

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE STATISTIQUE DE LA FORMULE LEUCOCYTAIRE MANUELLE CHEZ LE CHIEN : EFFET FROTTIS ET EFFET OBSERVATEUR

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Céline PICAUT

Née, le 2 mars 1980 à METZ (Moselle)

Directeur de thèse : Mlle le Docteur Armelle DIQUELOU

JURY

PRESIDENT :

Mme Elisabeth ARLET-SUAU

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mlle Armelle DIQUELOU

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Djalil CHAFAI

Ingénieur de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	J. FERNEY
	M.	P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	D. GRIESS
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELFY
	M.	M. EECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS de LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie - Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
Mlle LE MINOR Odile, *Epidémiologie*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre président de thèse,

Madame le Professeur Elisabeth ARLET - SUAU

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Médecine interne

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse

Hommages respectueux

A notre jury de thèse,

Madame le Docteur Armelle DIQUELOU

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Unité pédagogique de pathologie médicale des Equidés et des Carnivores

Qui nous a confié ce travail et nous a guidé dans son élaboration

Pour son aide, ses conseils et son soutien

Madame le Docteur Nathalie BOURGES - ABELLA

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Unité pédagogique d'anatomie pathologique

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements

A notre membre invité,

Monsieur Djalil CHAFAI

Chargé de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Unité de physiopathologie et toxicologie expérimentale

Qui nous a grandement éclairé et soutenu dans ce travail

Qu'il veuille bien trouver l'expression de notre vive gratitude

DEDICACES

A ma famille,

Une petite famille qui prend tend de place dans mon cœur. Merci pour votre soutien et toute la confiance que vous placez en moi.

A Pierrot qui nous a quitté beaucoup trop tôt, pensées éternelles.

A Julien,

Pour tout ce que tu m'as fait découvrir et tout ce qu'il nous reste à partager, puisse-t-il ne plus y avoir de mi-temps.

A mes amis qui me connaissent bien et qui m'apprécient quand même,

Aux copines d'Agen, pour cette amitié qui perdure malgré les années et les distances
Marie, Audrey, Sandra, Emilie, Hélène : merci d'être toujours là.

Aux vetos, avec qui j'ai partagé des années inoubliables et avec qui j'espère faire encore un bout de chemin,

Les colocs Psychés : St, Nico, Manue. Merci de m'avoir fait connaître cette merveilleuse aventure qu'est la colocation. Vous m'avez fait comprendre que les meilleurs moments sont toujours ceux que l'on partage. J'espère que notre amitié durera encore longtemps.

Les colocs de la maison Ketanou : Béné, Anaig, Béren. Merci de m'avoir accueillie si chaleureusement et de me permettre de poursuivre un peu l'aventure.

A ceux que j'ai eu la chance de rencontrer et de connaître autour d'un café ou d'un verre au cercle,

A Myriam une nana pas raisonnable pour tous ces moments délirants qu'on a partagés merci,

A Elise que j'ai connu trop tard merci pour tes conseils avisés et ton franc-parler,

A Romu, l'illustre personnage, pour ta franchise et ta présence, merci,

A Pierrou, le petit bonhomme qui court, merci d'être toujours partant,
A Gaby le libanais, pour toutes nos soirées « spirituelles » ou non, merci,
A Nico E., comique malgré lui, pour ton humilité et toutes tes blagues perso, merci,
A Marco et Pillot les bretons, parce que les vieux sages ne sont pas tous vieux et sages merci,
A Antoine le plus cool des profs de guitare, pour ta patience et ton soutien, merci
A Clemouille un sacré caractère merci pour ton dynamisme et tes coups de main,
Merci à Cyril pour toutes les aventures sympatico-culturelles que tu sais si bien organiser, à
Matt et les moments si peu organisés, à Nico C. pour les repas diététiques qu'on a pu partager,
à VB pour ta gentillesse.

A ceux que je croise moins souvent et qui pourtant comptent beaucoup,
A Céline (Piché ou Ricaud ?) merci d'avoir partagé plus qu'un prénom et la moitié d'un nom
de famille, merci pour cette amitié de toujours, qui a grandi avec nous
A Bago, l'intermittent internaute, merci pour toutes nos discussions et le réconfort qu'elles
ont pu m'apporter.
A Tof, merci pour nos grandes discussions et nos petites déprimés passées au téléphone, je te
dois beaucoup (à France télécom aussi).

