figure 11 : Identification des sous populations lymphocytaires dans des dot plot bi-paramétriques grâce à un marquage CD3/CD4 (Zafrani et al., 2017)	23
Figure 12: Principe du tri cellulaire dans un cytomètre en flux (Duperray, 2020)	24
Figure 13: L'ACCURI™ C6 Plus (BD Biosciences, 2019a)	25
Figure 14: Le FACSCanto™ (BD Biosciences, 2019b)	25
Figure 15: Le LSRFortessa™ (BD Biosciences, 2019c)	26
Figure 16: Différenciation des différentes lignées hématopoïétiques (Roitt et al, 1997). MDP : précurseur commun aux monocytes et au TC : Lymphocyte T cytotoxique, TH : Lymphocyte T helper, B : Lymphocyte B, NK : Natural Killer	32
Figure 17: Hématopoïèse de la lignée B avec l'expression des différents CD en fonction du stade de différenciation dans la moelle osseuse (Plonquet, 2013)	34
Figure 18: Recombinaison de l'ADN lors de la commutation de classe (Abbas et Lichtman, 2010)	35
Figure 19: Voies d'activation des LB lors de la rencontre avec un AgT-dépendant et un Ag T-indépendant (Cancro et al., 2017).	35
Figure 20: Différenciation lymphocytaire B et désordres lymphoprolifératifs associés chez le chien (Deleglise, 2010)	37
Figure 21: Sélection positive et négative des LT double positif dans le thymus (Abbas et al., 2010)	38
Figure 22: Stimulation, prolifération, différenciation des LT naïfs (ici en LT cytotoxiques) (Carbone et al., 2017)	40
Figure 23: Différenciation lymphocytaire T et les désordres lymphoprolifératifs associés chez le chien (Deleglise, 2010)	41
Figure 24: Récepteurs intervenant dans l'activation des NK (Institut National de Recherche Pédagogique , 2002).	42
Figure 25: Lymphoblastes présents dans le sang d'un chien atteint de LAL - coloration Wright-Giemsa. (Harvey, 2015a)	57
Figure 26: Algorithme de marquages cytochimiques utilisé dans la distinction des différentes LA (Feldman et al., 2000)	58
Figure 27: Sites de prélèvement de moelle osseuse représentés sur un squelette de chien (Grindem et al., 2002)	60
Figure 28 : Différentes étapes menant à la cytologie sur cytoponction à l'aiguille fine	61
Figure 29: diagramme mesurant le SSC et FSC des LB après une aspiration à l'aiguille fine. A gauche dans le cas d'un nœud lymphatique réactionnel, à droite dans le cas d'un lymphome à grandes cellules B (Riondato et Comazzi, 2021)	66

Figure 30 : phénotype aberrant lors d'un lymphome B sur une cytoponction de nœud lymphatique : la population CD21+CD45- présente un phénotype aberrant par l'absence de CD45 (Comazzi et Gelain, 2011).	67
Figure 31: les sous-types de MDSCs (adapté de Gabrilovich et Nagaraj, 2009).	77
Figure 32: Différentes étapes de l'érythropoïèse (Arlet, 2013).	82
Figure 33: Erythrocyte (flèche blanche) et réticulocyte (flèche noire) (Harvey, 2015)	82
Figure 34: Lyse intravasculaire des hématies, adapté de L'italien et Leblanc, 2008.	83
Figure 35: Lyse intravasculaire et intravasculaire des hématies (Petz et Garatty, 2003)	84
Figure 36: Principe du test de Coombs (Harvey, 2015b)	90
Figure 37: Résultat d'une analyse en CF visant à identifier les réticulocytes à l'aide d'orange thiazole (Wilkerson, 2012).	91
Figure 38: Recherche des auto-Ac dirigés contre les hématies (Quigley et al, 2001)	92
Figure 39: Plaquettes saines en agrégat chez un chien (Harvey, 2015c)	94
Figure 40: La différenciation plaquettaire et sa régulation dans la moelle osseuse (Eto et Kunishima, 2016)	95
Figure 41: Principe du test ELISA indirect, d'après (Zuchuat, 2017)	103
Figure 42: Résultat d'une analyse de CF visant à identifier les RP à l'aide d'orange thiazole. Les plus petites cellules marquées (en rouge) sont les RP, les cellules vertes sont les réticulocytes (Wilkerson, 2012)	105

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux CD utilisés chez le chien (Feldman et al., 2000 ; Wilkerson et al., 2005 ; Antibodies-online, 2021)	17
Tableau 2: Chronologie d'apparition des différents marqueurs lymphocytaires B (Chatenoud, 2012)	36
Tableau 3 : Chronologie d'expression des différents marqueurs lors de la maturation des LT (Plonquet, 2004)	39
Tableau 4: Classification des leucémies aiguës myéloïdes (Jain et al, 1991)	47
Tableau 5: Complications et signes cliniques associées dans les leucémies chez les carnivores domestiques (Dobson et al., 2006)	55
Tableau 6: Différents Ag CD identifiés chez les animaux d'après Feldman et al., 2000.	63
Tableau 7 : Valeurs de référence des différents marqueurs de lymphocytes dans le sang chez le chien sain	64
Tableau 8: valeurs de référence des différents marqueurs de lymphocytes dans le sang chez le chat sain	65
Tableau 9: Valeur de référence en pourcentage des différents marqueurs de lymphocytes dans un nœud lymphatique de chien sain (Gibson et al., 2004 ; Rütgen et al., 2015)	66
Tableau 10: Les différentes classes d'anémie hémolytiques auto-immunes (Chabanne, 2006)	85

Liste des abréviations

Ac : anticorps

ADCC : Antibody-Dépendent Cell-mediated Cytotoxicity

Ag : antigène

ADN : acide désoxyribonucléique

AHAI : anémie hémolytiques auto-immunes

ALAT : alanine transaminase

APA : Anticorps antiplaquettaires

ARN : acide ribonucléique

BCR : récepteur des LB

BD : Becton Dickinson

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CPA : cellule présentatrice de l'antigène

CD : Cluster de Différenciation

CF : Cytométrie en flux

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Ethylènediaminetétraacétate

FACS : Fluorescence-activated cell sorting.

FeLV : virus leucémogène félin

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FIV : virus d'immunodéficience féline

FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3

FSC : paramètre Forward Scatter

GGT : gamma-glutamyltransférase

Ig : immunoglobuline

KAR : Killer cell Activator Receptor

KIR : Killer cell Inhibitor Receptor

LA : Leucémie aigue

LAL : Leucémie aigüe lymphoïde

LAM : Leucémie aigüe myéloïde

LB : lymphocyte B

LC : leucémie chronique

LCR : liquide céphalo-rachidien

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LMC : leucémie myéloïde chronique

LT : lymphocyte T

LTh : Lymphocyte T helper

LTreg : Lymphocyte T régulateur

MDSC : cellule myéloïde suppressive

NK : Natural Killer

NL : nœuds lymphatiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAL : phosphatases alcalines

PAX5 : Paired Box 5

PBA : test de détection des Ac antiplaquettaires

PBMC : cellule mononuclée du sang périphérique

PBS : tampon phosphate salin

PDF : produit dégradation de la fibrine

PFA : paraformaldéhyde

PRCA : aplasie de la lignée érythrocytaire

PU/PD : polyuro/polydypsie

RAG1 et RAG2 : enzyme recombination activating gene 1 et 2

RP : plaquettes réticulées

RS : cellules de Reed-Sternberg

SSC : paramètre Side Scatter

TCK : Temps de Cephaline Kaolin

TQ : Temps de Quick

TLR : récepteur de type Toll

VIH : virus immunodéficience humain

Introduction

Depuis Pasteur et les grandes avancées en immunologie du XIX^e siècle, d'autres chercheurs ont essayé d'identifier les éléments de la réponse immunitaire, aussi bien solubles que cellulaires. Avec la microscopie optique, il a été possible de distinguer les cellules sanguines, appelées Globules Blancs, des Globules Rouges. Ces cellules nucléées sont de différents types et certaines colorations permettent d'identifier par exemple, différents sous-groupes comme les polynucléaires, les monocytes et les lymphocytes. Ainsi, l'hémogramme, ou numération formule sanguine, s'établissait à l'aide du microscope et permettait, en comptant cent globules blancs sur un frottis sanguin (étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre) d'établir des pourcentages pour chaque sous-population. Or cette technique est longue et fastidieuse, ainsi des automates de formulation ont vu le jour dès les années 30. En effet, en 1934, Moldovan publie dans le célèbre journal scientifique *Science*, le premier article expliquant le comptage de cellules circulant dans un tube capillaire devant un détecteur photoélectrique, qu'on appellera plus tard la cytométrie de flux (CF) (Moldovan, 1934 ; Davey, 2000).

Les techniques d'immunomarquages voient le jour en 1906, quand Obermayer et Pick visualisent un antigène (Ag) au moyen d'un anticorps (Ac) marqué par un colorant. Mais c'est à partir des années 1940 que l'immunofluorescence connaît son évolution en une technique exacte (Federlin, 1965). Les fluorochromes ou sondes fluorescentes sont des colorants activés par une stimulation lumineuse à une longueur d'onde d'excitation donnée et émettent à une longueur d'onde d'émission donnée propre à chaque fluorochrome. Ils peuvent être fixés sur des Ac dirigés contre les structures ou molécules d'intérêt dans les tissus à la surface des cellules ou en intracellulaire. En utilisant des filtres sélectifs, seule la lumière émise par les fluorochromes est visible (Stern, 2017).

La cytométrie en flux (CF) est l'étude précise de particules isolées entraînées par un flux liquide. Elle permet la caractérisation individuelle de chaque cellule contenue dans un échantillon liquide, en les faisant passer une par une devant un laser. La lumière diffusée ainsi que l'émission fluorescente (lors d'utilisation de fluorochromes) sont mesurées. Un système informatique transforme ces signaux lumineux en signaux électronique. Les résultats donnent ensuite des informations sur la taille de la cellule, sa complexité interne, ainsi que la présence et la quantité de fluorochromes marquant des Ag spécifiques à sa surface (Tarrant, 2005).

Les progrès de la science ont mené progressivement aux cytomètres actuels. En 1953, un appareil est créé par Crosland-Taylor qui utilise pour la première fois la focalisation hydrodynamique. Elle permet une délivrance reproductible de cellules en suspension dans un fluide, à travers le capillaire. Le détail de cet appareil est présenté dans la Figure 1 ci-dessous (Crosland-Taylor, 1953). Brièvement, l'appareil est rempli d'eau distillée qui entre par les tubes (2) et (2a) et passe dans les tubes (3) puis (4) puis le vortex (5). Les cellules à analyser sont en suspension et passent à travers l'aiguille (1) puis le tube (3) pour être analysées en (4). Le flux de ces cellules s'affine et sa vitesse augmente à mesure qu'il se rapproche du vortex. Une pression négative de 25 mmHg est appliquée sur le vortex. La même année, Coulter breveta un appareil de comptage des cellules sanguines par détection de

conductivité électrique dans la solution lors du passage de particules. L'amplitude de cette variation est proportionnelle au volume de la cellule (Coulter, 1949). En effet, les médecins avaient besoin de moyens rapides, précis et faciles d'utilisation, pour dénombrer les cellules sanguines afin de poser des diagnostics. Le compteur Coulter fut rapidement utilisé largement pour compter les globules rouges chez l'humain (Brecher *et al.*, 1956 ; Shapiro, 2004).

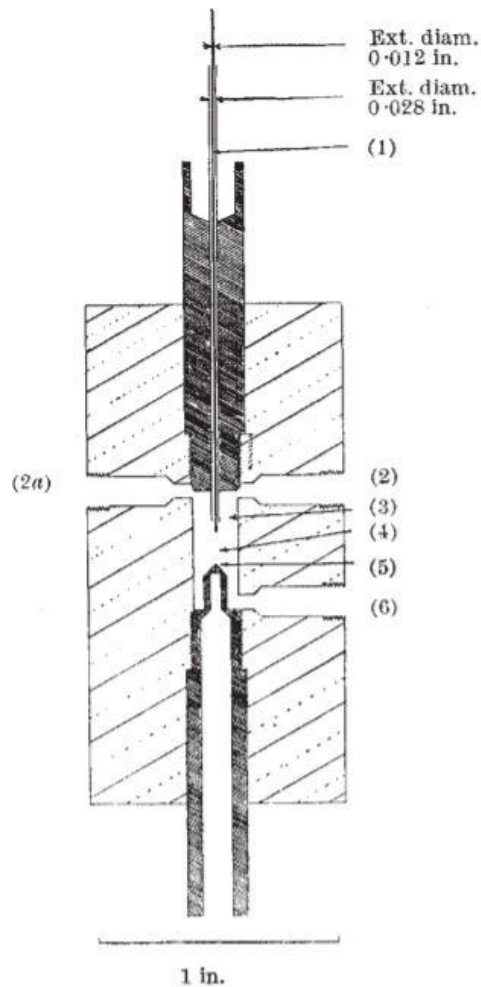


Figure 1 : Détail de la chambre d'hydrofocalisation (Crosland-Taylor, 1953)

En 1965, la spectrophotométrie est utilisée par Kamentsky *et al.* afin de permettre la mesure du taux d'acide nucléique, coloré par de l'orange acridine, au sein de chaque cellule traversant un faisceau laser. Moins le photodétecteur recevait de lumière, plus la cellule était riche en acide nucléique. La taille des cellules était également mesurée grâce à la diffusion de la lumière. Les résultats étaient donnés sur un oscilloscope sur lequel chaque cellule était représentée par un point. Le résultat de l'analyse d'un échantillon était représenté par un nuage de points répartis sur deux axes représentant la quantité d'acide nucléique présent dans la cellule et la taille de celle-ci. La figure 2 est une représentation de l'appareil. La figure 3 présente les résultats obtenus par l'analyse de différentes cellules (Kamentsky *et al.*, 1965).

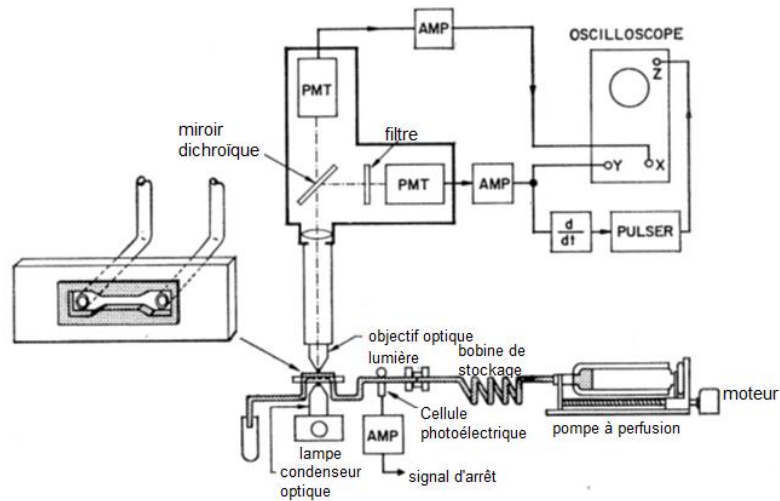


Figure 2: Diagramme de l'appareil (Kamentsky *et al.*, 1965). AMP : photoamplificateur, PMT : photomultiplicateur, d/dt : circuit différentiel, X et Y : entrées du signal, Z : Modulateur d'intensité.

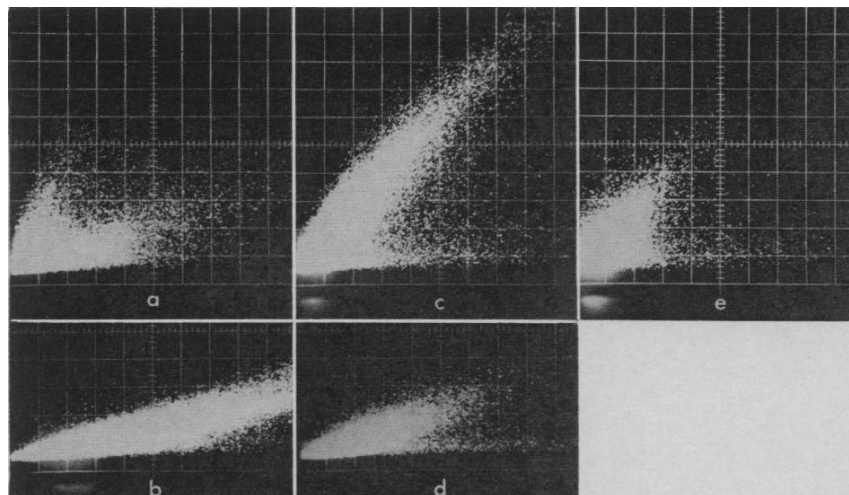


Figure 3: Résultats obtenus après l'analyse de cellules métastatiques, kératinisées à pH 2,1 d'un carcinome épidermoïde (a), les mêmes cellules à un pH 3,8 (b), cellules épithéliales saines du colon (c), cellules épithéliales vaginales saines (d) et des cellules d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus (e). L'absorption est représentée en ordonnée et la taille de la cellule en abscisse (Kamentsky *et al.*, 1965).

En 1974, la cytométrie de flux moderne apparaît avec le trieur de cellules activées par fluorescence (FACS), mis sur le marché par Becton Dickinson® (BD®), il utilise un laser à l'argon et deux détecteurs optiques permettant de mesurer respectivement la fluorescence et la dispersion lumineuse. La composition simplifiée du FACS est présentée en Figure 4 (Herzenberg *et al.*, 1976).

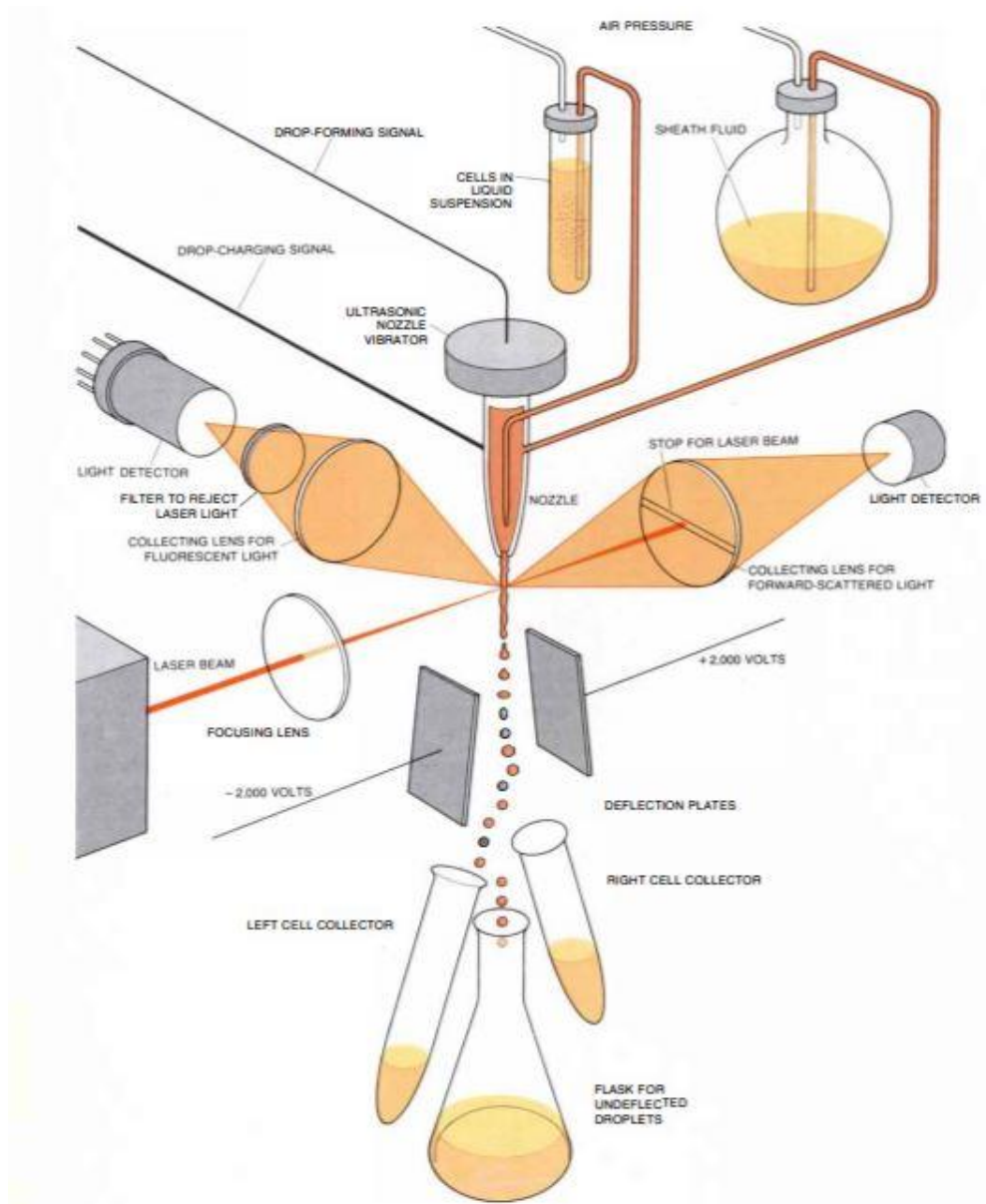


Figure 4: Composants principaux du FACS (Herzenberg *et al.*, 1976)

Au même moment, Köhler et Milstein réussissent à produire des Ac monoclonaux spécifiques à partir d'hybridomes de plasmocytes murins (Köhler et Milstein, 1975). Ces Ac monoclonaux sont très spécifiques pour leur Ag respectif et sont ensuite très facilement couplés à des fluorochromes. Cette découverte permit le développement massif de la CF en tant que standard tant dans le domaine de la recherche que dans le domaine de la médecine clinique. C'est ainsi qu'il fut découvert, grâce au FACS, une centaine d'Ag présents à la surface ou dans les cellules. Le FACS permet également le développement de nouveaux Ac monoclonaux en triant les hybridomes obtenus suite à une nouvelle fusion, permettant ainsi la conservation de clones sécrétant de nouveaux Ac monoclonaux, même présents en faible quantité (Herzenberg *et al.*, 2002). C'est ainsi que les connaissances sur les sous-populations de lymphocytes ont grandement avancé. Le FACS permet alors d'avancer dans la distinction des sous-populations de lymphocytes, qui sont morphologiquement et structurellement

très proches mais fonctionnellement différents et dont les différences de constitutions membranaires sont infimes (Herzenberg *et al.*, 1976). La combinaison des glycoprotéines membranaires, utilisées comme marqueurs, forme le phénotype de la cellule. Ces marqueurs membranaires sont détectés à l'aide d'Ac monoclonaux, couplés à des fluorochromes et révélés par l'analyse dans un cytomètre en flux, on parle d'immunomarquages. Ces marqueurs sont appelés « classe de différenciation » (CD) et ont été regroupés dans une nomenclature pour la première fois en 1982. L'immunophénotype des cellules est alors désigné par la combinaison des CD exprimés (CD⁺) et des CD absents (CD⁻) (Fanfano, 2018).

Ainsi les cellules sanguines ont été immunophénotypées et peuvent être décrites sous forme de combinaison de CD. Les leucocytes sont porteurs de CD45. Les lymphocytes se divisent en lymphocytes B (LB) caractérisés par CD21⁺ et en lymphocytes T (LT) caractérisés par CD3⁺. Les LT se divisent quant à eux en LT cytotoxiques porteurs de CD8⁺ et en LT helper porteur de CD4⁺. Le tableau 1 reprend les principaux CD utilisés chez le chien.

Tableau 1: Principaux CD utilisés chez le chien (Feldman *et al.*, 2000 ; Wilkerson *et al.*, 2005 ; Antibodies-online, 2021)

Ag	Spécificité
CD3	LT
CD4	LT helper
CD8	LT cytotoxiques
CD14	Monocytes
CD21	LB mature
CD34	Cellules souches et cellules précurseurs
CD41/CD61	Plaquettes
CD45	Leucocytes
CD49	LB
CD172a	Granulocytes et monocytes

Première partie : CYTOMETRIE EN FLUX : PRINCIPES ET FONCTIONNEMENT

A- Principes de fonctionnement

La CF est une technique de mesure et d'analyse multiparamétrique de particules en suspension. Les caractéristiques de chaque particule sont mesurées grâce à un système optique, couplé à un système électronique qui enregistre la dispersion de la lumière incidente et l'émission de fluorescence par les particules exposées à une source d'excitation laser. Les particules sont séparées les unes des autres et mises en suspension grâce au principe d'hydro-focalisation.

1- Composition d'un cytomètre

Un cytomètre en flux est une machine complexe qui présente trois systèmes : un système fluide, un système optique et un système électronique (Figure 5). Un système de tri cellulaire peut s'ajouter à cette base.

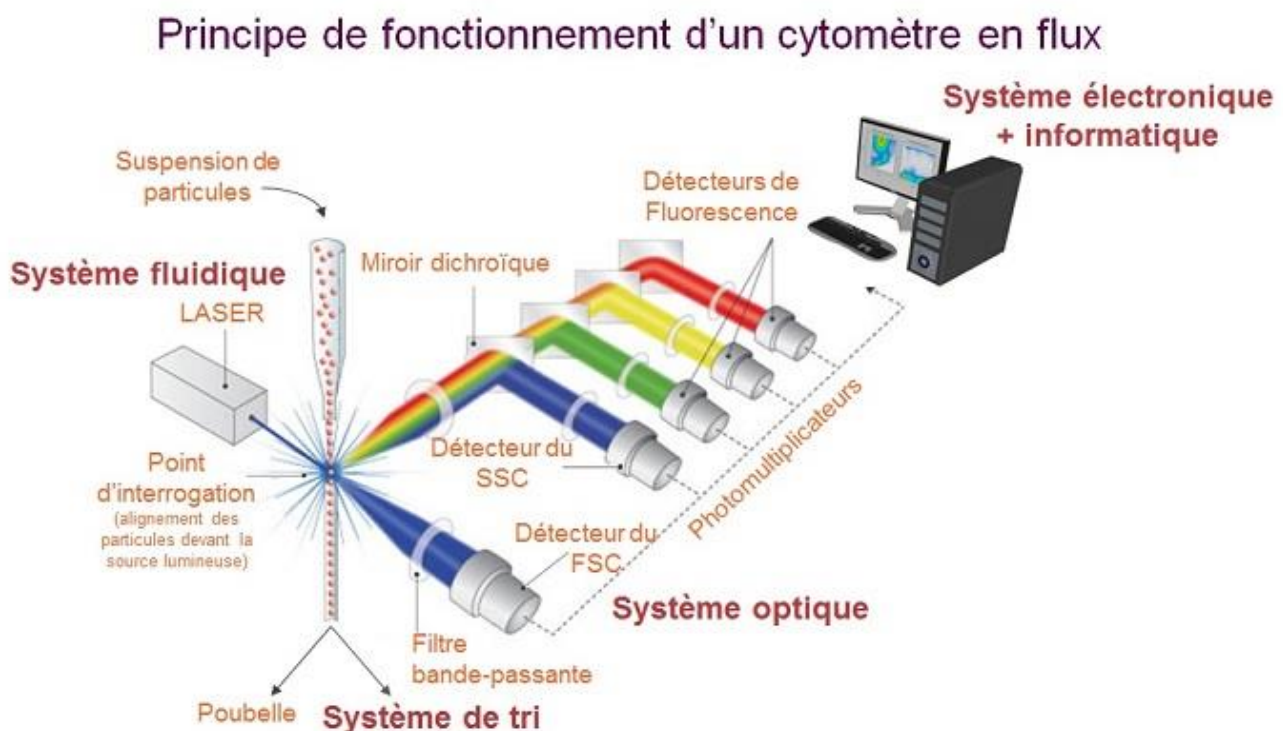


Figure 5: Composition d'un cytomètre en flux (Nicoletti, 2013)

a- Le système fluide

Le système fluide entraîne les particules depuis le tube de l'échantillon jusqu'au point d'interrogation, « focus point » en anglais, point auquel la particule est soumise au laser (Figure 6). La solution de particules en suspension est amenée par un injecteur au centre d'une buse, dans laquelle le liquide dit « de gaine » est poussé avec une pression plus ou moins élevée (Figure 7). Les deux flux sont laminaires, co-axiaux mais ne se mélangent pas. La vitesse de défilement peut être modifiée en modulant la pression du liquide de gaine. La qualité des mesures est affectée par la pression du liquide de gaine ainsi que par sa nature. En effet si la vitesse de défilement des cellules est trop élevée, la qualité des mesures ainsi que le centrage du flux diminuent, ce qui induit une modification de la fluorescence (Shapiro, 2005 ; Ronot *et al.*, 2006 ; Nicoletti *et al.*, 2013).

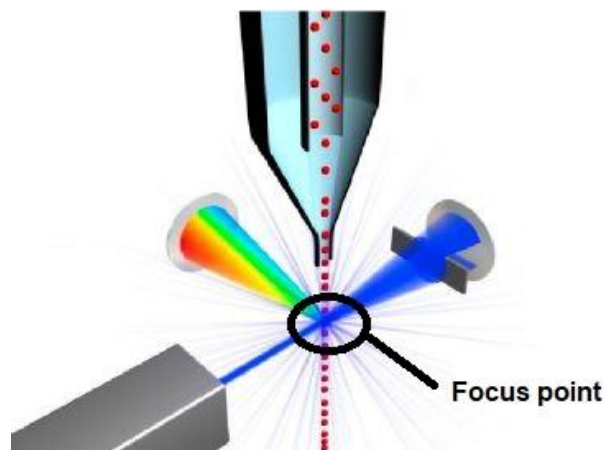


Figure 6: Le point d'interrogation ou "focus point" : lieu de rencontre entre le faisceau lumineux et le flux de cellules (Nicoletti, 2013)

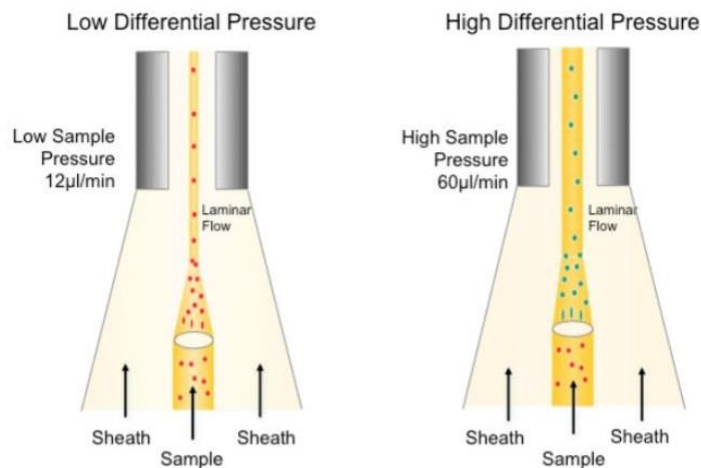


Figure 7: Principe d'hydrofocalisation (Nicoletti, 2013)

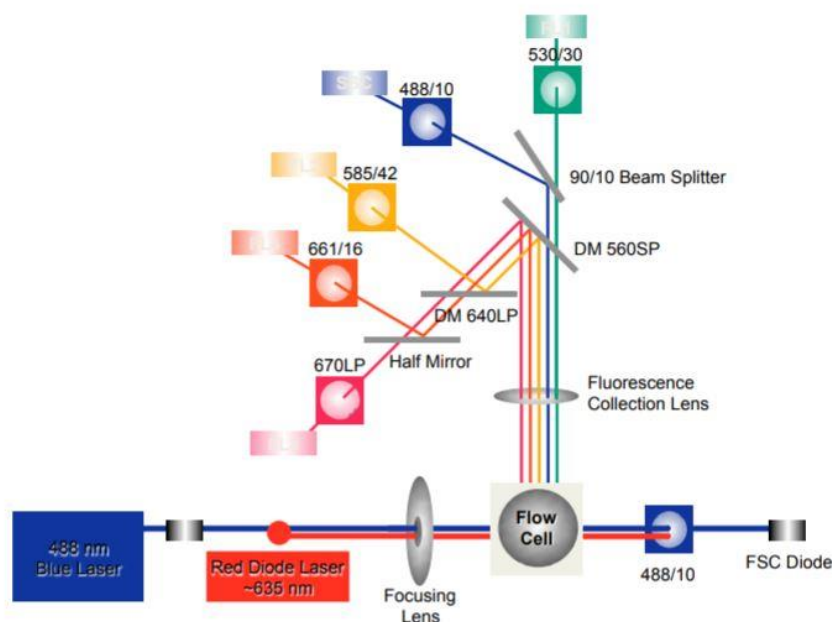
b- Le système optique

Le système optique comprend les sources lumineuses ainsi que les filtres optiques qui séparent la lumière émise par la cellule et la dirigent vers les détecteurs (Ronot *et al.*, 2006).

La source lumineuse est constituée d'un laser et de lentilles optiques qui focalisent le rayon lumineux. Le laser se caractérise par sa longueur d'onde qui est spécifique du gaz utilisé dans le laser. Le laser le plus fréquemment utilisé est le laser à l'argon, émettant à une longueur d'onde de 488nm. Les cytomètres peuvent être équipés de plusieurs lasers permettant d'étendre le spectre d'activation des fluorochromes utilisés. On retrouve très fréquemment la diode laser rouge émettant à 635nm, le laser violet à 405nm, l'ultraviolet à 375nm ou le vert-jaune à 540nm (Nicoletti *et al.*, 2013).

C'est au « focus point » que le faisceau lumineux rencontre la particule à analyser et subit des modifications tant en intensité qu'en direction et en couleur. Ces nouveaux signaux émis par la particule sont reçus et enregistrés par des détecteurs. Ils peuvent être de différents types : photodiode, récepteur optique qui transforme le signal lumineux en signal électrique, et des photomultiplicateurs, récepteurs optiques qui transforment les photons émis par la fluorescence en signal électrique. Les photomultiplicateurs sont équipés de filtres optiques qui permettent de séparer les différentes longueurs d'onde, ainsi que d'amplificateurs qui permettent la détection des signaux issus de la fluorescence qui sont souvent trop faibles pour être détectés et enregistrés sans amplification (Nicoletti *et al.*, 2013). Le banc optique du FACScalibur™ commercialisé par BD Biosciences® est schématisé dans la Figure 8. Les lasers bleu et rouge sont focalisés sur le flux de particules, après passage dans une lentille convergente. Une photodiode capte les signaux lumineux faiblement déviés. Les signaux lumineux fortement déviés sont ensuite filtrés en fonction de leur longueur d'onde pour être distribués à leurs photomultiplicateurs respectifs.

Figure 8: Banc optique du FACScalibur™ de BD Biosciences® (Nicoletti *et al.*, 2013)



c- Le système électronique

Le système électronique convertit la lumière reçue en signaux électroniques analysables par l'ordinateur. Le premier élément de ce système est un détecteur (photodiode ou photomultiplicateur) qui transforme les photons reçus en courant électrique. La numérisation du signal se fait au moyen d'un convertisseur qui transforme un voltage en valeur numérique. Les données sont ensuite enregistrées sous forme de liste de valeur pour chaque paramètre (issus des différents détecteurs : taille, granulométrie...) et pour chaque cellule (Ronot *et al.*, 2006).

2- Les différents signaux optiques cellulaires collectés

Les cytomètres en flux mesurent les signaux lumineux émis par la particule (Figure 9) :

- Par dispersion. Lorsqu'une particule croise le faisceau laser, la lumière incidente se disperse. La dispersion aux petits angles donne le paramètre Forward Scatter (FSC) et se mesure dans l'axe de la lumière incidente. Le FSC est proportionnelle à la taille de la particule. La dispersion aux grands angles (90°) de la lumière diffractée donne le paramètre Side Scatter (SSC) qui est dépendante de la granularité et de la complexité relative de la particule. Cela permet d'identifier les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes. Ces différents signaux lumineux sont représentés sur la figure 9.
- Par fluorescence. Les fluorochromes absorbent l'énergie du laser et la restitue en produisant un rayon lumineux d'une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière reçue. Des Ac monoclonaux couplés à des fluorochromes sont ajoutés à l'échantillon, afin de réaliser des immunomarquages révélant des Ag d'intérêt. Ces signaux lumineux sont ensuite dirigés par des filtres optiques vers les détecteurs (Nicoletti *et al.*, 2013).

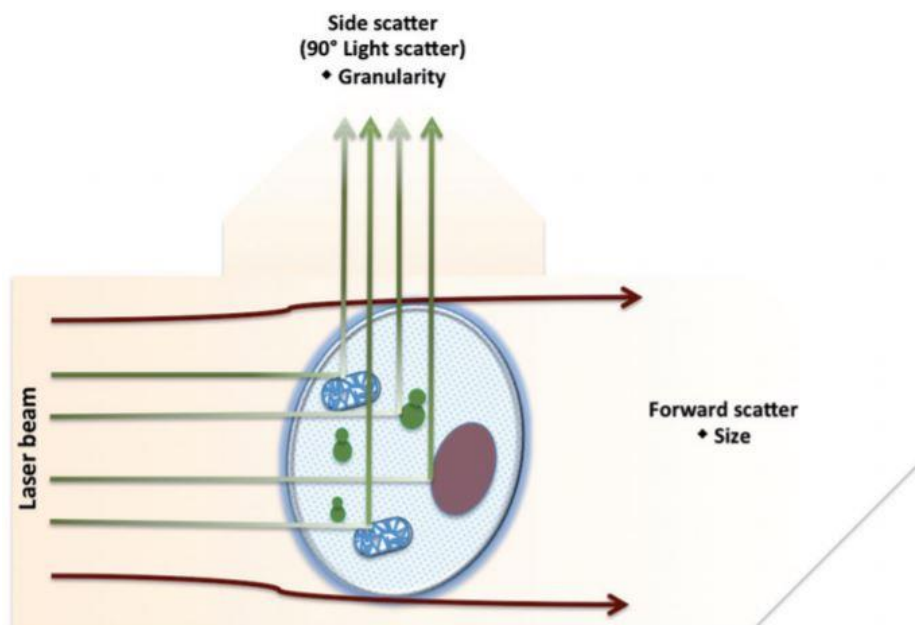


Figure 9: Définition du FSC et du SSC (Adan *et al.*, 2017)

3- Analyse des résultats

Les résultats peuvent être présentés sous formes d'histogrammes mono-paramétriques. La Figure 10 représente en abscisses l'intensité du signal analysé et en ordonnées le nombre de cellules. Ils peuvent également être représentés par un diagramme de nuage de points appelé « dot plot » en anglais, ils représentent alors deux paramètres simultanément. Il est alors possible de réaliser des analyses statistiques sur les sous-populations cellulaires. Chaque cellule est représentée par un point et se place dans le diagramme en fonction de ses caractéristiques. La figure 11 représente les différentes populations de leucocytes en fonction de leur taille et de leur granulosité puis les différentes sous populations de lymphocytes en fonction qu'ils sont porteurs des marqueurs CD3, marqueurs des lymphocytes T, et de CD4. Les lymphocytes CD3⁻ sont donc les lymphocytes B ainsi que les natural killer (NK). Les lymphocytes CD3⁺, situés au-dessus de la barre horizontale sont donc des lymphocytes T, ceux CD4⁺ sont les LT CD4⁺, les LT CD4⁻ sont les LT CD8⁺.

Événement	Paramètre 1 FSC	Paramètre 2 SSC	Paramètre 3 FITC	Paramètre 4 PE	Paramètre 5 APC
1	100	500	10	650	4
2	110	505	700	700	6
3	90	480	720	670	10
4	95	490	15	700	15

Stockage en fichier List Mode

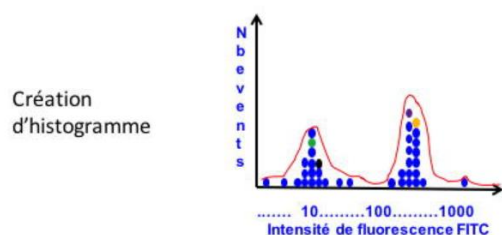


Figure 10 : Création d'un histogramme mono-paramétrique représentant l'intensité de fluorescence de la sonde FITC à partir des résultats présents dans le tableau (Duperray, 2020)

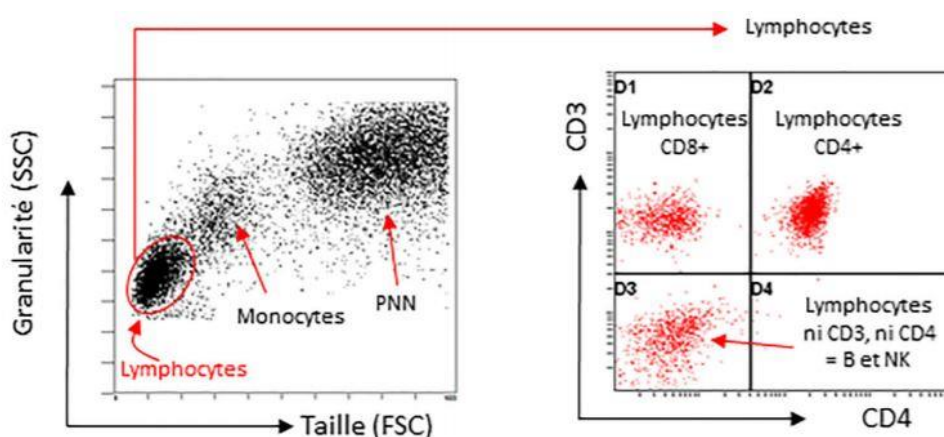


Figure 11 : Identification des sous populations lymphocytaires dans des dot plot bi-paramétriques grâce à un marquage CD3/CD4 (Zafrani et al., 2017)

4- Le tri cellulaire

Les analyseurs permettent d'identifier des populations cellulaires particulières mais ne permettent pas de les isoler pour approfondir les recherches dessus. Ainsi des analyseurs-trieurs ont été mis au point. Ils sont capables de réaliser un tri dans les cellules de l'échantillon et de mettre de côté une sous-population cellulaire définie au préalable par l'utilisateur. Toute cellule présentant des caractéristiques comprises dans l'intervalle défini seront alors isolées. Ces cellules peuvent ensuite être réinjectées dans des modèles murins ou être étudiés *in vitro*, lorsque le tri est réalisé de manière stérile.

Pour cela, l'échantillon cellulaire est injecté cellule par cellule dans la buse dans laquelle il est soumis à une onde de vibration d'amplitude et de fréquence déterminées grâce à un système piézo-électrique. Le jet laminaire est alors rompu et forme ainsi des gouttelettes en un point précis appelé « point of break » (Figure 12). Ce point se situe en aval du focus point et la distance entre les deux est appelé « drop delay » ou « retard de charge ». Si une gouttelette contient une cellule d'intérêt, alors elle est chargée électriquement par le cytomètre et se trouve déviée du flux rectiligne en passant dans un champ électrostatique et est récupérée dans un récipient collecteur. Si la cellule n'appartient pas à une sous-population sélectionnée ou si la gouttelette ne contient pas de cellule, elle n'est pas chargée électriquement et continue sa progression vers un récipient « poubelle ». Selon les cytomètres en flux, il est aujourd'hui possible d'isoler d'une à six populations cellulaires différentes simultanément dans des tubes ou en plaques de culture avec un nombre de puits variables (Duperray, 2020).

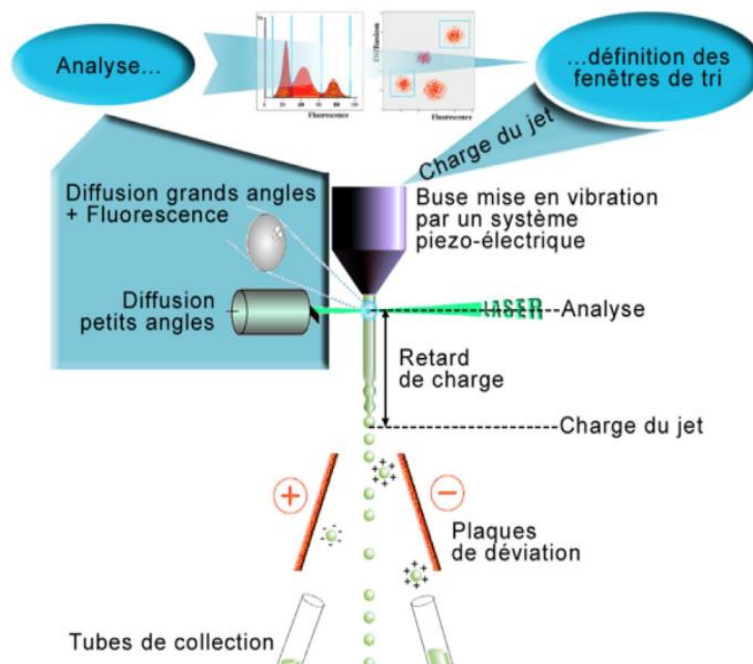


Figure 12: Principe du tri cellulaire dans un cytomètre en flux (Duperray, 2020)

B- Les différents modèles de cytomètres

Au fil des années, les analyseurs de CF se sont perfectionnés en gagnant en nombre de lasers, permettant ainsi la quantification de plus de marqueurs fluorescents et ainsi l'identification et la découverte d'un plus grand nombre de populations cellulaires.

Le premier analyseur (FACS™) a été commercialisé en 1974 par la société BD Biosciences®. La source lumineuse était un laser à l'argon. Il permettait de recueillir des informations issues de la diffusion (FSC et SSC) ainsi que la fluorescence émise avec une longueur d'onde supérieure à 530nm par des fluorochromes (la rhodamine et la fluorescéine).

Dans les années 1980, les cytomètres de pointe possédaient 2 lasers et détectaient les fluorochromes tels que la fluorescéine, la phycoérythrine et l'allophycocyanine (Parks *et al.*, 1984).

De nos jours, les analyseurs les plus simples sont composés au minimum de 2 lasers et de plusieurs photomultiplicateurs. Par exemple, l'ACCURI™ C6 Plus (figure 13) commercialisé par BD Biosciences® et utilisé par le BioPôle de l'ENVA en routine, est composé de 2 lasers (488nm et 635nm) et de quatre détecteurs à fluorescence avec filtres optiques optimisés pour la détection de nombreux fluorochromes populaires ainsi que des nouveaux polymères colorants tels que le BD Horizon Brilliant® Blue 515. Il permet l'analyse de 10 000 cellules à la seconde (BD Biosciences, 2019a) .

Des analyseurs plus performants ont également été mis au point. Certains permettent l'analyse jusqu'à 10 paramètres en simultanément. C'est le cas de la gamme FACSCanto™ (figure 14) composée de 3 lasers (bleu (488 nm), rouge (633 nm), et violet (405 nm)) et de 3 photomultiplicateurs pour les lasers violet et rouge et de 5 pour le laser bleu. Ceci lui confère une meilleure sensibilité. Sa vitesse maximale d'exécution est de 10 000 évènements par seconde (BD Biosciences, 2019b).



Figure 13: L'ACCURI™ C6 Plus (BD Biosciences, 2019a)



Figure 14: Le FACSCanto™ (BD Biosciences, 2019b)

Pour répondre aux besoins actuels de la recherche, de nombreux colorants et substrats fluorescents ont été mis au point. Les derniers analyseurs sont capables d'analyser jusqu'à 18 couleurs simultanément grâce à ces colorants et donc 18 marqueurs différents. Le LSRFortessa™ (figure 15) de BD Biosciences® possède pour cela 7 lasers (bleu, rouge, violet, jaune, vert et ultra-violet) associés à de nombreux filtres (BD Biosciences, 2019c).



Figure 15: Le LSRFortessa™ (BD Biosciences, 2019c)

C- Avantages et limites de la CF

1- Vitesse d'analyse

Grâce à la CF, il est possible d'analyser de manière fiable en moyenne 10 000 cellules par seconde et même jusqu'à 40 000 cellules par seconde avec les analyseurs les plus récents, notamment le FACSymphony™ A5 (BD Biosciences, 2019.). Cette vitesse d'analyse permet d'avoir une signification statistique bien plus importante qu'avec la microscopie optique, même pour une sous-population cellulaire très minoritaire dans l'échantillon (Robinson, 2005). Par exemple, le typage d'un lymphome B ou T chez le chien au BioPôle, laboratoire de l'ENVA, peut se réaliser par CF ou immunocytochimie. La première technique donne les résultats en 48h en moyenne quand la seconde prend 3 à 4 jours avant de rendre ses résultats (Biopôle ENVA, 2021). Cette rapidité de rendu de résultat permet une prise en charge précoce.

La CF permet également l'analyse simultanée de plusieurs paramètres. Avec les meilleurs instruments de cytométrie utilisés dans les laboratoires de recherche, il est possible d'analyser jusqu'à 17 paramètres en même temps, cette polyvalence n'est atteinte par aucune autre méthode d'analyse qu'elle soit physico-chimique ou immunologique. En laboratoire d'analyse clinique, les cytomètres utilisés classiquement peuvent aller jusqu'à 8 marquages différents.

Cependant, l'utilisation d'un cytomètre trieur ralentit grandement les analyses. En effet, la grande pureté des cellules triées par la CF nécessite un temps d'analyse non négligeable : pour obtenir un million de cellules d'une sous population représentant 0,5% de la population initiale, il faudrait 3h de tri, à la vitesse théorique de 20 000 cellules par seconde. Ce temps d'analyse risque d'altérer les cellules ce qui représente un inconvénient lorsque les cellules doivent être réutilisées pour d'autres analyses ou être utilisées dans des manipulations *in vitro* (Robinson, 2005).

Dans les laboratoires de recherche, l'analyse d'un échantillon prend moins de 30 minutes. Entre la réception du prélèvement par le laboratoire et l'obtention des résultats, il est possible qu'il ne s'écoule qu'une à deux heures au plus rapide. Dans les cas les plus longs, les résultats sont rendus en 48 heures.

Jamais ces résultats ne pourraient être atteints avec l'immunocytochimie ou l'immunohistochimie qui nécessite des temps de préparation de l'échantillon assez longs (Cell Signaling Technology, 2021).

2- Types de prélèvement

La CF ne peut analyser que des cellules séparées les unes des autres, ce qui la rend très facile à appliquer pour les milieux en suspension : sanguins (sur tube EDTA), des aspirations de moelles osseuses (sur tube hépariné ou milieu de culture RPMI-1640 additionné d'héparine et de sérum), des liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien, liquide d'épanchement pleural etc. ...) ou d'aspirations à l'aiguille fine de tissus comme par exemple des nœuds lymphatiques (Terra, 2012). Les échantillons solides provenant de biopsie par exemple ou de cultures cellulaires comme des macrophages par exemple, peuvent également être analysés, grâce à l'utilisation de nouveaux protocoles de séparation cellulaire enzymatique utilisant notamment la trypsine, permettant de mettre les cellules du tissu biopsié en suspension (Tsuji *et al.*, 2017).

Parmi ces protocoles, il existe l'utilisation de trypsine, et des protocoles de dissociation physique tels que la dilacération ou le broyage qui présentent l'inconvénient d'abimer les cellules tant d'un point de vue phénotypique que de la viabilité cellulaire (Fujiyama *et al.*, 2019). L'application d'ultrasons sur le tissu est à l'étude comme procédé de dissociation cellulaire sur des feuilles de cellules cultivées *in vitro* et semble montrer une conservation totale de la viabilité cellulaire ainsi que des marqueurs membranaires (Imashiro *et al.*, 2020).

L'équipe du Dr Tsuji a comparé en 2017 l'efficacité de la trypsine porcine, le tryPLE (trypsine synthétique vendue par ThermoFisher Scientific®), la collagénase à 3mg/mL et un réactif de dissociation cellulaire non enzymatique (C5789; Sigma-Aldrich®), sur la dissociation de cellules souches mésenchymateuses. Il ressort de cette étude que la TryPLE et la trypsine ont été très rapides pour dissocier le tissu (moins de cinq minutes alors qu'il faut 60 minutes à la collagénase et au C5789). Ils ont aussi montré que le choix de la TryPLE était préférable, car son activité n'a pas eu d'impact sur l'expression des Ag de surface même après 30 minutes, alors que la trypsine a significativement réduit le nombre de cellules CD44⁺, CD55⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD140a⁺, CD140b⁺ et CD201⁺ en moins de 30 minutes (Tsuji *et al.*, 2017). Fujiyama et son équipe ont montré en 2019, l'efficacité d'un protocole d'isolation cellulaire fondé sur un cocktail de trois enzymes (Collagenase D, Dispase I and DNase I) afin d'isoler les différentes sous-populations de macrophages contenues dans la rate (Fujiyama *et al.*, 2019).

Il est important pour la validité du résultat ainsi que la précision du diagnostic que les déterminants antigéniques ainsi que l'intégrité cellulaire soient conservés intacts. Ainsi les échantillons doivent être manipulés frais (dans les 24h qui suivent le prélèvement) (Robinson, 2005).

Il existe maintenant des protocoles qui permettent de fixer les échantillons et de les analyser ultérieurement. Lorsque l'analyse cytométrique se focalise sur des marqueurs membranaires, les laboratoires utilisent un protocole de fixation au paraformaldéhyde (PFA). Ce protocole s'exécute dans des tubes de culture en plastique de 12x75mm contenant un million de cellules par tube et intervient après l'étape de marquage aux Ac. Dans chaque tube, il faut introduire 0,5 à 1mL de solution froide de PFA à 1% et mélanger immédiatement. Ensuite, la solution fixée doit être conservée

à l'obscurité à 4°C. Il permet une analyse dans la semaine qui suit la fixation (Lanier et Warner, 1981).

Cela permet aux laboratoires de récolter les échantillons par exemple en début de semaine et de tous les analyser en fin de semaine, afin de ne faire tourner le cytomètre qu'un seul jour par semaine.

3- Résultats fournis par la CF

La CF présente un avantage majeur sur la microscopie optique, elle permet une analyse quantitative des paramètres mesurés. Là où la microscopie ne peut classer des cellules en plus de quatre niveaux semi-quantitatifs de fluorescence : « négatif », « faible », « moyen » et « fort », un cytomètre avec amplificateur logarithmique permet de quantifier précisément chaque critère optique sur une échelle de 1 à plusieurs centaines de milliers d'unités arbitraires de fluorescence (Robinson, 2005).

L'inconvénient majeur en termes de résultat fourni par la CF est qu'il ne donne de réponse que sur les marqueurs utilisés. Les cellules sont positives ou négatives pour les marqueurs choisis dans le panel mais si le panel est mal choisi et que toutes les cellules sont négatives, alors le phénotype des cellules testées reste inconnu.

A cause de l'hétérogénéité des propriétés antigéniques des cellules néoplasiques et l'absence d'une spécificité absolue des Ag pour une lignée donnée, il est donc nécessaire d'établir un algorithme à suivre et un panel d'Ac à utiliser en fonction de l'information clinique accompagnant l'échantillon. En médecine humaine, il existe environ 400 Ac monoclonaux disponibles (Craig et Foon, 2017).

La sélection du panel devrait être basée principalement sur le type d'échantillon en tenant compte des informations fournies sur la morphologie, l'indication médicale et / ou les antécédents cliniques. Toute réduction du panel recommandé pour ce type d'échantillon doit être évitée, sauf indication médicale spécifique, question morphologique ciblée, diagnostic récent de néoplasie hématopoïétique, quantité limitée d'échantillon ou autre circonstance atténuante. Cette approche multidisciplinaire peut dans certains cas permettre de réduire les coûts d'analyse en réduisant le panel d'Ac utilisé (Wood *et al.*, 2007).

Il n'y a pas de consensus sur le nombre d'Ac à utiliser mais il est admis qu'un nombre limité d'Ac peut affecter la précision du diagnostic. Il est fortement suggéré d'inclure dans un même panel des Ac de lignées différentes à cause des signatures immunophénotypiques de certaines néoplasies ainsi que d'introduire une certaine redondance dans les Ac utilisés afin d'éviter le manque de dépistage d'un type cellulaire suite à une perte d'expression par une cellule néoplasique (Terra, 2012).

4- Le coût d'analyse

Afin de comprendre le prix d'une analyse par CF, il faut prendre en compte le prix d'achat et d'entretien de l'appareil de CF, des réactifs ainsi que celui de la main d'œuvre.

Par la démocratisation de la technique, le prix des cytomètres de flux a diminué et les laboratoires d'analyses vétérinaires peuvent de plus en plus s'équiper de cytomètres en flux, cependant un cytomètre en flux reste encore très onéreux. A l'heure actuelle, l'ACCURI C6 Plus coûte environ 62 000€ HT (Dutscher, 2021). Il faut compter en plus le coût de la maintenance annuelle qui représente environ 10% du prix d'achat de l'appareil.

Les Ac monoclonaux utilisés afin de marquer les Ag d'intérêt sont également coûteux. A l'heure actuelle, un échantillon d'Ac anti-CD4 conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et anti-CD8 canins conjugué au Phycoerythrin (PE), permettant de faire cent analyses coûte 454 € HT (Bio-Rad Antibodies, 2021), ce qui représente 4,54€ pour une analyse de typage d'un lymphome par exemple. Ce tarif correspond à des Ac monoclonaux à usage restreint à la recherche. A ce prix, il faut rajouter le prix d'achat de tous les Ac du panel utilisé dans l'analyse, le prix d'achat des réactifs, ainsi que le coût de la main d'œuvre spécialisée et l'utilisation de l'appareil.

La CF nécessite moins de manipulations lors de la préparation de l'échantillon pour l'analyse que la préparation d'une lame analysée en immunocytochimie. La préparation dure ainsi moins longtemps et coûte moins cher. La CF nécessite la bonne configuration du logiciel d'analyse des résultats et l'interprétation par une personne qualifiée, alors que l'immunocytochimie nécessite qu'un cytologiste analyse une ou plusieurs lames pour le même patient afin d'arriver au résultat de la même analyse, cela demande plus de temps.

Au BioPôle, le tarif pour le typage d'un lymphome B ou T, par CF, chez le chien et le chat est de 70€ TTC. Le même résultat obtenu par immunocytochimie coûte 91€ TTC (Biopôle ENVA, 2021). Ainsi pour la même analyse, la CF est moins chère que l'immunocytochimie.

Deuxième partie : CYTOMÉTRIE EN FLUX ET ONCOLOGIE

Historiquement les classifications des hémopathies malignes reposaient sur la cytomorphologie réalisées par des cytopathologistes en microscopie optique. La cytomorphologie est un outil indispensable en oncologie en première intention car elle permet d'orienter le diagnostic. Cependant, dans certains cas, la cytomorphologie ne permet pas l'identification des cellules, notamment dans les premiers stades de développement cellulaire ou lorsque les cellules malignes présentent des atypies morphologiques. Il faut alors compléter ces observations avec de la cytochimie et/ou de l'immunophénotypage afin d'obtenir l'identification précise des cellules impliquées. Néanmoins cette technique prend du temps pour aller au bout du diagnostic car elle nécessite différentes colorations. Dans ce genre de situations, la CF présente l'avantage de pouvoir donner un phénotype complet des cellules incriminées en une seule analyse et donc d'obtenir un diagnostic précis qui permet de donner un pronostic fiable ainsi que d'orienter sur une prise en charge optimale très rapidement.

A- Pour le diagnostic des lymphomes et leucémies chez le chien et le chat

1- Généralités

Il est intéressant de connaître le processus de différenciation des différentes lignées médullaires ainsi que leurs phénotypes afin de pouvoir classer précisément les hémopathies malignes et ainsi pouvoir déterminer le traitement le plus adapté et le pronostic associé.

a- Hématopoïèse

i- Dans la moelle osseuse

Les cellules de l'immunité sont produites dans la moelle osseuse hématopoïétique. Cette moelle produit également les lignées conduisant aux globules rouges ainsi qu'aux plaquettes.

Dans la moelle osseuse se trouvent des cellules souches multipotentes à l'origine des différentes cellules sanguines. Ces cellules souches se différencient dans une première étape en cellules souches myéloïdes ou lymphoïdes (Figure 16).

Les cellules souches pluripotentes sont en contact avec les travées osseuses dans la moelle hématopoïétique, et possèdent la capacité d'auto-renouvellement. Cette capacité est perdue lorsque ces cellules ne sont plus en contact avec les ostéoblastes présents à la surface des travées. Elles commencent alors à se différencier en se déplaçant vers les sinus veineux médullaires.

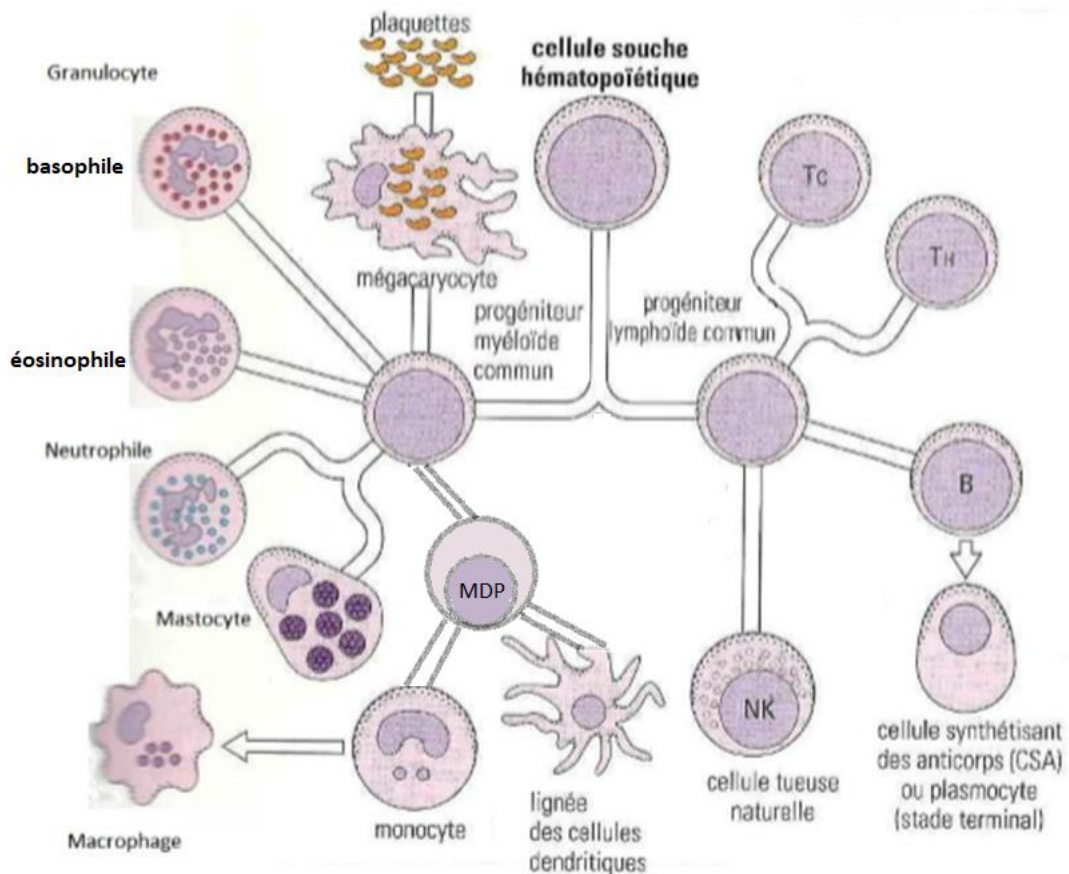


Figure 16: Différenciation des différentes lignées hématopoïétiques (Roitt et al, 1997). MDP : précurseur commun aux monocytes et au TC : Lymphocyte T cytotoxique, TH : Lymphocyte T helper, B : Lymphocyte B, NK : Natural Killer

Au stade le plus indifférencié, la perte de la capacité d'auto-renouvellement se reflète par l'apparition du récepteur Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3). La cellule souche multipotente est maintenant devenue un précurseur multipotent (Plonquet, 2013). La spécialisation vers l'une ou l'autre des lignées sanguines se réalise vraisemblablement par la perte progressive d'une potentialité à la fois. Les cellules multipotentes se spécialiseraient donc en perdant d'abord leur capacité à s'engager vers la lignée érythrocytaire puis vers la lignée macrophagique (Chatenoud, 2012).

Les précurseurs multipotents qui se dirigent vers la voie lymphoïde, se différencient en progéniteurs lymphocytaires très précoces qui expriment les enzyme « recombination activating gene » 1 et 2 (RAG1 et RAG2), responsable des processus de réarrangement des différents segments des gènes codant pour les chaînes d'immunoglobulines. Lorsque RAG s'exprime, la cellule subit des réarrangements des segments D et J du gène de la chaîne lourde. Cette cellule peut alors devenir :

- Un progéniteur T précoce qui rejoindra le thymus,
- Un progéniteur lymphoïde commun (PLC) qui est encore capable de se différencier en lymphocyte T (LT) ou en LB (LB) ou NK.

La population de PLC est hétérogène avec pour certaines cellules un potentiel de différenciation en LT, LB ou en NK, pour d'autres avec un fort potentiel de différenciation en LB et un faible potentiel pour évoluer en LT et une perte de la potentialité de se différencier en NK. Ils sont porteurs chez l'homme des marqueurs CD34⁺, CD10⁺, Lin⁻ (Galy *et al.*, 1995 ; Plonquet, 2013).

ii- Différenciation lymphocytaire B

✓ Stades précoces

Les PLC CD34⁺, CD10⁺, Lin⁻ se différencient ensuite en pro-B porteur de CD19 et des réarrangements ont lieu au sein des segments géniques codant pour les parties variables des chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig). Le rôle de ces réarrangements géniques est de créer un panel de spécificités antigéniques dont certains seront sélectionnés et amplifiés. Puis la protéine de surface Paired Box 5 (PAX5) est exprimée, cette protéine ne se retrouve que dans les cellules de lignée B, son expression est corrélée à une impossibilité de quitter cette voie de différenciation (Plonquet, 2013).

Au stade pré-B, une phase de prolifération est enclenchée. Elle est accompagnée d'une réduction progressive de la taille des cellules ainsi que du réarrangement des segments de gène de la chaîne légère. C'est à ce stade qu'émerge à la surface de la cellule une immunoglobuline M complète (chaînes lourde et légère) qui forme le récepteur des LB (BCR) avec sa spécificité antigénique (Plonquet, 2013).

A cette étape, la cellule est un LB immature. Cette population cellulaire subit une sélection négative c'est-à-dire qu'il y a élimination des cellules potentiellement auto-réactives. Il se produit alors un épissage alternatif permettant la co-expression d'IgM et d'IgD à la surface de la cellule, caractéristique du stade LB mature naïf qui sort de la moelle osseuse pour rejoindre les tissus lymphoïdes secondaires par le flot circulatoire (Plonquet, 2013).

L'un des marqueurs précoces de la lignée B est le CD79a (également appelé Ig α) qui est une des sous-unités du BCR. Le peptide CD19 exprimé plus précocement continue de l'être sur l'ensemble des cellules B à l'exception des plasmocytes. D'autres marqueurs B viennent compléter les molécules de différenciation, notamment CD24, CD21 et CD20.

Dans les nœuds lymphatiques, les LB se retrouvent dans la zone corticale superficielle des follicules en état de quiescence, ils sont alors appelés lymphocytes du manteau. Tant qu'ils ne sont pas stimulés, ils expriment à leur surface des IgM ainsi que des IgD, des Ag spécifiques à la lignées B (CD19, CD20, CD21 et CD22). Ils sont également porteurs de CD5, marqueur des lymphocytes, on le trouve également associé au LT (Burrows et Cooper, 1997 ; Plonquet, 2013 ; Eibel *et al.*, 2014). La chronologie d'apparition des différents marqueurs en fonction des stades précoces de différenciation des LB est reprise dans la figure 17.

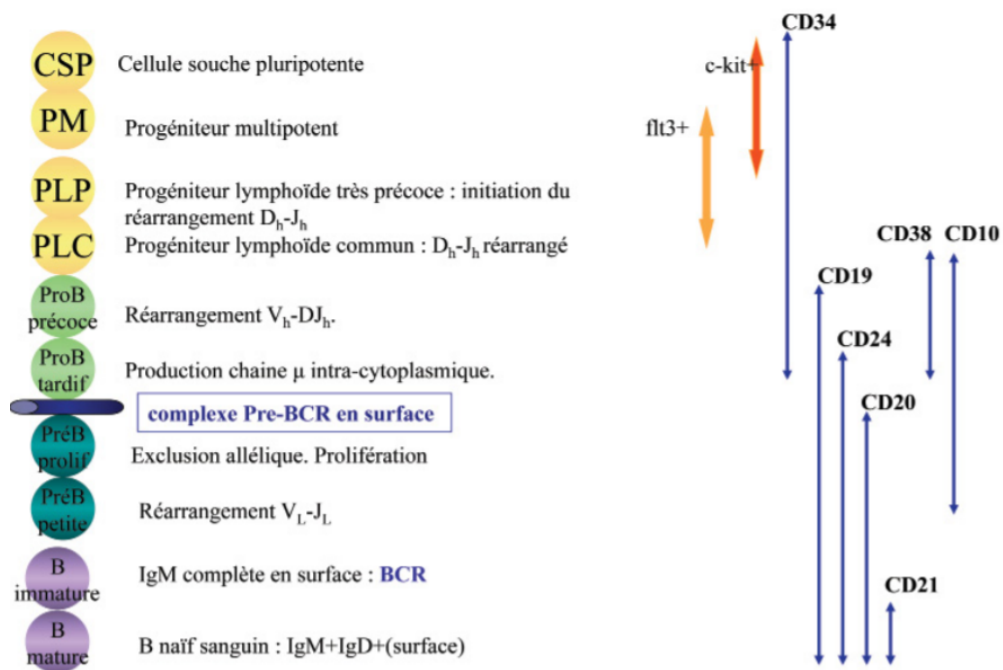


Figure 17: Hématopoïèse de la lignée B avec l'expression des différents CD en fonction du stade de différenciation dans la moelle osseuse (Plonquet, 2013)

- ✓ Modifications morphologiques et phénotypiques à la suite d'une stimulation antigénique

Lors de la réponse immunitaire B primaire T-dépendante, initiée dans la zone T interfolliculaire, le LB fixe son Ag grâce au BCR et il reçoit des signaux positifs du LT auxiliaire (ou « helper ») CD4⁺ possédant le TCR qui reconnaît un peptide issu du même Ag, il prolifère et forme un foyer primaire de prolifération B. Les centroblastes subissent le « switch » ou commutation isotypique, c'est-à-dire qu'ils produisent désormais une Ig d'une autre classe (G, A ou E), avec la même partie variable donc spécifique du même Ag ce qui modifie les propriétés effectrices de l'Ac. Ce switch résulte d'une recombinaison somatique dans l'ADN grâce à une enzyme spécifique des LB, l'Activation-Induced cytidine Deaminase (AID). La cellule ne pourra plus synthétiser d'IgM ni d'IgD. La figure 18 présente le mécanisme de commutation isotypique. D'autres centrocytes terminent leur différenciation soit en LB mémoire qui resteront dans les organes lymphoïdes secondaires soit en plasmocytes qui rejoignent la moelle osseuse (Feuillard et Raphaël, 2000 ; Plonquet, 2013). Enfin, les centres germinatifs involuent en laissant persister quelques centrocytes au sein du réseau de cellules folliculaires dendritiques (MacLennan *et al.*, 1992).

Lorsque l'Ag est T-indépendant, l'Ag se fixe au BCR ainsi qu'au récepteur de type Toll (TLR) qui enclenche un deuxième signal activateur. La figure 19 reprend les deux mécanismes d'activation des LB naïfs. Les cellules clones formées par la prolifération peuvent se différencier en cellules productrices d'Ac IgG et migrer dans la médullaire du nœud lymphatique ou rejoindre un follicule pour y former un centre germinatif et deviennent ainsi des centroblastes (Plonquet, 2013). Dans cette réponse immunitaire des LB T-indépendante, aucune mémoire immunologique ne se met en place. En effet, c'est le switch isotypique qui induit cette mémoire immunitaire avec la production d'Ac plus efficace et ce dernier n'a pas lieu en raison de l'absence d'interaction avec un LT helper.

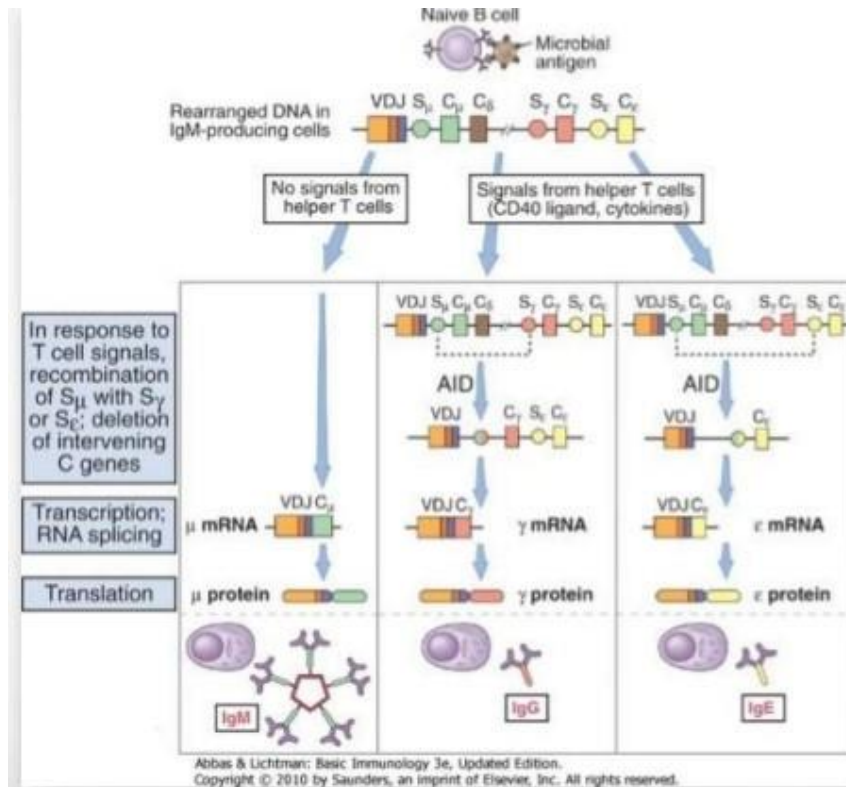


Figure 18: Recombinaison de l'ADN lors de la commutation de classe (Abbas et Lichtman, 2010). Lors de l'activation d'un LB, les gènes codant pour les Ig produites vont subir des délétions dans la région de la chaîne lourde menant à un changement de classe d'Ig. La partie variable, spécifique d'un Ag donné, est conservée.

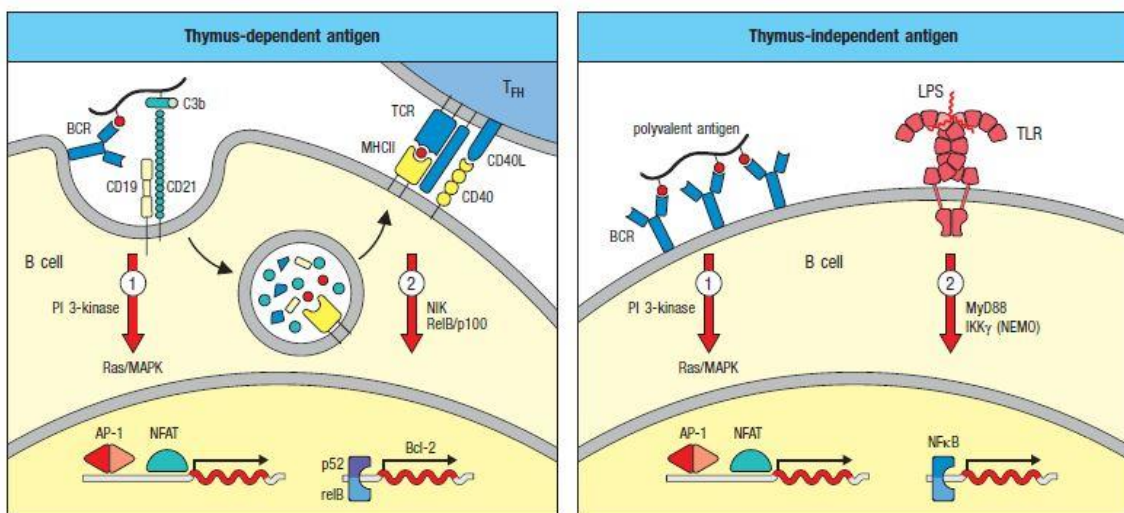


Figure 199: Voies d'activation des LB lors de la rencontre avec un Ag T-dépendant et un Ag T-indépendant (Cancro *et al.*, 2017). Un premier signal d'activation du LB est obtenu par fixation de l'Ag sur le BCR. Pour les Ag T-dépendants, un second signal est délivré par un LT auxiliaire qui reconnaît l'Ag présenté par le CMH II. Pour les Ag T-indépendants, le second signal est délivré par l'activation des TLR par des ligands des TLR associés à l'Ag.

Lors des différentes étapes de différenciation, les marqueurs cellulaires évoluent et signent ces différentes étapes (Tableau 2). Chez l'Homme, ces marqueurs sont bien connus. Avant l'entrée dans le centre germinatif, c'est-à-dire les lymphocytes B naïfs circulants sont IgM⁺ IgD⁺. Les lymphocytes B-blastiques des zones interfolliculaires et les plasmocytes sécréteurs d'IgM apparaissent IgM⁺, IgD⁺, CD10⁻, CD38⁻, Bcl2⁺, Bcl6⁻. Lors de la formation des centres germinatifs et l'établissement de la réponse immunitaire B secondaire, les centroblastes et centrocytes sont porteurs de CD10, CD38 et Bcl6. La distinction entre centroblastes et centrocytes peut se faire grâce au niveau d'expression de CD77. Les lymphocytes B mémoires expriment CD10⁻, CD27⁺, CD38⁻, Bcl2⁺ et Bcl6⁻. Les cellules plasmocytaires quant à elles sont CD45⁻, CD10⁻, CD38⁺ et CD138⁺ et excrètent une immunoglobuline détectable en intracytoplasmique. Les plasmocytes IgM⁺ pré et post centre germinatif partagent ce phénotype (Feuillard et Raphaël, 2000).

Tableau 2: Chronologie d'apparition des différents marqueurs lymphocytaires B (Chatenoud, 2012)

	Cellule souches	Cellule pro-B	Cellule pré-B	Cellule B immature	Cellule B mature	Plasmocyte
CD45	+					
CD45R		+	+	+	+	
CD34	+					
CD38		+	+			+
CD43		+	+			
CD79a (Igα)		+	+	+	+	
CD79b (Igβ)		+	+	+	+	
CD19		+	+	+	+	
CMH classe II		+	+	+	+	
CD40			+	+	+	
CD20			+	+	+	
CD22				+	+	
CD21					+	

La figure 20 reprend les différents stades de différenciation de la lignée B ainsi que les hémopathies malignes associées.

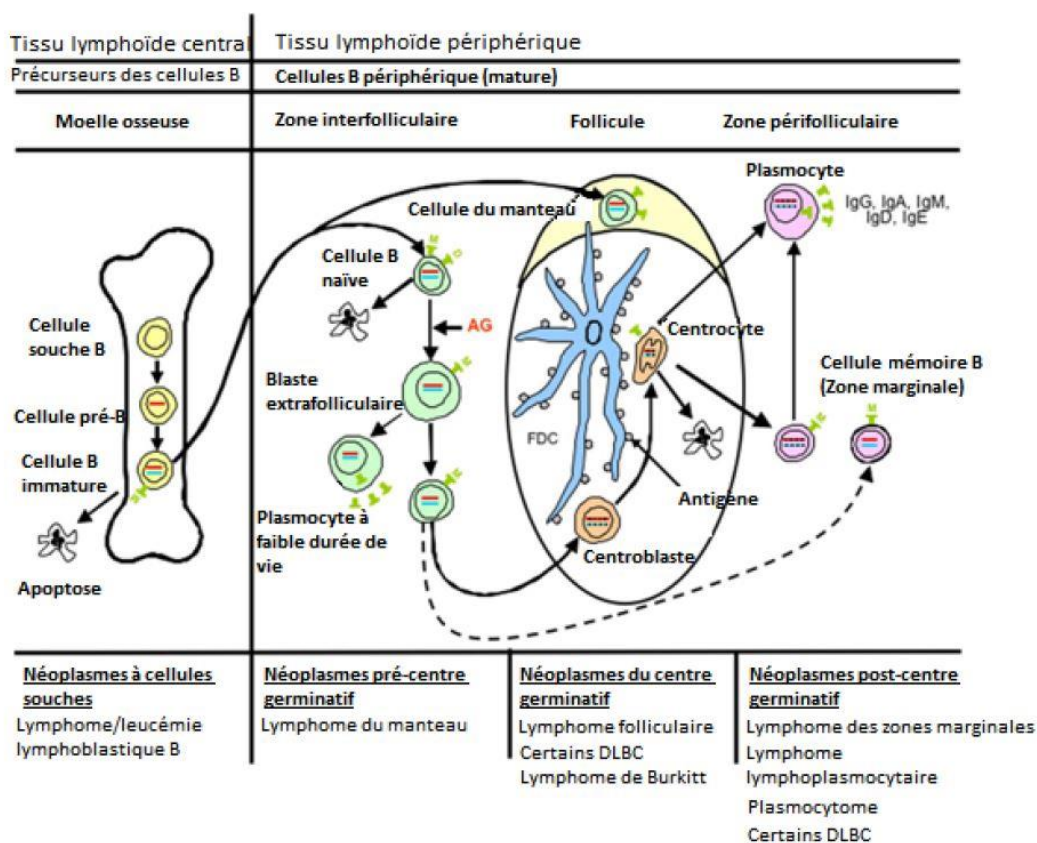


Figure 20: Différenciation lymphocytaire B et désordres lymphoprolifératifs associés chez le chien (Deleglise, 2010)

iii- Différenciation lymphocytaire T

✓ Stades précoces

Les cellules précurseurs lymphoïdes T issus des cellules souches multipotentes migrent de la moelle osseuse ou le foie fœtal vers le thymus, lieu de leur maturation. Cette phase de maturation permet la sélection de lymphocytes capables de ne pas réagir avec les molécules du soi et qui ont acquis un récepteur à l'Ag fonctionnel (Galy *et al.*, 1995).

Le thymus est peuplé de précurseurs $CD34^+$, $CD44^+$, $CD71^+$, $CD38^{\text{faible}}$ provenant de la moelle hématopoïétique, qui ne sont pas encore engagés dans la voie de différenciation T quand ils entrent dans le thymus (Plonquet, 2004). Ils n'expriment pas encore les récepteurs membranaires caractéristiques des cellules T matures, c'est-à-dire le TCR, CD3 et CD4 ou CD8. Ils sont dits « triples négatifs » et les gènes codant pour le TCR ne sont pas encore réarrangés. C'est le contact avec le stroma thymique qui enclenche la différenciation en cellules pro-T porteuses et l'expression des premiers marqueurs spécifiques des cellules T CD2 et CD7 puis CD25 (Chatenoud, 2012). Il y a alors réarrangement génique pour les chaînes variables β , γ et δ du TCR. Ce réarrangement génique marque le passage au stade de LT naïf. Les cellules n'expriment plus CD44 et commencent à exprimer CD4

et à synthétiser la chaîne β du TCR qui s'associe à la chaîne α invariante. On parle alors du stade « simple positif ». La synthèse de la chaîne α est concomitante à l'expression de CD3. Cette étape est marquée par une forte prolifération des thymocytes ainsi que l'apoptose de nombre d'entre eux qui n'ont pu générer de réarrangement productif (Plonquet, 2004).

Le stade « double positif » représente 85% des cellules du thymus. Lors de cette étape, on observe l'apparition de CD1 et l'expression de CD4 et CD8, ainsi que la poursuite des réarrangements géniques pour le TCR qui va s'exprimer en complexe avec CD3. C'est également à ce stade que la double sélection (positive et négative) des thymocytes a lieu. Plus de 95% de ces cellules vont mourir par apoptose (Plonquet, 2004).

La sélection positive correspond à la sélection des thymocytes capable de reconnaître des peptides du CMH du soi. Les cellules non sélectionnées meurent par apoptose et sont éliminées par les macrophages. Les cellules restantes n'expriment alors plus qu'un des co-récepteurs CD4 ou CD8 : CD4 pour les cellules reconnaissant les peptides du CMH de classe II, CD8 pour celles reconnaissant les peptides du CMH de classe I.

La sélection négative se déroule dans la partie médullaire du thymus. Elle consiste en l'élimination des cellules dont le TCR interagit trop fortement avec les peptides du CMH, c'est-à-dire les cellules qui s'attaqueraient aux cellules de l'organisme, dites auto-réactives. Les mécanismes de sélections des LT double positifs sont repris dans la figure 21.

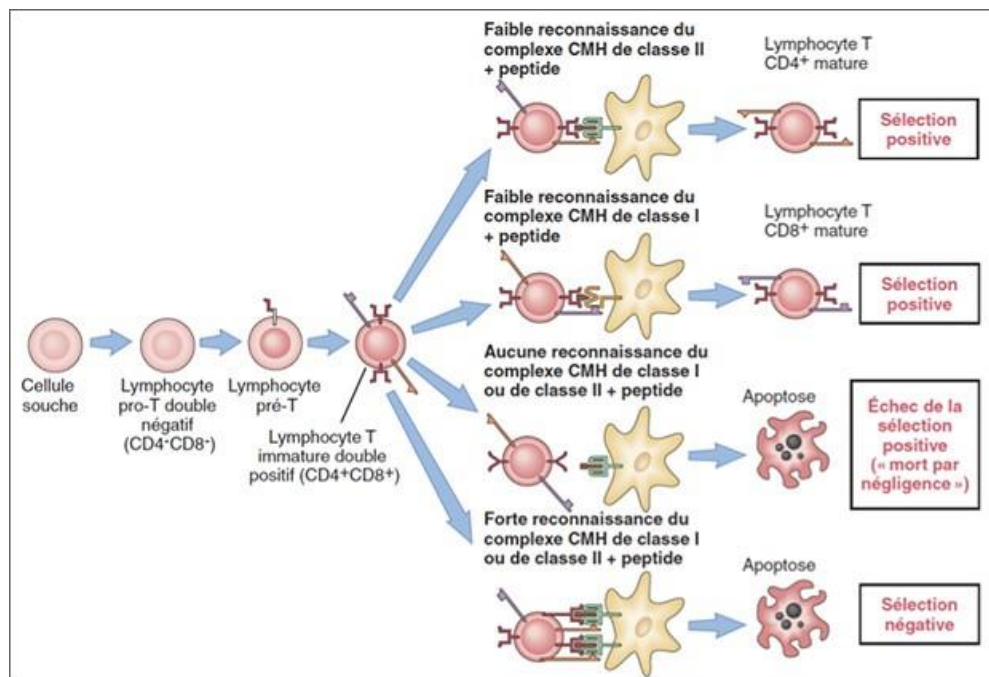


Figure 21: Sélection positive et négative des LT double positif dans le thymus (Abbas *et al.*, 2010)

Les thymocytes survivants sont donc des « simple positifs » $CD4^+$, $CD8^-$ ou $CD4^-$, $CD8^+$. Lors de cette étape d'importantes modifications phénotypiques apparaissent, comme l'augmentation

d'expression du complexe TCR/CD3, la perte de CD1, CD38 et CD71. Ils sont presque indistingables des LT matures périphériques. Une fois cette maturation finie, les LT quittent le thymus pour gagner les organes lymphoïdes secondaires (Plonquet, 2004 ; Chabanne, 2006 ; Chatenoud, 2012).

Le tableau 3 recense les différents marqueurs cellulaires portés au cours de la maturation des LT dans le thymus.

Tableau 3 : Chronologie d'expression des différents marqueurs lors de la maturation des LT (Plonquet, 2004)

	Cellules souches	Pré-T1	Pré-T2 (CDISP)	DPP	DP
CD34	++	+	f	-	-
CD1a	-	+	+	+	+
CD2	-	+	+	+	+
CD3 cytopl	-	+	+	+	+
CD4	-	-	+	+	+
CD5	-/f	+	+	+	+
CD7	++	+	+	+	+
CD8 α	-	-	-	+	+
CD8 β	-	-	-	-	+
CD25	-	+	-	-	-
CD44	++	+	-	-	-
CD45RA	+	+	-	-	-
CD127 (IL-7R α)	+	+	+	?	
Réarrangements loci TCR	Aucun	Génomique β , γ , et δ	Expression $\beta/\rho T\alpha$	Expression $\beta/\rho T\alpha$ OU voie $\gamma\delta$ (ID3)	Expression TCR $\alpha\beta$ définitif
f : faible.					