A tous ceux que j'oublie et qui m'en voudront, Merci (et pardon).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	7
-------------------	---

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I/ LE FROTTIS SANGUIN.....	11
1. INTERETS DU FROTTIS SANGUIN	11
1.1. La formule leucocytaire.....	11
1.2. L'étude morphologique des cellules sanguines	13
1.3. La recherche de parasites sanguins.....	15
1.4. L'estimation du nombre de plaquettes et de leucocytes	15
2. REALISATION DU FROTTIS SANGUIN.....	17
2.1. Collecte du sang	17
2.2. Etalement.....	18
2.3. Coloration.....	20
2.4. Examen classique systématique d'un frottis sanguin	21
II/ LA FORMULE LEUCOCYTAIRE	23
1. METHODES DE LECTURE DU FROTTIS SANGUIN	23
1.1. Zone de comptage.....	23
1.2. Observation au microscope optique : grossissement.....	26
1.3. Nombre de cellules nécessaires pour le comptage	27
1.4. Méthodes de déplacement au dessus de la lame.....	28
2. INTERPRETATION DES RESULTATS	30
2.1. Intervalles de référence.....	30
2.1.1) Etablissement des intervalles de référence	30
2.1.2) Valeurs usuelles des leucocytes circulants	33
2.2. Variations physiologiques dans l'espèce canine	34
2.2.1) Liées à l'état comportemental.....	34
2.2.2) Liées à l'âge.....	34
2.2.3) Liées au sexe.....	35
2.2.4) Liées à la race	35
2.3. Variations pathologiques	35
2.3.1) Variations du nombre de granulocytes neutrophiles	36
2.3.2) Variations du nombre de granulocytes éosinophiles	37
2.3.3) Augmentation du nombre de granulocytes basophiles : basophilie	39
2.3.4) Variations du nombre de lymphocytes	39
2.3.5) Augmentation du nombre de monocytes : monocytose.....	40
3. IMPRECISION DE LA FORMULE LEUCOCYTAIRE MANUELLE	41
3.1. Erreur d'échantillonnage	41
3.2. Erreur de l'observateur	43
3.3. Erreur mécanique.....	43
4. L'AUTOMATISATION EN HEMATOLOGIE	46
4.1. Principe de fonctionnement des appareils automatisés	47
4.1.1) L'analyse d'image	47
4.1.2) La détection volumétrique par variation d'impédance	47

4.1.3)	le système QBC	49
4.1.4)	La détection optique	49
4.2.	Automates et formule leucocytaire.....	50
4.2.1)	Intérêts	50
4.2.2)	Limites.....	50

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

I/ ETUDE PRELIMINAIRE : NUMERATIONS LEUCOCYTAIRES SUR FROTTIS

ENTIERS.....	55
1. MATERIEL ET METHODES	55
1.1. Spécimens sanguins : collecte	55
1.2. Numération leucocytaire manuelle et automatisée	55
1.3. Préparation des frottis sanguins.....	56
1.3.1) Etalement.....	56
1.3.2) Quadrillage	56
1.4. Comptage leucocytaire manuel	57
1.5. Comptage leucocytaire automatisé : VetABC®.....	58
2. RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE	59
2.1. Numérations leucocytaires des frottis entiers.....	59
2.1.1) Numérations totales par frottis	59
2.1.2) Numérations différentielles : distribution relative des cellules blanches sur le frottis	59
2.2. Formule leucocytaire par colonne	64
2.3. Comparaison des formules leucocytaires manuelles et automatisées avec les résultats sur frottis entier	65
3. DISCUSSION.....	66
II/ ETUDE D'UNE METHODE DE LECTURE	68
1. MATERIEL ET METHODES	68
1.1. Spécimens sanguins : collecte	68
1.2. Préparation des frottis sanguins.....	68
1.3. Lecture et réalisation de la formule leucocytaire.....	69
1.4. Analyse statistique des résultats	69
2. RESULTATS	70
2.1. ANALYSE DESCRIPTIVE	70
2.1.1) Distributions des résultats par chien et par observateur	70
2.1.2) Comparaison aux valeurs usuelles.....	74
2.1.3) Dispersion des résultats en fonction du frottis.....	78
2.1.4) Moyennes des cinq lectures par frottis	81
2.2. ANALYSE STATISTIQUE	85
2.2.1) Modélisation des résultats	85
2.2.2) Analyse de variance.....	85
2.2.3) Importance des facteurs de variation considérés	85
2.2.4) Effets significatifs.....	86
3. DISCUSSION.....	88
CONCLUSION	91
BIBLIOGRAPHIE	105