- ✓ Modifications morphologiques et phénotypiques à la suite d'une stimulation antigénique

Les LT naïfs circulent en permanence du flux sanguin aux organes lymphoïdes secondaires (nœuds lymphatiques, rate ou encore aux tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT)) et retournent dans le sang. Cela favorise les rencontres entre les LT naïfs et les Ag des pathogènes. Pour qu'un pathogène ou ses Ag déclenchent une réaction immunitaire médiée par les LT, il faut qu'ils soient transportés vers l'organe lymphoïde secondaire le plus proche, soit par la lymphe vers les nœuds lymphatiques ou les MALT soit vers la rate par la circulation sanguine (Carbone *et al.*, 2017).

Arrivés dans les nœuds lymphatiques, les LT matures se logent dans la zone para-corticale se trouvant entre les cordons de la médullaire et le cortex superficiel avec les follicules. Cette zone se compose de LT CD4⁺ et de cellules dendritiques dérivées des lignées monocytaires (Chatenoud, 2012).

Ces cellules dendritiques captent les Ag en provenance des régions drainées par le nœud lymphatique dans lequel elles se trouvent. Cette captation entraîne leur différenciation en cellule présentatrice d'Ag (CPA) qui activent les LT spécifiques de cet antigène, ainsi que la sécrétion de cytokines qui entraînent une réponse inflammatoire non spécifique, dont le recrutement de macrophages et de

lymphocytes B, eux-mêmes pouvant être CPA dans un second temps (Chatenoud, 2012 ; Carbone *et al.*, 2017).

Lorsque le TCR se lie à au peptide antigénique présenté par la CPA, il y a transduction d'un premier signal induisant l'activation du LT naïf. Pour que cette activation soit effective, la CPA envoie un signal co-activateur par le biais du récepteur CD28 qui entraîne une augmentation du taux de survie et de prolifération de ce LT spécifique. Enfin la CPA sécrète des cytokines notamment IL-2, qui dirigent la différenciation des cellules T dans l'un des sous-ensembles de LT effecteurs. Ces étapes sont représentées dans la figure 22 (Carbone *et al.*, 2017).

La différenciation des LT naïfs leur confère la capacité de synthétiser les molécules requises pour remplir leur fonction, ainsi que la capacité à déclencher une attaque immunitaire sans co-activation spécifique lorsqu'ils rencontreront à nouveau l'antigène.

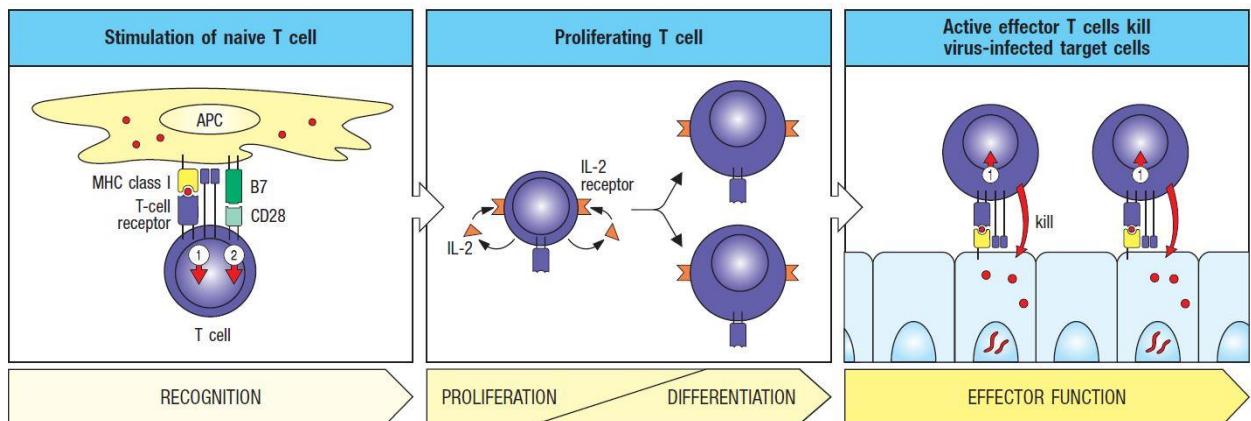


Figure 22: Stimulation, prolifération, différenciation des LT naïfs (ici en LT cytotoxiques) (Carbone *et al.*, 2017)

Les LT matures du sang et des organes lymphoïdes sont porteur de CD2 et CD7. En fonction des marqueurs exprimés, on distingue différentes sous populations aux fonctions différentes :

- Les LT porteur de CD8 sont dit « cytotoxiques ». En effet, lors d'une rencontre avec une cellule porteuse d'un Ag présenté par le CMH de classe I issu d'un pathogène intracellulaire, le plus souvent un virus, le LT CD8⁺ libère des molécules qui perforent ou désorganisent la membrane plasmique de la cellule infectée.
- Les LT CD4⁺ sont dits « auxiliaires » car ils apportent une aide dans l'éradication des agents pathogènes à différentes classes cellulaires en favorisant leur prolifération, leur maturation et leurs fonctions immunologiques grâce aux cytokines qu'ils sécrètent. Il existe plusieurs sous-catégories de LT CD4⁺ :
 - Les LT « helper » (LTh) qui améliorent les fonctions effectrices d'autres classes cellulaires. Il en existe également différentes classes qui possèdent chacune leurs propriétés.
 - Les LTh1 activent les macrophages notamment par l'intermédiaire d'IFN γ et les aident à détruire les bactéries extracellulaires.

- Les LTh2 sécrètent l'IL-4 qui active les mastocytes et les basophiles, l'IL-5 qui active les éosinophiles, et l'IL-13 qui favorise une meilleure immunité aux interfaces muqueuses dans la lutte contre les parasites.
- Les LTh17 sécrètent l'IL-17 qui induit la production de cytokines par les cellules épithéliales et stromales localement, induisant le recrutement de neutrophiles dans les sites d'infection. Les LTh17 produisent également IL-22 qui, associée à IL-17, peut activer les cellules épithéliales aux interfaces muqueuses pour produire des peptides antimicrobiens qui tuent les bactéries.
- Les LTfh se fixent aux LB naïfs grâce au BCR pour induire leur switch isotypique. Ils sécrètent IFN γ qui active la production d'Ac à très fort caractère opsonisant (IgG). Lorsqu'ils sécrètent IL-4, ils induisent un switch isotypique vers les IgE qui activent les dégranulations des mastocytes et des basophiles.
- Les LT régulateurs (LTreg) ont pour rôle de réguler l'action de l'immunité cellulaire pour prévenir le développement de réaction auto-immune. Ainsi les LTreg suppriment l'activité des LT (Carbone *et al.*, 2017).

La figure 23 reprend les différentes étapes de la différenciation de la lignée lymphocytaire T ainsi que les hémopathies malignes associées à ces stades de différenciation.

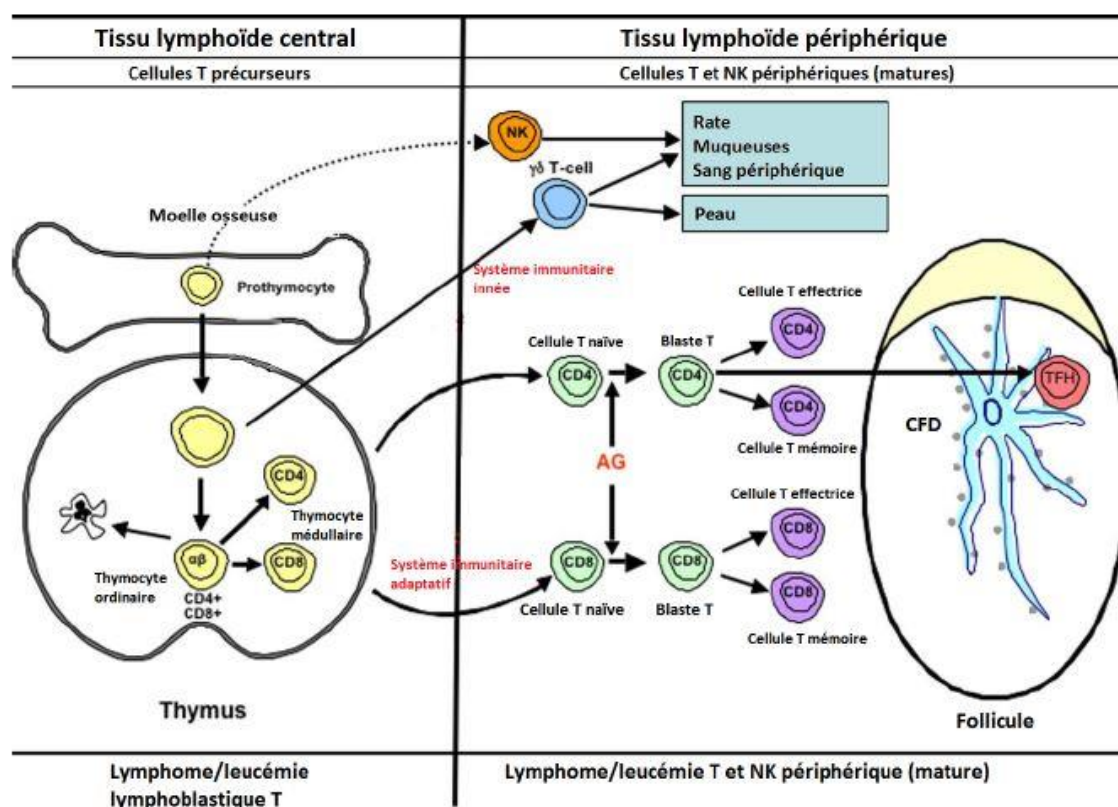


Figure 23: Différenciation lymphocytaire T et les désordres lymphoprolifératifs associés chez le chien (Deleglise, 2010)

iv- Les cellules NK

Les cellules naturelles tueuses dites NK pour Natural Killer, découlent de progéniteurs lymphoïdes dans la moelle osseuse et ont une évolution commune avec les lymphocytes jusque dans le thymus. Cependant, ce ne sont ni des lymphocytes B ni des lymphocytes T. En effet, ces cellules ne portent ni BCR ni TCR ou CD3, car ces cellules ne font pas le réarrangement génique. Elles se caractérisent par l'expression de CD56 (Chatenoud, 2012).

Les NK se trouvent à la fois dans les tissus et dans la circulation sanguine. Elles sont de plus grande taille que les LT et les LB et possèdent des granules cytoplasmiques contenant des protéines cytotoxiques (perforine, granzyme...) qui produisent les mêmes effets que les LT CD8⁺ cytotoxiques (Shizuo *et al.*, 2017).

Les NK ont la capacité de reconnaître les cellules infectées des cellules saines. En effet, elles possèdent des récepteurs activateurs (KAR) ainsi que des récepteurs inhibiteurs (KIR). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires dont les domaines extracellulaires présentent des similitudes, alors que leurs domaines intracellulaires présentent des différences induisant leur rôle inhibiteur ou activateur. Il suffit de l'activation d'un seul KIR pour que la NK ne s'active pas, alors qu'il faut plusieurs signaux activateurs pour mener à l'activation. Les KIR reconnaissent le CMH de classe I porté par les cellules du soi. Les cellules non porteuses du CMH de classe I sont alors détruites, ce qui est le cas des cellules infectées par un virus ou une bactérie intracellulaire ainsi des parasites extracellulaires, ce mode de fonctionnement est repris dans la figure 24. Il existe une autre voie d'activation des NK, la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC). Les NK possèdent des récepteurs CD16 qui sont spécifiques des fragments constants (Fc) des IgG qui leur permettent de se fixer à des cellules attaquées par la réponse immunitaire humorale (Shizuo *et al.*, 2017).

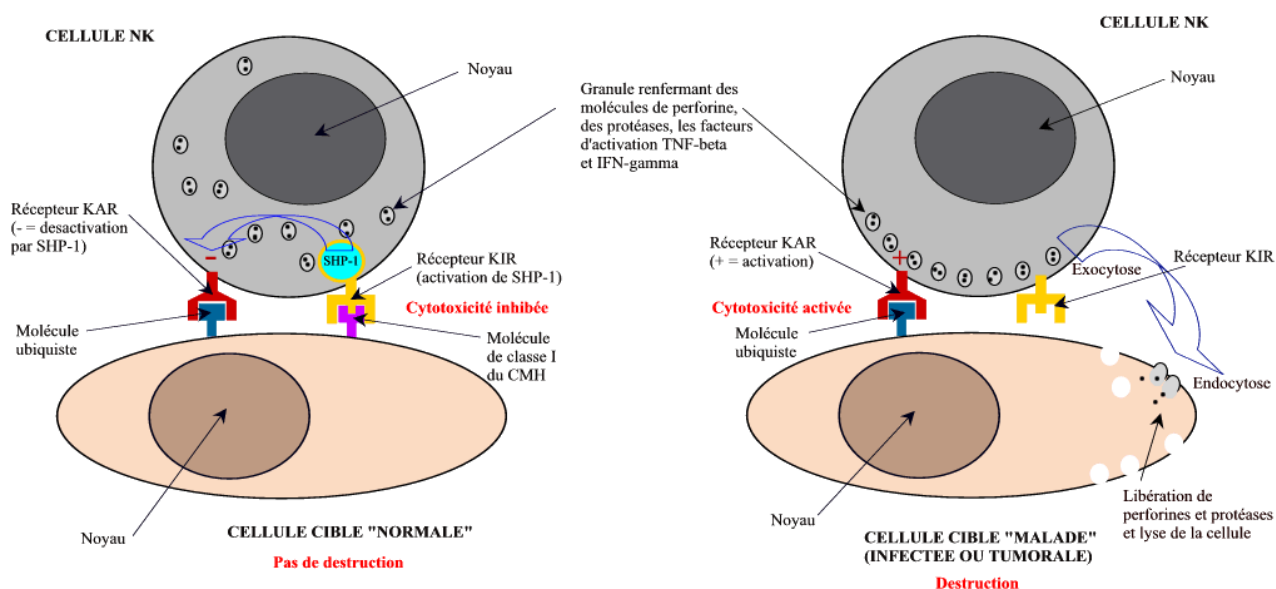


Figure 24: Récepteurs intervenant dans l'activation des NK (Institut National de Recherche Pédagogique , 2002).

b- Définition des hémopathies malignes : lymphomes et leucémies.

Les premières classifications de ces hémopathies étaient fondées sur des critères morphologiques, les notions de lignées B et T étaient encore inconnues. Il y a donc eu distinction entre les proliférations lymphocytaires à expression tissulaire lymphoïde secondaire prédominante, c'est-à-dire les lymphomes, et celles à expression hématologique prédominante, c'est-à-dire les leucémies. Ces deux termes étaient classiquement opposés et la leucémie désignait une prolifération de cellules cancéreuses des lignées myéloïdes ou lymphoïdes localisée dans la moelle osseuse hématopoïétique avec un envahissement sanguin possible. Aujourd'hui, ces deux entités sont regroupées sous le terme d'hémopathies malignes. En effet, le sang et la moelle osseuse peuvent être atteints secondairement par des cellules tumorales en cas de lymphome, et les nœuds lymphatiques peuvent être envahis au cours de l'évolutions de certaines leucémies.

Chez les animaux, les hémopathies malignes sont catégorisées selon des classifications issues des connaissances chez l'Homme. En effet, les connaissances médicales relatives aux chiens et aux chats sont restreintes en comparaison à celles relatives à l'Homme et en sont souvent inspirées, tant au niveau de la genèse des pathologies, que des données cytogénétiques ou des marqueurs moléculaires (Gisselbrecht, 2009).

Chez les animaux, les lymphomes se caractérisent par une prolifération clonale de cellules lymphoïdes. Ils regroupent des entités anatomo-cliniques hétérogènes ayant chacun leur spécificité morphologique, immunologique, cytogénétique. Chaque entité a un pronostic propre (Gisselbrecht, 2009).

Les leucémies sont des hémopathies malignes intéressant dans un premier temps la moelle osseuse puis le sang avant d'être multicentriques. Elles se distinguent par la prolifération de cellules hématopoïétique blastiques ou matures. En fonction du stade de développement de ces cellules, la leucémie sera qualifiée d'aigüe lorsque que les cellules sont très immatures avec un fort pouvoir prolifératif, et de chronique lorsque les cellules proliférant sont à un stade différencié avec un faible pouvoir prolifératif (Fournel-Fleury *et al.*, 1992).

c- Classification des différentes hémopathies malignes

i- Classification actuelle des hémopathies malignes en médecine humaine

En médecine humaine, la classification actuelle des hémopathies malignes est la classification de l'OMS réalisée en 2001 et corrigée en 2008 puis 2016. C'est la première classification à faire consensus à l'échelle mondiale. Elle reprend les mêmes principes que la classification REAL (Revised European American Lymphoma Classification) de 1994 qui séparait les tumeurs lymphoïdes en trois grandes catégories :

- Les lymphomes ou leucémies lymphoïdes à cellules B
- Les lymphomes ou leucémies lymphoïdes à cellules T
- Maladie de Hodgkin

La classification REAL prend en compte la localisation anatomique et rattache les cellules cancéreuses à leur lignée d'origine. De plus, cette classification insiste sur la notion de grade basée sur des caractéristiques histologiques, ainsi que sur la notion d'agressivité basée sur le comportement clinique de la tumeur (Harris *et al.*, 1994).

La classification de l'OMS organise les tumeurs en fonction de leur lignée d'origine (myéloïdes, lymphoïdes, mastocytes, macrophages). Les différentes entités comprises dans chacune de ces catégories se distinguent par des données morphologiques, immunophénotypiques, génétiques et cliniques (Campo *et al.*, 2011).

ii- Classification des lymphomes chez les animaux

✓ Classification anatomique des lymphomes non-hodgkiniens

Chez le chien, les lymphomes non-hodgkiniens sont dans 75% des cas des lymphomes ganglionnaires. Il existe 5 stades : le premier, pour les lymphomes ganglionnaires, étant une atteinte d'un seul nœud lymphatique et le cinquième, le plus avancé, une atteinte généralisée avec envahissement du secteur sanguin ou de la moelle osseuse (Ponce *et al.*, 2010 ; Vezzali *et al.*, 2010). Chez les jeunes chiens, le lymphome le plus fréquent est le lymphome médiastinal à cellules T qui entraîne un œdème du cou et de la face et une dyspnée liés à la présence d'une masse dans le médiastin ainsi qu'une polyuro/polydypsie (PU/PD) entraînée par une hypercalcémie néoplasique (Day, 1997). On trouve également des lymphomes digestifs, cutanés, hépatique, oculaire, pulmonaire ou encore nerveux. D'autres localisations ont été décrites mais restent très atypiques (Zandvliet, 2016).

Chez le chat, l'atteinte nodale est assez peu fréquente. Les chats atteints de lymphomes présentent des formes extranodales seules ou en association avec des atteintes de nœuds lymphatiques (Moore, 2013). Le site le plus fréquemment touché est le tractus digestif. Le lymphome digestif présente une durée de survie moyenne plus courte que les lymphomes médiastinaux ou nasaux (Moore, 2013 ; Sato *et al.*, 2014). Il existe également chez le chat des formes cutanées (Rook, 2019), rénales, nerveuses, oculaires, laryngées (Moore, 2013).

Cette classification est facilement applicable mais présente le désavantage majeur de regrouper des lymphomes très hétérogènes d'un point de vue clinique, histologique ou pronostique. Elle est donc insuffisante (Teske, 1994).

✓ Classification de Kiel actualisée

La classification de Kiel actualisée se fonde essentiellement sur des critères morphologiques, immunophénotypiques et sur la nature de la cellule d'origine pour classer les lymphomes. Cette classification est facilement applicable en médecine canine. Il a été montré que cette classification présente un intérêt concernant le pronostic, car les lymphomes B et T présentent des durées de survie

significativement différentes (Ponce *et al.*, 2004). Cependant l'utilisation d'une classification clinico-morphologique ne permet plus de faire le parallèle avec les lymphomes chez l'Homme.

Chez le chien, il existe peu de lymphome de bas grade, c'est-à-dire faiblement agressif : entre 20 et 26,1% selon les études contre 73,9 et 80% de lymphome de haut grade (Fournel-Fleury *et al.*, 1997 ; Sözmen *et al.*, 2005 ; Ponce *et al.*, 2010).

✓ Classification de l'OMS

En 2016, l'OMS a publié une révision de sa classification des tumeurs hématopoïétiques chez les animaux domestiques fondée sur la classification REAL. Elle utilise des critères histologiques et immunophénotypiques. Cette classification semble être utile mais pas totalement adaptée. En effet elle est prévue pour plusieurs espèces qui présentent chacune des particularités (Wolfesberger *et al.*, 2018).

iii- Classification des leucémies chez le chien et le chat

✓ Les leucémies aiguës

Les leucémies aiguës (LA) proviennent de la prolifération de cellules hématopoïétiques très immatures appelées blastes qui se caractérisent par un fort pouvoir prolifératif. Ce type de leucémie évolue très rapidement, en l'absence de traitement sur environ un mois chez le chien (Fournel-Fleury *et al.*, 1992). Les blastes envahissent rapidement la moelle osseuse et « étouffent » les autres lignées sanguines ce qui crée une cytopénie sévère et il est possible de trouver une blastose sanguine si les blastes possèdent les récepteurs cellulaires nécessaire au passage dans le sang (Gorman et Evans, 1987).

Les LA se divisent en leucémie aiguë myéloïde (LAM) et en leucémie aiguë lymphoïde (LAL) en fonction de la lignée cellulaire impliquée. Cette distinction se fait sur des critères morphologiques quand cela est possible, ou par des techniques d'immunocytochimie (Fournel-Fleury *et al.*, 1992).

On retrouve chez le chien, les LAL de type 1, LAL-1, caractérisées par des cellules de petites tailles à noyau régulier et nucléole peu visible et les LAL de type 2, LAL-2, plus fréquentes que la précédente, se caractérisent par des blastes de plus grandes tailles à noyau irrégulier nettement nucléolé (Fournel-Fleury *et al.*, 1992).

Les LAM regroupent les leucémies liées aux lignées granulocytaire, monocytaire, érythrocytaire et mégacaryocytaire. Les LAM ont été classées selon les lignées cellulaires impliquées ainsi que le stade de maturation cellulaire, elle est reprise dans le tableau 4.

- Leucémie aiguë indifférenciée : LAI : les cellules impliquées ne sont engagées dans aucune lignée cellulaire. Elles ne sont reconnaissables ni par des critères morphologiques ni par marquages immuno- ou cyto-chimique. Ces cellules présentent un noyau excentré, un nucléole distinct, quelques granulations cytoplasmiques azurophiles, un cytoplasme modérément basophile et parfois des pseudopodes (Feldman *et al.*, 2000)

- Leucémie aiguë myéloïde sans maturation : LAM- M0 : les cellules impliquées, les myéloblastes, sont engagées dans une lignée cellulaire mais n'ont pas encore subi de maturation qui les rendrait morphologiquement distinguables. Il faut procéder à de l'immunophénotypage pour les reconnaître et écarter l'appartenance à la lignée lymphoïde (Feldman *et al.*, 2000),
- Leucémies aiguës granulocytaires : LAM-M1, LAM-M2, LAM-M3 : on distingue 3 stades de maturation dans les LA granulocytaires. Le stade LAM-M1 est le stade myéloblastique maturation granuleuse minimale ; la LAM-M2, myéloblastique avec maturation granuleuse ; la LAM-M3, promyélocytaire. Chez le chien, on rencontre essentiellement les sous-types M1 et M2 (Jain *et al.*, 1991). Dans la plupart des cas et notamment pour les formes très indifférenciées, il faut rechercher des marqueurs d'immunophénotypage ou recourir à la cytoenzymologie afin d'identifier la lignée cellulaire impliquée (Fournel-Fleury *et al.*, 1992),
- Leucémie aiguë myélomonocytaire : LAM-M4 : prolifération de deux populations de blastes, l'une d'aspect myéloblastique avec un fort rapport noyau/cytoplasme avec une chromatine dentelée, un nucléole proéminent et des granules azurophile, l'autre d'aspect monoblastique avec un noyau rond à légèrement irrégulier avec une chromatine fine, un cytoplasme basophile et sans granulation (Feldman *et al.*, 2000).
- Leucémie aiguë monocyttaire : LAM-M5 : Prolifération de cellules monocytaires plus ou moins différenciées (monoblastes ou monocytes). Dans la moelle osseuse on retrouve plus de 80% de cellules issues de la lignée monocyttaire parmi les cellules non érythroïdes. Les monocytes présentent de nombreuses anomalies morphologiques (Jain *et al.*, 1991).
- Leucémie aiguë érythroblastique : LAM-M6 : Prolifération d'érythroblastes (supérieure à 50%) avec un contingent de blastes myéloïdes représentant au moins 30% des cellules non érythroïdes de la moelle osseuse (Jain *et al.*, 1991).
- Leucémie mégacaryoblastique : LAM-M7 : prolifération de mégacaryocytes immatures ou de leurs précurseurs dans la moelle osseuse et les autres tissus hématopoïétiques. L'hémogramme se caractérise par une thrombocytopenie sévère accompagnée de plaquettes anormales morphologiquement et fonctionnellement (Jain *et al.*, 1991).

Tableau 4: Classification des leucémies aiguës myéloïdes (Jain *et al*, 1991)

Abréviation	Caractéristiques
LAI	Blastes négatifs pour toutes les réactions cytochimiques et les marqueurs phénotypiques
LAM-M0	Blastes dont la différenciation myéloïde ne peut être certifiée que par microscopie électrique ou d'après immunophénotypage
LAM-M1	Blastes > 90% des CNE ; granulocytes ou monocytes < 10% ; blastes PO ou NS positifs > 3%
LAM-M2	Blastes > 30% ANC et < 90% CNE ; granulocytes > 10% ; monocytes < 20%
LAM-M3	Promyélocytaire : non rapportée chez les carnivores domestiques
LAM-M4	Myéloblastes + monoblastes > 30% ANC et CNE ; granulocytes > 20% ; monocytes > 20% ; cellules ENS positives > 20% CNE
LAM-M5	Monocytes + monoblastes > 80% CNE
M5a	Monoblastes > 80% CNE
M5b	Monoblastes > 30% et < 80% CNE
LAM-M6	Erythroblastes > 50% ANC ; myéloblastes > 30% CNE
M6 Er	Erythroblastes > 50% ANC ; blastes non érythroïdes + pro-érythroblastes > 30% ANC
LAM-M7	Mégacaryocytes > 30% CNE ; mégacaryocytes atypiques ; blastes Facteur VIII et GpIIb-IIIa positifs

ANC : total des cellules nucléées, CNE : Cellules non-érythroïdes, ENS : Estérase Non-Spécifique, Er : Erythroïdes, FAB : Franco-américano-britannique, LAI : leucémies aiguës indifférenciée, LAM : leucémie aiguë myéloïdes, PO : Peroxydases, NS : Noir Soudan.

✓ Les leucémies chroniques

Les leucémies chroniques (LC) se caractérisent par la prolifération de cellules en fin de différenciation dont l'évolution spontanée est beaucoup plus longue que celle des leucémies aiguës. Ces cellules différenciées ont toujours la capacité de gagner le compartiment sanguin où elles s'accumulent progressivement. De ce fait, il n'y a pas d'étouffement des autres lignées médullaires et donc pas de cytopénies sanguines (Harvey, 2015a).

Comme pour les LA, les LC se distinguent en leucémie chronique lymphoïdes (LLC) et en leucémie chronique myéloïde (LMC). Les LMC sont le plus souvent neutrophiliques chez le chien et le chat. Les LLC se distinguent en LLC-T et en LLC-B chez le chien (Harvey, 2015a). Une entité supplémentaire a été appelé LLC atypiques par Vail lorsque la lignée B ou T n'a pu être établie (Vail *et al.*, 2013).

iv- Les lymphomes et leucémies chez le chien et le chat

✓ Lymphome hodgkinien

Le lymphome Hodgkinien a été décrit chez le chat et le chien en comparaison avec le lymphome hodgkinien humain. Cette pathologie est décrite comme un cancer d'évolution lente se développant dans un nœud lymphatique et se propageant aux nœuds lymphatiques contigus, puis dans les cas les plus avancés jusque dans le foie et la rate et dans les phases terminales, atteint la moelle osseuse. Histologiquement, le lymphome hodgkinien se caractérise par la présence de cellules lymphoïdes et inflammatoires avec une minorité de cellules malignes de Reed-Sternberg (RS) dispersées dans le tissu. Une étude de 2001 présente 20 cas chez le chat entre 1992 et 1999 (Walton et Hendrick, 2001). Deux cas de lymphomes hodgkinien extranodaux ont également été décrits, l'un conjonctival (Holt *et al.*, 2006), l'autre cérébelleux (Yoshino *et al.*, 2017). Chez le chien, de rares cas de lymphomes « Hodgkin-like » ont été décrits. En 1973, Wells rapporte qu'avant lui seulement une trentaine de cas ont été décrits et étaient assez peu documentés en général (Wells, 1974).

✓ Lymphomes non-hodgkiniens

➤ Lymphomes à cellules B

Les classifications des différents lymphomes essaient le plus possible de rattacher les différentes pathologies aux cellules normales dont elles dérivent. Les lymphomes B sont plus fréquents chez le chien que les lymphomes T (Teske, 1994 ; Fournel-Fleury *et al.*, 1997 ; Ponce *et al.*, 2010). La figure 20 présentée précédemment page 37, fait le lien entre les différents stades de différenciation des LB et les lymphomes associés.

Dérivant des cellules B naïves, se trouve le lymphome du manteau. Classé parmi les lymphomes indolents nodaux à cellules B, il est rapporté fréquemment dans les lymphomes spléniques canins. Ils sont, en histologie, morphologiquement identifiables par la prolifération des cellules de la coiffe du manteau, l'atrophie de la paracorticale et la dégénérescence des centres germinatifs. Les cellules néoplasiques chez le chien sont porteuses de CD5, CD20, CD45, CD79a et Bcl-2 et dans 80% des cas de Pax-5, ce qui donne un immunophénotype proche de son homologue humain (Stein *et al.*, 2019). La distinction morphologique avec un lymphome folliculaire n'est pas toujours simple et la distinction peut se faire sur la base de la recherche CD5/CD10. Le lymphome du manteau est CD5⁺/CD10⁻ alors que le lymphome folliculaire est CD5⁻/CD10⁺ (Sriganeshan *et al.*, 2008).

Lorsque le lymphome a pour origine des cellules centrofolliculaires, on trouve trois types de lymphome : le lymphome folliculaire, ainsi que la plupart des lymphomes B diffus à grandes cellules et le lymphome de Burkitt.

Les lymphomes folliculaires sont rares chez le chien, représentant entre 0 et 6,25% des lymphomes ce qui s'expliquerait par un diagnostic plus tardif de la maladie lui laissant le temps d'évoluer. Ils se retrouvent dans les organes lymphoïdes secondaires : nœuds lymphatiques et rate essentiellement (Teske *et al.*, 1994 ; Fournel-Fleury *et al.*, 1997). Chez le chat, les lymphomes folliculaires sont tout

aussi rares que chez le chien (0,9%) (Valli *et al.*, 2000) et contrairement à l'Homme les lymphocytes malins ne sont pas porteur de Bcl2 (Henrich *et al.*, 2019).

Le lymphome de Burkitt, chez l'Homme est un lymphome de haut grade et le virus d'Epstein-Barr (VEB), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou la malaria sont des facteurs de risque connus. C'est un lymphome extranodal à développement extrêmement rapide avec un taux de multiplication cellulaire très élevée (proche de 100%). Les LB tumoraux sont de taille moyenne avec un noyau contenant de la chromatine grossière, des nucléoles basophiles volumineux et un cytoplasme très basophile. On trouve également en coupe histologique une population de macrophages répartis « en ciel étoilé ». Le phénotype des lymphocytes tumoraux est généralement CD79a⁺, CD10⁺, Bcl2⁻, Bcl6⁺ (Molyneux *et al.*, 2012). Le lymphome de Burkitt chez le chien se définit par sa ressemblance avec son homologue humain.

Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) sont des lymphomes de haut grade. Ils semblent être les lymphomes les plus présents (40,0% des cas de lymphomes) chez le chien (Guija de Arespacochaga *et al.*, 2007 ; Deleglise, 2010). Ce type de lymphome se caractérise par une hypertrophie modérée à sévère des nœuds lymphatiques périphérique. Les cellules tumorales sont de grandes cellules dont le noyau fait deux fois la taille d'une hématie avec une chromatine fine et un cytoplasme peu abondant. Les nucléoles sont toujours multiples et visibles. Ces cellules expriment CD79a, CD20 et Pax5. Certains DLBCL semblent provenir de l'évolution de lymphomes folliculaires et de lymphomes de la zone marginale. Par ailleurs, il est à noter que la durée médiane de survie semble varier en fonction de l'index mitotique. Au-dessus de 20 mitoses pour 10 champs au grossissement 400, la médiane de survie est de 31 jours. En dessous de ce nombre de mitoses, la médiane de survie est de 188 jours (Aresu, 2016). Le pronostic pour ce type de lymphomes est sombre avec une courte réponse à une chimiothérapie (protocole CHOP : cyclophosphamide-doxorubicine-vincristine-prednisone) et une durée de survie moyenne de 10 mois (Keller *et al.*, 1993).

Lorsque les cellules à l'origine de la tumeur sont post-centre germinatif, les lymphomes associés sont le lymphome des zones marginales et certains lymphomes B diffus à grandes cellules qui en découlent ou encore les plasmocytomes.

Le lymphome de la zone marginale (MZL) est composé de cellules de taille intermédiaire avec un cytoplasme abondant situées en périphérie des centres germinatifs. Ces cellules peuvent être entières ou clivées (Valli *et al.*, 2000). Lorsqu'il se situe dans la rate c'est un lymphome indolent avec un faible index mitotique de bon pronostic après splénectomie. Les MZL des nœuds lymphatiques ont été assez peu étudiés, en 2017 une étude de Cozzi *et al.* a montré que les 35 chiens compris dans l'étude présentaient une lymphadénopathie généralisée au moment du diagnostic, un tiers présentaient une implication extranodale. De plus un tiers des chiens présentaient des symptômes généraux. Les lymphocytes tumoraux sont des cellules de taille moyenne porteuses de CD21. La durée de survie médiane était de 259 jours, ce qui est un pronostic sombre malgré la caractérisation de ce lymphome comme « indolent » (Cozzi *et al.*, 2018).

Chez le chat, de nombreux lymphomes extra-nodaux sont à LT, notamment les lymphomes nasaux, et rénaux (Moore, 2013). Les lymphomes intraoculaires sont majoritairement des lymphomes diffus à grandes cellules B (Assenmacher *et al.*, 2019). Les lymphomes pulmonaires sont majoritairement à grandes cellules qu'ils soient primaires ou métastatiques (Santagostino *et al.*, 2015)

Les lymphomes lymphoplasmocytaires se définissent comme des lymphomes à lymphocytes plasmocytoides. Ils touchent souvent la moelle osseuse mais peuvent parfois se développer dans la rate et les nœuds lymphatiques. Ce sont des lymphomes de bas grade (Fournel-Fleury *et al.*, 1997 ; Sueiro *et al.*, 2004). Ils sont regroupés dans la classification humaine de l'OMS avec les lymphomes à petits lymphocytes B et les plasmocytomes (Jaillardon et Fournel-Fleury, 2011). Chez le chat et le chien, ce type de lymphomes est assez rare et représente 2% des lymphomes chez le chat (Valli *et al.*, 2000), entre 1,5% et 3,4% chez le chien (Greenlee *et al.*, 1990 ; Fournel-Fleury *et al.*, 1997 ; Vezzali *et al.*, 2010)

Les plasmocytomes regroupent les plasmocytomes indolents extramédullaires et les myélomes multiples, qui sont des plasmocytomes multicentriques de localisation primitive médullaire osseuse et à développement systémique possible. Ils sont la cause la plus fréquente de gammopathie monoclonale chez les carnivores domestiques (Fina, 2009).

➤ Les lymphomes T

On trouve différents lymphomes T, en fonction du stade cellulaire atteint. La figure 23 présentée précédemment page 42, fait le lien entre les étapes de différenciation et les lymphomes T associés. D'une manière générale, les lymphomes T sont de moins bon pronostic que les lymphomes B (Ponce *et al.*, 2004 ; Valli *et al.*, 2013). Les lymphomes lymphoblastiques T sont diffus avec de fort index mitotiques, ils présentent des lymphoblastes T de taille moyenne avec des noyaux ronds ou légèrement irrégulier, leur cytoplasme est étendu et basophile. Ce lymphome touche plutôt des animaux d'âge moyen entre 5 et 7 ans selon les études. Les chiens présentaient au moment du diagnostic une adénomégalie (localisée ou généralisée), 80% présentaient une masse médiastinale et 30% une hypercalcémie. Des signes cliniques importants étaient rapportés comme de la faiblesse, de l'anorexie, une perte de poids, de la dyspnée ainsi que des vomissements. Ces symptômes se mettent en place sur une durée allant de 1 à 4 semaines (Fournel-Fleury *et al.*, 2002 ; Ponce *et al.*, 2004 ; Ponce *et al.*, 2010). Ce sont des lymphomes de haut grade qui répondent assez mal au traitement (Valli *et al.*, 2013). Leur immunophénotype est soit double négatif (CD4⁻/CD8⁻) soit double positif (CD4⁺/CD8⁺) (Fournel-Fleury *et al.*, 2002).

Dans les lymphomes T de bas grade, il y a les lymphomes pléomorphes à petites cellules qui se composent de petites cellules avec des noyaux dentelés avec une chromatine plus ou moins agglomérée et un cytoplasme peu visible, l'atteinte ganglionnaire est diffuse. L'index mitotique est faible (Fournel-Fleury *et al.*, 2002). Il y a également les lymphomes des zones T qui sont des lymphomes à petites cellules claires, localisés dans la paracorticale des nœuds lymphatiques, comparable à leur homologue humain par leurs caractéristiques histologiques, cytologiques ainsi que par leur évolution plus indolente que les autres lymphomes T périphériques (Ponce *et al.*, 2010). Dans l'étude de Valli et al. les chiens atteints de ce type de lymphome avaient la médiane de survie la plus longue (622 jours) et il semble que les chiens sont diagnostiqués à des stades avancés de la maladie en raison du peu de symptômes (Valli *et al.*, 2013).

Dans les lymphomes de haut grade, on trouve le plus fréquemment les lymphomes pléomorphes à cellules de taille variable qui ont une architecture diffuse avec des cellules atypiques de petite,

moyenne et grande taille avec des noyaux irréguliers et une chromatine fine. Leur index mitotique est moyen à élevé (Fournel-Fleury *et al.*, 2002 ; Ponce *et al.*, 2010). Les chiens présentent une adénomégalie avec des signes clinique comme de la léthargie, des pertes de poids et de la faiblesse (Ponce *et al.*, 2004). Les lymphomes pléomorphes à grandes cellules ressemblent aux lymphomes pléomorphes à cellules variables mais avec des cellules de grande taille avec un index mitotique toujours élevé (Fournel-Fleury *et al.*, 2002). Ces deux types de lymphomes sont regroupés parmi les lymphomes périphériques non précisés et touchent des chiens d'âge moyen (6-8 ans en moyenne) (Fournel-Fleury *et al.*, 2002).

Chez le chat, les lymphomes digestifs sont prédominants avec dans 70% des cas selon une étude de Moore en 2012, des lymphomes T modifiant la structure de la muqueuse intestinale par des infiltrats diffus de cellules de taille petite à moyenne dans l'épithélium et le chorion villositaire, exprimant CD3. La durée médiane de survie était de 29 mois (Moore *et al.*, 2012).

✓ Les leucémies aiguës

La distinction entre LAL et LAM est importante car le pronostic et le traitement sont différents. Chez le chien, les LAM semblent être plus fréquentes que les LAL (Vernau et Moore, 1999 ; Adam *et al.*, 2009).

Chez le chat, les leucémies aiguës sont beaucoup plus fréquentes que chez le chien (Fournel-Fleury *et al.*, 1992). Le virus leucémogène félin (FeLV) est impliqué dans 100% des LAL et 90% des LAM (Leifer et Matus, 1985). Une étude réalisée au Brésil en 2019 a trouvé une implication légèrement moindre du FeLV dans les leucémies aiguës chez le chat : 86,7% pour les LAL et 66,7% pour les LAM (Cristo *et al.*, 2019).

➤ Les LAL

Les LAL restent assez rares (11,9% des hémopathies malignes) (Weiss, 2006) et prédominent chez les chiens d'âge moyen (5-6 ans) (Matus *et al.*, 1983 ; Morris et Dobson, 2001), plus récemment Adam *et al.* ont trouvé dans leur étude une moyenne d'âge plus élevée (8,0 ans) pour l'apparition des LAL (Adam *et al.*, 2009). Les signes cliniques sont d'apparition brutale et l'évolution est très rapide. Chez les chiens atteints de LAL, on rencontre fréquemment une léthargie, un amaigrissement rapide voire de la cachexie, ainsi que des symptômes liés aux cytopénies secondaires à l'envahissement médullaire tels que des muqueuses pâles et une intolérance à l'effort causées par de l'anémie, des infections avec hyperthermie causée par une neutropénie ou des pétéchies, ecchymoses voire une CIVD causées par une thrombopénie (Presley *et al.*, 2006 ; Dobson *et al.*, 2006 ; Vail *et al.*, 2013). Le pronostic est sombre chez le chien et le chat, même lors de chimiothérapie agressive, la durée de survie chez le chien n'excédant pas les 4 mois (Matus *et al.*, 1983). Chez le chat, la réponse au traitement est également décevante avec un taux de rémission complète de 27% des chats avec une durée de survie de 1 à 7 mois variable en fonction du statut vis-à-vis du virus leucémogène félin (FeLV) et du virus d'immunodéficience féline (FIV) de l'animal (Cotter, 1983 ; Presley *et al.*, 2006).

➤ Les LAM

Les LAM sont plus fréquentes que les LAL chez le chien avec une prévalence toute catégories confondues de 21% (Weiss, 2006).

Le sous-type qui prédomine largement chez le chien est la LAM-M4 concernant la lignée myélomonocytaire puis viennent les types granulocytaires M1 et M2 (Jain *et al.*, 1991). Les LAM-M6 sont exceptionnelles chez le chien et plus fréquentes chez le chat (Fournel-Fleury *et al.*, 1992). En effet les sous-types prédominants chez le chat sont M1, M2, M4 et M6 (Feldman *et al.*, 2000).

Le pronostic des LAM est moins bon que celui des LAL avec des durées de survie après diagnostic en moyenne de l'ordre de quelques semaines et rarement supérieur à trois mois chez le chien (Couto, 1985 ; Mylonakis *et al.*, 2008). Chez le chat, la durée de survie varie de deux à dix semaines (Couto, 2014).

✓ Les leucémies chroniques

➤ Les LLC

Chez le chien, les LLC sont rares (0,4% des hémopathies malignes sur 717 échantillons médullaires (Weiss, 2006), mais elles sont sûrement sous diagnostiquées (Workman et Vernau, 2003). Les LLC se manifestent à un âge similaire aux LAL, entre 7 et 10 ans (Vail *et al.*, 2013), mais il semblerait qu'elles affectent des chiens un peu plus vieux (Leifer et Matus, 1985 ; Adam *et al.*, 2009 ; Comazzi *et al.*, 2011). L'évolution des LLC est souvent silencieuse, leur découverte est souvent fortuite et il n'est pas rare qu'aucun traitement ne soit proposé en absence de signes cliniques. Le pronostic des LLC est meilleur que celui des LAL et des LMC. C'est l'insuffisance immunitaire qui cause le décès des patients par le biais d'infections à répétition (Leifer et Matus, 1986; Fournel-Fleury *et al.*, 1992; Workman et Vernau, 2003). La moitié des cas de LLC sont asymptomatiques chez le chien (Workman et Vernau, 2003), les autres présentent des signes très généraux comme une baisse d'appétit et une léthargie. Certains présentent de la PU/PD, des troubles digestifs sporadiques ou une perte de poids (Leifer et Matus, 1986 ; Presley *et al.*, 2006 ; Vail *et al.*, 2013).

Le pronostic est meilleur que pour les autres leucémies. En effet, en l'absence de traitement une survie de plusieurs années est possible (Harvey *et al.*, 1981). Avec un traitement standard (Chlorambucil et Prednisolone) la durée de rémission est comprise entre 10 et 30 mois (Couto et Sousa, 1986 ; Kristensen *et al.*, 1991). Une étude sur 17 chiens traités par l'association de vincristine, chlorambucil et prednisone montre une médiane de survie de 12 mois et un taux de survie à 24 mois de 30% (Leifer et Matus, 1986).

Les LLC à cellules T (CD3⁺) représentaient, dans une étude, 73% des LLC chez le chien et seraient également plus présentes que les LLC à cellules B chez le chat (Vernau et Moore, 1999 ; Harvey, 2015a) mais l'étude de Adam *et al.* ne démontre pas de différence significative de prévalence selon le typage des LLC (Adam *et al.*, 2009). Une étude a montré que les LLC à cellules T (CD3⁺ CD8⁺) étaient de meilleur pronostic que les LLC à cellules B (CD21⁺) avec une durée de survie 3 fois plus longue (Comazzi *et al.*, 2011).

Chez le chat, les LLC sont rarement rapportées (Thrall, 1981).

➤ Les LMC

Les LMC semblent être très rares (Adam *et al.*, 2009) et représentent 0,3% des hémopathies malignes chez le chien dans une étude (Weiss, 2006). Comme pour les LLC, les LMC sont peu rapportées chez le chat. Seuls des cas sont rapportés de manière ponctuelle et prouvent leur existence. Ce sont les LMC éosinophiles qui semblent être les plus fréquentes (Finlay, 1985 ; Huibregtse et Turner, 1994 ; Sharifi *et al.*, 2008).

Comme pour les LLC, il n'est pas rare que les LMC soient asymptomatiques. Les signes cliniques quand ils existent varient peu de ceux retrouvés dans les cas de LLC (léthargie, fatigabilité, dysorexie, polydipsie...) et il est fréquent de trouver une anémie plus ou moins sévère, une adénomégalie modérée, une splénomégalie, des signes variables d'infection notamment respiratoires ou cutanées (Grindem *et al.*, 1992 ; Fine et Tvedten, 1999 ; Feldman *et al.*, 2000).

Le pronostic des LMC chez le chien est plus sombre que celui des LLC. En effet, les LMC ont un plus grand risque de survenue de crises blastiques et donc de se transformer en leucémie aiguë (Dobson *et al.*, 2006). Cette acutisation terminale a lieu dans un délai de quelques mois à deux ans (Fournel-Fleury *et al.*, 1992). La durée moyenne de survie varie avec le type cellulaire impliqué. Les leucémies granulocytaires chroniques sont celles avec le pronostic le plus sombre, survie en moyenne d'un an avec des extrêmes allant de 41 jours à quatre ans et demi (Leifer et Matus, 1986 ; Grindem *et al.*, 1992) et l'usage de la chimiothérapie ne semble pas modifier le délai de survenue de la crise blastique (Feldman *et al.*, 2000). Chez le chat, deux cas de leucémies éosinophiles chroniques ont survécu 30 et 40 mois avec un traitement adapté (Feldman *et al.*, 2000).

2- Processus diagnostique

Afin d'arriver au diagnostic d'hémopathies malignes, un ensemble d'examen complémentaires de routine sont réalisés.

a- Symptômes

Les motifs de consultation conduisant au diagnostic d'une hémopathie maligne sont souvent des signes non spécifiques comme une dysorexie voire une anorexie, un abattement marqué, une hyperthermie persistante.

i- Les lymphomes

Les lymphomes chez le chien se présentent sous plusieurs formes soit sous forme nodale, le lymphome se concentre dans un ou plusieurs nœuds lymphatiques, l'animal présentant alors une (poly)adénomégalie visible ou non si les nœuds lymphatiques touchés sont en surface ou profonds, soit sous forme extranodale qui représente les formes issues d'une prolifération tumorale située hors des nœuds lymphatiques initialement (peau, tube digestif, foie, rate...).

Ces présentations peuvent également être décrites en fonction de leur localisation anatomique et des symptômes associés :

- La forme multicentrique, caractérisée par une adénomégalie superficielle. Le plus souvent il s'agit des nœuds lymphatiques mandibulaires et préscapulaires. On peut noter une infiltration pulmonaire ainsi qu'une hépatomégalie et une splénomégalie.
- La forme digestive qui infiltre le tractus digestif se manifeste par des symptômes digestifs chroniques : vomissements, diarrhées, ainsi qu'une perte de poids.
- La forme médiastinale qui touche les nœuds lymphatiques médiastinaux craniaux ou le thymus (Vail *et al.*, 2013).
- La forme cutanée, qui peut être isolée ou généralisée. On distingue une forme épithéliothrope qui affecte la peau ou les jonctions cutanéomuqueuses avec une grande variété de signes cliniques (érythème, squames, alopecie, érosions, ulcères, nodules, plaques, infiltration gingivale, labiale, palpébrale, nasale, anale ou génitale, prurit parfois violent). La forme non-épithéliothrope est rare chez le chien, mais plus fréquente chez le chat et se manifeste par de multiples lésions infiltratives d'évolution rapide concernant le derme. L'évolution de ces lésions tend vers l'ulcération et est très rapide (Muller *et al.*, 2014).
- Les formes atypiques peuvent toucher tous les organes qui contiennent des lymphocytes tels que les reins, les yeux, le système nerveux et s'expriment par l'altération du fonctionnement de ces organes (Vail *et al.*, 2013).

ii- Les leucémies

La présentation clinique typique d'une leucémie aigüe inclut des signes non spécifiques comme dans le cas des lymphomes. L'hyperthermie réfractaire est liée aux substances pyrogènes libérées par les cellules tumorales. Une hypothermie est possible lorsque l'animal présente un abattement progressif depuis plusieurs jours à plusieurs semaines.

Les animaux souffrant de leucémie aigüe présentent également des signes cliniques associés :

- Aux troubles hématologiques induits par la leucémie (anémie, thrombocytopenie) tels que des muqueuses pâles voire « blanc porcelaine », du purpura, des ecchymoses ainsi que des épanchements sanguins articulaires,
- À la prolifération des cellules tumorales dans certains organes : une hépatomégalie, une splénomégalie parfois très importante, une lymphadénopathie souvent peu marquée, une infiltration rétinienne et des signes neurologiques. des symptômes digestifs ainsi qu'urinaires sont également décrits (Morris *et al.*, 1993 ; Morris et Dobson, 2001 ; Vail *et al.*, 2013).

Les leucémies chroniques, du fait de leur faible pouvoir proliférant, ont une présentation clinique très différente. En effet, les signes cliniques sont frustrés et dans la moitié des cas de leucémies chroniques, les animaux présentent un bon état général jusqu'en fin d'évolution de la maladie où les signes cliniques se rapprochent de ceux d'une leucémie aigüe (Fournel-Fleury, 2006). Le tableau 5 regroupe les complications des leucémies et les signes cliniques qu'elles impliquent chez les carnivores domestiques.

Tableau 5: Complications et signes cliniques associées dans les leucémies chez les carnivores domestiques (Dobson *et al.*, 2006)

Complications	Signes cliniques
Cytopénie(s) : Anémie non régénérative Neutropénie Thrombocytopénie	Léthargie Hyperthermie Pétéchies, Ecchymoses Saignements gingivaux
Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	Saignements généralisés
Hypercalcémie	Polyurie, polydipsie Anorexie, vomissements Bradycardie
Hyperviscosité sanguine	Signes neurologiques, Signes oculaires (vaisseaux rétiniens de taille augmentée et tortueux) Signes d'insuffisance rénale

De nombreux cas sont découverts de manière fortuite au cours d'un examen clinique et sanguin de routine chez des animaux asymptomatiques : c'est le cas pour 50% des chiens atteints de leucémie lymphoïde chronique. Lorsqu'ils sont symptomatiques, les propriétaires rapportent une léthargie, une anorexie, des vomissements et une perte de poids. Lors de leur examen clinique, on peut retrouver une légère adénomégalie généralisée, une splénomégalie, une hépatomégalie, ainsi que rarement une pâleur des muqueuses et de l'hyperthermie. Ces signes cliniques sont variables et dépendent directement du stade de l'évolution de la maladie, c'est-à-dire, de l'importance de la lymphocytose sanguine, de l'infiltration médullaire et de l'envahissement des organes périphériques (rate et foie notamment) (Workman et Vernau, 2003 ; Nelson et Couto, 2014).

En fin d'évolution, lorsque la prolifération de la lignée tumorale a conduit à la cytopénie des autres lignées, on observe des infections secondaires et récurrentes touchant divers appareils : pyodermites, entérites, bronchopneumonies évoluant parfois vers une septicémie (Leifer et Matus, 1986).

Quelques rares cas de leucémie lymphoïde chronique concernant la lignée lymphocytaire B présentent un syndrome d'hyperviscosité sanguine causée par une gammopathie monoclonale, qui se traduit par des saignements oculaires, des saignements des muqueuses, une épistaxis (Leifer et Matus, 1985).

Il est rarement possible d'établir le diagnostic de leucémie sur la base de l'historique de l'animal ou l'examen clinique.

b- Hémogramme et frottis sanguin

Pour arriver au diagnostic définitif de leucémie ou de lymphome, il faut réaliser des examens complémentaires qui permettent également de détecter la présence et la sévérité des complications associées.

i- Les leucémies

Un hémogramme donne déjà les premières pistes en faveur d'une leucémie. En effet, il permet de mettre en évidence la prolifération de la lignée cellulaire tumorale et la diminution des lignées sanguines saines. Ces modifications peuvent ne pas être détectables dans les phases aleucémiques et subleucémiques (Dobson *et al.*, 2006).

Lors de LAL, la lymphocytose peut soit être très importante ($>100\ 000$ cellules/mm³) soit discrète à normale ($<4\ 000$ cellules/mm³). Il convient alors d'exclure toute lymphocytose causée par un stress ou une excitation (de $10\ 000$ à $15\ 000$ cellules/mm³) en suivant l'évolution de cette lymphocytose dans le temps. Si elle est stable ou qu'elle augmente, c'est en faveur d'une LAL (Médaille et Briend-Marchal, 2008).

Lors de LLC, l'hémogramme révèle systématiquement une leucocytose, causée par une lymphocytose entre $6\ 000$ et $100\ 000$ cellules/mm³. Les cytopénies associées sont plus discrètes et plus tardives que lors de LAL. On retrouve une anémie dans 80% des cas, normochrome, normocytaire et arégénérative, légère à modérée, une thrombocytopenie fréquente, les neutropénies sont quant à elles rares (Vail *et al.*, 2013).

Le frottis sanguin est complémentaire des données chiffrées données par l'hémogramme et permet l'apport d'informations essentielles pour le diagnostic du type de leucémie.

Pour les leucémies aiguës, les cellules tumorales sont des cellules non différenciées (blastes) que l'on retrouve anormalement en grand nombre (Feldman *et al.*, 2000). En effet les lymphoblastes observés dans les cas de LAL sont deux à trois plus grands que les cellules lymphoïdes normales avec un cytoplasme basophile (figure 25). Leur noyau est légèrement indenté et l'on observe également un ou plusieurs nucléoles ainsi qu'une chromatine immature mouchetée (Presley *et al.*, 2006 ; Cowell et Tyler, 2006).

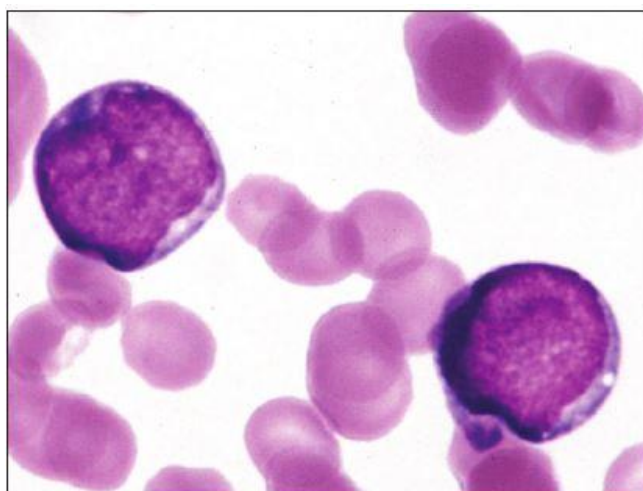
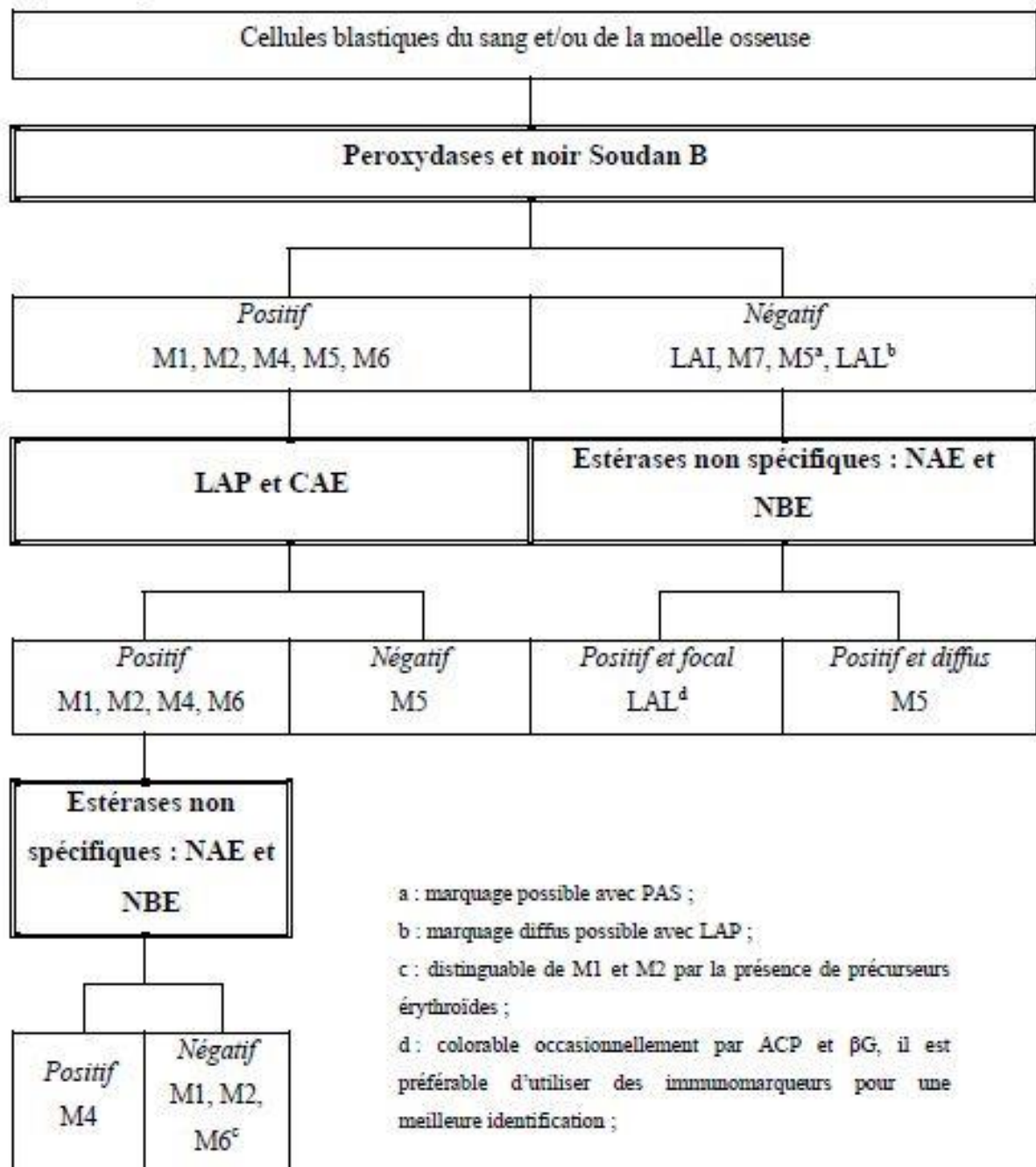


Figure 25: Lymphoblastes présents dans le sang d'un chien atteint de LAL - coloration Wright-Giemsa. (Harvey, 2015a)

Lors de leucémie compliquée d'anémie, l'hématologue doit rechercher des parasites érythrocytaires tels que *Babesia*, des bactéries telles que les *Hemobartonella*, *Ehrlichia*, ou *Rickettsia* de sorte d'éliminer l'hypothèse infectieuse. Il convient également d'éliminer les causes virales, notamment chez le chat, dont le FIV et le FeLV qui sont des causes de leucémies (Feldman *et al.*, 2000).

En revanche, le frottis ne permet pas la distinction entre LAL et LAM car les cellules tumorales étant au stade blastique, elles sont morphologiquement très proches. Il faut pour les distinguer réaliser des marquages cytochimiques (Grindem et Buoen, 1986). Il existe un algorithme qui permet de distinguer les différentes LA utilisant la peroxydase ainsi que le noir Soudan B afin de distinguer les LAM à l'exception de LAM M7 des LAL et des LAI. L'utilisation d'autres marquages tels que la leucocyte alcaline phosphatase (LAP) et la chloracétate estérase (CAE) permet de distinguer les LAM M5 des autres types de LAM. L'utilisation d'estérases non spécifiques telles que la naphtaline acétate estérase (NAE) et la naphtaline butyrate estérase (NBE) permet de distinguer la LAM M4 des LAM M1, M2 et M6. Cet algorithme est illustré dans la figure 26.

Lors de LLC, les cellules tumorales sont peu différenciables des lymphocytes normaux matures.



LAP : leucocyte alcaline phosphatase ; CAE : chloracétate esterase ; NAE : naphthaline acétate esterase ; NBE : naphthaline butyrate esterase ; ACP : phosphatase acide ; βG : bêta glucuronidase ; PAS : acide périodique de Schiff.

Figure 26: Algorithme de marquages cytochimiques utilisé dans la distinction des différentes LA (Feldman *et al.*, 2000)

ii- Les lymphomes

Une lymphocytose est observée dans moins de 20% des cas de lymphomes. Cependant chez le chien, on peut retrouver une lymphocytose pouvant évoquer une LAL, dans des cas de lymphome de stade V, mais généralement elle n'est que modérée (entre 10 000 et 20 000 cellules/mm³). Par ailleurs, les lymphomes de stade V se distinguent des LAL par la présence d'une lymphadénopathie importante et une infiltration médullaire modérée à absente (Dobson *et al.*, 2006 ; Vail *et al.*, 2013 ; Nelson et Couto, 2014).

c- Autres examens sanguins

D'autres analyses sanguines peuvent être réalisées dans le but de rechercher la présence de complications liées à la leucémie, telles qu'une hypercalcémie, une déficience organique ainsi qu'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Dobson *et al.*, 2006). La calcémie reste modérée dans les cas de leucémie primaire et survient dans 20 à 40% des cas de lymphomes (Dhaliwal *et al.*, 2003). L'augmentation des paramètres hépatiques (alanine transaminase (ALAT), phosphatases alcalines (PAL), gamma-glutamyltransférase (GGT)) traduit l'atteinte du foie souvent atteint en premier par l'envahissement tumoral. La réalisation des temps de coagulation, des tests de coagulation sur lame et dans le cas de suspicion de CIVD, le dosage des produits de dégradation de la fibrine (PDF) et de la fibrine permettent d'évaluer la fonction hémostatique qui peut être altérée par une CIVD et une atteinte hépatique (Dobson *et al.*, 2006).

d- Cytologie et histologie

i- Myélogramme

Lors d'une leucocytose marquée et persistante, le myélogramme est l'examen de choix pour diagnostiquer une leucémie du fait même de la définition de la maladie. Le diagnostic de leucémie aigüe est posé dès lors que 30% ou plus des cellules médullaires sont des cellules blastiques (Grindem *et al.*, 2002).

Le myélogramme se réalise à partir de ponctions cellulaires de moelle osseuse réalisées dans l'os spongieux. Différents sites de prélèvements sont possibles en fonction de la taille de l'animal (Figure 27) :

- Les crêtes iliaques chez le chat et les grands chiens,
- La tête humérale chez le chien et le chat,
- La fosse trochantérienne pour les chats, les chiens de petites races et animaux en croissance,
- Les 3^{ème} et 5^{ème} sternèbres chez les jeunes chiens de grande taille (Grindem *et al.*, 2002; Abella-Bourgès *et al.*, 2005).

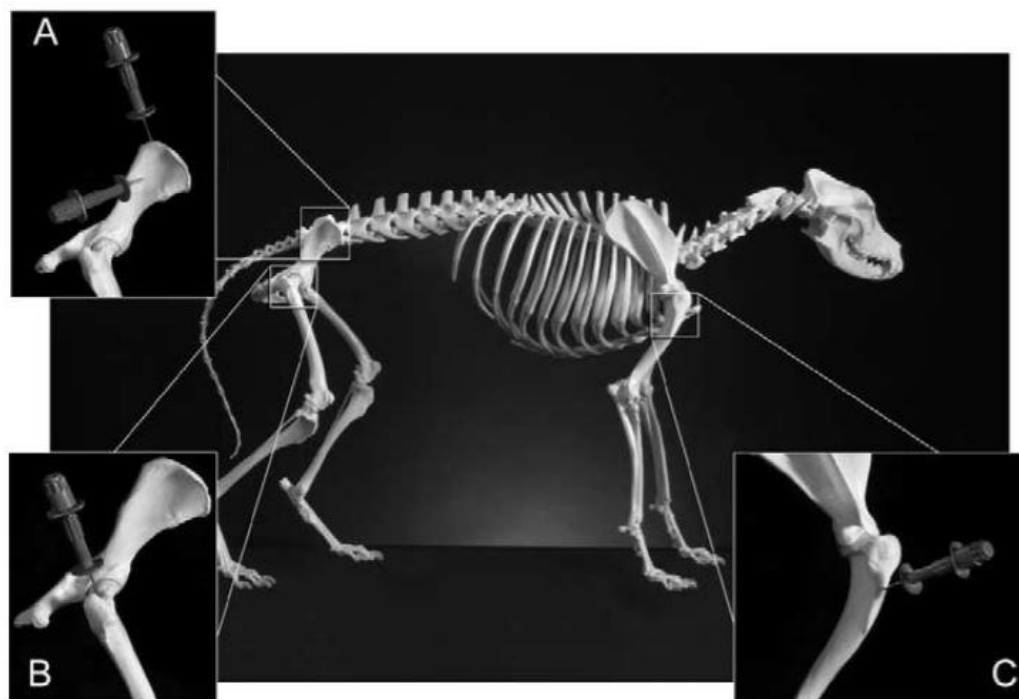


Figure 27: Sites de prélèvement de moelle osseuse représentés sur un squelette de chien A : crête iliaque en dorsal, aile de l'ilium en latéral. B : fosse trochantérienne. C : tête humérale (Grindem *et al.*, 2002)

Le nombre de blastes est rapporté à celui de toutes les cellules nucléées de la moelle osseuse (incluant les lymphocytes, les macrophages, les mastocytes et les plasmocytes) ainsi qu'à celui des cellules non érythroïdes. Puis ils sont caractérisés à l'aide de marqueurs cytochimiques (Feldman *et al.*, 2000).

Le myélogramme est particulièrement utile dans les cas de leucémies aleucémiques ou subleucémiques, c'est-à-dire lorsque les cellules blastiques ne sont pas ou peu passées dans le sang (Grindem et Buoen, 1986).

Comme pour le frottis sanguin, déterminer le type de LA sur un myélogramme avec seulement des critères morphologiques est très rarement possible. Il est nécessaire d'utiliser des techniques complémentaires comme les marquages immunocytochimiques lisibles en microscopie optique ou les marquages immunofluorescents lisibles par la CF. L'immunophénotypage est incontournable (Fournel-Fleury *et al.*, 1994).

Lorsque le myélogramme montre 30% ou plus de lymphocytes matures alors il est possible de conclure à une leucémie lymphoïde chronique, à condition d'avoir écarté l'hypothèse d'un lymphome métastasé dans la moelle osseuse (Workman et Vernau, 2003). Lors de LLC, la lymphocytose est majeure et une cytopénie discrète des lignées cellulaires non lymphoïdes est observée (Leifer et Matus, 1986).

Le myélogramme peut également présenter une hypergranulocytose, c'est-à-dire un rapport M/E augmenté, où M est le nombre de cellules des différentes lignées granuleuses et E le nombre de cellules érythroïdes. Physiologiquement, M/E est compris entre 0,75 et 2,5 (Grindem *et al.*, 2002).

Ce rapport varie entre 3 et 24 dans les cas de leucémie myéloïde chronique (Fournel-Fleury *et al.*, 1994).

ii- La cytologie sur cytoponction à l'aiguille fine

✓ Généralités

Il s'agit de l'observation au fort grossissement microscopique des cellules prélevées par aspiration au sein d'une lésion. Le processus d'obtention de ces cellules est repris dans la figure 28.

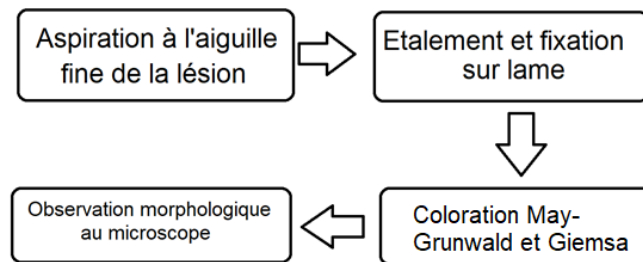


Figure 28 : Différentes étapes menant à la cytologie sur cytoponction à l'aiguille fine

Les informations fournies par cet examen sont toujours utiles, c'est d'ailleurs l'examen de choix et de première intention dans la démarche diagnostique lors d'adénomégalie sans cause évidente. Par ailleurs, le développement de l'échographie en routine permet la réalisation de cytoponctions échoguidées de lésions présentes sur les organes internes. Ces informations peuvent ainsi permettre de poser un diagnostic de lymphome, les formes digestives étant fréquemment diagnostiquées par cette méthode (May, 2001).

✓ Avantages et limites

La cytoponction à l'aiguille fine présente plusieurs avantages en comparaison avec la biopsie. En effet, elle ne nécessite généralement pas d'anesthésie générale sauf pour les animaux les plus agités (May, 2001). Elle permet la ponction d'organe de petite taille alors que pour réaliser des biopsies à l'aide de pistolet à biopsie, il faut des organes d'une taille minimale correspondant à la taille du pistolet (May, 2001 ; Ramery et Layssol, 2016).

La cytoponction est préférée à la biopsie dans le cas de tissus richement vascularisés comme la rate ou des tumeurs hypervascularisées ou de tissus présentant un risque septique lors de leur prélèvement, afin de limiter les risques de saignements ou de péritonite lors d'un passage transluminal (May, 2001).

La cytologie après ponction à l'aiguille fine présente des limites. En effet, la qualité du diagnostic dépend de la représentativité, de la richesse cellulaire et de la qualité de l'échantillon. Celles-ci dépendent quant à elles de la qualité du prélèvement, du bon repérage de la zone de ponction et d'un étalement correct sur la lame.

Le diagnostic différentiel de l'adénomégalie comprend notamment une lymphadénite, rare chez le chien, une hyperplasie et un lymphome. Le lymphome se caractérise par un monomorphisme de la population cellulaire suspecte, une répétition d'anomalies cytonucléaires, l'absence de plasmocytes et une disparition des blastes (Fournel-Fleury *et al.*, 1994).

Malgré ces limites, la cytologie à l'aiguille fine est un examen fiable, avec un pouvoir diagnostique d'environ 90% quand l'échantillon est qualitatif (Ramery et Layssol, 2016).

e- Immunomarquage

L'immunomarquage est une technique d'immunophénotypage cellulaire qui consiste en la mise en évidence d'enzymes ou de molécules spécifiques d'un type cellulaire que l'on retrouve dans les cellules tumorales ainsi que dans les cellules saines, grâce à des Ac spécifiques. Le choix des marqueurs utilisés se fait en fonction des informations recueillies par la cytologie. Ainsi, cette technique permet la caractérisation d'une population cellulaire d'après ses marqueurs et de déterminer le type de cellules impliquées. Elle affine fréquemment le diagnostic formulé lors de la cytologie et le modifie parfois (Brousse *et al.*, 1997).

Ces marquages peuvent être réalisés soit sur une coupe de tissu, c'est alors de l'immunohistochimie qui nécessite la préparation des échantillons pour l'histologie, soit sur un prélèvement cytologique à la suite d'une ponction à l'aiguille fine, on parle alors d'immunocytochimie (Brousse *et al.*, 1997).

Cette technique permet de différencier les lymphomes des autres proliférations ganglionnaires non néoplasiques. En effet dans les structures lymphoïdes, les populations lymphocytaires sont habituellement variées. Dans le cas d'un immunomarquage de nœuds lymphatiques présentant une population homogène de lymphocytes positifs pour les mêmes marqueurs, le diagnostic est en faveur d'un lymphome (Magnol, 1998).

Par immunocytochimie, il est possible aujourd'hui de distinguer les LB des LT ainsi que de préciser le caractère CD4/CD8 de ceux-ci, afin de typer précisément les lymphomes ce qui est d'un grand intérêt pronostique et pour l'orientation du traitement.

3- Les apports de la cytométrie en flux

a- Précision du diagnostic

L'immunophénotypage permet de différencier les types cellulaires sanguins grâce à leurs Ag de surface. La CF est devenue la référence en médecine humaine dans le diagnostic des leucémies aigües grâce à une meilleure sensibilité que la cytochimie (Kheiri *et al.*, 1998). Différents marqueurs chez les animaux ont été identifiés (Tableau 6) et différentes études les jugent fiables dans un processus diagnostique (Danilenko *et al.*, 1992 ; Cobbold et Metcalfe, 1994 ; Vernau et Moore, 1999). La CF permet d'obtenir un diagnostic fiable, même dans le cadre de pathologies particulièrement difficiles à diagnostiquer à l'aide de la cytologie en microscopie optique, comme par exemple la leucémie éosinophile chronique chez le chat (Sharifi *et al.*, 2008).

i- Large panel de marqueurs utilisé

L'utilisation de large panel d'Ac monoclonaux permet la description précise des cellules étudiées. Lors d'analyses sur prélèvements sanguins, le CD34 est utilisé pour marquer une origine médullaire des cellules et ainsi un caractère leucémique. Les marqueurs CD3 et CD21 permettent de distinguer les lymphocytes T (CD3⁺/CD21⁻) des lymphocytes B (CD3⁻/CD21⁺). Les LT peuvent ensuite être marqués avec CD4 et CD8 afin de préciser le type de lymphome. Lorsque les LT sont CD4⁻/CD8⁻, il est nécessaire de les tester avec des marqueurs de NK comme CD69⁺ ou CD11b⁺ ou CD3⁻αD⁺CD8α⁺. Le caractère myéloïde des cellules est souvent défini par l'absence de marqueurs lymphoïdes et l'expression variable de différents marqueurs tels que CD1c, CD11b, CD11c, CD11d, CD14. Le caractère non différencié des cellules impliquées se définit par la présence de marqueurs très généraux de leucocytes tels que CD45, CD11a, CD18, CD49d et CD90 (Vernau et Moore, 1999 ; Workman et Vernau, 2003).

Tableau 6: Différents Ag CD identifiés chez les animaux d'après Feldman et al., 2000.

Antigènes	Espèce canine	Espèce féline	Distribution
CD ₁	-	X	Thymocytes corticaux, cellules dendritiques, cellules de Langerhans, pré-lymphocytes B ;
CD ₄	X	X	Lymphocytes T helper, monocytes, macrophages ;
CD ₅	X	X	Lymphocytes T, pré-lymphocytes B ;
CD ₈	X	X	Lymphocytes T cytotoxiques ;
CD ₉	-	X	Thrombocytes, monocytes, pré-lymphocytes B ;
CD _{11a}	X	-	Leucocytes ;
CD _{11b}	X	-	Granulocytes, monocytes, NK ;
CD _{11c}	X	-	Granulocytes, monocytes, NK, pré-lymphocytes T, pré-lymphocytes B ;
CD ₂₁	X	X	Lymphocytes B ;
CD ₂₅	-	X	Lymphocytes T activés ;
CD ₃₄	X	X	Cellules souches et cellules précurseurs hématolymphopoïétique ;
CD _{41/61}	X	-	Thrombocytes, mégacaryocytes ;
CD ₄₄	X	-	Leucocytes, érythrocytes ;
CD ₄₅	X	X	Leucocytes ;
CD _{45R}	X	-	Lymphocytes B, pré-lymphocytes T ;
CD ₄₉	X	-	Lymphocytes B, pré-lymphocytes T, monocytes, thrombocytes ;
CD ₆₉	X	-	Lymphocytes T et B activés, NK.

CD : cluster of differentiation ; NK : cellules natural killer.

ii- Méthode de détection des hémopathies malignes.

Différentes études ont permis de déterminer des valeurs de références en CF chez le chien et le chat quant aux différents marqueurs membranaires des lymphocytes dans le sang (Tableau 7 et 8) (Dean *et al.*, 1991 ; Byrne *et al.*, 2000 ; Winnicka *et al.*, 2002 ; Gibson *et al.*, 2004 ; Reis *et al.*, 2005).

En ayant fixé des valeurs de référence, il est ainsi facile de déceler des anomalies de composition lors de prélèvements par cytoponction dans les nœuds lymphatiques ou par prélèvement sanguin.

Tableau 7 : Valeurs de référence des différents marqueurs de lymphocytes dans le sang chez le chien sain

Marqueurs chez le chien en fonction de la classe d'âge	D'après Byrne et al, 2000	D'après Winnicka et al. 2002	D'après Reis et al, 2005 (Chiens mâles sans différence statistique avec les femelles de même âge)
CD5 (LT)	83,3% ± 3,5%	61,56% ± 3,04%	
Jeunes chiens (≈4 mois)			57,5% ± 12,1%
Chien d'âge moyen (2-6 ans)			74,6% ± 6,1%
Chiens âgés (≈ 9ans)			
CD4	45,0% ± 8,3%	40,77% ± 2,04%	
Jeunes chiens (≈4 mois)			39,9% ± 9,7%
Chiens d'âge moyen (2-6 ans)	45,1% ± 5,4%		44,6% ± 5,3%
Chiens âgés (≈ 9ans)	30,9% ± 8,7%		
CD8	28,8% ± 5,6%	26,44 ± 1,7%	
Jeunes chiens(≈4 mois)			24,9% ± 4,6%
Chiens d'âge moyen (2-6 ans)	17,0% ± 5,5%		28,9% ± 8,7%
Chiens âgés (≈ 9ans)	18,9 % ± 8%		
CD21-Like (LB)	12,9% ± 3,9%	5,12% ± 0,2%	
Jeunes chiens (≈4 mois)			21,1% ± 9,2%
Chiens d'âge moyen (2-6 ans)	22,7% ± 5,2%		10,1% ± 3,7%
Chiens âgés (≈9ans)	13,8% ± 2,5%		

Ratio CD4/CD8	1,87% ± 0,48%		
Jeunes chiens (≈4 mois)			1,7% ± 0,6%
Chiens d'âge moyen (2-6 ans)	3,17% ± 0,96%		1,7% ± 0,5%
Chiens âgés (≈9ans)	2,21% ± 1,41%		

Tableau 8: valeurs de référence des différents marqueurs de lymphocytes dans le sang chez le chat sain

Marqueurs chez le chat	D'après Dean et al. 1991	D'après Byrne et al. 2000
LT	Marqueur F43 : 55,3% ± 11,5%	Marqueur Pan T1 (CF54A) : 77,3% ± 3,9%
CD4	32,1% ± 7,9%	44,5% ± 6,7%
CD8	22,8 % ± 5,8%	25,7% ± 6,5%
CD21	/	24,1% ± 11,4%

D'autres études ont permis la création de valeur de référence en CF pour différents marqueurs cellulaires des lymphocytes dans les nœuds lymphatiques chez le chien (Tableau 9).

Dans le cas des lymphomes B, il n'y a pas encore de consensus sur une valeur seuil de pourcentage de LB dans une aspiration à l'aiguille fine pour les différencier d'une prolifération de LB réactifs (Riondato et Comazzi, 2021). Certaines études proposent la valeur de 60% de cellules porteuses de CD21 (Wilkerson *et al.*, 2005 ; Pinheiro *et al.*, 2014), d'autres 65% (Pawlak *et al.*, 2016). Etudier la taille de ces LB aide à faire cette distinction. En effet les LB réactionnels sont généralement de petite taille (Figure 29). Ce paramètre est évalué par le FSC et il a été montré que les lymphomes B diffus à grandes cellules présentaient une FSC supérieure à 469 U, seuls les lymphomes folliculaires et les lymphomes B diffus à petites cellules présentaient des LB de taille inférieure (Wolf-Ringwall *et al.*, 2020).

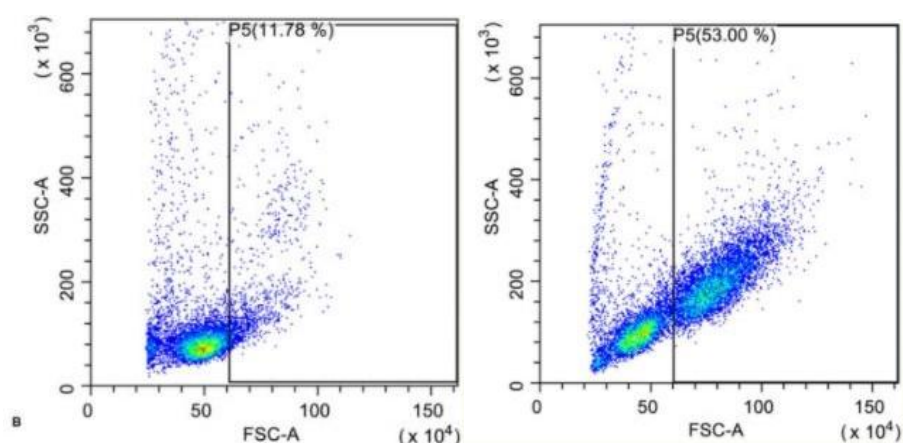


Figure 29: diagramme mesurant le SSC et FSC des LB après une aspiration à l’aiguille fine. A gauche dans le cas d'un nœud lymphatique réactionnel, à droite dans le cas d'un lymphome à grandes cellules B (Riondato et Comazzi, 2021)

Tableau 9: Valeur de référence en pourcentage des différents marqueurs de lymphocytes dans un nœud lymphatique de chien sain (Gibson *et al.*, 2004 ; Rütgen *et al.*, 2015)

Marqueurs	D’après Rütgen et al. 2015	D’après Gibson et al. 2004
CD3+ (LT)	55,0% ± 14,1%	54,5% ± 23,3%
Dont CD4+	58,7 ± 9%	
Dont CD8+	21,3% ± 7,8%	
CD4+		22,1% ± 8,7%
CD8+		9,0 ± 4,4%
CD5+	52,3% ± 12,7%	
CD21+ (LB)	33,9% ± 11,8%	31,4% ± 17,4%
CD14+	5,5 % ± 6,8%	2,4% ± 1,7%

La deuxième méthode, plus fiable, pour diagnostiquer une néoplasie reste d’identifier une population cellulaire avec un phénotype aberrant (Comazzi et Gelain, 2011), avec ajout ou suppression d’un marqueur sur une population cellulaire (Figure 30) comme par exemple l’expression de marqueurs de cellules T sur des lymphocytes B ou la diminution d’expression d’un marqueur comme le CD79a (Gelain *et al.*, 2008).

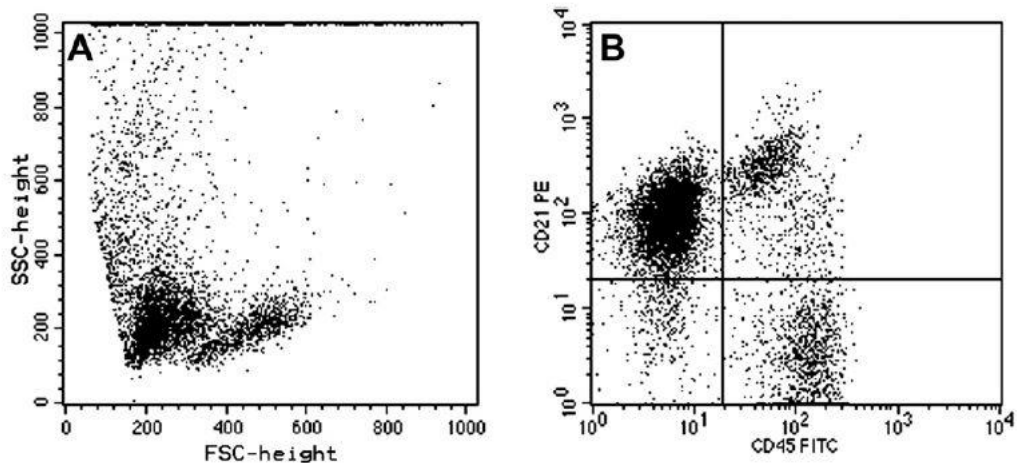


Figure 30 : phénotype aberrant lors d'un lymphome B sur une cytoponction de nœud lymphatique : la population CD21+CD45- présente un phénotype aberrant par l'absence de CD45 (Comazzi et Gelain, 2011).

iii- Représentativité de l'analyse

L'usage de la CF permet l'analyse d'un plus grand nombre de cellules. En effet l'ensemble des cellules de l'échantillon est marqué puis analysé par le cytomètre soit plusieurs centaines de milliers de cellules. Alors que l'immunocytochimie ne permet la description que d'un nombre limité de cellules par le cytologiste.

b- Rapidité d'analyse

Dans le diagnostic de lymphome ou de leucémie, la CF remplace l'immunocytochimie, qui nécessite de nombreuses étapes entre la préparation de l'échantillon, la coloration de la lame avec des Ac couplés à des fluorochromes et ensuite la lecture de la lame au microscope par un cytologiste. Les laboratoires mettent en moyenne, en immunocytochimie, entre 1 à 2 semaines à rendre leur résultat après réception des échantillons, contre 24 à 48h pour la CF.

Grâce à la CF, les mêmes informations sont obtenues avec une rapidité bien plus importante. L'analyse nécessite moins de préparation et prend moins de temps, de plus elle est réalisée par un automate, donc le cytologiste peut se consacrer à l'étude des résultats. C'est pourquoi, les résultats sont disponibles en général dans les 48h après réception des échantillons (Biopôle ENVA, 2021).

Ces données fournissent des informations capitales couplées au tableau clinique ainsi qu'aux résultats de la numération formule sanguine (NFS) et aux autres examens complémentaires réalisés. L'ensemble des informations récoltées grâce aux examens complémentaires permet d'établir un diagnostic plus rapidement et ainsi d'informer le propriétaire de l'animal du pronostic associé et des différentes options thérapeutiques et de les mettre en place plus précocement, ce qui est primordial dans le cas de pathologies extrêmement agressives comme les leucémies aiguës par exemple.

c- Affinage du pronostic

La CF permet d'établir le phénotype précis des cellules. Cette identification permet d'orienter le pathologiste et permet ensuite d'apporter un pronostic aux propriétaires des animaux malades.

i- En fonction du diagnostic

✓ Leucémie aigue

Les leucémies aigues sont les hémopathies malignes qui présentent les pronostics les plus sombres. Ce pronostic sévère est lié à un faible taux d'induction de rémission et à la difficulté de la maintenir, aux déficiences organiques qui augmentent la toxicité du traitement et aux septicémies.

Chez le chien, le pronostic des LAL est légèrement meilleur que celui des LAM, avec seulement 20 à 40% des cas de LAL qui entrent en rémission, et généralement des moyennes de survie entre 1 et 3 mois, parfois plus. Le temps de survie des chiens atteints de LAM ne dépasse que rarement les 3 mois (Dobson *et al.*, 2006 ; Couto, 2014). Chez le chat, les LAL sont d'aussi mauvais pronostic que chez le chien. Une étude rétrospective menée sur 6 chats atteint de LAL et traité par chimiothérapie a mis en évidence une médiane de survie de 55 jours (extrêmes : 1- 115) (Tomiyasu *et al.*, 2018).