TABLE DES ILLUSTRATIONS : Figures

Figure 1 : technique d'étalement sur lame (Crespeau F, 1981).....	18
Figure 2 : technique d'étalement sur lamelles (Pratt P.W. ,1998).....	19
Figure 3 : agrégats plaquettaires en queue de frottis (photo service de Médecine ENVT).....	22
Figure 4 : représentation schématique d'un frottis sanguin sur lame de verre.....	24
Figure 5 : méthode de balayage de la zone monocouche (NCCLS, 1992).....	25
Figure 6 : trois méthodes de balayage (Jain N.C., 1986).....	25
Figure 7 : la méthode en créneaux (<i>battlement method</i>) d'après Kerr M.G., 1989.....	28
Figure 8 : les trois méthodes en créneaux de Lord-Dube H. <i>et al</i> , 1983.....	29
Figure 9 : Courbe des résultats d'un test pour des animaux sains et construction de l'intervalle de référence.....	31
Figure 10 : Erreur maximale due uniquement au hasard lors de formules leucocytaires effectuées sur 100, 200 ou 400 cellules (Humbert F., 1983).....	42
Figure 11 : les trois méthodes de lecture étudiées par MacGregor R.G.S., 1940.....	44
Figure 12 : représentation d'un frottis et de son quadrillage.....	57
Figure 13 : représentation des différentes proportions de leucocytes (formule leucocytaire) et nombres de cellules identifiées pour chaque zone quadrillée du frottis T05 1802.....	60
Figure 14 : représentation des différentes proportions de leucocytes (formule leucocytaire) et nombre de cellules identifiées pour chaque zone quadrillée du frottis T05 1113.....	62
Figure 15 : représentation des différentes proportions de leucocytes (formule leucocytaire) et nombre de cellules identifiées pour chaque zone quadrillée du frottis T05 1857.....	63
Figure 16 : Occurrence des résultats des numérations leucocytaires en valeur absolue ($10^9/L$) sur 50 lectures faites par l'observateur 1 (en clair) et 2 (en foncé) pour le chien 1618 (GB= $11.10^9/L$).....	71
Figure 17 : Occurrence des résultats des numérations leucocytaires en valeur absolue ($10^9/L$) sur 50 lectures faites par les observateurs 1 (en clair) et 2 (en foncé) pour le chien 1619 (GB= $27.10^9/L$).....	72
Figure 18 : comparaison des résultats des numérations en neutrophiles (PNN) du chien 1618 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.....	76
Figure 19 : comparaison des résultats des numérations en lymphocytes du chien 1618 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.....	76
Figure 20 : comparaison des résultats des numérations en neutrophiles (PNN) du chien 1619 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.....	77
Figure 21 : comparaison des résultats des numérations en lymphocytes du chien 1619 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.....	77
Figure 22 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles et lymphocytes du chien 1618, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.....	78
Figure 23 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles et lymphocytes du chien 1618, pour les observateurs 1 et 2.....	79
Figure 24 : dispersions des résultats des numérations en éosinophiles du chien 1618, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.....	79
Figure 25 : dispersions des résultats des numérations en monocytes du chien 1618, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.....	79
Figure 26 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles et lymphocytes du chien 1619, tout observateur confondu; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.....	80

Figure 27 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles, lymphocytes du chien 1619, pour les observateurs 1 et 2.	80
Figure 28: dispersions des résultats des numérations en éosinophiles du chien 1619, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.	81
Figure 29: dispersions des résultats des numérations en monocytes du chien 1619, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.	81
Figure 30 : comparaison des moyennes (+/- sd) des 5 lectures par frottis pour les observateurs 1 et 2.	82
Figure 31 : comparaison des moyennes (+/- sd) des 5 lectures par frottis pour les observateurs 1 et 2.	83
Figure 32 : intervalle de valeurs en numération de neutrophiles (hachuré) dans lequel un résultat ne peut être interprété avec certitude (Intervalle de référence en grisé).....	88
Figure 33 : exemple de résultats possibles en numération de neutrophiles (hachuré), chez un même chien, et simplement dus à la variation analytique (Intervalle de référence en grisé).	89
Figure 34 : Les leucocytes du chien au microscope optique (objectif à immersion)	94

TABLE DES ILLUSTRATIONS : Tableaux

Tableau 1 : Interprétation de la formule leucocytaire (d'après Crespeau F., 1981).....	12
Tableau 2 : valeurs usuelles du leucogramme du chien adulte (Jain N.C., 1986 ; Crespeau F., 1981 ; Sodikoff C.H., 1995)	33
Tableau 3 : feuille à remplir lors du comptage total d'un frottis sanguin quadrillé	58
Tableau 4 : Résultats de la lecture du frottis entier T05 1802 convertis en pourcentage. Les résultats significativement différents (d'après le test d'adéquation à la loi normale) sont en grisé.....	61
Tableau 5 : Résultats de la lecture du frottis entier T05 1113 convertis en pourcentage. Les résultats significativement différents (d'après le test d'adéquation à la loi normale) sont en grisé.....	62
Tableau 6 : Résultats de la lecture du frottis entier T05 1857 convertis en pourcentage. Les résultats significativement différents (d'après le test d'adéquation à la loi normale) sont en grisé.....	63
Tableau 7 : Comparaison des formules de chaque colonne avec la formule leucocytaire de tout le frottis quadrillé (pourcentage par colonne le plus proche du pourcentage général en gras).	64
Tableau 8 : Comparaison de la formule leucocytaire du frottis entier avec les formules leucocytaires manuelle et automatisée pour chacun des 3 chiens (numération la plus proche du frottis entier en gras).....	65
Tableau 9 : Tableau de contingence : effectifs observés de la variable GNN selon l'observateur, effectifs théoriques entre parenthèses.....	73
Tableau 10 : nombre de lectures donnant des interprétations différentes d'après les valeurs usuelles (Jain N.C., 1986).....	75
Tableau 11 : comparaison des formules leucocytaires moyennes du frottis (5 lectures de 10 frottis par 2 observateurs soit 100 lectures) à la formule donnée par l'analyseur hématologique VetABC®.	84
Tableau 12 : Résultats de l'analyse de variance effectuée sur les 100 lectures de frottis des chiens 1618 et 1619: p-value de l'effet croisé Observateur avec Frottis et des effets simples Observateur et Frottis ($p < 0.05$ considéré comme significatif en gras).	86
Tableau 13 : Résultats de l'analyse de variance effectuée sur les 50 lectures de frottis des chiens 1618 et 1619 pour chaque observateur : p-value de l'effet Frottis. ($p < 0.05$ considéré comme significatif en gras).	87
Tableau 14 : résultats de l'analyse de variance sur les numérations en monocytes et la somme des numérations en monocytes et neutrophiles d'après les 50 lectures des frottis du chien 1618 (effet significatif en gras)	90