✓ Leucémie chronique

Les leucémies chroniques présentent un pronostic plus favorable que les LA. Les moyennes de survie peuvent dépasser un an pour les LLC qui ont souvent une évolution asymptomatique, et sont généralement plus courtes pour les LMC (Feldman *et al.*, 2000 ; Dobson *et al.*, 2006). Chez le chien et le chat, les LLC serait entre 68% et 73% des LLC à LT (T-LLC) (Ruslander *et al.*, 1997 ; Vernau et Moore, 1999).

Chez le chien, le pronostic serait meilleur pour les T-LLC avec une durée de survie trois fois plus longue que pour les LLC à cellules B (B-LLC) et 19 fois plus importante que pour les LLC atypiques (Comazzi *et al.*, 2011). Les B-LLC sont considérées comme une forme indolente de leucémie chronique, mais les évolutions cliniques sont assez variables, notamment pour les chiens qui présentent un Ki67 élevé et qui présentent une forme plus agressive (Rout *et al.*, 2021). Chez le chat, il existe assez peu d'études sur le pronostic des LLC.

✓ Lymphome

Dans le cas des lymphomes canins, le taux de réponse aux traitements est assez élevé avec 80% des chiens présentant une durée médiane de survie de 1 an, certains patients ont une rémission clinique et une durée de survie très courtes malgré les traitements parfois très agressifs instaurés (Keller *et al.*, 1993). Avec l'évolution des connaissances, il a été mis en évidence que le lymphome canin est une entité très hétérogène avec des évolutions et des pronostics très variés (Deravi *et al.*, 2017).

Les lymphomes T sont de moins bons pronostics que les lymphomes B, en effet les durées de rémission clinique et durée de survie moyenne sont plus courtes (Fournel-Fleury *et al.*, 1997 ; Starrak *et al.*, 1997 ; Dobson *et al.*, 2001).

Par exemple dans le cas des lymphomes spléniques, l'équipe de Van Stee a montré en 2015 que parmi les chiens traités par splénectomie, ceux souffrant d'un lymphome à cellules B présentaient une survie globale bien supérieure à ceux souffrant de lymphome T, en moyenne entre 377 jours pour les lymphomes de la zone marginale et 561 jours pour les lymphomes à cellules B autres que le lymphome du manteau et le lymphome de la zone marginale, pour une moyenne de 4 jours pour les chiens atteints de lymphomes T périphériques et de 8 jours pour les lymphomes NK (van Stee *et al.*, 2015).

ii- Pronostic en fonction d'autres marqueurs

La CF permet d'identifier et de quantifier la présence de certains marqueurs à la surface des cellules cancéreuses. Certains de ces marqueurs ont été identifiés comme facteurs pronostics dans le cas des lymphomes.

✓ Ki67

Parmi cette hétérogénéité des lymphomes, il a été montré chez le chien que l'Ag nucléaire Ki67 comme chez l'Homme est un indicateur du grade du lymphome. Lorsque que le pourcentage de cellules exprimant Ki67 est supérieur à 12,2%, le lymphome est très probablement de haut grade (sensibilité = 96,3%, spécificité = 100%) (Poggi *et al.*, 2015). Par ailleurs, le niveau d'intensité d'expression de Ki67 est un facteur pronostic dans les lymphomes B de haut grade . En effet les chiens atteints d'un lymphome B de haut grade et une intensité intermédiaire (20,1-40%) du Ki67 présentent une survie moyenne et un intervalle sans rechute plus longs que les chiens présentant une intensité de Ki67 plus haute (Poggi *et al.*, 2017). Cependant, en pratique pour le moment, ce marqueur est essentiellement utilisé en immunohistochimie.

✓ Ratio CD4/CD8

Le ratio CD4/CD8 dans le sang périphérique est un facteur pronostic dans le cadre des lymphomes canins. Un ratio bas est associé à une durée de survie plus longue et un meilleur pronostic. Un ratio CD4/CD8 élevé est également associé à une rechute du lymphome avant que les signes cliniques ne soient détectés (O'Connor *et al.*, 2012). Le ratio CD4/CD8 est un facteur pronostic dans nombre d'autres néoplasies (Biller *et al.*, 2010 ; Watabe *et al.*, 2011).

✓ Immunophénotype des LT

Parmi les lymphomes multicentriques, les immunophénotypes $CD4^+/CD8^-/MHCII^+$, $CD4^-/CD8^+/MHCII^+$ et $CD4^-/CD8^+/MHCII^-$ ont une durée de survie moyenne plus longue que l'immunophénotype $CD4^+/CD8^-/MHCII^-$. Les immunophénotypes $CD4^+/CD8^-/MHCII^+$, $CD4^-/CD8^+/MHCII^-$ et $CD4^-/CD8^-/MHCII^+$ sont associés à des durées sans évolution de la maladie, plus longues. Pour les lymphomes multicentriques, le poids, le sexe, la taille des cellules et les différents protocoles de chimiothérapie n'ont pas montré de différences significatives en terme de pronostic dans certaines études (Deravi *et al.*, 2017).

✓ CMH II

Au sein des lymphomes à cellules B, un faible niveau d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) serait associé à un mauvais pronostic tant pour la mortalité que pour la rechute (Sato *et al.*, 2012).

✓ CD25

Il a été montré que les chiens atteints de lymphome diffus à grandes cellules B (DLBC) et de lymphome de la zone T présentent un nombre de cellules de CD25⁺ plus important (respectivement 49% et 80,2%) que les chiens sains (9,8%). Il a été montré également que la durée de survie sans aggravation est plus courte chez les chiens atteints de lymphome diffus à grandes cellules B dont l'expression de CD25 dans les nœuds lymphatiques est importante que chez les chiens pour lesquels elle est basse (Mizutani *et al.*, 2016). Ainsi le niveau d'expression de CD25 permettrait de préciser le pronostic associé à ces types de néoplasie.

d- De nouvelles pistes de traitement

i- La chimiothérapie : traitement classique

La chimiothérapie reste l'approche de base dans le traitement des leucémies et des lymphomes chez le chien et le chat. De nombreux protocoles sont utilisés depuis des décennies. En fonction des pathologies, il existe des protocoles plus efficaces que d'autres. Très souvent, le traitement associe plusieurs molécules anti-cancéreuses qui agissent à différentes étapes du cycle cellulaire, car les populations cellulaires tumorales sont souvent hétérogènes avec des cellules à des phases différentes du cycle cellulaire (Feldman *et al.*, 2000). Il convient de préciser qu'une rémission n'est pas une guérison mais l'abaissement de la lymphocytose tumorale en dessous d'un seuil fixé par le thérapeute. Pour cela, on suit l'évolution du nombre de cellules tumorales grâce à la CF au cours et en fin de traitement.

Un des protocoles les plus connus est le protocole COP (Cyclophosphamide, Oncovin®= vincristine et Prednisolone). La vincristine (Oncovin®) est un alcaloïde qui empêche la polymérisation des microtubules, bloquant les cellules en phase de mitose (Dobson *et al.*, 2008), diminuant ainsi fortement la viabilité des cellules (Pawlak *et al.*, 2014). Le cyclophosphamide (Endoxan®) est un agent alkylant immunodépresseur et anti-néoplasique cytostatique qui empêche toute réplication et transcription de l'ADN, il agit ainsi à toutes les phases du cycle cellulaire. Il fait partie des meilleures molécules induisant l'apoptose (Pawlak *et al.*, 2014). Il peut s'administrer de façon quotidienne par voie orale à la dose de 50mg/m² ou de façon hebdomadaire par voie intraveineuse à la dose de 250mg/m² (Presley *et al.*, 2006). Lorsque le protocole COP est complété par de la doxorubicine, il est appelé CHOP.

D'autres molécules sont classiquement utilisées :

- La L-asparaginase (Kidrolase®) qui agit sur le métabolisme protéique des cellules cancéreuses. Cependant les cellules tumorales développent rapidement une résistance à cette molécule (Dobson *et al.*, 2008).
- La cytosine arabinoside, encore appelé cytarabine, est un antimétabolite qui empêche la réplication de l'ADN en inhibant l'ADN polymérase (Dobson *et al.*, 2008).
- Le chlorambucil, agent anticancéreux cytostatique alkylant qui empêche la réplication de l'ADN (Dobson *et al.*, 2008)

ii- L'immunothérapie : vers de nouvelles pistes de traitement

L'immunothérapie consiste à agir sur le système immunitaire du patient afin de l'aider à lutter contre sa maladie. Ainsi dans le cadre du cancer, elle aide le système immunitaire à reconnaître et à détruire les cellules tumorales. En médecine humaine, les oncologues disposent de différents outils comme la vaccination avec des cellules autologues, les cytokines, les Ac monoclonaux et les cellules thérapeutiques. En médecine vétérinaire, toutes ces options ne sont pas encore disponibles.

Les différentes pistes thérapeutiques présentées ci-après sont destinées aux lymphomes ou leucémie à cellules B, c'est pourquoi il est important d'immunophénotyper, notamment grâce à la CF, les lymphomes et les leucémies lymphoïdes. Ainsi on peut proposer une gamme plus large de traitements aux propriétaires d'animaux souffrant d'hémopathies à cellules B.

✓ Vaccins

Différents vaccins utilisant plusieurs approches ont été étudiés.

Les premiers se fondent sur l'activité de la télomérase reverse transcriptase (TERT), il s'agit d'une enzyme à activité transcriptase inverse, qui assure la synthèse de la séquence télomérique en utilisant l'autre sous-unité ARN comme matrice (Peruzzi *et al.*, 2010). Son activité est nécessaire à la prolifération cellulaire et elle est présente dans plus de 90% des tumeurs canines (Impellizeri *et al.*, 2018). Ces vaccins ciblent la télomérase qui ne peut plus fonctionner normalement. Une première étude a montré une augmentation de la durée médiane de survie chez les chiens vaccinés après la première rémission mais aucune amélioration sur la durée de la première rémission (Gavazza *et al.*, 2013). Plus récemment une étude a montré que les chiens vaccinés avec le Tel-eVax, en plus d'avoir une durée de survie plus longue, ont produit des Ac contre la télomérase (Impellizeri *et al.*, 2018).

A ce jour, les vaccins autologues sont les plus utilisés et les plus efficaces, chez le chien. Il existe un vaccin qui récolte les protéines de choc thermique tumorales pour les réinjecter ensuite (APAVAC) ainsi que des vaccins fabriqués à partir des tissus tumoraux qui représentent ainsi toute la diversité antigénique tumorale. Une étude rétrospective menée sur 5 ans dans deux centres italiens d'oncologie vétérinaire, a montré que la vaccination avec APAVAC augmentait significativement la durée de survie des chiens atteints de lymphome B traités par le protocole chimiothérapeutique CHOP par rapport à ceux non vaccinés (médiane de 401 jours contre 220 jours). De plus, le taux de survie à 1 an est passé de 20% à 51% avec l'ajout de la vaccination à la chimiothérapie. Les bénéfices de

l'immuno-chimiothérapie étaient les plus importants pour les chiens en stade V, qui n'ont pas été traités préalablement par des stéroïdes et qui présentent un taux élevé de LDH dans le sang. Par ailleurs cette étude a montré que cette immunothérapie est très bien tolérée par les patients sans réactions locales ni systémiques (Marconato *et al.*, 2019). Les vaccins autologues à base de tissus cancéreux autologues présentent peu d'effets secondaires comme une légère hyperthermie, une démangeaison au site d'injection ou une léthargie qui ont disparu sans intervention médicale (Crossley *et al.*, 2019).

Un vaccin à ADN xénogénique ciblant le CD20 canin est en cours d'étude. Sa technologie se fonde sur le principe du vaccin Oncept[®] développé pour lutter contre les mélanomes canins. Le vaccin contient un plasmide d'ADN murin codant pour le CD20. L'organisme synthétise ce CD20 murin et produit en retour des Ac anti-CD20 capable de réagir envers le CD20 murin et le CD20 canin, détruisant ainsi les LB malins. Ce vaccin s'administre par voie transdermique. Il devrait produire une réponse Ac anti-CD20 similaire à celle observée chez l'Homme (Thamm, 2019).

Ces différents vaccins ne sont étudiés que sur des chiens atteints de lymphomes B, en effet le chien est un modèle animal pour la recherche thérapeutique humaine avec une présentation de la maladie spontanée proche de la présentation chez l'Homme.

✓ Les Ac monoclonaux

En médecine humaine, les Ac monoclonaux dirigés contre CD20 exprimé par la majorité des cas de lymphomes à cellules B ont révolutionné le traitement de ces pathologies.

Chez le chien, un Ac anti-CD20 a été mis au point en 2014, mais il a été retiré du marché après que les études n'aient montré aucune amélioration des résultats lors de son utilisation en adjuvant à une chimiothérapie conventionnelle. Un autre Ac anti-CD20 semble prometteur sur la déplétion des LB *in vivo* chez des chiens de laboratoire mais il est encore en phase de développement (Thamm, 2019). En 2020, une nouvelle étude a généré un Ac chimérique anti-CD20 de chien (4E1-7-B_f) qui a montré une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac ainsi qu'une cytotoxicité dépendante du complément *in vitro* et une déplétion considérable sur des lymphocytes B de beagles sains *in vivo*. C'est ainsi un bon candidat au traitement des lymphomes B chez le chien (Mizuno *et al.*, 2020).

D'autres études sont en cours sur le sujet afin d'obtenir de nouvelles pistes thérapeutiques des chiens atteints de lymphomes mais également pour la thérapeutique en médecine humaine. Une équipe a généré un Ac anti-CD19 canin qui *in vitro*, se révèle être spécifique du CD19 canin (Haran *et al.*, 2020).

Par ailleurs, des études se sont intéressées au blocage de certains points de contrôle immunitaire comme l'axe CD47/SIRP α qui régule l'activation des macrophages. CD47 est exprimé par les cellules cancéreuses et leur permet d'éviter la phagocytose. Ainsi bloquer CD47 permet de stimuler la phagocytose des cellules cancéreuses *in vitro*. Cette approche est plus efficace encore lorsque qu'elle est associée à des Ac anti-CD20 (Weiskopf *et al.*, 2016)

Les Ac monoclonaux restent une piste thérapeutique intéressante pour le traitement futur des lymphomes B.

✓ Thérapies par les LT

En médecine humaine, l'une des dernières avancées en matière de traitement des hémopathies lymphoïdes est la technologie des LT à récepteur antigénique chimérique (CAR-T). Ce sont des LT modifiés génétiquement pour reconnaître des Ag de surface portés par les cellules tumorales et qui possèdent un domaine d'activation propre. Ils ne nécessitent pas de second signal d'activation pour s'activer (Thamm, 2019).

Chez le chien, quelques études ont déjà été menées. Les premières études montraient que les CAR-T CD20 étaient spécifiques du CD20 et possédaient une cytotoxicité *in vitro* (Panjwani *et al.*, 2016). Elles ont montré leur efficacité dans le traitement du lymphome car elles avaient persisté et se localisaient dans les tissus tumoraux, en obtenant de meilleurs résultats en complément du protocole CHOP, que lorsque celui-ci était administré seul. En 2020, l'équipe de Sakai a généré des CAR-T de deuxième et troisième génération par transduction de gène rétroviral et les ont testées *in vitro*. Elles ont présenté une cytotoxicité contre les cellules tumorales exprimant CD20 mais n'eurent aucun impact sur les cellules ne l'exprimant pas (Sakai *et al.*, 2020).

Afin de pouvoir utiliser cette technologie, il faut au préalable avoir identifié les Ag portés par les cellules tumorales par CF afin d'utiliser les bonnes CAR-T.

✓ Transplantation de cellules hématopoïétiques autologues

Chez l'homme, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ est utilisée couramment chez des patients en rechute de lymphomes à grandes cellules B avec un taux de rémission de 50%. Des études ont montré que ce protocole est applicable chez le chien. Les chiens atteints de lymphomes B subissent un traitement à haute dose de cyclophosphamide et de stimulateur des précurseurs sanguins. Puis un prélèvement de cellules mononuclées dans le sang périphérique est réalisé, grâce à la CF, les cellules CD34⁺ sont isolées pour être réinjectées au patient après qu'il ait subi une radiothérapie par irradiation corporelle totale. Sur 21 chiens ayant reçu ce traitement, l'intervalle médian sans maladie était de 271 jours et la durée de survie globale de 463 jours (Willcox *et al.*, 2012).

Une étude a ensuite été menée avec le même protocole sur des chiens atteints de lymphome T et a montré des résultats permettant de considérer la greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues comme une possibilité des traitement des lymphomes T chez le chien (Warry *et al.*, 2014).

e- Suivi de la maladie résiduelle minimale

La maladie résiduelle minimale (MRD pour Minimal Residual Disease) est le nombre de cellules malignes persistantes dans un tissu après rémission clinique. Ce paramètre est utilisé dans le suivi des patients atteints de leucémies et de lymphomes. En médecine humaine, il est utilisé comme facteur pronostic. La quantité de MRD après chimiothérapie influe fortement sur le pronostic des patients, mais n'est pas liée à la charge tumorale avant traitement (Sato *et al.*, 2016).

En médecine vétérinaire, son évaluation est classiquement réalisée par PCR pour réarrangement du gène du récepteur (PARR), qui se fonde sur la clonalité de la lignée tumorale. La PARR amplifie les régions variables des gènes des récepteurs des LT et des LB (Vail *et al.*, 2013).

La surveillance de son évolution et son rôle pronostique par CF sont peu documentés chez le chien. Une étude a montré que plus le taux de cellules malignes résiduelles est élevé, moins le pronostic est bon. Le temps de rechute est d'autant plus court que ce taux est élevé dans le cas des lymphomes à grandes cellules B (Chalfon *et al.*, 2019). Aucune étude n'a été menée sur les lymphomes T (Comazzi et Riondato, 2021).

Si le taux de cellules résiduelles est trop bas, la CF peut manquer de sensibilité et ne pas les détecter (Sato *et al.*, 2016), ainsi l'évaluation de la maladie résiduelle minimale par CF est moins sensible que par la méthode PARR mais l'association de ces deux techniques est plus sensible et donne de meilleurs résultats pronostiques (Aresu *et al.*, 2014). La technique la plus sensible à ce jour est la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) : dans une étude menée sur 20 chiens atteints de lymphome B, la RT-qPCR a pu mettre en évidence une augmentation de la MRD jusqu'à six semaines avant la rechute clinique (Sato *et al.*, 2016).

Cependant, la CF est d'une mise en œuvre plus simple et plus rapide que la RT-qPCR. En effet, la RT-qPCR nécessite un prélèvement initial avant traitement pour typer le clone tumoral et le délai de résultat est beaucoup plus long, de l'ordre de quelques jours, alors qu'il n'est que de quelques heures pour la CF. La CF est certes moins sensible mais plus applicable que la méthode par RT-qPCR (Gauthier *et al.*, 2018).

La CF permet un diagnostic plus précis, en déterminant le type de lymphocyte impliqué (T ou B), ainsi que la présence ou l'absence de bon nombre de marqueurs qui donnent des informations précieuses notamment sur le pronostic attendu. Les résultats sont rendus plus rapidement que les techniques par microscopie optique, comme l'immunocytochimie, ce qui permet de mettre en place plus rapidement le traitement le plus complet possible vis-à-vis de la pathologie rencontrée, avec par exemple, l'ajout d'immunothérapie.

B- Pour la recherche de nouveaux biomarqueurs

1- Généralités

Dans la communauté scientifique, la définition donnée par le National Institut of Health (USA) est utilisée actuellement pour définir un biomarqueur comme étant « une caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique » (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

Ils peuvent donc être utilisés pour mesurer ou mettre en évidence des processus biologiques normaux (fréquence cardiaque, pression artérielle, température), des processus pathologiques (la présence d'un cancer) ou la réponse de l'organisme à un traitement.

De nos jours les biomarqueurs sont utilisés dans différents domaines tels que la médecine clinique :

- pour le diagnostic. Par exemple, chez l'homme, la protéine-amyloïde 1-45 et la protéine tau hyperphosphorylée dans le LCR, sont des marqueurs biologiques utilisés dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (Pôle interministériel de prospective et d'anticipation des mutations économiques, 2009).
- Pour donner un pronostic. Par exemple dans le cas du cancer colo-rectal chez l'homme, il est mis en évidence par l'équipe des Dr Rauh et Dr Zügel, que le taux d'expression de la protéine MYO5B chez les patients en stade II est un biomarqueur pronostique. En effet, lorsque MYO5B s'exprime fortement, les patients présentent un fort taux de survie à 5 ans, à l'inverse quand l'expression est faible le taux de survie à 5 ans est faible aussi. Ainsi ces derniers patients sont de bons candidats à la chimiothérapie en complément de l'exérèse chirurgicale (Letellier, 2018).
- Pour évaluer la réponse à un traitement, dans le cas d'une infection par le virus d'immunodéficience humain (VIH), le taux de lymphocytes CD4⁺ est mesuré régulièrement afin d'adapter au mieux le traitement en fonction de la réponse de l'organisme ;

Ils sont utilisés également en développement pharmaceutique (Pôle interministériel de prospective et d'anticipation des mutations économiques, 2009).

Les biomarqueurs sont de nature physique variée (moléculaire, cellulaire, paramètre physiologique...) ainsi que de forme biologique variée (ADN, ARN, protéine...). La CF met en évidence des molécules présentes à la surface des cellules, ce qui permet d'identifier les différentes populations cellulaires présentes dans des liquides ou des tissus. Ainsi grâce à sa capacité à les identifier et les dénombrer, il est possible d'étudier l'évolution de certains de ces sous-types cellulaires dans certaines circonstances, comme l'évolution d'une pathologie.

2- Les MDSC : cellules myéloïdes suppressives (Myeloid Derived Suppressor Cells)

Un exemple de cellules identifiables en CF qui pourraient jouer le rôle de biomarqueur dans la recherche de néoplasies sont les MDSC.

a- Que sont ces cellules ?

Les cellules myéloïdes suppressives sont, comme leur nom l'indique, des cellules myéloïdes mais immatures. Leur différenciation normale devrait donner naissance à des macrophages ou à des cellules dendritiques. Elles se trouvent physiologiquement dans la moelle osseuse. Chez la souris, elles représentent moins de 4% des cellules sanguines et spléniques (Serafini *et al.*, 2006).

Chez l'Homme, elles sont présentes en très faible quantité dans le sang chez les individus en bonne santé, mais leur nombre augmente chez les patients atteints d'infections chroniques ou de cancers (Gabrilovich, 2017). Dans le cas de cancer, les MDSC ont été reconnues capable de supprimer la réponse immunitaire de l'organisme contre la tumeur. En effet, elles ont une forte activité enzymatique notamment de l'arginase qui dégrade la L-arginine ce qui induit un arrêt de la prolifération des LT (Rodríguez et Ochoa, 2008), et de l'iNOS (inducible nitric oxide synthase) qui produit du monoxyde d'azote (NO) qui est à l'origine de l'apoptose des LT. Les MDSC sont également capables de produire du peroxydant (ONOO⁻), un des oxydants les plus puissants du corps humain, qui provoque la nitration du TCR et des molécules CD8, ce qui rend non fonctionnel la reconnaissance de l'Ag spécifique par le LT (Gabrilovich et Nagaraj, 2009). Elles sont également capables de provoquer le changement des macrophages M1 vers des macrophages M2 (Tizard, 2012). Les MDSC ont également un rôle prédominant dans l'angiogenèse des tumeurs et interviennent dans la mauvaise réponse au traitement immunothérapeutique anticancéreux. Ainsi ces cellules semblent être une bonne cible thérapeutique. De plus les études montrent que les tumeurs infiltrées par un fort taux de MDSC sont associées à un pronostic défavorable et à une résistance thérapeutique (Tizard, 2012 ; Gabrilovich, 2017). C'est en ce sens, que les MDSC pourraient être utilisées en tant que biomarqueurs reflétant un pronostic défavorable.

b- Phénotypes et marqueurs

Ce type cellulaire a été étudié chez la souris et l'homme et très récemment chez le chien. Deux sous types cellulaires ont été décrits dans ces espèces, celles de type granulocyte (G-MDSC) et celles de type monocyte (M-MDSC).

i- Chez la souris

Initialement les MDSC étaient identifiées grâce aux marqueurs de surface Gr1 et CD11b. Plus tard, les recherches ont permis la mise en évidence de deux sous-types phénotypiquement différents (Figure 31).

Le type monocyte, de phénotype $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$, produit de l'oxyde nitrique (NO) qui associé à une forte activité de l'arginase inactiverait la réponse immunitaire au niveau du tissu tumoral.

Le type granulocyte, de phénotype $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$, a également un rôle immunosuppresseur, grâce à de nombreux mécanismes d'action, notamment par la production de ROS (Reactive Oxygene Species) qui est un facteur immunosuppresseur des LT $CD8^+$ qui perdent leur fonction cytolytique. (Nagaraj et Gabrilovich, 2008)

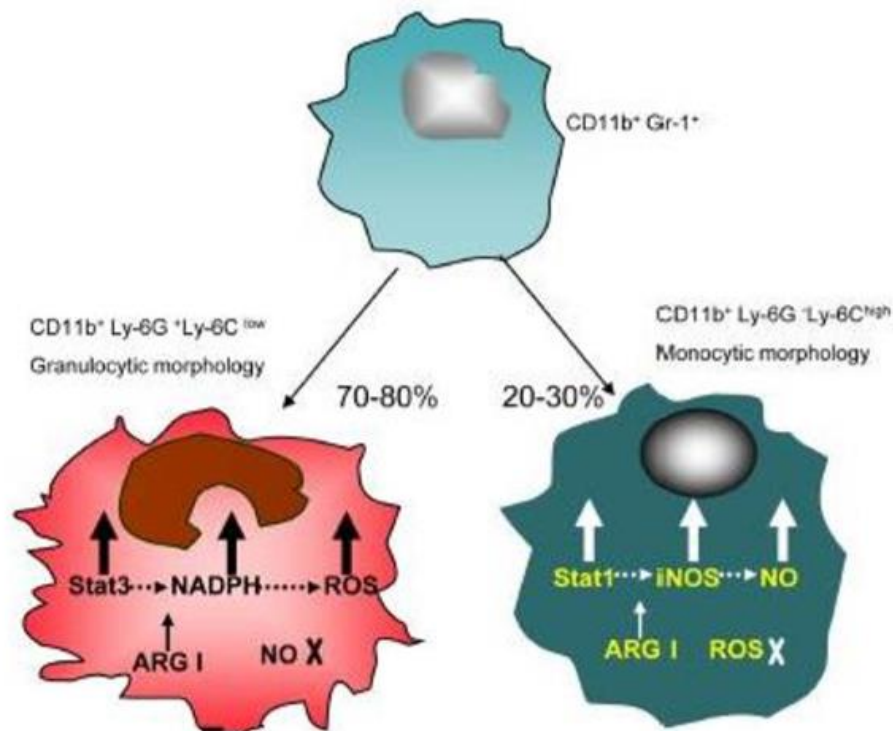


Figure 31: les sous-types de MDSCs (adapté de Gabrilovich et Nagaraj, 2009).

ii- Chez l'Homme

Chez l'Homme, en raison de l'importance des MDSC dans l'échappement tumoral, de nombreuses études ont été réalisées dans le but de déterminer leur phénotype grâce à la CF. Il en résulte qu'il dépendrait du type de cancer associé ce qui rend difficile la détermination de son phénotype.

Les MDSC sont caractérisées par le marqueur $CD11b$ qui marque les monocytes/macrophages, le marqueur de la lignée myéloïde $CD33$ ainsi que l'absence de $HLA-DR$ habituellement porté par les cellules myéloïdes. Comme chez la souris, il a été identifié un sous type monocyttaire $CD14^+$ et un sous-type granulocyttaire $CD15^+$.

Ainsi chez l'Homme, deux phénotypes de MDSC sont observables :

- Pour les G-MDSC : $CD11b^+CD14^-CD15^+HLA-DR^{low/-}CD33^+$
- Pour les M-MDSC : $CD11b^+CD14^+CD15^-IL4R\alpha^+HLA-DR^{low}CD33^+$ (Parker *et al.*, 2015)

A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur spécifique aux MDSC. Il faut donc prouver le caractère immunosuppresseur des cellules isolées.

Chez l'Homme, le taux de MDSC est augmenté dans les tumeurs solides, comme dans le cas du cancer du sein, du colon, de l'œsophage, de la prostate ou de la vessie, le cas des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, le cancer du poumon non à petites cellules, le carcinome rénal, l'adénocarcinome pancréatique, le carcinome surrénalien, hépatocellulaire et thyroïdien ou le cancer gastro-intestinal, ou dans le sang dans le cas de myélome multiple ou de lymphome non Hodgkinien (Parker *et al.*, 2015).

iii- Chez le chien

Le chien sert fréquemment de modèle pour l'étude du développement et de la progression des tumeurs de l'Homme. C'est pourquoi des études portant sur les MDSC ont été menées récemment dans cette espèce montrant que cette classification s'applique également.

En 2012, Goulart et son équipe ont mis en évidence des cellules sanguines de phénotype $CD11b^+CD14^-CMHII^-$ et dont la mise en culture, après tri par CF, avec des LT hétérologues, mettait en évidence leurs capacités immunosuppressives (Goulart *et al.*, 2012). En parallèle une seconde équipe a montré avec un protocole similaire qu'il existe un second phénotype cellulaire ayant la capacité de supprimer la prolifération des LT *in vitro*. Ce phénotype est $CD11b^{low}CADO48A^{low}$ (Sherger *et al.*, 2012) mais cette étude n'a pas permis de conclure quant au fait qu'il s'agisse d'une population différente de celle identifiée par Goulart.

Plus tard, Goulart a réussi à isoler grâce à la CF deux sous-populations de cellules $CD5^-CD21^-CD11b^+CMHII^{low}$ chez des chiens atteints de cancers. La première $CADO48A^+CD14^-$ qui serait le sous-type granulocytaire et la deuxième $CADO48A^-CD14^+$ qui serait le sous-type monocytaire. L'étude de leur signature transcriptomique montre que les deux sous-groupes sont différents et révèle des similitudes significatives entre les G-MDSC humains et canins (Goulart *et al.*, 2019).

c- Avancées récentes en oncologie vétérinaire

i- Dans les 10 dernières années

Les études récentes réalisées chez le chien ont montré les mêmes résultats que chez l'Homme quant à la corrélation entre le pourcentage de MDSC circulantes et l'avancement du cancer dans le cas de cancers solides comme les carcinomes, les sarcomes et les mastocytomes.

L'étude de Goulart *et al.* réalisée sur des tumeurs solides montre qu'il existe une différence significative entre le taux de MDSC trouvées par analyse en CF dans la circulation sanguine de chiens souffrant d'un cancer de stade avancé ou métastasé (36%) et ce même taux chez des chiens sains ou présentant un cancer de stade peu avancé, non métastasé (9%) (Goulart *et al.*, 2012). L'équipe de Sherger a montré la même différence significative sur le pourcentage de MDSC entre les chiens sains (3,6%) et les chiens atteints de cancers (8%) (Sherger *et al.*, 2012). Dans cette étude, les cancers

présentés étaient des carcinomes, des sarcomes et des mélanomes buccaux. Les deux études n'utilisaient pas la même méthode d'identification des MDSC. En effet l'équipe de Sherger s'est basée sur la détection en cytométrie de flux des marqueurs CD11b et CADO48A, qui ne représentent que les MDSC granulocytaires alors que l'équipe de Goulart a isolé des cellules CD11b⁺/CD14⁻ qui correspondent aux MDSC monocytaires, ce qui explique les différences entre les pourcentages obtenus par les deux équipes.

Une étude plus récente a montré que le taux de MDSC (Gr1⁺/CD11b⁺/CD33⁺) dans le sang des chiens sains (0,35%) est significativement inférieur à celui de chiens diagnostiqués avec des tumeurs mammaires malignes. De plus, le taux de MDSC circulantes le plus élevé était retrouvé chez les chiens atteints de cancers mammaires avancés (5,94 % pour le stade I et 8,13% pour le stade II contre 15,63% pour le stade III et 15,44 % pour le stade IV) (Mucha *et al.*, 2014). Cette étude permet de s'interroger sur la possibilité que les MDSC soient un biomarqueur de stade élevé ou de processus métastatique d'un cancer chez le chien.

Les études sur le sujet sont peu nombreuses et réalisées avec de petits échantillons ne permettant pas à ce jour de connaître le statut d'un chien vis-à-vis du cancer en fonction du pourcentage de MDSCs circulants, ni d'affirmer que les résultats obtenus sont représentatifs de l'espèce canine. Cependant, les études tendent à prouver que le taux de MDSC circulantes est significativement plus élevé dans le sang de chiens atteints de cancers à un stade avancé par rapport à un chien sain, et met en lumière l'intérêt de la cytométrie de flux dans le suivi de ces cellules et leur potentiel intérêt diagnostic/pronostic.

ii- Etude réalisée au Biopôle à l'ENVA (Nadal, 2018)

C'est dans le but de démontrer que les MDSC peuvent être un biomarqueur cellulaire d'avancée de la pathologie cancéreuse chez le chien qu'une étude a été menée en 2018, au Centre Hospitalier Vétérinaire d'Alfort (CHUVA) et ceci afin de confirmer les différences observées dans les autres études sur le taux de MDSC dans le sang des chiens sains, des chiens atteints de cancers à des stades peu avancés et des chiens atteints de cancers à des stades avancés ou métastasés. L'échantillon de chiens atteints d'un cancer était de 22 chiens dont 8 à un stade avancé et celui de chiens sains se composait de 18 chiens. Les chiens de plus de 7 ans étaient sur-représentés dans le groupe de chiens malades par rapport à celui de chiens sains.

Les MDSC ont été identifiées par CF parmi les cellules mononuclées du sang périphériques, à l'aide des marqueurs CD11b, CD14 et MHCII, que Goulart avait utilisé dans son étude de 2012. Le cytomètre utilisé était le BD Accuri C6 Plus (Becton, Dickinson and Company), équipé d'un laser bleu (488nm) et d'un rouge (640nm). Les analyses ont été réalisées ensuite grâce au logiciel Accuri C6 Plus selon la méthode de « gating ».

Les résultats ont montré une différence significative entre les chiens sains (6%) et les chiens atteints de cancer (31%). Il n'y avait pas de différence significative du taux de MDSC dans le sang des chiens atteints de tumeur solide et ceux atteints de tumeur non solide, mais le nombre de ces derniers n'étant que de 3, ce résultat serait à confirmer par une étude avec un échantillon de plus grande taille.

Cependant, de façon inattendue le groupe de chiens avec un cancer avancé présentait un taux de MDSC plus faible (22,8%) que ceux avec un cancer peu avancé (35,2%) mais cette différence n'était pas statistiquement significative.

Cette absence de différence du taux de MDSC entre les deux groupes de chiens avec cancer peut s'expliquer, ici, par la petite taille de l'échantillon étudiée et par le fait que la moitié des chiens présentant des métastases était sous traitement. Il est possible aussi qu'il y ait eu une erreur de diagnostic entre une forme peu avancée et avancée par manque d'investigation complète ou de sensibilité des analyses chez certains chiens.

Ainsi l'étude a conclu qu'il existe un lien entre le statut pathologique (sain ou tumoral) et le taux de MDSC circulantes chez le chien. Des études sur des cohortes bien plus grandes et menées sur de plus longues périodes pourraient amener à définir une valeur seuil du taux de MDSC permettant de déterminer lorsque la probabilité d'une atteinte tumorale est très forte. Si les études à venir montrent également une différence significative de taux de MDSC dans le sang entre les chiens atteints de cancer peu avancé et ceux atteints de cancer très avancé, on peut imaginer de même la détermination d'une deuxième valeur seuil au-delà de laquelle il est très probable que des métastases soient présentes ou que le cancer soit de stade IV ou plus. Les MDSC pourraient alors être utilisées comme un biomarqueur d'atteinte tumorale chez le chien. Elles seraient un biomarqueur utilisable dans le diagnostic et le pronostic des pathologies tumorales disponible par simple prise de sang sur tube EDTA et analyse en CF.

TROISIÈME PARTIE : CYTOMÉTRIE EN FLUX ET MALADIES AUTO-IMMUNES TOUCHANT DES ÉLÉMENTS FIGURÉS DU SANG.

A- Anémie hémolytique auto-immune

L'anémie hémolytique auto-immune est un déficit en hématies et en hémoglobine lié à une érythrolyse précoce causée par la présence d'auto-Ac dirigés contre les érythrocytes de l'organisme (Godeau *et al.*, 2009).

1- Généralités

a- Erythropoïèse et érythrolyse

i- Erythropoïèse

Les hématies sont produites au cours de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse dont les différentes étapes sont présentées dans la figure 32. Issues de cellules souches pluripotentes, la première cellule reconnaissable est le pro-érythroblaste, cellule de 15 à 20µm de diamètre avec un cytoplasme très basophile et un noyau sphérique occupant les $\frac{3}{4}$ de la cellule contenant plusieurs nucléoles et de la chromatine très dispersée. Puis cette cellule se différencie en érythroblastes basophiles, de plus petite taille, dont la chromatine se densifie et dont les nucléoles ont disparu. La synthèse de la globine et de l'hème apparaît à ce stade. Ensuite, la cellule évolue en érythroblastes polychromatophiles avec la coloration de Wright, de petite taille avec un cytoplasme de couleur bleue (basophile) ou bleu rosé (polychromatophile) voire orange (orthochrome). Le changement de coloration du cytoplasme résulte de la synthèse débutante d'hémoglobine et de la réduction progressive de la quantité d'acide ribonucléique. Puis ces cellules deviennent des érythroblastes acidophiles qui sont les plus petites cellules nucléées de la lignée, avec un noyau est de petite taille ou pycnotique. Pour passer au stade réticulocyte, la cellule expulse son noyau. Le réticulocyte est une cellule anucléée, polychromatophile qui synthétise intensément de l'hémoglobine. Sa maturation se déroule sur un ou deux jours puis il passe dans la circulation sanguine par diapédèse. Il se différencie ensuite en hématie en 24 à 30 heures, durant lesquelles la synthèse d'hémoglobine, le nombre de ribosomes et de mitochondries ainsi que la taille cellulaire diminuent. La forme des cellules change pour devenir biconcave (Jain, 2000). La figure 33 montre un érythrocyte et un réticulocyte.

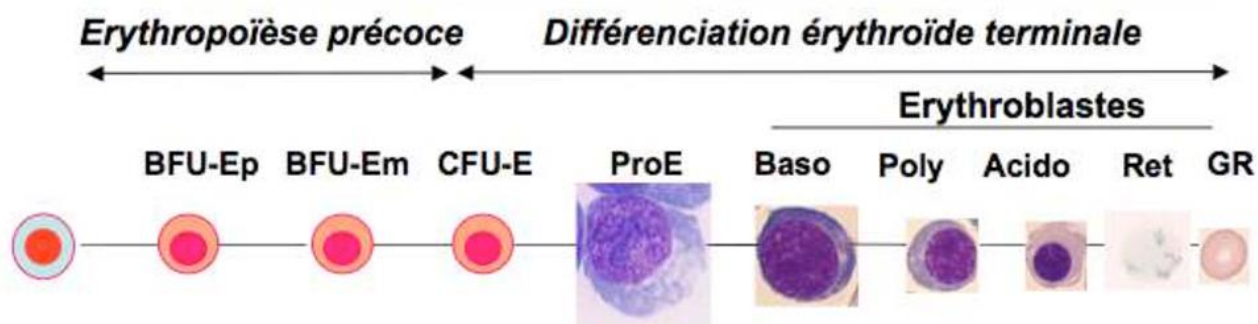


Figure 32: Différentes étapes de l'érythropoïèse (Arlet, 2013). BFU-Ep : progéniteur immature d'unité d'éclatement, BFU-Em : progéniteur mature d'unité d'éclatement, CFU-E : progéniteur le plus mature. ProE : Proérythrocyte, Baso : basophile, Poly : polychromatophile, Acido : Acidophile, Ret : réticulocyte, GR : érythrocyte.

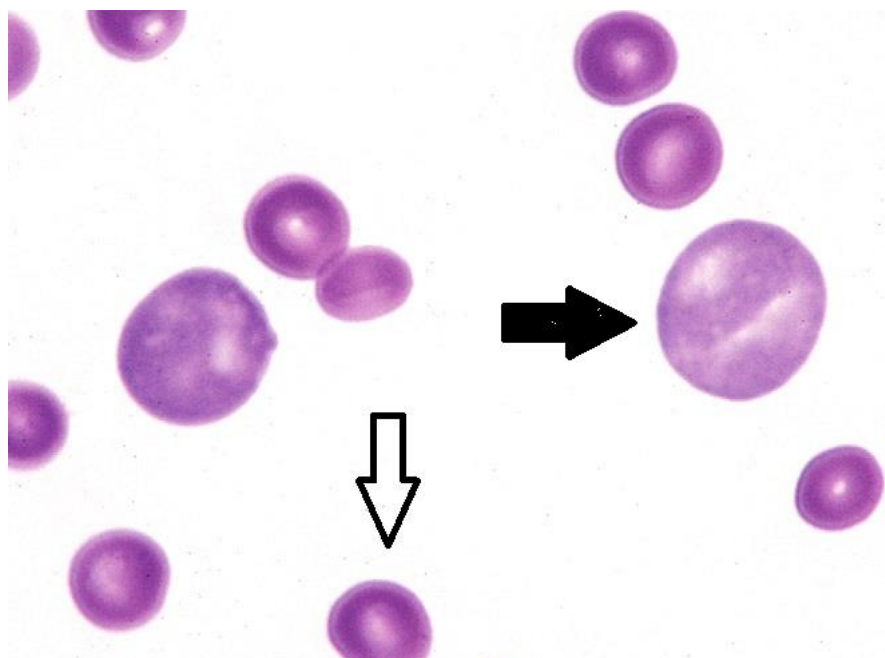


Figure 33: Erythrocyte (flèche blanche) et réticulocyte (flèche noire) (Harvey, 2015)

ii- Erythrolyse

La durée de vie d'une hématie est de 73 jours chez le chat et est comprise entre 100 et 115 jours chez le chien. En vieillissant, les hématies deviennent moins déformables à cause de la liaison entre l'hémoglobine oxydée et la spectrine et de l'oxydation des lipides membranaires. Ces hématies ne sont pas repérables sur un frottis sanguin (Christian, 2000).

L'érythrolyse a lieu par phagocytose par des macrophages dans la moelle osseuse, le foie et la rate. Les érythrocytes portent à leur surface des protéines bande 3. Lors de leur sénescence, ces protéines

se regroupent et forment un épitope reconnu par des IgG. La fixation des IgG entraîne la phagocytose des érythrocytes (Rettig *et al.*, 1999).

b- Etiopathogénie des anémies auto-immunes

i- Lyse des hématies

La lyse des hématies implique l'intervention d'auto-Ag portés par les hématies, notamment les canaux ioniques bande 3 et les glycophorines, d'IgG, M et parfois A ainsi que le complément et de lymphocytes T auto-réactifs : ils sont à la base de la pathogénie des anémies hémolytiques auto-immunes. Ces lymphocytes sont présents mais inhibés chez les animaux sains. Leur perte de tolérance contre les Ag du soi est la cause de l'anémie hémolytique (Barker *et al.*, 1997 ; Day, 1999).

La lyse intravasculaire des hématies est plus rare que la lyse extravasculaire et se produit lors de réaction immunitaire sévère. Celle-ci met en jeu l'ensemble des protéines du complément. En effet lorsque des auto-Ac sont présents en très grand nombre à la surface des hématies, le complément s'active. Sa fixation sur les hématies est à l'origine des sphérocytes et entraîne la formation d'un complexe C8C9C5bC6C7 qui se lie à la membrane des hématies et favorise sa perforation, ce qui engendre la lyse de la cellule. La lyse intravasculaire a pour conséquence la libération d'hémoglobine dans le sang (figure 34) (McCullough, 2003 ; Balch et Mackin, 2007).

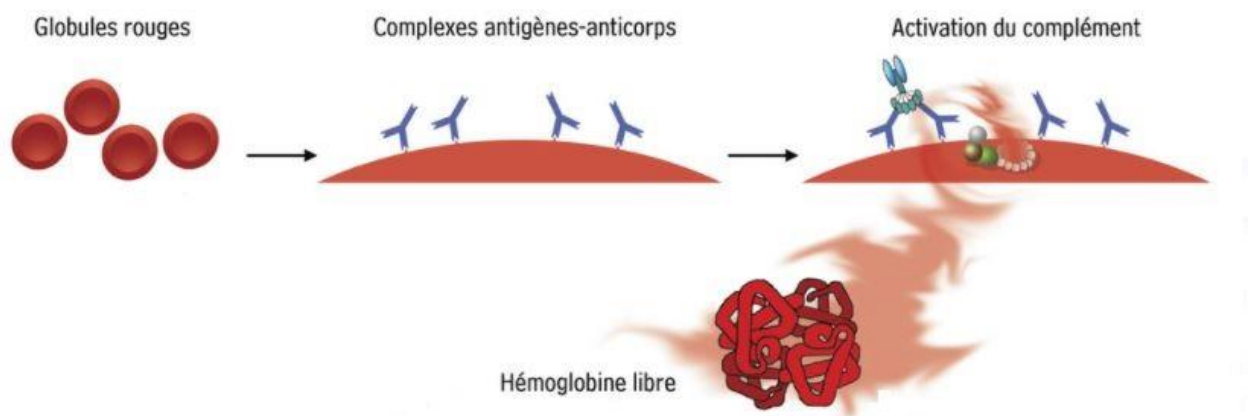


Figure 34: Lyse intravasculaire des hématies, adapté de L'italien et Leblanc, 2008.

Lors de réaction immunitaire plus modérée, on observe la lyse extravasculaire des hématies dans la rate et le foie. En effet, ces deux organes possèdent des macrophages capables de reconnaître à la partie constante des IgG, ce qui permet la phagocytose facilitée des hématies notamment par le biais des IgG. Le complément intervient également dans la lyse extravasculaire par l'intermédiaire du facteur C3b. Quand il est lié à la membrane des hématies, celles-ci peuvent être partiellement lysées dans la rate et produisent des sphérocytes (figure 35). Dans ce processus, l'hémoglobine est métabolisée en bilirubine. Il n'y a donc pas de hémoglobinurie associée (McCullough, 2003 ; Balch et Mackin, 2007).

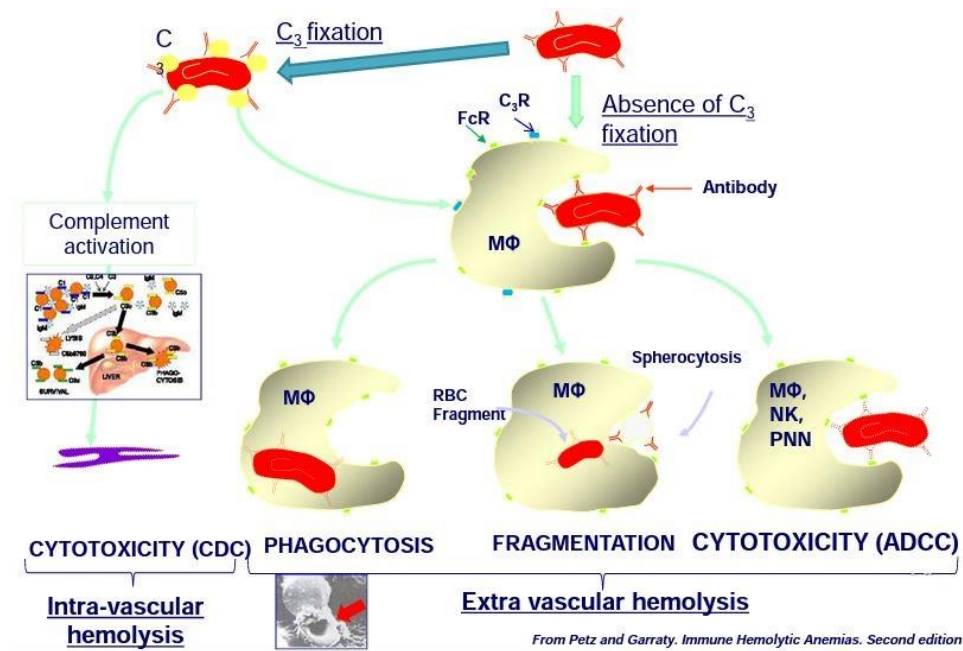


Figure 35: Lyse intravasculaire et extravasculaire des hématies (Petz et Garatty, 2003)

ii- Lyse des précurseurs d'hématies

Lors d'anémies arégénératives auto-immunes ou d'aplasies érythrocytaires, ce sont les précurseurs des hématies qui sont lysés par le système immunitaire. Différents mécanismes sont impliqués. Un mécanisme à médiation immune semble impliqué avec des IgG dirigés contre les précurseurs érythroïdes par lyse directe grâce la fixation du complément chez l'Homme et le chien. Chez l'Homme, des IgG dirigés contre l'érythropoïétine peuvent également intervenir en formant des immuns complexes qui l'inactivent. Il existe un mécanisme cellulaire décrit chez l'Homme impliquant des LT cytotoxiques et des NK pouvant lyser directement les précurseurs des hématies (Fisch *et al.*, 2000). Stokol et son équipe ont mis en évidence que les stades principalement détruits sont les érythroblastes acidophiles et les polychromatophiles (Stokol *et al.*, 2000).

c- Classification des anémies auto-immunes

Pour qu'une anémie soit auto-immune, il faut que la réaction immunitaire implique un Ag du soi et un auto-Ac (Day, 2011).

Les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) périphériques se distinguent des AHAI centrales par les cellules prises pour cible par le système immunitaire : les hématies dans le premier cas et les précurseurs des érythrocytes dans le second.

i- Les AHAI périphériques

Une classification des AHAI périphériques existe et repose sur la classe d'Ig impliquée, la température optimale à laquelle les auto-Ac réagissent, sur le lieu de la lyse des hématies et sur l'activité des Ac (agglutination ou hémolyse). Le tableau 10 reprend les différentes classes d'AHAI.

Tableau 10: Les différentes classes d'anémie hémolytiques auto-immunes (Chabanne, 2006)

<u>Classe</u>	<u>Classe d'immunoglobuline</u>	<u>Dénomination des anticorps</u>	<u>Température optimale</u>	<u>Site de destruction des hématies</u>	<u>Conséquence clinique</u>
<u>I</u>	G>>M	Auto-agglutinines	37°C	Rate	Agglutination intravasculaire Anémie
<u>II</u>	M	Hémolysines	37°C	Foie	Hémolyse intravasculaire Anémie
<u>III</u>	G	Anticorps « incomplets »	37°C	Rate	Anémie
<u>IV</u>	M	Agglutinines froides	4°C	Foie	Cyanose et nécrose des extrémités
<u>V</u>	M	Hémolysine froide à activité incomplète	4°C	Foie	Anémie

La classe IV des agglutinines froides provoque un tableau clinique dominé par des lésions cutanées aux extrémités et non une anémie contrairement aux autres.

ii- Les AHAI centrales

Les AHAI centrales se classent en deux groupes en fonction du myélogramme associé. Soit la lignée érythrocytaire est présente en très faible nombre voire absente, il s'agit alors d'une aplasie de la lignée érythrocytaire ; soit la lignée érythrocytaire est présente en grand nombre mais certains stades de maturation sont en nombre très réduit, on est alors dans le cas d'une anémie périphérique auto-immune non régénérative malgré la présence d'une lignée érythrocytaire. Cette forme est beaucoup plus répandue que l'aplasie de la lignée érythrocytaire (PRCA). En effet des études ont montré qu'elle représentait 95% des cas (Scott-Moncrieff *et al.*, 1995 ; Stokol *et al.*, 2000).

iii- Chez le chien

La plupart des anémies hémolytiques auto-immunes sont primaires chez le chien, les autres sont secondaires à une maladie ou à un traitement (Chabanne, 2006). Pour les AHAI centrales et périphériques, l'âge moyen d'apparition de la maladie est voisine de 6 ans (Stokol *et al.*, 2000 ; Scott-Moncrieff *et al.*, 2001 ; McManus et Craig, 2001 ; Weiss, 2002 ; Weinkle *et al.*, 2005).

Certaines races seraient prédisposées aux AHAI périphériques comme le Cocker Spaniel, le Schnauzer miniature, le Colley et le Labrador, mais la maladie a été décrite dans de nombreuses autres races (Burgess *et al.*, 2000 ; McManus et Craig, 2001 ; Scott-Moncrieff *et al.*, 2001 ; Weinkle *et al.*, 2005). Les AHAI centrales ne semblent pas présenter de prédispositions raciales et se retrouvent dans de nombreuses races également (Stokol *et al.*, 2000 ; Weiss, 2002).

iv- Chez le chat

Chez le chat, les anémies périphériques à médiation immune sont le plus souvent secondaires à une infection au FeLV. Les AHAI sont beaucoup plus rares que chez le chien et ne représentent que 14% des cas d'anémie hémolytique à médiation immune (Werner et Gorman, 1984 ; Kohn *et al.*, 2006a ; Paes *et al.*, 2010). L'âge moyen d'apparition est compris entre 3 et 6 ans. La maladie a été décrite dans de nombreuses races telles que le British Shorthair, l'Oriental, le Maine Coon, l'abyssin (Kohn *et al.*, 2006a) ainsi que chez le Siamois, le Sacré de Birmanie et le Persan (Husbands *et al.*, 2002).

Les AHAI centrales sont également rares et peu documentées, comme le montre l'étude rétrospective sur 8 ans de Stokol et Blue (1999) qui n'a recensé que 9 cas de PRCA, qui avaient entre huit mois et 3 ans. Les jeunes chats seraient donc prédisposés. Il n'est apparu aucune prédisposition raciale.

Afin de diagnostiquer une AHAI, il est nécessaire de s'appuyer sur la symptomatologie de l'individu malade ainsi que sur des examens complémentaires qui permettent d'éliminer d'autres causes d'anémie hémolytique.

2- Processus diagnostic

a- Symptomatologie

Dans les symptômes liés aux anémies hémolytiques auto-immunes chez le chien et le chat, il y a les symptômes engendrés par la présence d'une anémie tels que la pâleur des muqueuses, une léthargie, une faiblesse, une intolérance à l'effort, une tachycardie, une tachypnée, des vomissements et une anorexie. Sur les cas d'anémie grave, on peut entendre un souffle systolique (Day, 1999 ; Stokol *et al.*, 2000 ; Weiss, 2002 ; Kohn *et al.*, 2006a).

Le caractère hémolytique confère des symptômes spécifiques aux anémies hémolytiques auto-immunes. En effet, la lyse des hématies peut être à l'origine d'une hyperbilirubinémie se manifestant par un ictère, d'une pigmenturie dont la nature devra être déterminée, ainsi qu'une hépatomégalie et

une splénomégalie. Il peut y avoir parfois de la fièvre (Werner et Gorman, 1984 ; Day, 1999 ; Reimer *et al.*, 1999 ; Husbands *et al.*, 2002 ; Weiss, 2002 ; Weinkle *et al.*, 2005 ; Kohn *et al.*, 2006a ; Piek, 2011). Certains chats peuvent présenter aussi du pica (Kohn *et al.*, 2006a).

b- Hématologie

Dans les cas de suspicion d'anémie, il faut déterminer le niveau de gravité de l'anémie en mesurant le taux d'hémoglobine et rechercher des signes de régénération médullaire.

i- L'hématocrite

Quand il est inférieur à 36% chez le chien et 24% chez le chat, l'anémie est confirmée. Dans les cas d'anémie hémolytique auto-immune lors de l'admission, l'anémie est souvent sévère, avec un hématocrite en moyenne chez le chien entre 11 et 17,6% (Day, 1996 ; Burgess *et al.*, 2000 ; Scott-Moncrieff *et al.*, 2001 ; Weinkle *et al.*, 2005), chez le chat entre 9,3 et 12% (Scott *et al.*, 1973 ; Husbands *et al.*, 2002 ; Kohn *et al.*, 2006a)

ii- Signe de régénération médullaire

En routine, le frottis sanguin ainsi que le myélogramme sont utilisés pour rechercher des signes de régénération médullaire. Désormais la CF peut également être utilisée et nous verrons ce qu'elle apporte dans ce domaine.

✓ Le frottis sanguin et la numération réticulaire

La réalisation d'un frottis sanguin devrait suivre chaque numération sanguine afin de confirmer le décompte de l'automate. Après coloration, il permet la mise en évidence d'une macrocytose et d'une augmentation du nombre de réticulocytes, signant une anémie régénérative. Dans le cas des anémies hémolytiques, il est possible d'observer également la présence de :

- Sphérocytes, petits érythrocytes très colorés même en leur centre. Ils ont perdu leur forme biconcave. Ils sont généralement associés à une lyse extravasculaire (Walker, 2006). Ils sont un signe prédominant dans le début de la maladie. Chez le chien lors d'AHAI, ils représentent plus de 50% des érythrocytes. Dans de rares cas cependant, ils peuvent être absents. Chez le chat, étant de petites tailles, ils sont difficile à identifier (Poitout *et al.*, 1995), c'est pourquoi dans les études, on les retrouve peu ou pas présents chez les chats souffrant d'AHAI (Scott *et al.*, 1973 ; Kohn *et al.*, 2006a)
- Schizocytes : ce sont des fragments d'hématies de forme irrégulière qui présentent des bordures découpées asymétriques et des projections pointues (Walker, 2006).

Il convient également d'exclure toute cause parasitaire. Ainsi chez le chien la présence de *Babesia canis* et chez le chat de *Mycoplasma haemofelis* est souvent recherchée (Scott *et al.*, 1973 ; Day, 1996).

Chez le chien, le comptage des réticulocytes peut se faire grâce aux automates utilisant la CF, mais chez le chat, l'idéal reste de faire un comptage sur frottis sanguin, en déterminant le nombre de réticulocytes pour 200 à 300 hématies ce qui permet ensuite de déterminer la numération

réticulocytaire (Guelfi *et al.*, 1993). Il n'est pas toujours simple de calculer ce nombre, notamment lors d'autoagglutination (McManus et Craig, 2001). En effet, il existe deux types de réticulocytes : les agrégés qui deviennent ensuite les ponctués. Chez le chien, les deux types de réticulocytes sont pris en compte, mais chez le chat, seuls les agrégés sont considérés, ce qui justifie le comptage manuel (Trumel *et al.*, 2004).

Pour que l'anémie soit considérée comme régénérative, les normes actuelles indiquent des valeurs absolues d'environ 60000/ μ L chez le chien et 100000/ μ L chez le chat. Si l'on connaît les valeurs d'hématocrite physiologique de l'animal mesuré lors d'un bilan de routine antérieur, il faut utiliser avec précision le nombre de réticulocytes corrigé :

$$\text{nbr réticulocytes corrigé} = \frac{\text{réticulose absolue} \times \text{hématocrite anémiée}}{\text{hématocrite physiologique}}$$

Si l'on a pas de valeur d'hématocrite physiologique de l'animal,

Un indice supérieur à 1% chez le chien et 0,4% chez le chat confirme le caractère régénératif de l'anémie (Trumel *et al.*, 2004).

Face à une anémie arégénérative, il est nécessaire de répéter cet examen 3 à 4 jours plus tard avant de conclure à une anémie arégénérative. En effet il faut 3 à 4 jours à la moelle osseuse pour augmenter l'érythropoïèse (McManus et Craig, 2001)

Dans le cas des anémies hémolytiques auto-immunes, le caractère régénératif est variable. Une étude a montré en 2001 qu'il n'y avait pas de norme chez le chien : en effet sur 20 chiens, le nombre de réticulocytes était compris entre 0 et 754 000 cellules/ μ L. Pour certains d'entre eux, l'anémie est fortement régénérative et pour d'autres elle est arégénérative (Scott-Moncrieff *et al.*, 2001). Chez le chat, les études ont mené à la même conclusion (Husbands *et al.*, 2002 ; Kohn *et al.*, 2006a).

✓ Le myélogramme

Le myélogramme permet de déterminer si l'anémie est centrale ou périphérique. En effet, la lignée érythrocytaire de la moelle osseuse peut être l'objet de réaction auto-immune et les anémies hémolytiques auto-immunes peuvent être régénératives ou non (Day, 1996).

Le myélogramme permet de faire la différence entre une PRCA et est l'absence de précurseurs érythrocytaire alors que les autres lignées cellulaires sont normales, d'une anémie hémolytique auto-immune non régénérative. Connaître le caractère régénératif ou non de l'anémie permet de réduire les hypothèses diagnostiques. Des examens complémentaires immuno-hématologiques sont nécessaires afin de préciser l'étiologie de l'anémie.

c- Immunologie

Il existe différents tests pour mettre en évidence le caractère auto-immun de l'anémie. Cependant aucun test ne permet de préjuger si l'anémie est à médiation immunitaire primaire ou secondaire.

i- Autoagglutination et test de dilution saline

✓ Principe

L'autoagglutination spontanée des érythrocytes peut se produire quand le sang est en contact avec de l'EDTA ou qu'il est déposé sur une lame (Poitout *et al.*, 1995). Cela peut être lié à la formation d'agglutinats d'origine immunitaire ou à la formation de rouleaux causée par une forte concentration en protéines sériques. Il est donc crucial de les distinguer (Manev et Marincheva, 2018).

Le test de dilution saline des agglutinats se fonde sur le fait que les rouleaux disparaissent lorsqu'une goutte de sang est diluée avec 3 à 4 gouttes de sérum physiologique. Dans le cas d'une anémie hémolytique, l'agglutination persiste. Pour lire correctement ce test, il faut observer la lame macro et microscopiquement (Poitout *et al.*, 1995). Lorsqu'une anémie hémolytique auto-immune est suspectée, il faut réaliser ce test même si aucune autoagglutination n'est observée macroscopiquement. Dans ce cas, il faudra observer préférentiellement la zone d'étalement des hématies et la queue du frottis (Poitout *et al.*, 1995).

✓ Résultats dans le cadre des AHAI

L'autoagglutination est présente chez 40 à 50% des chiens atteints d'AHAI (Scott-Moncrieff *et al.*, 1997 ; Scott-Moncrieff *et al.*, 2001 ; McManus et Craig, 2001) et entre 20 et 50% chez le chat (Scott *et al.*, 1973 ; Husbands *et al.*, 2002 ; Kohn *et al.*, 2006a). La présence d'autoagglutination chez un animal présentant des signes d'anémie hémolytique est caractéristique d'une maladie immunitaire (Poitout *et al.*, 1995). Lorsque le test se révèle être négatif, il faut réaliser un test de Coombs afin d'exclure l'origine immunitaire de l'anémie hémolytique (Honeckman *et al.*, 1996).

ii- Test de Coombs

✓ Principe et interprétation

Le test de Coombs se fonde sur l'agglutination des hématies lorsqu'elles sont mises en présence d'antiglobuline (Figure 36). C'est pourquoi la mise en présence des hématies, portant sur leur membrane des IgG ou IgM et des composants du complément dont le facteur C3b comme c'est le cas lors d'AHAI, avec des Ac spécifiques des IgG, des IgM ou du facteur C3b provoque une réaction d'agglutination (Tissot *et al.*, 1999 ; Zantek *et al.*, 2012).

Il existe deux méthodes : l'une dite en tube et l'autre en gel, mais la technique en gel serait moins sensible (Tissot *et al.*, 1999). Ce test est relativement spécifique aux AHAI. Cependant il ne permet pas de distinguer une AHAI primaire d'une AHAI secondaire. Le diagnostic d'AHAI primaire repose sur l'exclusion de causes sous-jacente (Chabanne, 2006 ; Kohn *et al.*, 2006a).

Les résultats de ce test sont à interpréter à la lumière des éléments cliniques et biologiques car il n'est pas rare d'avoir des faux positifs, causés par des réactions croisées liées à des maladies inflammatoires ou infectieuses, des néoplasies ou une transfusion antérieure, ou des faux négatifs essentiellement causés par une administration de corticoïdes (Laboratoire Orbio, 2020).

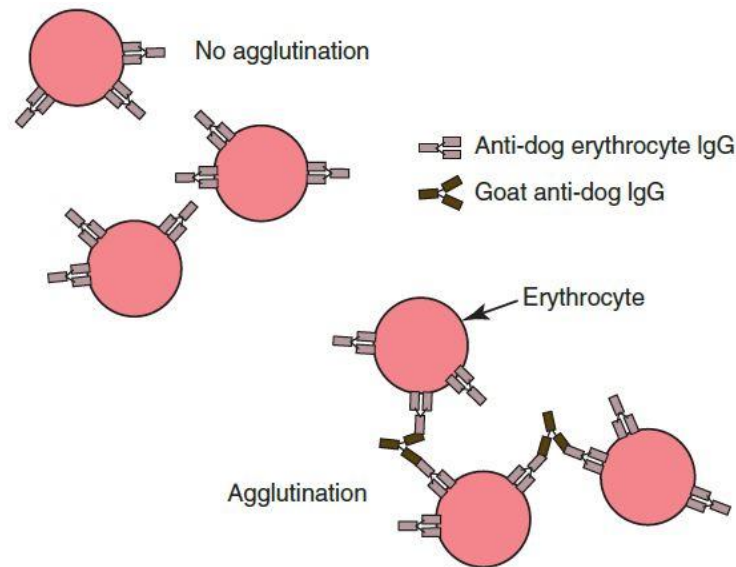


Figure 36: Principe du test de Coombs (Harvey, 2015b)

✓ Résultats dans le cas des AHAI

Chez le chien, le test de Coombs avec un antisérum polyspécifique, c'est-à-dire qu'il reconnaît les IgG, les IgM et la fraction C3 du complément est positif, dans 77 à 89% des cas (Burgess *et al.*, 2000 ; Carr *et al.*, 2002 ; Weinkle *et al.*, 2005). Les études utilisant des antisérum monospécifiques, ont mis en évidence que la majorité des réponses positives étaient obtenues avec des Ac anti- IgG (Klag *et al.*, 1993).

Chez le chat, l'étude de Kohn *et al.* en 2006 a montré que le test de Coombs était valide également dans l'espèce féline.

Ainsi grâce au test d'auto-agglutination et au test de Coombs, le clinicien peut conclure au caractère immunitaire de l'anémie. A ce stade, on peut donc parler d'anémie hémolytique à médiation immunitaire (AHMI), seule l'exclusion de causes sous-jacentes permet d'arriver au diagnostic d'AHAI.

3- La cytométrie de flux

Les examens complémentaires précédant visaient à mettre en évidence la présence de réticulocytes attestant du caractère régénératif de l'anémie, ainsi que la présence d'IgG et IgM à la surface des hématies par le test de Coombs. Voyons maintenant les apports de la CF dans le diagnostic des AHMI.

a- Possibilités apportées par la CF

i- Dénombrement des réticulocytes

Avec la CF, il est possible de mesurer le nombre de réticulocytes présent dans le sang, en les marquant à l'aide d'orange thiazole qui est très affine de l'ARN réticulaire dont les réticulocytes sont d'autant plus riches qu'ils sont immatures. La CF permet également de connaître le stade de maturation des réticulocytes, en fonction de la quantité d'ARN contenue qui est révélée par le degré de fluorescence. Ainsi la CF permet de connaître la vitesse de régénération de la moelle osseuse (Riley *et al.*, 2001).

La figure 37 présente le résultat d'une analyse de CF cherchant à quantifier les réticulocytes. L'orange thiazole marque les réticulocytes ainsi que les plaquettes, la distinction se fait sur le critère de la taille. La barre verticale sépare les cellules non fluorescentes des cellules fluorescentes. Ici en vert à droite de la barre : les réticulocytes.

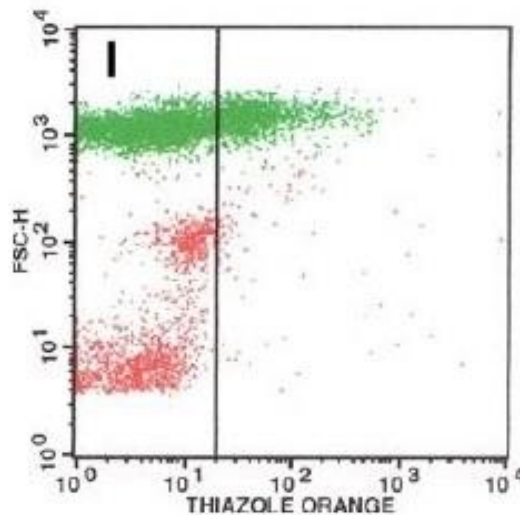


Figure 37: Résultat d'une analyse en CF visant à identifier les réticulocytes à l'aide d'orange thiazole (Wilkerson, 2012).

ii- Alternative performante au test de Coombs

La CF permet de révéler la présence d'Ac ou du complément à la surface des hématies comme le test de Coombs. En effet, les auto-Ac présents sur les hématies sont marqués à l'aide d'Ac anti-immunoglobulines et anti-complément porteurs d'un fluorochrome. La CF révèle ensuite la présence des fluorochromes à la surface des hématies et permet de la quantifier (Tarrant, 2005). La figure 38 illustre le principe de cette analyse. Cette quantification permet d'évaluer la gravité de la maladie et de pouvoir suivre son évolution (Quigley *et al.*, 2001 ; Garden *et al.*, 2019).

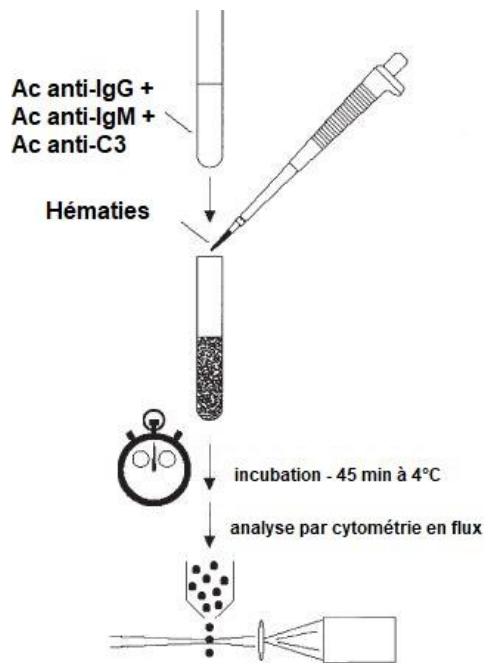


Figure 38: Recherche des auto-Ac dirigés contre les hématies (Quigley et al, 2001)

Ce test a une sensibilité comprise entre 92 et 100% selon les auteurs. Sa spécificité est d'environ 87 à 100% (Wilkerson *et al.*, 2000 ; Garden *et al.*, 2019). De ce fait, la cytométrie a une sensibilité bien supérieure et une spécificité voisine du test de Coombs, ce qui en fait un outil diagnostique idéal pour mettre en évidence la présence d'auto-Ac sur les hématies (Quigley *et al.*, 2001). La CF permet de diagnostiquer des patients dont le caractère immunitaire de l'anémie ne pouvait être diagnostiqué par le test de Coombs dont le résultat est un faux négatif. En effet, la CF permet la détection d'auto-Ac à des concentrations bien plus faibles que le test de Coombs, mais aussi la détection d'IgG de faible affinité qui peuvent être éliminées lors des lavages préparatoires et elle permet également de mettre en évidence les hématies sensibilisées uniquement par des IgA ou plus rarement des IgM mais sans fixation du complément. Ces hématies ne peuvent être détectées par le test de Coombs qui utilise des anti-IgG et anti-C3 (Segel et Lichtman, 2014). En médecine humaine, la CF a démontré son efficacité et peut être utilisé en nouvelle méthode de routine (Wang *et al.*, 2001 ; Khunger *et al.*, 2019). Par ailleurs, le caractère quantitatif des résultats fournis par la CF pourrait permettre de suivre l'efficacité du traitement. Certaines études ont montré des associations statistiques entre la clinique et le pourcentage d'hématies porteuses d'auto-Ac (Garden *et al.*, 2019).

De plus, cette méthode est également plus rapide et plus rentable pour quantifier l'immunoglobuline et/ou le complément liés aux érythrocytes par rapport au test de Coombs actuellement utilisé. Le gain économique de la CF sur le test de Coombs résulte de la quantité d'antisérum utilisée. La CF utilise seulement 10% de la quantité nécessaire à un test de Coombs. Elle nécessite également une quantité moindre d'hématies ce qui peut être pratique sur un animal anémié (Quigley *et al.*, 2001).

iii- Détection des plaquettes activées

Les thrombo-embolies sont une complication courante des AHAI chez le chien, mais qui n'est pas décrite chez le chat. Elle résulte d'un état d'hypercoagulabilité. Les éléments cliniques ne sont pas spécifiques, on note une dyspnée et une tachypnée grave apparues de manière brutale (Scott-Moncrieff *et al.*, 2001 ; McCullough, 2003). Des examens complémentaires sont à réaliser afin de rechercher des signes de thrombo-embolie, notamment la recherche de plaquettes activée. En effet 75% des chiens atteints de thrombo-embolie lors d'AHAI possèdent des plaquettes activées (Weiss et Brazzell, 2006).

L'activation des plaquettes est signée notamment par la présence de sélectine P (CD62p) à leur surface (Tomer, 2004). Cette protéine est issue des granules alpha et est libérée lors de la dégranulation des plaquettes. Sa détection par CF est sensible et est intéressante pour diagnostiquer un état d'hypercoagulabilité avant la formation de thrombus (Weiss et Brazzell, 2006 ; Ridyard *et al.*, 2010). Il semblerait également que la détection des agrégats leucocytaires-plaquettaires et notamment les monocytaires-plaquettaires, soit également un bon marqueur de l'activation plaquettaire, recherchant l'association CD45 et CD41 (Nagasawa *et al.*, 2013). La détection de cet état permet la mise en place d'un traitement anti-thrombotique avant l'apparition de ceux-ci.

b- Limites de la technique

La CF reste un examen qui nécessite des équipements onéreux et des spécialistes pour interpréter les résultats fournis par l'automate (Chaudhary *et al.*, 2006). De plus, ces analyses ne sont encore que très peu disponibles en médecine vétérinaire. Ainsi la CF est un outil qui se révèle performant dans le diagnostic des anémies hémolytiques à médiation immune et intervient à plusieurs niveaux tels que :

- La recherche de réticulocytes pour déterminer le caractère régénératif de l'anémie,
- Une alternative au test de Coombs direct : elle est plus sensible pour déterminer si la cause de cette anémie est à médiation immune,
- La détection des états d'hypercoagulabilité qui est une complication des AHMI.

Cependant, la CF, comme les autres tests à disposition, ne parvient pas à trancher sur le caractère primaire ou secondaire de l'anémie à médiation immune.

B- Thrombocytopénie auto-immune

La thrombocytopénie ou thrombopénie, est une diminution du nombre de plaquettes circulantes. Elle peut être centrale, résultant d'une baisse de production plaquettaire dans la moelle osseuse, ou périphérique résultant soit d'une destruction accrue, soit d'une consommation excessive ou d'une séquestration plaquettaire accrue.

1- Généralités

a- Morphologie et données numériques

Les plaquettes sont des cellules rondes, ovales ou allongées qui changent de morphologie (Figure 39) lorsqu'elles sont activées : des pseudopodes peuvent être observés. Elles ont un diamètre entre 1,3 et 4,7 micromètres et une épaisseur de 0,5 micromètres. Cela représente le quart voir les deux tiers du diamètre d'une hématie chez le chien. Chez le chat, les plaquettes peuvent être plus grandes que les hématies. Sur un frottis sanguin elles peuvent apparaître isolées ou agglutinées. Des thrombopénies techniques sont décrites quel que soit le mode d'obtention de la numération plaquettaire. En effet dans le tube de prélèvement, les plaquettes ont tendance à s'agglutiner avant que l'automate n'analyse l'échantillon. De plus, l'agglutination plaquettaire en périphérie du frottis n'est pas rare chez le chat, ce qui peut également donner à tort l'impression d'une thrombopénie (Guelfi *et al.*, 1993 ; Walker, 2006).

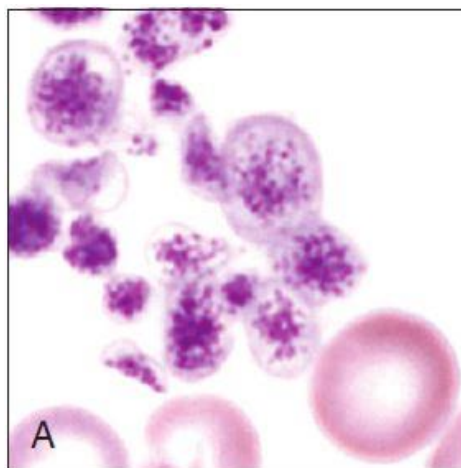


Figure 39: Plaquettes saines en agrégat chez un chien (Harvey, 2015c)

b- Thrombopoïèse et destruction des thrombocytes

L'hématopoïèse commence à partir de cellules souches pluripotentes (CFU : Colony Forming Unit) à l'origine des différentes lignées sanguines. La CFU se différencie d'abord en CFU-Mégacaryocyte, cellule souche unipotente, puis évolue en mégacaryoblaste. Ce sont des cellules peu nombreuses dans la moelle osseuse, avec un fort rapport nucléocytoplasmique. En effet leur noyau se divise par endomitose et ces cellules peuvent donc avoir jusqu'à 4 noyaux. La différenciation mène à la

formation en plusieurs étapes des métamégacaryocytes qui sont les cellules les plus grosses de la lignée. Ce sont des cellules contenant des granules azurophiles regroupées et sur la périphérie se trouvent les plaquettes qui sont ensuite libérées par fragmentation du métamégacaryocyte (Messick, 2006 ; Eto et Kunishima, 2016). Les différentes étapes de la thrombopoïèse sont reprises dans la Figure 40.

La thrombopoïèse est régulée par le nombre de plaquettes circulantes. Lors de thrombopénie, le rein sécrète davantage de thrombopoïétine (TPO). Cette hormone agit à trois niveaux. Elle stimule la différenciation des CFU en CFU-Meg, elle induit une augmentation des endomitoses dans les mégacaryocytes et elle réduit la durée de la thrombopoïèse. Elle intervient également sur la voie de différenciation des CFU en érythrocyte, lorsque son taux est élevé. A haute dose la TPO favorise l'érythropoïèse à la thrombopoïèse, par l'intermédiaire de l'inhibition de FLI1, facteur favorisant la thrombopoïèse et l'activation de KLF1 inhibiteur de la thrombopoïèse. La Figure 40 reprend ces mécanismes de régulation de la thrombopoïèse (Messick, 2006 ; Eto et Kunishima, 2016).

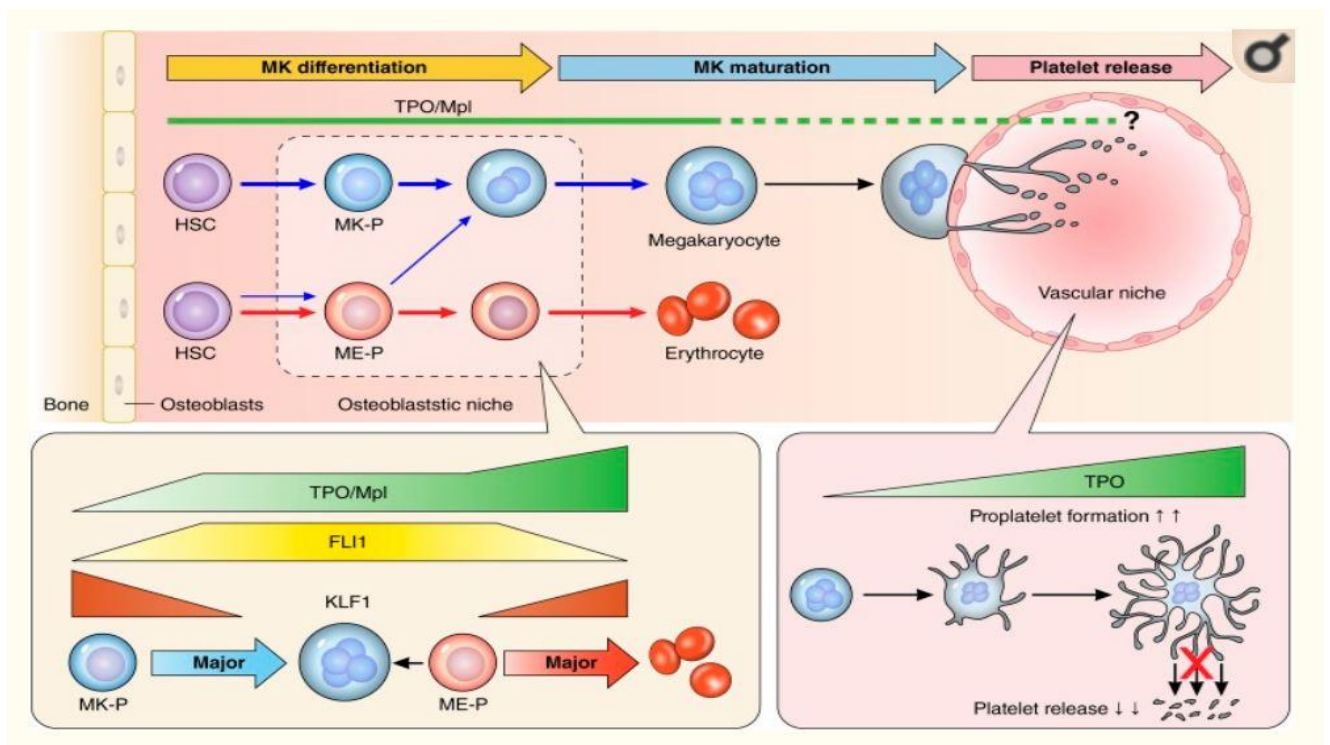


Figure 40: La différenciation plaquettaire et sa régulation dans la moelle osseuse (Eto et Kunishima, 2016) HSC : cellule souche hématopoïétique, MK-P : CFU-Mégacaryocyte, TPO : Thrombopoïétine, Mpl : récepteur MPL, FLI1 : Friend Leukemia intégration 1, KLF1 : Kruppel-like Factor 1.

Les plaquettes, dans leur plus grande majorité, sont stockées dans la rate et peuvent être rapidement libérées en cas de besoin par splénocontraction. Leur durée de vie chez un animal sain est de 9 à 12 jours. Leur destruction se déroule essentiellement dans la rate, mais elle peut avoir lieu également dans le foie et la moelle osseuse. Elles sont phagocytées par le système des phagocytes mononucléés (Messick, 2006).

c- Pathogénie des thrombopénies auto-immunes

Les thrombopénies auto-immunes sont causées par une phagocytose Ac-dépendante des plaquettes. Il y a assez peu de données chez les carnivores domestiques quant à la pathogénie des thrombopénies auto-immunes. Toutefois, il apparaît que les résultats obtenus montrent une analogie entre les thrombopénies à médiation immune primaires chroniques chez l'homme et le purpura thrombopénique idiopathique du chien, ce qui permet une transposition des connaissances de l'Homme au chien (Lewis et Meyers, 1996 ; Pellerin et Person, 1996). Chez le chat, la thrombopénie auto-immune est une pathologie rare et très peu décrite. Les thrombopénies à médiation immunes sont le plus souvent secondaires à une pathologie sous-jacente (Kohn *et al.*, 2006b).

i- Acteurs impliqués

Les Ac présents à la surface des plaquettes lors de thrombopénie auto-immunes sont uniquement les IgG. En effet, il y a une corrélation entre le nombre d'Ac fixés sur les plaquettes et la numération plaquettaire. Plus elle est faible et plus le nombre d'Ac fixé sur les plaquettes est élevé. Cette corrélation n'est vérifiée que pour les IgG, c'est pourquoi l'intervention des IgM et IgA a été écartée du processus pathogénique (Lewis et Meyers, 1996 ; Pellerin et Person, 1996 ; Mackin et Ward, 2005).

Ces Ac antiplaquettaires (APA) sont le résultat d'une perte de tolérance du soi, contrôlée par les lymphocytes T. Chez l'Homme et chez le chien, la cause est inconnue. Il semblerait que les individus malades présenteraient une diminution du nombre de LT suppresseurs (Lewis et Meyers, 1996 ; Granat *et al.*, 2011). L'environnement devient pro-inflammatoire avec l'émission de cytokines par les Th1, Th17 et Th22 qui favorisent l'activité des macrophages ainsi que le développement des LB autoréactifs et des LT cytotoxiques (LeVine et Brooks, 2019).

Chez l'Homme, les auto-Ac ont pour cible les glycoprotéines membranaires GPIIb/IIIa et GPIb/IX (Mackin, 1995 ; Lewis et Meyers, 1996 ; Pellerin et Person, 1996). Les glycoprotéines membranaires GPIIb/IIIa ont été identifiées chez un chien et seul GPIIb a été retrouvée chez trois chiens (Lewis et Meyers, 1996). C'est l'association des auto-Ac sur ces glycoprotéines qui entraîne la phagocytose des plaquettes principalement dans la rate (Mackin et Ward, 2005). Chez le chat, les Ag-cibles n'ont pas encore été identifiés (Kohn *et al.*, 2006b).

ii- Mécanismes de destruction plaquettaire

Les plaquettes sont détruites préférentiellement dans la rate, car c'est un organe très riche en macrophages. La destruction plaquettaire se fait par opsonisation quand les macrophages interagissent avec les IgG à la surface des plaquettes (Feldman *et al.*, 1988 ; Lewis et Meyers, 1996 ; Pellerin et Person, 1996). Quand la concentration en APA est très élevée, la destruction des plaquettes peut également se produire dans le foie et la moelle osseuse (Feldman *et al.*, 1988).

iii- Conséquences sur la thrombopoïèse et l'activité des thrombocytes

Pour compenser la destruction massive de plaquettes, la thrombopoïèse augmente (Mackin, 1995 ; Lewis et Meyers, 1996 ; Pellerin et Person, 1996). Chez les animaux atteints de purpura thrombopénique idiopathique, les troubles de l'hémostase primaire ne sont pas uniquement causés par la thrombopénie, mais aussi par le dysfonctionnement plaquettaire causé par la présence des auto-Ac (Kristensen *et al.*, 1994a). En effet, une étude réalisée *in vitro* chez le chien, a mis en évidence un défaut d'agrégation des plaquettes des animaux malades de thrombopénie auto-immune. Toutefois l'intensité des saignements ne semble pas forcément corrélée au dysfonctionnement plaquettaire (Kristensen *et al.*, 1994a).

d- Epidémiologie des thrombopénies auto-immunes

i- Chez le chien

La proportion de thrombocytopénies à médiation immune parmi toutes les thrombocytopénies est de 5% (Grindem *et al.*, 1991). Cependant, la proportion de thrombopénies à médiation immune primaires n'est pas négligeable (entre 56 et 73% des cas) parmi les thrombopénies à médiation immune (Jackson et Kruth, 1985 ; Grindem *et al.*, 1991). Il semblerait que ce sont les chiens adultes d'âge moyen, entre 6 et 7 ans selon les études, qui sont les plus représentés dans les malades de thrombopénies auto-immunes (Jackson et Kruth, 1985 ; Jans *et al.*, 1990 ; Rozanski *et al.*, 2002). Il semblerait également que les femelles soient prédisposées à cette affection (Williams et Maggio-Price, 1984 ; Jackson et Kruth, 1985 ; Grindem *et al.*, 1991 ; Lewis et Meyers, 1996). Elles représenteraient 62 à 70% des individus atteints selon les études, et la stérilisation semble être un facteur prédisposant car les femelles stérilisées sont surreprésentées (Williams et Maggio-Price, 1984 ; Lewis et Meyers, 1996).

ii- Chez le chat

Les thrombopénies sont rares chez le chat. Une étude menée pendant 5 ans sur 3300 chats hospitalisés, montre seulement 41 chats soit 1,2% étaient thrombopéniques et parmi ces thrombopénies seulement 2% étaient d'origine immunitaire (Jordan *et al.*, 1993). Ces thrombopénies d'origine immunitaire sont essentiellement secondaires (environ 89%) (Jordan *et al.*, 1993 ; Peterson *et al.*, 1995 ; Kohn *et al.*, 2006b). Cette étude sur 41 chats ne permet pas de conclure à des prédispositions d'âge ou de sexe (Jordan *et al.*, 1993).