ANNEXES

Annexe 1 : ELEMENTS FIGURES DU FROTTIS SANGUIN	92
Annexe 2 : RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE	96
Annexe 3 : RESULTATS DU TEST KHI2 D'ADEQUATION A LA LOI NORMALE	97
Annexe 4 : RESULTATS DES LECTURES	98
Annexe 5 : VALEURS STATISTIQUES DESCRIPTIVES DONNEES PAR SYSTAT10©	102
Annexe 6 : RESULTATS DE L'ANALYSE DE VARIANCE DONNES PAR SYSTAT10© POUR LES FORMULES LEUCOCYTAIRES DU CHIEN 1618	103
Annexe 7 : RESULTATS DE L'ANALYSE DE VARIANCE DONNES PAR SYSTAT10© POUR LES FORMULES LEUCOCYTAIRES DU CHIEN 1619	104

INTRODUCTION

La formule leucocytaire est un résultat hématologique souvent très utile au praticien vétérinaire dans l'élaboration d'un diagnostic. Elle permet de mettre en évidence des modifications quantitatives des différentes cellules blanches circulant dans le sang. En médecine vétérinaire, la proportion relative des différents types leucocytaires est encore fréquemment obtenue par la lecture d'un frottis sanguin. Au cours de celle-ci, de nombreuses autres informations peuvent être recueillies. Cependant la formule leucocytaire manuelle, bien que simple de réalisation, est depuis longtemps considérée comme très imprécise. Ainsi dans les laboratoires d'analyses humaines, le gain de temps et de précision des analyseurs hématologiques en fait des outils indispensables. En hématologie vétérinaire, de tels automates ne seraient pas encore assez fiables dans l'identification de toutes les cellules blanches. On voit cependant apparaître sur le marché des appareils de plus en plus performants, adaptés à différentes espèces animales comme le nécessite la pratique vétérinaire. Dans ce contexte, la méthode manuelle, considérée comme la méthode de référence, aura-t-elle encore sa place ?

Dans le laboratoire d'analyses de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, l'analyseur d'hématologie utilisé, le VetABC® (commercialisé par SCIL), fournit une approche de la formule leucocytaire. Des études expérimentales ont montré son manque de fiabilité et la lecture du frottis reste encore indispensable. Quelle confiance accorder alors aux résultats de la méthode manuelle utilisée?

Nous avons réalisé deux études expérimentales pour donner une approche de son imprécision. L'étude préliminaire qui consiste à compter les leucocytes de la totalité de frottis sanguins, a pour but de donner une formule leucocytaire la plus proche possible des numérations réelles. C'est elle qui sert donc de référence pour comparer l'automate VetABC avec la méthode de lecture manuelle utilisée à l'ENVT. Elle a également permis d'étudier la distribution cellulaire dans l'étalement. D'après certaines études préalables celle-ci serait très hétérogène d'où l'importance du choix de la zone de lecture.

La deuxième étude expérimentale porte sur la méthode de lecture classique utilisée à l'ENVT : plusieurs lectures, plusieurs frottis, plusieurs observateurs pour un même échantillon sanguin ont été nécessaires pour avoir une approche de la variation des résultats et de ses causes possibles.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I/ LE FROTTIS SANGUIN

1. INTERETS DU FROTTIS SANGUIN

Un étalement de sang, coloré au May-Grünwald-Giemsa permet d'examiner au microscope:

- les hématies (morphologie)
- les plaquettes (appréciation de la richesse de l'étalement et morphologie)
- les globules blancs (richesse de l'étalement, formule leucocytaire et morphologie).

NB : La description de ces différents éléments figurés chez le chien est reportée en Annexe 1.

La valeur de ces renseignements, dont la plupart ne peuvent être apportés par les compteurs automatiques actuels, ne doit pas être sous-estimée.

1.1. La formule leucocytaire

Le leucogramme représente le nombre de leucocytes circulants et la proportion respective de leurs différentes catégories (Jongh O., 1993). Il comprend la numération totale des leucocytes par microlitre de sang et la numération différentielle des différents types leucocytaires (au nombre de cinq : granulocytes neutrophiles [GNN], éosinophiles [GNE], basophiles [GNB], monocytes et lymphocytes ; voire six types lorsque les neutrophiles immatures sont différenciés).

La numération totale est donnée par les appareils automatisés. La numération différentielle, communément appelée formule leucocytaire, est issue en médecine vétérinaire du comptage manuel d'au moins 100 cellules blanches sur un frottis sanguin avec identification de chaque type de leucocytes. Le nombre relatif de chaque catégorie de leucocytes est exprimé en pourcentage. En multipliant ce pourcentage par le nombre total de globules blancs par microlitre de sang, on obtient la formule leucocytaire en valeur absolue (Kidd R., 1991). Ce calcul se révèle nécessaire dans la mesure où seul le nombre absolu de chacun des types leucocytaires circulants est interprétable.

En effet, d'après l'exemple présenté en tableau 1, une même formule sanguine en pourcentage peut amener après calcul, à des interprétations très différentes :

NUMERATION LEUCOCYTAIRE	14 000/mm ³		5 000/mm ³		21 000/mm ³	
NEUTROPHILES	65%	9 100/mm ³	65%	3 250/mm ³	65%	13 650/mm ³
EOSINOPHILES	3,8%	532/mm ³	3,8%	190/mm ³	3,8%	798/mm ³
BASOPHILES	0%	0/mm ³	0%	0/mm ³	0%	0/mm ³
LYMPHOCYTES	21,5%	3 010/mm ³	21,5%	1 075/mm ³	21,5%	4 515/mm ³
MONOCYTES	9,7%	1 358/mm ³	9,7%	485/mm ³	9,7%	2 037/mm ³
CONCLUSION	Numération et formule normales		Leucopénie avec formule normale		Leucocytose avec formule normale	

Tableau 1 : Interprétation de la formule leucocytaire (d'après Crespeau F., 1981)

Lors de la lecture par les automates, les globules rouges nucléés sont comptés comme des leucocytes ; si leur nombre est supérieur à 5% de cellules dénombrées, il est alors nécessaire de corriger la numération leucocytaire initiale en utilisant cette formule :

Numération leucocytaire corrigée = (numération initiale x 100) / (100 + %globules rouges nucléés) (Williard M.D. *et al*, 1999).

Le frottis sanguin est encore largement nécessaire à l'élaboration des différentes concentrations en globules blancs. En effet les analyseurs en hématologie vétérinaire ne donnent pas encore accès à des comptages leucocytaires différentiels complets et fiables, contrairement à ceux utilisés en hématologie humaine. En revanche, ces appareils donnent un comptage total des leucocytes sanguins beaucoup plus précis que la méthode manuelle nécessitant un hématimètre (cellule de Malassez) (Guelfi J.-F. *et al*, 1994 ; Kidd R., 1991). Il est enfin possible de faire une approximation rapide de ce résultat lors de la lecture du frottis sanguin pour vérifier un résultat automatisé surprenant ou pour obtenir une numération complète en urgence, en attendant confirmation par l'automate (Cf. I/1.4).

La formule leucocytaire peut être utile pour déterminer la cause, la sévérité, la durée ou encore le pronostic d'un phénomène pathologique. Très souvent, comme les autres paramètres sanguins, elle est plus le reflet d'une réponse générale de l'organisme (typiquement une réponse inflammatoire) qu'un indicateur d'une maladie en particulier (Cf. II/2.). Les anomalies du nombre de leucocytes circulants doivent toujours être interprétées en parallèle avec les commémoratifs, l'examen clinique, les autres paramètres de l'hémogramme et les résultats d'éventuels examens complémentaires supplémentaires (Dunn J., 2000).

1.2. L'étude morphologique des cellules sanguines

L'examen attentif et complet de la morphologie cellulaire, au fort grossissement, constitue le deuxième aspect de la lecture d'un frottis. Son importance est inestimable. Il contribue probablement plus au diagnostic des maladies hématologiques que tout autre test de laboratoire. Presque toutes les maladies qui touchent les éléments figurés sanguins peuvent se traduire par des modifications cytologiques de la morphologie cellulaire ou par des changements dans la distribution des types cellulaires (Wintrobe M.M. *et al*, 1981).