2- Processus diagnostique

Le diagnostic repose sur la réalisation d'un examen clinique exhaustif qui permettra au clinicien d'émettre des hypothèses. Dans un deuxième temps, des examens complémentaires permettront d'infirmer ou de confirmer les hypothèses.

a- Signes cliniques

Les signes cliniques évocateurs sont ceux liés aux troubles de l'hémostase primaire comme des saignements cutanés superficiels, des pétéchies, des ecchymoses, une épistaxis, des saignements des muqueuses digestives et urogénitales (Jain et Switzer, 1981 ; Williams et Maggio-Price, 1984 ; Feldman *et al.*, 1988 ; Garon *et al.*, 1999 ; Tasker *et al.*, 1999 ; Rozanski *et al.*, 2002). Les saignements sont rencontrés plus fréquemment chez le chien que chez le chat. Lorsque les pertes sanguines sont très importantes, un état de choc peut se mettre en place (Jain et Switzer, 1981 ; Williams et Maggio-Price, 1984). Chez le chat, il a également été rapporté la présence de souffle cardiaque à l'auscultation d'individus malades (Tasker *et al.*, 1999 ; Garon *et al.*, 1999).

b- Hématologie

Pour explorer l'hémostase primaire, il est nécessaire de connaître la numération plaquettaire et de réaliser un temps de saignement (Feldman *et al.*, 1988 ; Peterson *et al.*, 1995 ; Tasker *et al.*, 1999).

i- Numération plaquettaire

✓ Généralités

La numération plaquettaire signe une thrombopénie lorsqu'elle est inférieure à 180 000-200 000 cellules/ μ L selon les auteurs (Pellerin et Person, 1996 ; Savary Bataille, 2003). La numération plaquettaire est obtenue le plus souvent à l'aide d'un automate ou peut être approchée par dénombrement plaquettaire sur un frottis. Pour cela, le frottis doit être observé à un grossissement x1000. Ainsi pour chaque plaquette observée dans un champ correspondent 15000 plaquettes circulantes dans 1 μ L de sang. Donc au-dessus de 12 plaquettes visibles par champ, on peut conclure que la numération plaquettaire est normale (Pellerin et Person, 1996).

Chez le chat, espèce dans laquelle les plaquettes peuvent être d'une taille comparable à celle des hématies, il n'est pas rare que les automates donnent une valeur peu fiable de la numération plaquettaire par confusion des deux types cellulaires. De plus dans cette espèce, les plaquettes ont une forte tendance à s'agréger, ce qui minore encore plus le dénombrement plaquettaire par l'automate (Jordan *et al.*, 1993 ; Tasker *et al.*, 1999). C'est pourquoi il est nécessaire chez les chats suspects de thrombopénie de confirmer la numération plaquettaire par un dénombrement manuel bien qu'une agrégation soit possible également sur les frottis (Jordan *et al.*, 1993).

✓ Dans le cas des thrombopénies auto-immunes

Les purpuras thrombopéniques idiopathiques chez le chien se caractérisent par une numération très faible entre 6 et 36 760 plaquettes/ μ L d'après différentes études (Jackson et Kruth, 1985 ; Grindem *et al.*, 1991 ; Rozanski *et al.*, 2002). Chez le chat, la numération plaquettaire peut être très diminuée (inférieure à 16 000 plaquettes/ μ L) (Tasker *et al.*, 1999 ; Kohn *et al.*, 2006b) mais est en général modérée. Sur une étude de 42 chats thrombopéniques, la numération plaquettaire est en moyenne de 56 000 plaquettes/ μ L (6 000-179 000/ μ L)(Kohn *et al.*, 2006b). Dans une autre sur 5 chats, les

dénombrements plaquettaires étaient compris entre 4 et 46 000 plaquettes/ μ L (Wondratschek *et al.*, 2010).

ii- Frottis sanguin

Un frottis devra toujours être effectué pour confirmer une thrombopénie. En effet, les plaquettes peuvent former des agrégats, ce qui sous-estime artificiellement la thrombopénie quelle que soit la méthode utilisée. Ces agrégats surviennent lors de prélèvement difficile, après activation plaquettaire, après un temps d'attente trop long entre le prélèvement et l'analyse et sont courants chez le chat (Savary Bataille, 2003).

iii- Temps de saignement

✓ Généralités

Lors de thrombopénie, l'hémostase primaire est impactée. En effet, celle-ci est le fruit d'une interaction entre la paroi vasculaire, les plaquettes et l'endothélium. Le temps de saignement permet d'évaluer l'hémostase primaire mais ne permet pas de conclure à une thrombopénie, s'il est augmenté. Il faut en effet envisager également une thrombopathie ou une maladie de Von Willebrand. Son interprétation se fera à l'aide de la numération plaquettaire (Marks, 2000).

Ce test se fonde sur une incision au bistouri de la muqueuse gingivale, sur un chien en décubitus sternal dont la babine est éversée et maintenue en position par un lien. Le sang qui s'écoule est absorbé par un papier buvard qui ne doit pas être en contact avec la plaie afin de ne pas interférer dans la formation du clou plaquettaire (Marks, 2000). Le temps de saignement correspond à la durée entre l'incision et l'arrêt du saignement. Chez un animal sain, le temps de saignement est d'environ 3 min. Au-dessus de cette durée, il existe un trouble de l'hémostase primaire (Tasker *et al.*, 1999 ; Marks, 2000). Ce test peut également se réaliser par incision du pavillon auriculaire (Pellerin et Person, 1996).

✓ Dans le cas des thrombopénies auto-immunes

Ce test est rarement réalisé dans les études. Tasker *et al* (1999) l'ont réalisé chez un chat atteint de thrombopénie auto-immune et le temps de saignement était effectivement augmenté (environ 6 minutes).

iv- Temps de coagulation

Les temps de coagulation permettent d'explorer l'hémostase secondaire. Cette hémostase secondaire permet d'éviter l'apparition d'hémorragies majeures chez les sujets thrombopéniques. Ainsi sur les animaux thrombopéniques, en présence d'hémorragies majeures, il faudra systématiquement réaliser les temps de coagulation (Mackin, 1995 ; Pellerin et Person, 1996).

✓ Temps de coagulation sur tube sec

Le temps de coagulation sur tube sec permet d'explorer l'intégrité des voies endogènes et communes de la coagulation plasmatique. La coagulation peut avoir lieu jusqu'à des numérations plaquettaires très faibles. Un temps de coagulation augmenté sera donc soit lié à un trouble de l'hémostase secondaire soit à une forte thrombopénie (inférieure à 10 000 plaquettes/ μ L) (Mackin, 1995 ; Pellerin et Person, 1996).

✓ Temps de Quick et de Céphaline Kaolin

Le Temps de Quick (TQ) explore les voies de coagulation exogène et commune. Le temps de Céphaline Kaolin (TCK) explore les voies endogène et commune (Outters, 2014). Le sang est prélevé par ponction franche et déposé dans des tubes citratés. Les prélèvements doivent parvenir rapidement au laboratoire. Une élévation d'au moins 20 à 30% est considérée comme anormale (Outters, 2014). Ces temps de coagulation sont réalisés en routine dans les études.

✓ Dans le cas des thrombopénies auto-immunes

Dans l'espèce féline ou canine, les études montrent que les temps de coagulation ne sont pas modifiés (Grindem *et al.*, 1991 ; Tasker *et al.*, 1999 ; Kohn *et al.*, 2006b ; O'Marra *et al.*, 2011). Néanmoins, des études ont montré un chat avec des TQ et TCK augmentés, un autre avec seulement un TQ augmenté (Wondratschek *et al.*, 2010) et deux chats avec seulement les TCK augmentés (Garon *et al.*, 1999 ; Wondratschek *et al.*, 2010). Ces deux chats présentaient une numération plaquettaire inférieure à 10 000 plaquettes/ μ L (Garon *et al.*, 1999 ; Wondratschek *et al.*, 2010).

Ces examens complémentaires donnent au clinicien des indications sur la gravité de la thrombopénie et le risque hémorragique pour le patient. Cependant, afin de déterminer l'origine précise de cette thrombopénie, il faut déterminer l'origine auto-immune en cherchant à mettre en évidence les auto-Ac.

c- Immunologie

De nombreux tests sont décrits dans la littérature pour détecter les APA. Les tests de recherche des APA sont appelés tests Platelet Bound Antibody (PBA). Le PBA peut se faire selon différentes techniques décrites ci-dessous.

i- Test de libération du facteur plaquettaire 3 (PF-3)

✓ Généralités

Ce test est facilement accessible aux cliniciens (Mackin, 1995 ; Lewis et Meyers, 1996). Il repose sur le fait que lors d'atteinte membranaire des plaquettes, comme la fixation d'APA, le facteur plaquettaire 3 (PF-3) est libéré et permet une augmentation de la vitesse de coagulation (Jain et Kono, 1980 ; Lewis et Meyers, 1996). Ce test mesure la libération du PF-3 via une diminution du temps de

coagulation en présence de facteurs de contact (Jain et Kono, 1980 ; Chabanne et Fournel-Fleury, 1994).

Il existe une méthode directe réalisée à partir de plaquettes du patient et une méthode indirecte réalisée à partir du sérum du patient. La méthode directe nécessite un « plasma riche en plaquettes ». Pour cela, il faut récupérer le plasma après centrifugation de l'échantillon de sang sur anticoagulant. La méthode indirecte nécessite l'incubation du sérum du patient avec un plasma riche en plaquettes d'un individu sain (Chabanne et Fournel-Fleury, 1994). Dans le cadre de la méthode indirecte, le sérum peut être acheminé congelé au laboratoire. Sa qualité doit être évaluée avant l'analyse, car une lipémie ou une hémolyse peut fausser les résultats (Jain et Kono, 1980 ; Mackin, 1995).

Ce test est positif et démontre la libération du PF-3 quand le temps de coagulation est au moins divisé par 2 par rapport au témoin (Jain et Kono, 1980). Ce test présente une sensibilité moyenne, très variable selon les études et la technique employée (28% à 88%) (Williams et Maggio-Price, 1984 ; Chabanne et Fournel-Fleury, 1994 ; Mackin, 1995 ; Lewis, 2000) et manque de spécificité (Lewis et Meyers, 1996). Ces valeurs ont été établis dans l'espèce canine.

✓ Dans le cas des thrombopénies auto-immunes

Chez le chien, le test de libération du PF-3 est parfois réalisé dans les études (Williams et Maggio-Price, 1984 ; Jans *et al.*, 1990). Ces études confirment le manque de sensibilité du test et rappellent qu'un résultat négatif ne permet pas au clinicien d'exclure l'hypothèse de l'origine immunitaire de la thrombopénie (Williams et Maggio-Price, 1984).

Dans l'espèce féline, ce test est décrit mais semble peu utilisé. Une étude sur un seul cas a montré une très nette diminution du temps de coagulation, et donc une libération de PF-3 (Joshi *et al.*, 1979).

ii- Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique très intéressante dans le diagnostic des thrombopénies auto-immunes. Elle peut mettre en évidence les Ac à la surface des mégacaryocytes (immunofluorescence directe) (Chabanne et Fournel-Fleury, 1994 ; Lewis et Meyers, 1996 ; Lewis, 2000) ou mettre en évidence des Ac circulants dirigés contre les plaquettes (immunofluorescence indirecte) (Kristensen *et al.*, 1994a), par microscopie.

✓ Immunofluorescence directe

Ce test se pratique sur un prélèvement de moelle osseuse obtenu par biopsie (Chabanne et Fournel-Fleury, 1994) ou par cytoponction (Chabanne et Fournel-Fleury, 1994 ; Lewis, 2000). Il consiste à mettre en présence le prélèvement de moelle osseuse avec une anti-globuline spécifique marquée par un fluorochrome (Jain et Switzer, 1981). La sensibilité n'est pas très bonne, comprise entre 30 et 88% selon les auteurs (Lewis et Meyers, 1996 ; Lewis, 2000). Les faux négatifs ne sont pas rares, notamment lorsque le nombre de mégacaryocytes est trop faible pour que la fluorescence soit détectée

(Mackin, 1995 ; Pellerin et Person, 1996). La spécificité du test est faible. C'est pourquoi, avec de telles caractéristiques de sensibilité et spécificité, il est nécessaire de coupler ce test avec d'autres (Chabanne et Fournel-Fleury, 1994).

Cependant chez le chat, ce test est préconisé car il semble que les réactions sérologiques visant à détecter les APA ne sont pas toujours fiables. De plus, les tests utilisés chez le chien ne sont pas tous disponibles chez le chat (Tasker *et al.*, 1999).

✓ Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte se réalise avec du sérum de l'individu malade mis en présence de plaquette d'un individu sain et d'antiglobuline spécifiques marquée par un fluorochrome. La fluorescence est observée soit au microscope soit par CF (Kristensen *et al.*, 1994b ; Kristensen *et al.*, 1994c). La sensibilité de ce test est de 70%. La technique de détection de la fluorescence n'influence pas sur la sensibilité (Kristensen *et al.*, 1994b). La spécificité n'est pas parfaite non plus en effet d'autres pathologies peuvent engendrer des tests positifs comme par exemple les néoplasies (Kristensen *et al.*, 1994c). Chez le chat, ce test n'est pas disponible et n'est pas considéré comme fiable (Tasker *et al.*, 1999).

L'immunofluorescence indirecte serait plus sensible (67%) que l'immunofluorescence directe (41%) (Kristensen *et al.*, 1994b)

iii- Technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Le PBA peut se réaliser par tests ELISA qui ont pour but de mettre en évidence la présence d'APA soit à la surface des plaquettes (méthodes directe) soit dans le sérum (méthode indirecte) (Lewis *et al.*, 1995a).

✓ Méthode directe

La sensibilité de la méthode directe ELISA est supérieure à celle des tests précédemment décrits, car elle est comprise entre 90 et 94% (Chabanne et Fournel-Fleury, 1994 ; Lewis *et al.*, 1995a ; Lewis, 2000). La spécificité est estimée à 62%. Il existe des faux positifs comme les cas atteints de lupus érythémateux disséminé, d'ehrlichiose, de CIVD, de borreliose, de dirofilariose, de myélodysplasie ou traité avec au triméthoprime-sulfamide (Lewis *et al.*, 1995a ; Lewis, 2000). Il existe aussi des faux négatifs liés à l'élution des Ac lors du lavage des plaquettes par exemple. Cependant, dans la majorité des cas, un résultat négatif à ce test permet d'exclure une origine immunitaire (Lewis *et al.*, 1995a ; Lewis, 2000).

Ce test est un outil diagnostique très intéressant car la quantité d'Ac fixés aux plaquettes augmente fortement lors de thrombopénie auto-immunes (Wilkerson *et al.*, 2001). Cependant, il présente des inconvénients comme les conditions de conservation et de transport des prélèvements (Lewis *et al.*,

1995a ; Pellerin et Person, 1996 ; Wilkerson *et al.*, 2001), ainsi que le gros volume de prélèvement nécessaire afin d'obtenir assez de plaquettes pour faire le test (Mackin, 1995 ; Lewis *et al.*, 1995a). Ce qui est problématique chez des animaux thrombopéniques (Pellerin et Person, 1996).

✓ Méthode indirecte

La méthode indirecte consiste à mettre en évidence les APA dans le sérum de l'animal malade, selon la méthode présentée dans la figure 41. Ce test a des propriétés différentes de la méthode directe. En effet, sa sensibilité est variable en fonction des études (entre 34 et 80%) mais sa spécificité est bien meilleure (80%) (Lewis *et al.*, 1995a). Cette technique n'est pas décrites dans les études menées chez le chat (Joshi *et al.*, 1979 ; Garon *et al.*, 1999 ; Tasker *et al.*, 1999).

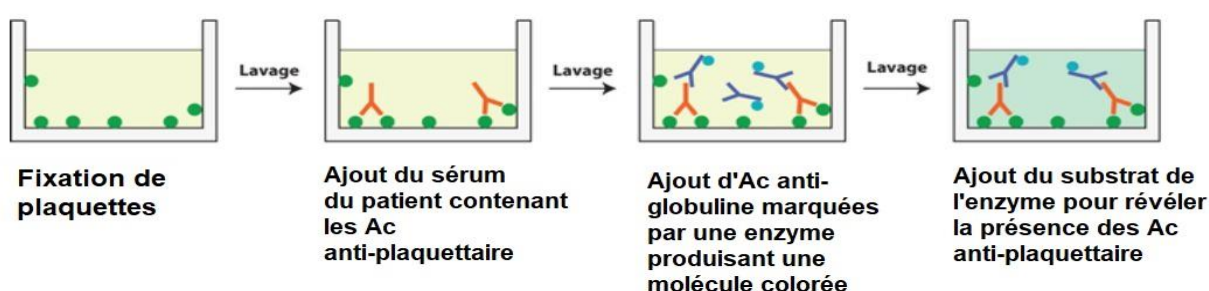


Figure 41: Principe du test ELISA indirect, d'après (Zuchuat, 2017)

Ainsi il existe de nombreux tests afin de déterminer le caractère immunitaire d'une thrombopénie. Cependant, ils sont assez peu fiables et/ou invasifs et contraignants. Les recherches d'Ac par la CF se réalisent à partir d'un échantillon sanguin et ne nécessitent pour le laboratoire, qu'un cytomètre de flux et les réactifs nécessaires. La CF dans ce type de test diagnostique représente donc un intérêt certain.

3- Possibilités apportées par la CF et ses limites

a- Test performant dans la détection des APA

L'équipe de Shropshire a montré que la détection des APA par CF par méthode directe est fiable même après une durée de 72h de conservation au frais de l'échantillon, permettant ainsi sa disponibilité pour une grande partie des patients. La méthode indirecte, la recherche des Ac dans le sérum, n'a pas montré une efficacité permettant son utilisation en clinique chez le chien (Shropshire *et al.*, 2018). Ce test est considéré positif si plus de 10% des plaquettes étaient liées à des APA, il est considéré négatif en dessous de ce seuil (Dircks *et al.*, 2009 ; Shropshire *et al.*, 2018). Ainsi en cas de résultat négatif, on peut quasiment exclure l'hypothèse de l'origine immunitaire

La CF est un outil très intéressant pour le PBA. En effet la CF est capable de donner un résultat fiable même sur des chiens présentant une thrombopénie sévère ainsi que sur des petits chiens, car elle ne nécessite que peu de sang (Lewis *et al.*, 1995b). De plus, elle ne nécessite que peu de manipulations de l'échantillon ce qui diminue le risque de dénaturation des Ag et des Ac à la surface des plaquettes (Kohn *et al.*, 2006b). Cette technique est également efficace chez le cheval (McGurrin *et al.*, 2004).

Chez le chat, la CF semble être une bonne alternative aux autres tests immunologiques, jugés très souvent insatisfaisants (Tasker *et al.*, 1999 ; Kohn *et al.*, 2006b). En effet, seuls les tests de détection du PF-3 par méthode indirecte (Joshi *et al.*, 1979) et de recherche d'Ac anti-megacaryocyte par immunohistochimie ou immunofluorescence par microscopie ont été décrits (Joshi *et al.*, 1979 ; Tasker *et al.*, 1999). Dans cette espèce, la destruction des plaquettes par médiation immunitaire est un mécanisme important dans la pathogénie des thrombopénies en raison de diverses maladies sous-jacentes (19 PBA positifs /42 chats thrombocytopeniques = 45%). Cependant, les thrombopénies auto-immunes semblent être très rares (2 chats PBA positifs sans maladies sous-jacentes détectées/ 42 chats thrombopéniques = 4%) (Kohn *et al.*, 2006b). Il est donc particulièrement intéressant, chez le chat, d'avoir un PBA sensible et relativement facile à mettre en place comme le permet le PBA par CF.

b- Echantillons moins contraignants

C'est une technique qui présente un avantage technique vis-à-vis du prélèvement. En effet elle ne demande qu'un faible volume sanguin et ne nécessite qu'une faible quantité de plaquettes afin de mettre en évidence les Ac antiplaquettaires (inférieure à 5000 plaquettes/ μ L) (Tarrant, 2005 ; Kohn *et al.*, 2006b). Cet avantage permet d'utiliser des échantillons 10 à 25 fois moins riches en plaquettes que les autres méthodes, que cela soit sur plasma enrichi en plaquettes ou sur sang total (De Cuyper *et al.*, 2013).

c- Caractère régénératif de la thrombopénie

Les plaquettes nouvellement formées sont des plaquettes riches en ARN et sont dites plaquettes réticulées (RP). Elles ne sont pas quantifiables par dénombrement sur frottis par leur morphologie contrairement aux réticulocytes. Leur dénombrement est possible par CF en les marquant avec un marqueur fluorescent spécifique de l'ARN (Harvey, 2015c).

Le taux de RP est un indicateur du taux de thrombopoïèse et permet donc de connaître le caractère régénératif de la thrombopénie (Wilkerson, 2012 ; Hedley *et al.*, 2015). La CF permet de diagnostiquer et de monitorer la thrombopoïèse et ce de manière non-invasive contrairement au dénombrement des mégacaryocytes de la moelle osseuse par ponction ou biopsie (Russell *et al.*, 1997).

Pour cela, les RP sont marquées avec du thiazole orange, marqueur fluorescent adapté au laser bleu pour la recherche d'ARN (Hedley *et al.*, 2015), qui se fixe à l'ARN contenu dans les RP, puis

analysées en cytométrie de flux avec un « gating », basé sur la taille des cellules (paramètre FSC) permettant de sélectionner que les thrombocytes comme le montre la figure 42 (Wilkerson, 2012).

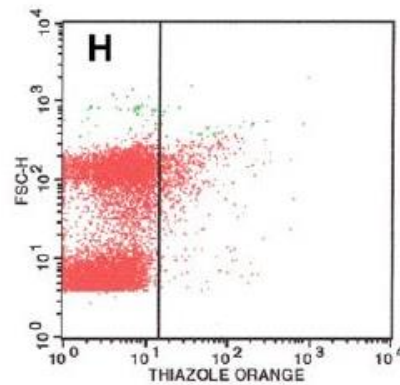


Figure 42: Résultat d'une analyse de CF visant à identifier les RP à l'aide d'orange thiazole. Les plus petites cellules marquées (en rouge) sont les RP, les cellules vertes sont les réticulocytes (Wilkerson, 2012)

Il est possible de coupler ce marquage avec celui des Ag plaquettaires GPIIb/IIIa aussi appelé CD41/CD61, cela permet de distinguer les plaquettes et les RP des érythrocytes et réticulocytes, ce qui facilite le gating pour identifier les RP (Hedley *et al.*, 2015). Cette technique a été validée également chez le cheval (Russell *et al.*, 1997) et chez le chat (Okamura *et al.*, 2003). Cependant une diminution du taux de RP ne signe pas toujours une diminution de la production, car les RP peuvent être détruites par le système immunitaire (Hedley *et al.*, 2015).

d- Réponse au traitement

Grâce à la CF et son caractère quantitatif, on peut suivre les effets du traitement. En effet, il a été montré que la réponse au traitement entraîne une baisse du taux des APA et qu'une récurrence entraîne une hausse de la quantité des APA. Ainsi il serait important de réaliser régulièrement des dosages d'APA par CF afin de monitorer la réponse au traitement et anticiper une rechute avant l'apparition de signes cliniques. Malgré cela, la quantité d'APA mesurée lors du diagnostic n'est pas corrélée à la réponse au traitement ou non (Shropshire *et al.*, 2020).

e- Distinction thrombopénie à médiation immune primaire ou secondaire

Malheureusement, la CF comme les autres tests immunologiques, ne permet pas de déterminer si la thrombopénie à médiation immune est primaire ou secondaire. Le diagnostic de thrombopénie auto-

immune se fait par exclusion de toute autre pathologie sous-jacente. De plus elle n'est pas toujours spécifique et peut mettre en évidence une destruction de plaquettes physiologiques (Tarrant, 2005 ; Kohn *et al.*, 2006b). En effet, un résultat positif montre une médiation immune à la thrombocytopénie et semble mettre en évidence un processus pathologique sévère, qu'il soit auto-immun ou secondaire à une pathologie sous-jacente, car les cas positifs à la recherche d'APA présentent des thrombopénies sévères (Dircks *et al.*, 2009).

Ainsi la CF permet un diagnostic plus rapide dans les cas des thrombopénies auto-immunes car elle permet d'obtenir en une seule analyse des résultats qui en nécessitaient plusieurs par le passé. En effet, la CF permet à partir d'un simple échantillon sanguin sur EDTA ou Citrate, de mettre en évidence la présence d'Ac dirigés contre les plaquettes signant ainsi une thrombopénie d'origine immunitaire. Elle permet également de déterminer si la thrombopénie est régénérative ou non en mesurant la quantité de plaquettes réticulées circulantes, sans avoir à réaliser de biopsie ou de ponction de moelle osseuse. Enfin elle permet de monitorer la réponse au traitement du patient en suivant la quantité d'APA, qui diminue avec la réponse au traitement et qui augmente lors de rechute. Cependant, la CF ne permet pas de distinguer une thrombopénie auto-immune d'une thrombopénie à médiation immunes secondaires à une pathologie sous-jacente.

Conclusion

La CF est une technique relativement récente, qui a vu le jour dans les années 1970 et qui permet l'étude de chaque cellule présente en suspension dans un liquide. Elle donne des informations sur sa taille, sa granularité et peut, grâce aux immunomarquages fluorescents, donner l'immunophénotype de chaque cellule pour les marqueurs sélectionnés dans l'analyse. C'est un outil efficace et rapide qui permet l'analyse de plusieurs milliers de cellules à la seconde et qui limite le nombre d'analyses par rapport aux autres techniques, comme la cytologie, l'immunocytochimie, les tests ELISA, etc... De plus sa capacité à analyser des cellules issues de cytoponction, permet aux investigations d'être peu invasives, contrairement aux immunohistochimies sur biopsie de moelle osseuse par exemple.

Les propriétaires d'animaux de compagnie et notamment de chiens et de chats demandent des soins et des diagnostics de plus en plus poussés pour leurs animaux, notamment face un diagnostic de néoplasie ou de maladies auto-immunes. Dans le cadre des lymphomes et des leucémies, qui sont des pathologies au pronostic sombre, il est de plus en plus fréquent, que les propriétaires souhaitent mettre en place un traitement afin d'augmenter l'espérance de vie de leur animal. Afin de mettre en place le traitement le plus adapté, il est nécessaire de savoir précisément quelle pathologie affecte l'animal. C'est pourquoi il est important de immunophénotyper le plus précisément possible le lymphome ou la leucémie. Savoir si l'hémopathie affecte la lignée lymphoïde (CD45⁺) ou la lignée myéloïde (CD45⁻), puis la sous-population impliquée : lymphocytes T (CD3⁺) CD4⁺ ou CD8⁺, lymphocytes B (CD79a⁺) ou la lignée érythrocytaire, granulocytaire, monocytaire (CD40⁺), thrombocytaire (CD41/CD61⁺) ; ainsi que le stade de développement : blastes (CD34⁺) ou cellule différenciée. Dans ce contexte, la CF est un outil efficace qui permet de gagner un temps précieux par rapport aux examens de typage réalisés jusqu'alors comme l'immunocytochimie avec des délais réduits d'une dizaine de jours à seulement 48h, avec une précision augmentée car la CF étudie des milliers de cellules lorsque le pathologiste n'en observe qu'une centaine. La CF permet également de préciser le pronostic de ces pathologies avec la recherche de certains marqueurs cellulaires qui ont été identifié comme facteur pronostic favorable ou défavorables, notamment le Ki67, marqueur de multiplication cellulaire qui est associé à une pathologie se développant rapidement et donc d'un pronostic assombri.

Dans le cadre des maladies auto-immunes, la CF se distingue par sa capacité à remplacer différents examens en une seule analyse. Il est possible de détecter la présence d'auto-Ac dirigés contre les hématies et les plaquettes dans les cas respectivement d'anémies et de thrombopénies à médiation immune. Ce test permet de remplacer le test de Coombs avec une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité dans le diagnostic des AHMI, et remplace le test de libération du PF-3 dans le diagnostic des thrombopénies à médiation immune. Lors de la même analyse, il est également possible de déterminer le caractère régénératif de la cytopénie en recherchant les érythrocytes respectivement des plaquettes réticulées à l'aide d'orange thiazole dans le cas des AHMI, ou des thrombopénies à médiation immune. Néanmoins, la cytométrie ne permet toujours pas de conclure directement à une cytopénie à médiation immune primaire ou secondaire à une pathologie sous-jacente. Afin de conclure à une cytopénie primaire, il sera toujours nécessaire d'exclure la présence de toute pathologie sous-jacente.

La CF est utilisée très fréquemment dans la recherche en immunologie et en biologie cellulaire, et notamment dans la recherche de biomarqueurs utilisables pour le diagnostic et le pronostic. En oncologie, les chercheurs s'intéressent notamment aux MDSC présentes dans la circulation sanguine, qui sont des cellules myéloïdes suppressives qui participent à l'échappement tumoral au système immunitaire. Les chiens atteints de cancer présentent un taux sanguin de MDSC plus élevé que les chiens sains et il semblerait que les chiens atteints de forme avancée aient des taux de MDSC plus élevés que ceux atteints de forme peu avancée. Des études de plus grande ampleur sont nécessaires afin de déterminer des valeurs seuil permettant de se servir des MDSC comme d'un biomarqueur d'atteinte cancéreuse lors d'un dépistage de routine par prise de sang. La détermination d'une deuxième valeur seuil permettrait de suspecter très fortement la présence de métastases ou de stades avancés dans le cas des cancers non solides.

La CF est encore une technique récente, qui mérite de s'installer plus largement dans les laboratoires d'analyses vétérinaires afin qu'un plus grand nombre d'animaux puissent en bénéficier à des fins diagnostiques. Elle reste pour l'heure encore onéreuse et peu disponible en raison d'un faible nombre d'Ac dirigés contre des protéines canines et félines disponibles. Par ailleurs, elle permet des progrès permanents, en médecine dans la recherche de traitements toujours plus performants que dans la découverte de facteurs pronostiques permettant aux propriétaires d'avoir toutes les informations nécessaires pour choisir le traitement de leur animal de compagnie. La CF intervient également dans la recherche et la quantification de micro-organismes, dans le domaine agro-alimentaire par exemple pour le suivi de la fermentation du vin ou le contrôle qualité des charcuteries, mais également dans le domaine de l'environnement pour le contrôle de la qualité des eaux notamment.

Liste des références bibliographiques

- ABBAS A., LICHTMAN (2010) Basic Immunology, 3th ed. Philadelphia, Saunders.
- ABELLA-BOURGÈS N., TRUMEL C., CHABANNE L., DIQUÉLOU A. (2005) Myélogramme et biopsie de moelle osseuse. *EMC - Vétérinaire* 2(2), 74-95
- ADAM F., VILLIERS E., WATSON S., COYNE K., BLACKWOOD L. (2009) Clinical pathological and epidemiological assessment of morphologically and immunologically confirmed canine leukaemia. *Vet Comp Oncol* 7(3), 181-195
- ADAN A., ALIZADA G., KIRAZ Y., BARAN Y., NALBANT A. (2017) Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechn* 37(2), 163-176
- ANTIBODIES-ONLINE (2021) Panel de marqueurs CD. In *Anticorps en ligne* [<https://www.anticorps-enligne.fr/resources/18/1540/panel-de-marqueurs-cd/>] (consulté le 19/01/2021).
- ARESU L., ARICÒ A., FERRARESSO S., *et al.* (2014) Minimal residual disease detection by flow cytometry and PARR in lymph node, peripheral blood and bone marrow, following treatment of dogs with diffuse large B-cell lymphoma. *Vet J* 200(2), 318-324
- ARESU L. (2016) Canine Lymphoma, More Than a Morphological Diagnosis: What We Have Learned about Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Vet Sci* 3 :77.
- ARLET J. (2013) Rôle de la chaperonne HSP 70 dans l'érythropoïèse inefficace des béta-thalassémies majeures. Thèse Hématologie. Université Paris Sud - Paris XI.
- ASSENMACHER T.D., JUTKOWITZ L.A., KOENIGSHOF A.M., DE A LUCIDI C., SCOTT M.A. (2019) Clinical features of precursor-targeted immune-mediated anemia in dogs: 66 cases (2004-2013). *J Am Vet Med Assoc* 255(3), 366-376
- BALCH A., MACKIN A. (2007) Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compend Contin Educ Vet* 29(4), 217-225
- BARKER R.N., HALL A.M., STANDEN G.R., JONES J., ELSON C.J. (1997) Identification of T-cell epitopes on the Rhesus polypeptides in autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 90(7), 2701-2715
- BD BIOSCIENCES. (2019a) BD Accuri™ C6 Plus. In *BD Biosciences*. [<https://wwwbdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/accuri-c6-plus>] (consulté le 06/08/2019).
- BD BIOSCIENCES. (2019b) BD FACSCanto™ II. In *BD Biosciences*. [<http://wwwbdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/facs canto-ii>] (consulté le 09/08/2019).

- BD BIOSCIENCES. (2019c) BD LSRFortessa™ II. In *BD Biosciences*. [http://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/lrfortessa] (consulté le 13/08/2019).
- BD BIOSCIENCES (2021) FACSymphony™ A5 cell analyzer. In *BD Biosciences*. [https://www.bdbiosciences.com/content/bdb/na/us/en-us/products/instruments/flow-cytometers/research-cell-analyzers/bd-facsymphony-a5.html] (consulté le 19/08/2021).roche
- BILLER B.J., GUTH A., BURTON J.H., DOW S.W. (2010) Decreased Ratio of CD8+ T Cells to Regulatory T Cells Associated with Decreased Survival in Dogs with Osteosarcoma. *J Vet Intern Med* 24(5), 1118-1123
- BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3), 89-95
- BIOPOLE ENVA (2021) Tarifs et délai de rendu de résultats d'analyse. Email d'informations du 27/07/2021
- BIO-RAD ANTIBODIES (2021) Anti Dog CD4:FITC/CD8:RPE, clone YKIX302.9 / YCATE55.9. In *Bio-Rad*. [https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/dog-canine-cd4-cd8-dual-color-reagent-ykix302-9-ycate55-9-dc048.html] (consulté le 25/08/2021).
- BRECHER G., SCHNEIDERMAN M., WILLIAMS G.Z. (1956) Evaluation of Electronic Red Blood Cell Counter. *Am J Clin Pathol* 26(12), 1439-1449
- BROUSSE N., GAULARD P., PECHMAUR M. (1997) Méthodes histologiques et immunohistochimiques d'étude des lymphomes. In *Lymphomes: lymphomes non hodgkiniens, maladie de Hodgkin*, Eds Solal-Céligny P. Paris, Frison-Roche, pp 90-111
- BURGESS K., MOORE A., RAND W., COTTER S.M. (2000) Treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs with cyclophosphamide. *J Vet Intern Med* 14(4), 456-462
- BURROWS P.D., COOPER M.D. (1997) B cell development and differentiation. *Curr Opin Immunol* 9(2), 239-244
- BYRNE K.M., KIM H.W., CHEW B.P., REINHART G.A., HAYEK M.G. (2000) A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 73(2), 167-182
- CAMPO E., SWERDLOW S.H., HARRIS N.L., *et al.* (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117(19), 5019-5032
- CANCRO M., HABERMAN A., KEARNEY J., *et al.* (2017) the humoral immune response. In *Janeway Immunobiology*, Eds Murphy K., Weaver C., 9th ed. New York, Garland Science, pp 399-444
- CARBONE F., CROTTY S., HEATH B., *et al.* (2017) T-cells Mediated Immunity. In *Janeway Immunobiology*, Eds Murphy K., Weaver C., 9th ed. New York, Garland Science, pp 345-398

- CARR A.P., PANCIERA D.L., KIDD L. (2002) Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *J Vet Intern Med* 16(5), 504-509
- CELL SIGNALING TECHNOLOGY (2021) Overview of Flow Cytometry. *In Cell Signaling Technology*. [<https://www.cellsignal.com/applications/flow-cytometry/flow-cytometry-overview>] (consulté le 22/01/2021).
- CHABANNE L. (2006) Immunologie clinique du chien et du chat. Issy-Les-Moulineaux, Elsevier-Masson.
- CHABANNE L., FOURNEL-FLEURY (1994) Les examens en immuno-hématologie: Exploration biologique des affections sanguines à médiation immune. *Point Vét*, 26, 503-510
- CHALFON C., MARTINI V., COMAZZI S., *et al.* (2019) Minimal residual disease in lymph nodes after achievement of complete remission predicts time to relapse in dogs with large B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol* 17(2), 139-146
- CHATENOUD L. (2012) Cellules de l'immunité. *In Immunologie, de la biologie à la clinique*, Eds Bach J.F., Chatenoud L., 6^e ed. Paris, Lavoisier MSP, pp 61-108.
- CHAUDHARY R., DAS D., GUPTA R., KHETAN D. (2006) Application of flow cytometry in detection of red-cell-bound IgG in Coombs-negative AIHA. *Hematology* 11(4) 295-300
- CHRISTIAN J. (2000) Red Blood Cell Survival and Destruction. *In Schalm's veterinary hematology*. B. F. Feldman, J. G. Zinkl, N. C. Jain, 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp 117-124
- COBBOLD S., METCALFE S. (1994) Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 43(3), 137-154
- COMAZZI S., GELAIN M.E., MARTINI V., *et al.* (2011) Immunophenotype Predicts Survival Time in Dogs with Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Vet Intern Med*, 25(1), 100-106.
- COMAZZI S., GELAIN M.E. (2011) Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet J* 188(2), 149-155
- COMAZZI S., RIONDATO F. (2021) Flow Cytometry in the Diagnosis of Canine T-Cell Lymphoma. *Front Vet Sci* 8, 600963
- COTTER S.M. (1983) Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone. II. Treatment of cats. *J Am Anim Hosp Assoc*, 19(2), pp 166-172.
- COULTER W. (1949) Means for counting particles suspended in a fluid. n° 2656508. Chicago. United States Patent Office.
- COUTO C.G. (1985) Clinicopathologic aspects of acute leukemias in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 186(7), 681-685

- COUTO C.G. (2014) Complications of cancer chemotherapy. *In Small Animal Internal Medicine* - Eds Nelson R.W., Couto C.G. Saint-Louis, Elsevier Health Sciences, pp 1108-1121
- COUTO C.G., SOUSA C. (1986) Chronic lymphocytic leukemia with cutaneous involvement in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 22(3), 374-379
- COWELL R.L., TYLER R.D. (2006) .Guide pratique de cytologie et hématologie du chien et du chat. Paris, Med'Com
- COZZI M., MARCONATO L., MARTINI V., *et al.* (2018) Canine nodal marginal zone lymphoma: Descriptive insight into the biological behaviour. *Vet Comp Oncol*, 16(2), 246-252
- CRAIG F.E., FOON K.A. (2017) Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111(8), 3941-3967
- CRISTO T.G., BIEZUS G., NORONHA L.F., *et al.* (2019) Feline Leukaemia Virus Associated with Leukaemia in Cats in Santa Catarina, Brazil. *J Comp Pathol* 170, 10-21
- CROSLAND-TAYLOR P.J. (1953) A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube. *Nature* 171(4340), 37-38
- CROSSLEY R.A., MATZ A., DEW T., *et al.* (2019) Safety Evaluation of Autologous Tissue Vaccine Cancer Immunotherapy in a Canine Model. *Anticancer Res* 39(4), 1699-1703
- DANILENKO D.M., MOORE P.F., ROSSITTO P.V. (1992) Canine leukocyte cell adhesion molecules (LeuCAMs): Characterization of the CD11/CD18 family. *Tissue Antigens* 40(1), 13-21
- DAVEY H.M. (2000) When? Important Developments in Flow Cytometry. *In Cytometry volume 10*. [<http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto10a/cytometryhistory/generalhistories/davey.html>] (consulté le 08/01/2021).
- DAY M.J. (1996) Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia. *J Small Anim Pract* 37(11), 523-534
- DAY M.J. (1997) Review of thymic pathology in 30 cats and 36 dogs. *J Small Anim Pract* 38(9), 393-403
- DAY M.J. (1999) Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Vet Immunol Immunopathol* 69(2-4), 215-224
- DAY M.J. (2011) *Clinical Immunology of the Dog and Cat*, 2nd ed. London, CRC Press
- DE CUYPER I.M., MEINDERS M., VAN DE VIJVER E., *et al.* (2013) A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood* 121(10), e70-e80
- DEAN G.A., QUACKENBUSH S.L., ACKLEY C.D., COOPER M.D., HOOVER E.A. (1991) Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 28(3-4), 327-335
- DELEGLISE N. (2010) Les lymphomes malins canins : données épidémiologiques à partir d'une étude rétrospective de 427 cas entre 2007 et 2008. Thèse Méd. Vét., ENVT.