- les hématies :

Leur morphologie est souvent modifiée lors d'anémie. Une anisocytose (hématies de tailles très différentes sur un même étalement) appréciée semi-quantitativement (de 1+ à 4+) avec parfois présence d'érythroblastes (hématies nucléées), signe en général chez le chien une anémie régénérative. Ce caractère régénératif est conforté par l'observation d'une polychromatophilie (présence de réticulocytes¹). La poïkilocytose se traduit par des hématies de formes différentes sur un même étalement. Elle concerne surtout les hématies spiculées² et la sphérocytose³ (Thrall M.A. *et al*, 2004). Selon la taille globalement diminuée ou augmentée des cellules, on peut caractériser l'anémie de respectivement microcytaire ou macrocytaire (Banks W.J., 1986). C'est la valeur du volume globulaire moyen (VGM) donnée par l'automate qui confirme l'impression de l'observateur. En cas d'anémie non régénérative, notamment lors de certaines affections chroniques, la taille moyenne des hématies peut ne pas être modifiée (anémie normocytaire). Les anémies microcytaires sont généralement dues à une déficience en fer (anémies ferriprives lors de pertes sanguines chroniques) caractérisée également par la présence d'annulocytes⁴.

Parmi les autres modifications des hématies, citons les poussières nucléaires (lors d'hyperhémolyse), les granulations violacées (corps de Pappenheimer) des sidérocytes lors d'intoxication par le plomb, les granulations azurophiles parfois volumineuses dans certains cas de maladie de Carré (Guelfi J.-F., 1981).

¹ réticulocytes : hématies immatures, plus violacées, en général de plus grande taille (Cf.annexe1).

² hématies spiculées : il peut s'agir de shizocytes (fragments d'hématies fragilisées), kérocytes (hématies fragmentées avec des prolongements en forme de corne), acanthocytes (hématies avec des prolongements en forme de doigt dus à une anomalie membranaire) ou échinocytes (hématies en forme d'oursin).

³ sphérocytes : hématies souvent de faible diamètre, sans pâleur centrale. rencontrées en particulier dans les anémies à médiation immunes

⁴ annulocytes : hématies avec pâleur centrale marquée.

- les leucocytes :

Seuls les granulocytes neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes sont suffisamment nombreux pour permettre une analyse morphologique.

L'observation des polynucléaires neutrophiles concerne la taille des cellules (polynucléaires géants), la forme du noyau (plus ou moins lobé, parfois annulaire), et l'aspect du cytoplasme (vacuoles, inclusions de la maladie de Carré par exemple, hématies ou germes phagocytés...). L'appréciation du nombre de lobes des noyaux est généralement semi-quantitative car la courbe d'Arneth¹ est fastidieuse à établir (Guelfi J.-F., 1993). La modification la plus fréquente dans l'aspect du cytoplasme s'observe lors d'état inflammatoire systémique ou de souffrance cellulaire, on parle alors de polynucléaires neutrophiles « toxiques ». On peut observer lors des premiers stades la présence d'inclusions grisâtres irrégulières (corps de Döhle) dans le cytoplasme. Celui-ci prend ensuite une teinte basophile et lors de toxicité élevée, une microvacuolisation apparaît et donne au cytoplasme un aspect spumeux. Dans les cas extrêmes, un gigantisme cellulaire et une lyse nucléaire complètent le tableau (Chuzel T., 2003).

Les monocytes circulants montrent parfois des modifications morphologiques témoignant de leur activité macrophagique. Ainsi la présence d'érythrophagocytes² peut parfois être observée lors de babésiose (Guelfi J.-F., 1993).

Certains lymphocytes peuvent devenir réactionnels (synthèse d'anticorps) lors de stimulation antigénique. Ces lymphocytes, appelés immunocytes, se caractérisent par une taille augmentée et une basophilie soutenue. Les lymphocytes à grains présentent quant à eux des inclusions azurophiles cytoplasmiques. Ils correspondent aux cellules NK (Natural Killer) visibles lors de stimulations non spécifiques du système immunitaire (maladie virale, vaccination récente), lors de tumeurs ou de certaines affections chroniques (Chuzel T., 2003). On peut quelquefois constater la présence de plages rose violacées dans le cytoplasme des lymphocytes dans certains cas de maladie de Carré (Guelfi J.-F., 1993).

Enfin une observation attentive des leucocytes peut avoir une grande valeur diagnostique lors de leucémies. Ainsi la présence de nucléoles, d'un noyau avec une fine chromatine et d'un cytoplasme basophile est indicatrice d'immatunité, les cellules jeunes étant souvent plus grande que les cellules mûres d'une même catégorie (Penny R.H., 1975).

¹ la courbe d'Arneth représente la répartition des neutrophiles en fonction du nombre de lobes de leurs noyaux (Cf. Annexe 1).

² monocytes ayant phagocyté des hématies.

- les plaquettes :

Les modifications de forme étant mal connues, on s'attardera surtout à vérifier qu'il n'y ait pas d'agglutinat sur les bords et en queue de frottis notamment lorsque l'appareil de comptage indique une thrombopénie (Christopher M.M., 2004). La présence de mégaplaquettes, de taille égale voire supérieure à celle d'une hématie, peut être évocatrice de thrombopénie régénérative ou peut être physiologique dans certaines races comme chez le Cavalier King Charles (Day M.J., 2000). A l'inverse la présence de microthrombocytes est possible lors de mécanismes de destruction plaquettaire à médiation immune.

1.3. La recherche de parasites sanguins

Pour certaines affections, notamment parasitaires, le frottis sanguin est un élément diagnostique déterminant (Guelfi J.-F. *et al*, 1994) :

-la babésiose : *Babesia canis* se caractérise par la présence d'inclusions basophiles en forme de poire, dans le cytoplasme des globules rouges,

-l'hépatozoonose : des gamétocytes d'*Hepatozoon canis* peuvent être présents dans les leucocytes,

-la dirofilariose : les larves de *Dirofilaria immitis*, appelées microfilaries, sont des éléments extracellulaires volumineux occasionnellement visualisés en queue de frottis à faible grossissement (X100) ; elles sont plus facilement mises en évidence après enrichissement (frottis faits à partir des couches cellulaires inférieures de sang centrifugé dans un tube à hématocrite) (Penny R.H., 1975).

-l'ehrlichiose : il est possible d'observer après enrichissement des morulas d'*Ehrlichia platys* dans les plaquettes, d'*E. canis* dans les leucocytes.

1.4. L'estimation du nombre de plaquettes et de leucocytes

Les estimations du nombre de globules blancs et de plaquettes sur les frottis sanguins sont un contrôle important des résultats obtenus par méthode manuelle ou électronique (Wintrobe M.M. *et al*, 1981).

En ce qui concerne les leucocytes, on peut citer par exemple la méthode qui consiste à compter dans la zone de lecture du frottis le nombre de leucocytes par champ en examinant au moins une vingtaine de champs. On obtient une estimation de la numération totale par

microlitre de sang en multipliant le nombre moyen par champ à l'objectif x 40 ou x 50 par 1500 ou 2000 respectivement (Kidd R., 1991).

Pour estimer le nombre de plaquettes par microlitre de sang, on multiplie le nombre moyen par champ à l'objectif à immersion (X100) par 15000 (Christopher M.M., 2004). Ainsi un nombre moyen de 8 à 25 plaquettes par champ suggère une numération des plaquettes dans les valeurs usuelles, il permet d'identifier avec certitude les thrombopénies (<3 plaquettes par champ) et les thrombocytoses majeures (Chuzel T., 2003).

La corrélation entre les résultats de ces estimations et les résultats des comptages par l'automate est assez bonne pour les plaquettes, un peu moins pour les leucocytes (Tvedten H. *et al*, 1988). Mais ces résultats restent très imprécis voire inexacts si la distribution cellulaire n'est pas suffisamment homogène dans l'étalement sanguin. Il faut notamment vérifier que les globules blancs ne soient pas localisés de façon disproportionnée sur les bords et en queue de frottis et qu'il n'y ait pas d'amas plaquettaire (Christopher M.M., 2004).

2. REALISATION DU FROTTIS SANGUIN

Le frottis sanguin est un test de laboratoire de procédure simple, rapide et nécessitant peu de matériel. Il est ainsi largement répandu puisqu'un simple microscope permet au praticien vétérinaire de le réaliser dans son propre cabinet. Cependant, la qualité du frottis est cruciale pour une analyse correcte des cellules et quelques règles s'imposent pour éviter tout artéfact susceptible de mener à des difficultés voire des erreurs d'interprétation.

2.1. Collecte du sang

Elle doit se faire idéalement dans le calme, sur un animal au repos, le stress pouvant induire des modifications hématologiques notables (Cf. II/ 2.2.1).

- Sang périphérique : certains le préfèrent pour les frottis destinés à la recherche de parasites sanguins (tels que les piroplasmose chez le chien) car ces derniers sont plus nombreux dans les capillaires. On récupère sur une lame une goutte de sang (en évitant de prendre la première) s'écoulant d'une petite incision (aiguille, lame de scapel) faite à la face interne de l'oreille après désinfection à l'alcool ou l'éther et séchage (Groulade P., 1981). L'étalement de cette goutte de sang doit être réalisé immédiatement, avant que le sang ne coagule.

- Sang veineux : il est prélevé en plus grande quantité afin de réaliser l'hémogramme et notamment la numération totale et différentielle des globules blancs nécessaires à l'établissement de la formule sanguine. Le sang prélevé à la veine (antébrachiale, saphène ou jugulaire) est recueilli par écoulement direct (tube sous vide) ou aspiration lente à la seringue, dans un tube contenant un agent anticoagulant. L'anticoagulant de choix est l'Acide Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA) utilisé sous forme de sel dissodique ou dipotassique, de préférence en solution à 11% à raison de 0,1ml pour 5 ml de sang (Crespeau F., 1981). L'héparine est déconseillée car elle entraîne la présence d'agrégats plaquettaires et peut être responsable d'une teinte bleutée du plasma, rendant la lecture des frottis colorés difficile (Houwen B., 2000). Des tubes contenant la quantité adéquate d'anticoagulant lorsqu'ils sont convenablement remplis sont disponibles dans le commerce. Immédiatement après la collecte, ils doivent être agités doucement par retournement (dix au minimum) afin de bien mélanger sang et anticoagulant (Médaille C., 1992).