- DERAVI N., BERKE O., WOODS J.P., BIENZLE D. (2017) Specific immunotypes of canine T cell lymphoma are associated with different outcomes. *Vet Immunol Immunopathol* 191, 5-13
- DHALIWAL R.S., KITCHELL B., MESSICK J.B. (2003) Canine lymphosarcoma: Clinical features. *Comp Cont Educ Pract*, 25, 572-582
- DIRCKS B.H., SCHUBERTH H.-J., MISCHKE R. (2009) Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004-2006). *J Am Vet Med Assoc* 235(8), 960-966
- DOBSON J., BLACKWOOD L.B., MCINNES E.F., *et al.* (2001) Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J Small Anim Pract* 42(8), 377-384
- DOBSON J., VILLIERS E., MORRIS J. (2006) Diagnosis and management of leukaemia in dogs and cats. *In Practice* 8, 22-31
- DOBSON J., HOHENHAUS A., PEASTON A. (2008) Cancer chemotherapy. *In Small Animal Clinical Pharmacology*, Eds Maddison J., Page S., Church D. New York, Elsevier Saunders
- DUPERRAY C. (2020) La cytométrie en flux. *In Cytobase- Service de cytométrie en flux de l'Institut de Recherche en Biothérapie*. [<http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html>] (consulté le 12/07/2021)
- DUTSCHER D. (2021) Cytomètre en flux BD Accuri C6 PLUS. *In Dutscher- Matériel de laboratoire*. [<https://www.dutscher.com/frontoffice/product?produitId=0ZINDUSH-11-01>] (consulté le 28/05/2021).
- EIBEL H., KRAUS H., SIC H., KIENZLER A.-K., RIZZI M. (2014) B cell Biology: An Overview. *Curr Allergy Asthma Rep* 14(5), 434
- ETO K., KUNISHIMA S. (2016) Linkage between the mechanisms of thrombocytopenia and thrombopoiesis. *Blood* 127(10), 1234-1241
- FANFANO S. (2018) Identification des cellules immunitaires. *In Acces - ENS Lyon*. [<http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunitaire-et-vaccination/thematiques/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/identification-des-cellules-immunitaires-la-notion-de-cd-cluster-of-differentiation-2>] (consulté le 14/01/2021).
- FEDERLIN K. (1965) Die Immunfluoreszenz. *Dtsch med Wochenschr* 90(15), 667-670
- FELDMAN B.F., THOMASON K.J., JAIN N.C. (1988) Quantitative platelet disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 18(1), 35-49
- FELDMAN B.V., ZINKL J.G., JAIN N.C., SCHALM O.W. (2000) Hematologic/Hemopoietic Neoplasia, Nonlymphoid Neoplasia. *In Schalm's Veterinary Hematology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins pp 671-763
- FEUILLARD J., RAPHAËL M. (2000) Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie* 6(5), 345-359

- FINA C. (2009) Le myélome multiple chez les carnivores domestiques : étude bibliographique. Thèse Méd. Vét., ENVL.
- FINE D., TVEDTEN H. (1999) Chronic granulocytic leukemia in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 214(12), 1809-12, 1791
- FINLAY D. (1985) Eosinophilic leukaemia in the cat: a case report. *Vet Rec* 116(21), 567
- FISCH P., HANDGRETINGER R., SCHAEFER H.E. (2000) Pure red cell aplasia. *Br J Haematol* 111(4), 1010-1022
- FOURNEL-FLEURY, GUELFY J.F., MAGNOL J.P. (1992) Leucémie et myélodysplasie dans l'espèce canine. In *Encyclopédie Vétérinaire, Cancérologie*, Paris, Elsevier.
- FOURNEL-FLEURY C., GUELFY J.F., MAGNOL J.P. (1994) Atlas en couleur de cytologie du cancer chez le chien et le chat. Paris, Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux.
- FOURNEL-FLEURY C., MAGNOL J.P., BRICAIRE P., *et al.* (1997) Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: Comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol* 117(1), 35-59
- FOURNEL-FLEURY C., PONCE F., FELMAN P., *et al.* (2002) Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet Pathol* 39(1), 92-109
- FOURNEL-FLEURY (2006) Cours d'hématologie clinique. Polycopié. ENVL.Cancérologie
- FUJIYAMA S., NAKAHASHI-ODA C., ABE F., *et al.* (2019) Identification and isolation of splenic tissue-resident macrophage sub-populations by flow cytometry. *Int Immunol* 31(1), 51-56
- GABRILOVICH D.I. (2017) Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 5(1), 3-8
- GABRILOVICH D.I., NAGARAJ S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9(3), 162-174
- GALY A., TRAVIS M., CEN D., CHEN B. (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3(4), 459-473
- GARDEN O.A., KIDD L., MEXAS A.M., *et al.* (2019) ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 33(2), 313-334
- GARON C.L., SCOTT M.A., SELTING K.A., COHN L.A. (1999) Idiopathic thrombocytopenic purpura in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 35(6), 464-470
- GAUTHIER M., COMONT T., VERGEZ F., YSEBAERT L. (2018) Maladie résiduelle minime dans la leucémie lymphoïde chronique : un enjeu restant d'actualité. *Bull Cancer* 105(11), 1042-1051
- GAVAZZA A., LUBAS G., FRIDMAN A., *et al.* (2013) Safety and efficacy of a genetic vaccine targeting telomerase plus chemotherapy for the therapy of canine B-cell lymphoma. *Hum Gene Ther* 24(8), 728-738

- GELAIN M.E., MAZZILLI M., RIONDATO F., MARCONATO L., COMAZZI S. (2008) Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol* 121(3-4), 179-188
- GIBSON D., AUBERT I., WOODS J.P., *et al.* (2004) Flow Cytometric Immunophenotype of Canine Lymph Node Aspirates. *J Vet Intern Med* 18(5), 710-717
- GISSELBRECHT C. (2009) Les lymphomes malins non hodgkiniens, Montrouge, J. Libbey Eurotext
- GODART P.-O. (2010) Les leucémies du chat et du chien: classification, diagnostic et traitement. Thèse Méd. Vét., ENVA.
- GODEAU B., MICHEL M., KELLAF M. (2009) L'anémie hémolytique auto-immune. *In Encyclopédie Orphanet Grand Public*.
[<https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/AnemieHemolytiqueAutoImmune-FRfrPub13392.pdf>] (consulté le 21/10/2020).
- GORMAN N.T., EVANS R. (1987) Myeloproliferative disease in the dog and cat: clinical presentations, diagnosis and treatment. *Vet Rec* 121(21), 490-496
- GOULART M.R., PLUHAR G.E., OHLFEST J.R. (2012) Identification of Myeloid Derived Suppressor Cells in Dogs with Naturally Occurring Cancer. *PLoS One* 7(3), e33274
- GOULART M.R., HLAVATY S.I., CHANG Y.-M., *et al.* (2019) Phenotypic and transcriptomic characterization of canine myeloid-derived suppressor cells. *Sci Rep* 9, 3574
- GRANAT F., CHABANNE L., TRUMEL C., DIQUELOU A. (2011) Troubles de l'hémostase primaire. *EMC - Vétérinaire* 10(1), 1–20.
- GREENLEE P.G., FILIPPA D.A., QUIMBY F.W., *et al.* (1990) Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 66(3), 480-490
- GRINDEM C.B., BREITSCHWERDT E.B., CORBETT W.T., JANS H.E. (1991) Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. *Vet Clin Pathol* 20(2), 38-43
- GRINDEM C.B., STEVENS J.B., BROST D.R., JOHNSON D.D. (1992) Chronic myelogenous leukaemia with meningeal infiltration in a dog. *Comp Haematol Int* 2(3), 170-174
- GRINDEM C.B., NEEL J.A., JUOPPERI T.A. (2002) Cytology of bone marrow. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 32(6), 1313-1374
- GRINDEM C.B., BUOEN L.C. (1986) Cytogenetic analysis of leukaemic cells in the dog. A report of 10 cases and a review of the literature. *J Comp Pathol* 96(6), 623-635
- GUELFY J.F., TRUMEL C., MÉDAILLE C. (1993) L'hémogramme. *Point Vét* 26,495-499
- GUIJA DE ARESPOCHAGA A., SCHWENDENWEIN I., WEISSENBOCK H. (2007) Retrospective Study of 82 Cases of Canine Lymphoma in Austria based on the Working Formulation and Immunophenotyping. *J Comp Pathol* 136(2-3), 186-192

- HARAN K.P., LOCKHART A., XIONG A., *et al.* (2020) Generation and Validation of an Antibody to Canine CD19 for Diagnostic and Future Therapeutic Purposes. *Vet Pathol* 57(2), 241-252
- HARRIS N.L., JAFFE E.S., STEIN H., *et al.* (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84(5), 1361-1392
- HARVEY J.W., TERRELL T.G., HYDE D.M., JACKSON R.I. (1981) Well-differentiated lymphocytic leukemia in a dog: long-term survival without therapy. *Vet Pathol* 18(1), 37-47
- HARVEY J. W. (2015a) Disorders of bone marrow. *In Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. St Louis, W B Saunders Co Ltd, pp 260-327
- HARVEY J. W. (2015) Evaluation of erythrocytes. *In Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*, St. Louis, Mo, W B Saunders Co Ltd, pp 49-121
- HARVEY J. W. (2015b) Immunohematology. *In Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. St Louis, W B Saunders Co Ltd, pp 177- 190
- HARVEY J. W. (2015c) Evaluation of Hemostasis: Coagulation and Platelet Disorders. *In Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. St Louis, W B Saunders Co Ltd, pp 191-233
- HEDLEY B.D., LLEWELLYN-SMITH N., LANG S., *et al.* (2015) Combined accurate platelet enumeration and reticulated platelet determination by flow cytometry. *Cytom Part B- Clin Cy* 88(5), 330-337
- HENRICH M., BAUKNECHT A., HECHT W., REINACHER M. (2019) Lack of Bcl-2 expression in feline follicular lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 31(6), 809-817
- HERZENBERG L.A., SWEET R.G., HERZENBERG Leonore A. (1976) Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Sci Am* 234(3), 108-117
- HERZENBERG L. A., PARKS D., SAHAF B., *et al.* (2002) The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clin Chem* 48(10), 1819-1827
- HOLT E., GOLDSCHMIDT M.H., SKORUPSKI K. (2006) Extranodal conjunctival Hodgkin's-like lymphoma in a cat. *Vet Ophthalmol* 9(3), 141-144
- HONECKMAN A., KNAPP D., REAGAN W.J. (1996) Diagnosis of Canine Immune-mediated hematologic Disease. *Compend Contin Educ Vet* 29(4), 113-125
- HUIBREGTSE B., TURNER J. (1994) Hypereosinophilic syndrome and eosinophilic leukemia: a comparison of 22 hypereosinophilic cats. *Am. Anim. Hosp. Assoc* 30(6), 591-599
- HUSBANDS B.D., SMITH S.A., WEISS D.J. (2002) Idiopathic immune-mediated haemolytic anemia (IMHA) in 25 cats. *In 20th annual ACVIM Forum, May 29-June, 2002, Adam's Mark Hotel, Dallas : proceeding*, Lakewood, Colo., American College of Veterinary Internal Medicine

- IMASHIRO C., HIRANO M., MORIKURA T., *et al.* (2020) Detachment of cell sheets from clinically ubiquitous cell culture vessels by ultrasonic vibration. *Sci Rep* 10(1), 9468
- IMPELLIZERI J.A., GAVAZZA A., GREISSWORTH E., *et al.* (2018) Tel-eVax: a genetic vaccine targeting telomerase for treatment of canine lymphoma. *J Transl Med* 16(1), 349
- INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE PEDAGOGIQUE (2002) Thérapie génique somatique. Cellules NK. In *Acces.ens-lyon.fr* [<http://acces.ens-lyon.fr/biotic/biomol/enjeux/TGS/html/nk.htm>] (consulté le 09/02/2021).
- JACKSON M.L., KRUTH S.A. (1985) Immune-mediated Hemolytic Anemia and Thrombocytopenia in the Dog: A retrospective study of 55 cases diagnosed from 1979 through 1983 at the Western College of Veterinary Medicine. *Can Vet J* 26(8), 245-250
- JAILLARDON L., FOURNEL-FLEURY C. (2011) Waldenström's macroglobulinemia in a dog with a bleeding diathesis. *Vet Clin Pathol* 40(3), 351-355
- JAIN N.C., BLUE J.T., GRINDEM C.B., *et al.* (1991) Proposed Criteria for Classification of Acute Myeloid Leukemia in Dogs and Cats. *Vet Clin Pathol* 20(3), 63-82
- JAIN N.C. (2000) Erythropoiesis and Erythrokinetics. In *Schalm's veterinary hematology*, 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp 100-104
- JAIN N.C., KONO C.S. (1980) The Platelet Factor- 3 Test for Detection of Canine Antiplatelet Antibody. *Vet Clin Pathol* 9(1), 10-14
- JAIN N.C., SWITZER J.W. (1981) Autoimmune thrombocytopenia in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 11(2), 421-434
- JANS H.E., ARMSTRONG P.J., PRICE G.S. (1990) Therapy of immune mediated thrombocytopenia. A retrospective study of 15 dogs. *J Vet Intern Med* 4(1), 4-7
- JORDAN H.L., GRINDEM C.B., BREITSCHWERDT E.B. (1993) Thrombocytopenia in cats: a retrospective study of 41 cases. *J Vet Intern Med* 7(5), 261-265
- JOSHI B., RAPPLEE R., POWELL A., HANCOCK F. (1979) Autoimmune thrombocytopenia in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 15(5), 585-588
- KAMENSKY L., MELAMED M., DERMAN H. (1965) Spectrophotometer : new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 150, 630-631
- KELLER E.T., MACEWEN E.G., ROSENTHAL R.C., HELFAND S.C., FOX L.E. (1993) Evaluation of Prognostic Factors and Sequential Combination Chemotherapy With Doxorubicin for Canine Lymphoma. *J Vet Intern Med* 7(5), 289-295
- KHEIRI S.A., MACKERRELL T., BONAGURA V.R., FUCHS A., BILLET H.H. (1998) Flow cytometry with or without cytochemistry for the diagnosis of acute leukemias? *Cytometry* 34(2), 82-86

- KHUNGER J.M., PATI H.P., MAHAPATRA M., KHUNGER A. (2019) Utilisation of Flow-cytometry in the Diagnosis of Auto Immune Haemolytic Anaemia. *Indian J Hematol Blood Transfus* 35(2), 297-303
- KLAG A.R., GIGER U., SHOFRER F.S. (1993) Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986-1990). *J Am Vet Med Assoc* 202(5), 783-788
- KÖHLER G., MILSTEIN C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517), 495-497
- KOHN B., WEINGART C., ECKMANN V., OTTENJANN M., LEIBOLD W. (2006a) Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: diagnosis, therapy, and outcome (1998-2004). *J Vet Intern Med* 20(1), 159-166
- KOHN B., LINDEN T., LEIBOLD W. (2006b) Platelet-bound antibodies detected by a flow cytometric assay in cats with thrombocytopenia. *J Feline Med Surg* 8(4), 254-260
- KRISTENSEN A.T., KLAUSNER J.S., WEISS D.J., SCHULTZ R.D., BELL F.W. (1991) Spurious Hyperphosphatemia in a Dog With Chronic Lymphocytic Leukemia and an IgM Monoclonal Gammopathy. *Vet Clin Pathol* 20(2), 45-50
- KRISTENSEN, WEISS D.J., KLAUSNER J.S. (1994a) Platelet Dysfunction Associated With Immune-Mediated Thrombocytopenia in Dogs. *J Vet Intern Med* 8(5), 323-327
- KRISTENSEN, WEISS D.J., KLAUSNER J.S., LABER J., CHRISTIE D.J. (1994b) Comparison of microscopic and flow cytometric detection of platelet antibody in dogs suspected of having immune-mediated thrombocytopenia. *Am J Vet Res* 55(8), 1111-1114
- KRISTENSEN, WEISS D.J., KLAUSNER J.S., LABER J., CHRISTIE D.J. (1994c) Detection of Antiplatelet Antibody With a Platelet Immunofluorescence Assay. *J Vet Intern Med* 8(1), 36-39
- LABORATOIRE ORBIO (2020) Test de Coombs. In *Orbio*. [<https://www.orbio.fr/canides-felides/analyses/hematologie/123-test-de-coombs.html>] (consulté le 18/11/2020).
- LANIER L.L., WARNER N.L. (1981) Paraformaldehyde fixation of hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *J Immunol Methods* 47(1), 25-30
- LEIFER C.E., MATUS R.E. (1985) Lymphoid leukemia in the dog : acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Vet Clin N Am Small* 15(4), 723-739
- LEIFER C.E., MATUS R.E. (1986) Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-1984). *J Am Vet Med Assoc* 189(2), 214-217
- LETELLIER E. (2018) Les biomarqueurs dans la maladie du cancer, notamment dans le cancer colorectal. *Info cancer* n°93, 4
- LEVINE D.N., BROOKS M.B. (2019) Immune thrombocytopenia (ITP): Pathophysiology update and diagnostic dilemmas. *Vet Clin Pathol* 48(S1), 17-28

- LEWIS D.C., MEYERS K.M., CALLAN M.B., BÜCHELER J., GIGER U. (1995a) Detection of platelet-bound and serum platelet-bindable antibodies for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 206(1), 47-52
- LEWIS D.C., MCVEY D.S., SHUMAN W.S., MULLER W.B. (1995b) Development and characterization of a flow cytometric assay for detection of platelet-bound immunoglobulin G in dogs. *Am J Vet Res* 56(12), 1555-1558
- LEWIS D. (2000) Immune-mediated thrombocytopenia. In *Schalm's Veterinary Haematology*, Eds Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C., 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp 807-814
- LEWIS D.C., MEYERS K.M. (1996) Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Vet Intern Med* 10(4), 207-218
- L'ITALIEN R., LEBLANC B. (2008) L'hémolyse intravasculaire. In *le monde en image - des collections pour l'éducation* [<https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55955&demande=desc>] (consulté le 13/01/2021)
- MACKIN A. (1995) Canine immune-mediated thrombocytopenia. *Contin Educ Pract Vet* 17(3), 353-362
- MACKIN A., WARD H. (2005) Immune mediated thrombocytopenia: pathophysiology and diagnosis. *Ir Vet J* 11(58), 637-639
- MACLENNAN I.C.M., LIU Y.-J., JOHNSON G.D. (1992) Maturation and Dispersal of B-Cell Clones during T Cell-Dependent Antibody Responses. *Immunol Rev* 126(1), 143-161
- MAEDA H., OZAKI K., HONAGA S., NARAMA I. (1993) Hodgkin's-like Lymphoma in a Dog. *J Vet Med A* 40(1-10), 200-204
- MAGNOL J.P., MARCHAL T., DELISLE F., DEVAUCHELLE P. et FOURNEL C. (1998) *Cancérologie clinique du chien*. Saint-Pierre-La-Palud : Marchal T.
- MANEV I., MARINCHEVA (2018) Canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Tradit and Mod in Vet Med*, 3(1), 59-64
- MARCONATO L., ARESU L., STEFANELLO D., *et al.* (2019) Opportunities and challenges of active immunotherapy in dogs with B-cell lymphoma: a 5-year experience in two veterinary oncology centers. *J Immunother Cancer* 7(1), 146
- MARKS S.L. (2000) The buccal mucosal bleeding time. *J Am Anim Hosp Assoc* 36(4), 289-290
- MATUS R.E., LEIFER C.E., MACEWEN E.G. (1983) Acute lymphoblastic leukemia in the dog: a review of 30 cases. *J Am Vet Med Assoc* 183(8), 859-862
- MAY W. (2001) Biopsies et cytoponctions échoguidées. Etude spécifique par organe. *Point Vét* 32(218), 68-70

- MCCULLOUGH S. (2003) Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33(6), 1295-1315
- MCGURRIN M.K.J., ARROYO L.G., BIENZLE D. (2004) Flow cytometric detection of platelet-bound antibody in three horses with immune-mediated thrombocytopenia. *J Am Vet Med Assoc* 224(1), 83-87
- MCMANUS P.M., CRAIG L.E. (2001) Correlation between leukocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994-1999). *J Am Vet Med Assoc* 218(8), 1308-1313
- MÉDAILLE C, BRIEND-MARCHAL A. (2008) Guide pratique des analyses biologiques vétérinaires, Paris, Med'com
- MESSICK J.B. (2006) Blood and Bone Marrow. In *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*, Eds Eurell J.A.C., Frappier B.L., Dellmann H.-D. Ames, Iowa., Blackwell Publishing, pp 61-78
- MIZUNO T., KATO Y., KANEKO M.K., *et al.* (2020) Generation of a canine anti-canine CD20 antibody for canine lymphoma treatment. *Sci Rep* 10(1), 11476
- MIZUTANI N., GOTO-KOSHINO Y., TSUBOI M., *et al.* (2016) Evaluation of CD25-positive cells in relation to the subtypes and prognoses in various lymphoid tumours in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 173, 39-43
- MOLDOVAN A. (1934) Photoelectric Technique For The Counting of Microscopical Cells. *Science* 80(2069), 188-189
- MOLYNEUX E.M., ROCHFORD R., GRIFFIN B., *et al.* (2012) Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379(9822), 1234-1244
- MOORE P.F., RODRIGUEZ-BERTOS A., KASS P.H. (2012) Feline Gastrointestinal Lymphoma: Mucosal Architecture, Immunophenotype, and Molecular Clonality. *Vet Pathol* 49(4), 658-668
- MOORE A. (2013) Extranodal Lymphoma in the Cat: Prognostic factors and treatment options. *J Feline Med Surg* 15(5), 379-390
- MORRIS J.S., DUNN J.K., DOBSON J.M. (1993) Canine lymphoid leukaemia and lymphoma with bone marrow involvement: A review of 24 cases. *J Small Anim Pract* 34(2), 72-79
- MORRIS J., DOBSON J.M. (2001) Hematopoietic system: leukaemi. In *Small Animal Oncology*, Malden, MA, Wiley-Blackwell, pp 239-246
- MUCHA J., MAJCHRZAK K., TACIAK B., HELLMÉN E., KRÓL M. (2014) MDSCs mediate angiogenesis and predispose canine mammary tumor cells for metastasis via IL-28/IL-28RA (IFN- λ) signaling. *PLoS One* 9(7), e103249
- MULLER A., MULLER C., GUAGUERE E., DEGORCE-RUBIALES F. (2014) Lymphome cutané canin : signes cliniques et diagnostic. *Prat Vét* n°49, 136-141

- MYLONAKIS M., PETANIDES T., VALLI V., *et al.* (2008) Acute myelomonocytic leukaemia with short-term spontaneous remission in a cat. *Austr Vet J* 86(6), 224-228
- NADAL C. (2018) Les cellules myéloïdes suppressives: outil diagnostique des cancers canins. Thèse Méd. Vét., ENVA.
- NAGARAJ S., GABRILOVICH D.I. (2008) Tumor Escape Mechanism Governed by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* 68(8), 2561-2563
- NAGASAWA A., MATSUNO K., TAMURA S., *et al.* (2013) The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *Int J Lab Hematol* 35(5), 534-541
- NELSON R.W., COUTO C.G. (2014) Leukemia. In *Small Animal Internal Medicine*, Philadelphia, Elsevier, 1175-1185
- NICOLETTI A., LASCHET J., LE ROUX D., GUEDJ K., PRIOTON Y. (2013) La cytométrie en flux : de l'échantillon cellulaire à l'analyse de résultats. Polycopié. Université Paris-Diderot, Paris 7
- O'CONNOR C.M., SHEPPARD S., HARTLINE C.A., *et al.* (2012) Adoptive T-cell therapy improves treatment of canine non-Hodgkin lymphoma post chemotherapy. *Sci Rep* 2, 249
- OKAMURA T., KURASHIGE A., HANAHACHI A., *et al.* (2003) Thiazole orange-positive platelets in cats with thrombocytopenia induced by cyclophosphamide. *Vet Rec* 152(16), 506-507
- O'MARRA S.K., DELAFORCADE A.M., SHAW S.P. (2011) Treatment and predictors of outcome in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *J Am Vet Med Assoc* 238(3), 346-352
- OUTTERS G. (2014) Exploration de l'hémostase chez le chien et le chat. *Point Vét* n°348, 26-28
- PAES G., PAEPE D., VELDEMAN J., CAMPOS M., DAMINET S. (2010) Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) in cats - part 1: a review. *Vlaams Diergen Tijds* 79(6), 415-423
- PANJWANI M.K., SMITH J.B., SCHUTSKY K., *et al.* (2016) Feasibility and Safety of RNA-transfected CD20-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells in Dogs with Spontaneous B Cell Lymphoma. *Mol Ther* 24(9), 1602-1614
- PARKER K.H., BEURY D.W., OSTRAND-ROSENBERG S. (2015) Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res* 128, 95-139
- PARKS D.R., HARDY R.R., HERZENBERG L.A. (1984) Three-color immunofluorescence analysis of mouse B-lymphocyte subpopulations. *Cytometry* 5(2), 159-168
- PAWLAK A., RAPAK A., ZBYRYT I., OBMIŃSKA-MRUKOWICZ B. (2014) The effect of common antineoplastic agents on induction of apoptosis in canine lymphoma and leukemia cell lines. *In Vivo* 28(5), 843-850

- PAWLAK A., RPAK A., DRYNDA A., *et al.* (2016) Immunophenotypic characterization of canine malignant lymphoma: a retrospective study of cases diagnosed in Poland Lower Silesia, over the period 2011-2013. *Vet Comp Oncol* 14 Suppl 1, 52-60
- PELLERIN J., PERSON J. (1996) Les thrombopénies à médiation immune du chien. *Point Vét* 28(179), 709-719
- PERUZZI D., GAVAZZA A., MESITI G., *et al.* (2010) A vaccine targeting telomerase enhances survival of dogs affected by B-cell lymphoma. *Mol Ther* 18(8), 1559-1567
- PETERSON J.L., COUTO C.G., WELLMAN M.L. (1995) Hemostatic disorders in cats: a retrospective study and review of the literature. *J Vet Intern Med* 9(5), 298-303
- PETZ L., GARATTY G. (2003) Immune Hemolytic Anemias, 2nd ed. New York, Churchill Livingstone
- PIEK C.J. (2011) Canine idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia: a review with recommendations for future research. *Vet Q* 31(3), 129-141
- PINHEIRO D., CHANG Y.-M., BRYANT H., *et al.* (2014) Dissecting the regulatory microenvironment of a large animal model of non-Hodgkin lymphoma: evidence of a negative prognostic impact of FOXP3+ T cells in canine B cell lymphoma. *PLoS One* 9(8), e105027
- PÔLE INTERMINISTERIEL DE PROSPECTIVE ET D'ANTICIPATION DES MUTATIONS ECONOMIQUES (2009) Réflexion prospective autour des biomarqueurs, rapport. Paris, Direction générale de la compétitivité, de l'industrie et des services
- PLONQUET A. (2004) Différenciation lymphoïde T méthodes d'exploration des lymphocytes T et applications aux lymphoproliférations T/NK. *Rev Francoph Lab* 2004(360), 23-34
- PLONQUET A. (2013) Différenciation lymphocytaire B normale. *Rev Francoph Lab* 2013(452), 27-35
- POGGI A., MINISCALCO B., MORELLO E., *et al.* (2015) Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Vet Comp Oncol* 13(4), 475-480
- POGGI A., MINISCALCO B., MORELLO E., *et al.* (2017) Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol* 15(2), 431-440
- POITOUT F., AIRD B., PERMAN V. (1995) Hématologie des anémies hémolytiques à médiation immunitaire. Conséquences diagnostiques. *Point Vét* 26(164), 775-781.
- PONCE F., MAGNOL J.-P., LEDIEU D., *et al.* (2004) Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet J* 167(2), 158-166
- PONCE F., MARCHAL T., MAGNOL J.P., *et al.* (2010) A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet Pathol* 47(3), 414-433

- PRESLEY R.H., MACKIN A., VERNAU W. (2006) Lymphoid leukemia in dogs. *Comp Cont Educ Pract* 28(12), 831-849
- QUIGLEY K.A., CHELACK B.J., HAINES D.M., JACKSON M.L. (2001) Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. *J Vet Diagn Invest* 13(4), 297-300
- RAMERY E., LAYSSOL C. (2016) Cytologie : les clés pour un prélèvement réussi. *Sem Vét* n°1694, 32-33
- REIMER M.E., TROY G.C., WARNICK L.D. (1999) Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 35(5), 384-391
- REIS A.B., CARNEIRO C.M., CARVALHO M. das G., *et al.* (2005) Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet Immunol Immunopat* 103(3-4), 173-185
- RETTIG M.P., LOW P.S., GIMM J.A., *et al.* (1999) Evaluation of biochemical changes during *in vivo* erythrocyte senescence in the dog. *Blood* 93(1), 376-384
- RIDYARD A.E., SHAW D.J., MILNE E.M. (2010) Evaluation of platelet activation in canine immune-mediated haemolytic anaemia. *J Small Anim Pract* 51(6), 296-304
- RILEY R.S., BEN-EZRA J.M., GOEL R., TIDWELL A. (2001) Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *J Clin Lab Anal* 15(5), 267-294
- RIONDATO F., COMAZZI S. (2021) Flow Cytometry in the Diagnosis of Canine B-Cell Lymphoma. *Front Vet Sci* 8: 600986
- ROBINSON J.P. (2005) Comparative Overview of Flow and Image Cytometry. *Curr Protoc Cytom* 31(1), 12.1.1,
- RODRÍGUEZ P.C., OCHOA A.C. (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222, 180-191
- RONOT X., GRUNWALD D., MAYOL J.-F., BOUTONNAT J. (2006) La cytométrie en flux, Paris, Lavoisier.
- ROOK K.A. (2019) Canine and Feline Cutaneous Epitheliotropic Lymphoma and Cutaneous Lymphocytosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 49(1), 67-81
- ROUT E.D., LABADIE J.D., YOSHIMOTO J.A., *et al.* (2021) Clinical outcome and prognostic factors in dogs with B-cell chronic lymphocytic leukemia: A retrospective study. *J Vet Intern Med*, 35(4):1918-1928
- ROZANSKI E.A., CALLAN M.B., HUGHES D., SANDERS N., GIGER U. (2002) Comparison of platelet count recovery with use of vincristine and prednisone or prednisone alone for treatment for severe immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 220(4), 477-481

- RUSLANDER D.A., GEBHARD D.H., TOMPKINS M.B., GRINDEM C.B., PAGE R.L. (1997) Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo* 11(2), 169-172
- RUSSELL K.E., PERKINS P.C., GRINDEM C.B., WALKER K.M., SELTON D.C. (1997) Flow cytometric method for detecting thiazole orange-positive (reticulated) platelets in thrombocytopenic horses. *Am J Vet Res* 58(10), 1092-1096
- RÜTGEN B.C., KÖNIG R., HAMMER S.E., *et al.* (2015) Composition of lymphocyte subpopulations in normal canine lymph nodes. *Vet Clin Pathol* 44(1), 58-69
- SAKAI O., IGASE M., MIZUNO T. (2020) Optimization of canine CD20 chimeric antigen receptor T cell manufacturing and in vitro cytotoxic activity against B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol* 18(4), 739-752
- SANTAGOSTINO S.F., MORTELLARO C.M., BORACCHI P., *et al.* (2015) Feline upper respiratory tract lymphoma: site, cyto-histology, phenotype, FeLV expression, and prognosis. *Vet Pathol* 52(2), 250-259
- SATO M., KANEMOTO H., KAGAWA Y., *et al.* (2012) Evaluation of the prognostic significance of BCL6 gene expression in canine high-grade B-cell lymphoma. *Vet J* 191(1), 108-114
- SATO H., FUJINO Y., CHINO J., *et al.* (2014) Prognostic analyses on anatomical and morphological classification of feline lymphoma. *J Vet Med Sci* 76(6), 807-811
- SATO M., YAMAZAKI J., GOTO-KOSHINO Y., *et al.* (2016) Minimal residual disease in canine lymphoma: An objective marker to assess tumour cell burden in remission. *Vet J* 215, 38-42
- SAVARY BATAILLE K. (2003) Conduite diagnostique face à une thrombopénie. *Point Vét* 34(240), 40-43
- SCOTT D., SCHULTZ R., POST J., BOLTON G., BALDWIN C. (1973) Autoimmune Hemolytic Anemia in the Cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 9, 530-539
- SCOTT-MONCRIEFF J.C., REAGAN W.J., GLICKMAN L.T., DENICOLA D.B., HARRINGTON D. (1995) Treatment of nonregenerative anemia with human gamma-globulin in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 206(12), 1895-1900
- SCOTT-MONCRIEFF J.C., REAGAN W.J., SNYDER P.W., GLICKMAN L.T. (1997) Intravenous administration of human immune globulin in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Am Vet Med Assoc* 210(11), 1623-1627
- SCOTT-MONCRIEFF J.C., TREADWELL N.G., MCCULLOUGH S.M., BROOKS M.B. (2001) Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *J Am Anim Hosp Assoc* 37(3), 220-227
- SEGEL G.B., LICHTMAN M.A. (2014) Direct antiglobulin (« Coombs ») test-negative autoimmune hemolytic anemia: a review. *Blood Cells Mol Dis* 52(4), 152-160

- SERAFINI P., BORRELLO I., BRONTE V. (2006) Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16(1), 53-65
- SHAPIRO H.M. (2004) The evolution of cytometers. *Cytometry A* 58(1), 13-20
- SHAPIRO H.M. (2005) Practical Flow Cytometry. 4th Ed. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons
- SHARIFI H., NASSIRI S., ESAMEILI H., KHOSHNEGAH J. (2008) Eosinophilic leukaemia in a cat. *J Feline Med Surg* 9, 514-7
- SHERGER M., KISSEBERTH W., LONDON C., OLIVO-MARSTON S., PAPENFUSS T.L. (2012) Identification of myeloid derived suppressor cells in the peripheral blood of tumor bearing dogs. *BMC Vet Res* 8, 209
- SHIZUO A., DINAUER M., LANIER L.L., *et al.* (2017) The Induced Responses of Innate Immunity. In *Janeway Immunobiology*, Eds Murphy K., Weaver C., 9th ed. New York, Garland Science, pp 77-139
- SHROPSHIRE S., DOW S., LAPPIN M. (2018) Validation of a clinically applicable flow cytometric assay for the detection of immunoglobulin associated platelets in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 202, 109-114
- SHROPSHIRE S., DOW S., LAPPIN M. (2020) Detection and dynamics of anti-platelet antibodies in thrombocytopenic dogs with and without idiopathic immune thrombocytopenia. *J Vet Intern Med* 34(2), 700-709
- SÖZMEN M., TASCA S., CARLI E., *et al.* (2005) Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest* 17(4), 323-330
- SRIGANESHAN V., BLOM T.R., WEISSMANN D.J. (2008) A unique case of mantle cell lymphoma with an aberrant CD5-/CD10+ immunophenotype and typical morphology. *Arch Pathol Lab Med* 132(8), 1346-1349
- STARRAK G.S., BERRY C.R., PAGE R.L., JOHNSON J.L., THRALL D.E. (1997) Correlation Between Thoracic Radiographic Changes and Remission/Survival Duration in 270 Dogs with Lymphosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound* 38(6), 411-418
- STEIN L., BACMEISTER C., YLAYA K., *et al.* (2019) Immunophenotypic Characterization of Canine Splenic Follicular-Derived B-Cell Lymphoma. *Vet Pathol* 56(3), 350-357
- STERN L. (2017) Appendix 1 The Immunologist's Toolbox. In *Janeway Immunobiology*, Eds Murphy K., Weaver C., 9th ed. New York, Garland Science, pp 749-790
- STOKOL T., BLUE J.T., FRENCH T.W. (2000) Idiopathic pure red cell aplasia and nonregenerative immune-mediated anemia in dogs: 43 cases (1988-1999). *J Am Vet Med Assoc* 216(9), 1429-1436

- SUEIRO F.A.R., ALESSI A.C., VASSALLO J. (2004) Canine Lymphomas: a Morphological and Immunohistochemical Study of 55 Cases, with Observations on p53 Immunoexpression. *J Comp Pathol* 131(2-3), 207-213
- TARRANT J.M. (2005) The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet J* 170(3), 278-288
- TASKER S., MACKIN A.J., DAY M.J. (1999) Primary immune-mediated thrombocytopenia in a cat. *J Small Anim Pract* 40(3), 127-131
- TERRA R. (2012) La cytométrie de Flux : un rôle majeur dans le diagnostic des néoplasies hématologiques. *In Labexpert* 2(4), 7-20
- TESKE E. (1994) Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q* 16(4), 209-219
- TESKE E., WISMAN P., MOORE P.F., VAN HEERDE P. (1994) Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp Hematol* 22(12), 1179-1187
- THAMM D.H. (2019) Novel Treatments for Lymphoma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 49(5), 903-915
- THRALL M.A. (1981) Lymphoproliferative Disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 11(2), 321-347
- TISSOT J.D., KIENER C., BURNAND B., SCHNEIDER P. (1999) The direct antiglobulin test: still a place for the tube technique? *Vox Sang* 77(4), 223-226
- TIZARD I. (2012) Resistance to tumors. *In Veterinary Immunology*, 9th ed. St Louis, Elsevier, pp 387-399
- TOMER A. (2004) Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. *J Biol Regul Homeost Agents* 18(2), 172-177
- TOMIYASU H., DOI A., CHAMBERS J.K., *et al.* (2018) Clinical and clinicopathological characteristics of acute lymphoblastic leukaemia in six cats. *J Small Anim Pract* 59(12), 742-746
- TRUMEL C., BOURGES-ABELLA N., DIQUELOU A. (2004) Syndrome anémique en hématopathologie. *EMC - Vétérinaire* 1(4), 154-174
- TSUJI K., OJIMA M., OTABE K., *et al.* (2017) Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* 26(6), 1089-1102
- VAIL D., MACEWEN E.G., YOUNG M. (2013) Canine lymphoma and lymphoid leukaemias. *In Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, Eds Withrow S., MacEwen E.G., 5th ed. Philadelphia, Elsevier Health Sciences, pp 699-732

- VALLI V.E., JACOBS R.M., NORRIS A., *et al.* (2000) The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. *J Vet Diagn Invest* 12(4), 295-306
- VALLI V.E., KASS P.H., MYINT M.S., SCOTT F. (2013) Canine Lymphomas: Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Vet Pathol* 50(5), 738-748
- VAN STEE L.L., BOSTON S.E., SINGH A., *et al.* (2015) Outcome and Prognostic Factors for Canine Splenic Lymphoma Treated by Splenectomy (1995-2011): Outcome of Canine Splenic Lymphoma Following Splenectomy. *Vet Surg* 44(8), 976-982
- VERNAU W., MOORE P.F. (1999) An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 69(2), 145-164
- VEZZALI E., PARODI A.L., MARCATO P.S., BETTINI G. (2010) Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet Comp Oncol* 8(1), 38-49
- WALKER D. (2006) Frottis sanguin. In *Guide pratique de cytologie et hématologie du chien et du chat*, Eds Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H. Paris, Med'Com, pp 254-283
- WALTON R.M., HENDRICK M.J. (2001) Feline Hodgkin's-like Lymphoma: 20 Cases (1992–1999). *Vet Pathol* 38(5), 504-511
- WANG Z., SHI J., ZHOU Y., RUAN C. (2001) Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 73(2), 188-193
- WARRY E.E., WILLCOX J.L., SUTER S.E. (2014) Autologous peripheral blood hematopoietic cell transplantation in dogs with T-cell lymphoma. *J Vet Intern Med* 28(2), 529-537
- WATABE A., FUKUMOTO S., KOMATSU T., ENDO Y., KADOSAWA T. (2011) Alterations of lymphocyte subpopulations in healthy dogs with aging and in dogs with cancer. *Vet Immunol Immunopathol* 142(3-4), 189-200
- WEINKLE T.K., CENTER S.A., RANDOLPH J.F., *et al.* (2005) Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc* 226(11), 1869-1880
- WEISKOPF K., ANDERSON K.L., ITO D., *et al.* (2016) Eradication of Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Murine Xenograft Model with CD47 Blockade and Anti-CD20. *Cancer Immunol Res* 4(12), 1072-1087
- WEISS D.J. (2002) Primary pure red cell aplasia in dogs: 13 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 221(1), 93-95

- WEISS D.J. (2006) A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004). *J Vet Intern Med* 20(4), 955-961
- WEISS D.J., BRAZZELL J.L. (2006) Detection of activated platelets in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med* 20(3), 682-686
- WELLS G.A. (1974) Hodgkin's disease-like lesions in the dog. *J Pathol* 112(1), 5-10
- WERNER L.L., GORMAN N.T. (1984) Immune-mediated disorders of cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 14(5), 1039-1064
- WILKERSON M.J., DAVIS E., SHUMAN W., *et al.* (2000) Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med* 14(2), 190-196
- WILKERSON M.J., SHUMAN W., SWIST S., *et al.* (2001) Platelet Size, Platelet Surface-Associated IgG, and Reticulated Platelets in Dogs with Immune-Mediated Thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol* 30(3), 141-149
- WILKERSON M.J., DOLCE K., KOOPMAN T., *et al.* (2005) Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 106(3), 179-196
- WILKERSON M.J. (2012) Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 42(1), 53-71
- WILLCOX J.L., PRUITT A., SUTER S.E. (2012) Autologous peripheral blood hematopoietic cell transplantation in dogs with B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med* 26(5), 1155-1163
- WILLIAMS D.A., MAGGIO-PRICE L. (1984) Canine idiopathic thrombocytopenia: clinical observations and long-term follow-up in 54 cases. *J Am Vet Med Assoc* 185(6), 660-663
- WINNICKA A., JAGIELSKI D., HOFFMANN-JAGIELSKA M., LECHOWSKI R. (2002) Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49(6), 303-306
- WOLFESBERGER B., FUCHS-BAUMGARTINGER A., GRESS V., *et al.* (2018) World Health Organisation Classification of Lymphoid Tumours in Veterinary and Human Medicine: a Comparative Evaluation of Gastrointestinal Lymphomas in 61 Cats. *J Comp Pathol* 159, 1-10
- WOLF-RINGWALL A., LOPEZ L., ELMSLIE R., *et al.* (2020) Prospective evaluation of flow cytometric characteristics, histopathologic diagnosis and clinical outcome in dogs with naïve B-cell lymphoma treated with a 19-week CHOP protocol. *Vet Comp Oncol* 18(3), 342-352
- WONDRATSCHEK C., WEINGART C., KOHN B. (2010) Primary immune-mediated thrombocytopenia in cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 46(1), 12-19
- WOOD B.L., ARROZ M., BARNETT D., *et al.* (2007) 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hemolymphoid neoplasia by flow

cytometry: Optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry Part B* 72B(S1), S14-S22

WORKMAN H.C., VERNAU W. (2003) Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33(6), 1379-1399

YOSHINO Y., CHAMBERS J.K., NAKAMORI T., *et al.* (2017) Primary cerebellar lymphoma with Hodgkin lymphoma-like morphology in a cat. *J Vet Diagn Invest* 29(5), 707-710

ZAFRANI L, MONNERET G (2017) Comprendre la cytométrie en flux. *Méd intensive Réa* 26:517-522

ZANDVLIET M. (2016) Canine lymphoma: a review. *Vet Q* 36(2), 76-104

ZANTEK N.D., KOEPESELL S.A., THARP D.R., COHN C.S. (2012) The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol* 87(7), 707-709

ZUCHUAT S. (2017) Le test ELISA. In *Bioutils- Pour que la biologie reste accessible à tous*. [<https://www.bioutils.ch/protocoles/14-le-test-elisa>] (consulté le 27/05/2021).

APPORTS DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

AUTEUR : Lola MELIN

RÉSUMÉ :

La cytométrie en flux est une technique développée depuis les années 70, qui permet d'identifier et de dénombrer des cellules en suspension dans un liquide. Malgré quelques limites, cette technique présente de nombreux avantages tels que la rapidité d'analyse, la diversité des prélèvements analysables, des résultats quantitatifs ainsi qu'un coût semblable aux analyses utilisées traditionnellement.

En médecine vétérinaire et notamment en oncologie dans le diagnostic des lymphomes et leucémies, la cytométrie en flux permet un diagnostic plus précis, en déterminant le type de lymphocyte impliqué (T ou B), ainsi que la présence ou l'absence de bon nombre de marqueurs qui donnent des informations précieuses notamment sur le pronostic attendu. Les résultats sont rendus plus rapidement que les techniques par microscopie optique, comme l'immunocytochimie, ce qui permet de mettre en place ou d'adapter plus rapidement le traitement le plus complet possible vis-à-vis de la pathologie rencontrée. La cytométrie en flux peut également être utilisée dans la recherche de biomarqueurs circulants, comme les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Ces cellules représentent en effet un biomarqueur de cancer intéressant pour le diagnostic oncologique et leur identification dans le sang par cytométrie en flux permettrait de par exemple, d'indiquer ou non la présence de métastases.

La cytométrie en flux est également utilisée dans le cadre des maladies auto-immunes touchant les éléments figurés du sang, comme les anémies hémolytiques auto-immunes et les thrombocytopenies auto-immunes. La cytométrie en flux permet, dans le cadre de ces pathologies, en une seule analyse de donner les résultats de plusieurs analyses réalisées en routine, comme le dénombrement des réticulocytes, le test de Coombs ou la détection des plaquettes activées.

Cette technique représente donc une avancée technologique certaine qui deviendra vite indispensable dans les laboratoires d'analyses vétérinaires d'ici quelques années.

MOTS CLÉS :

CYTOMETRIE EN FLUX, DIAGNOSTIC, CANCEROLOGIE, MALADIE AUTO-IMMUNE

JURY :

Président : Pr BELLIER Sylvain

Directrice de thèse : Dr LE ROUX Delphine

Examinatrice : Dr CORDONNIER Nathalie

CONTRIBUTIONS OF FLOW CYTOMETRY IN DIAGNOSIS IN VETERINARY MEDICINE

AUTHOR: Lola MELIN

SUMMARY:

Flow cytometry is a technique developed since the 1970s, which allows the identification and counting of cells suspended in a liquid. Despite some limitations, this technique has many advantages such as speed of analysis, diversity of samples that can be analysed, quantitative results as well as a cost similar to the analyses traditionally used.

In veterinary medicine, and particularly in oncology for the diagnosis of lymphomas and leukaemias, flow cytometry allows a more precise diagnosis, by determining the type of lymphocyte involved (T or B), as well as the presence or absence of a certain number of markers which give valuable information, particularly on the expected prognosis. The results are obtained more quickly than with light microscopy techniques, such as immunocytochemistry, which makes it possible to set up or adapt the most complete treatment possible for the pathology encountered. Flow cytometry can also be used to search for circulating biomarkers, such as myeloid derived suppressor cells (MDSCs). These cells represent an interesting cancer biomarker for oncological diagnosis and their identification in the blood by flow cytometry could, for example, indicate the presence or absence of metastases.

Flow cytometry is also used in autoimmune diseases affecting the blood's figurative elements, such as autoimmune haemolytic anaemias and autoimmune thrombocytopenia. Flow cytometry allows, in the context of these pathologies, in a single analysis to give the results of several analyses carried out in routine, such as the counting of reticulocytes, the Coombs test or the detection of activated platelets.

This technique therefore represents a definite technological advance that will soon become indispensable in veterinary laboratories in a few years' time.

KEY WORDS:

FLOW CYTOMETRY, DIAGNOSTIC, ONCOLOGY, AUTOIMMUNE DISEASE

JURY:

Chairperson: Pr BELLIER Sylvain

Thesis Director: Dr LE ROUX Delphine

Reviewer: Dr CORDONNIER Nathalie