Artéfacts (Kidd R., 1991) :

Après plusieurs heures de conservation du sang avec l'EDTA, des modifications morphologiques apparaissent, telles que gonflement cellulaire (les lymphocytes peuvent être confondus avec des cellules néoplasiques), hypersegmentation ou pycnose nucléaire (les cellules sont difficiles à identifier) et vacuolisation du cytoplasme (elle peut être interprétée comme un changement toxique).

2.2. Étalement

Il doit être réalisé immédiatement après la collecte pour le sang frais et dans les quatre heures suivant la collecte pour le sang prélevé sur anticoagulant (NCCLS, 1992).

- la technique sur lame de verre :

Il est important d'utiliser des lames parfaitement propres et dégraissées afin d'éviter les agrégations cellulaires et les dépôts de colorant (Theml H., 2000). Deux types de lames seront utilisés : une lame porte-objet qui portera l'étalement sanguin et une lame rodée, de largeur inférieure, dont les deux extrémités sont rodées et qui permettra d'étaler la goutte de sang.

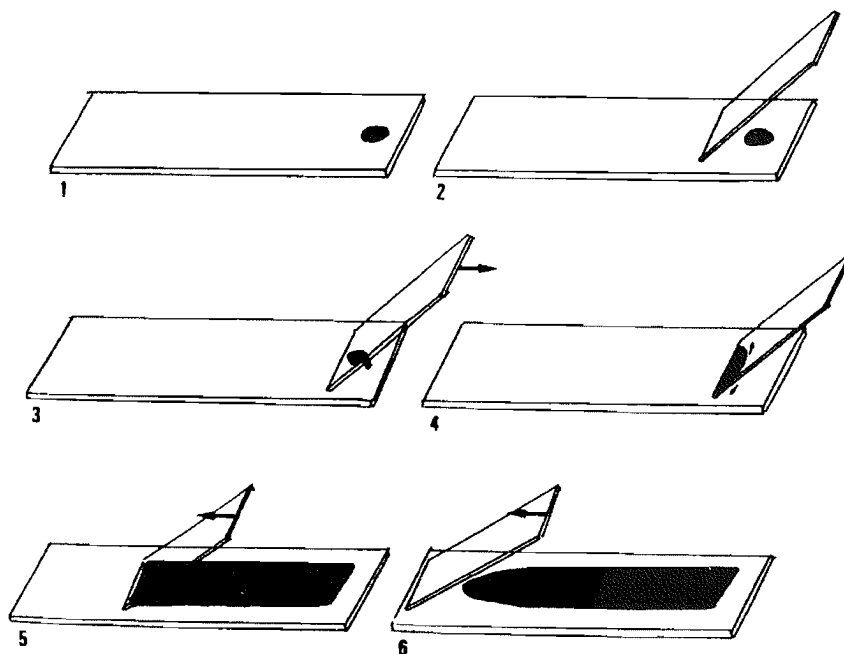


Figure 1 : technique d'étalement sur lame (Crespeau F, 1981)

Après avoir bien homogénéisé le contenu du tube de sang, une goutte de la taille d'une tête d'épingle est déposée sur la lame porte objet avec un tube capillaire par exemple, à environ un centimètre du bord. La taille de la goutte peut être contrôlée en utilisant une micropipette,

mais le volume nécessaire peut varier notamment en fonction de la qualité du sang. La lame rodée est placée devant elle avec un angle d'environ 30° puis tirée lentement vers l'arrière jusqu'à ce que la goutte entre en contact avec l'arête de la lame rodée et s'étale le long de celle-ci. Il faut ensuite faire glisser la lame supérieure sans trop de pression sur la lame porte-objet d'un mouvement continu et régulier, avec un angle d'environ 45°; un passage rapide avec un angle fermé rendra l'étalement plus long et fin qu'un passage lent avec un angle ouvert. Une fois étalé, le sang est immédiatement séché à l'air par agitation. Certains auteurs procèdent à l'inverse en tirant la lame supérieure au lieu de la pousser. Ces deux techniques nécessitent un peu d'entraînement avant de donner un résultat convenable. Lorsqu'elle est correctement effectuée, la méthode sur lame doit donner un frottis d'une longueur comprise entre 2,5 et 4 cm. Elle doit comprendre une zone de lecture suffisamment grande : il s'agit de la zone monocouche où les cellules se touchent sans se superposer, les autres parties du frottis étant trop épaisses (proximalement) ou trop fines (distalement) (Houwen B, 2000).

- la technique sur lamelle :

On utilise deux lamelles parfaitement plates, numéro 1 ½, carrées (22 X 22 mm), propres et dégraissées. Une petite goutte de sang est placée au centre de la lamelle tenue entre le pouce et l'index. Une deuxième lamelle est alors prise de la même manière avec l'autre main et placée délicatement sur la première en la décalant. Une fois le sang répandu entre les deux lamelles, celles-ci sont séparées d'un mouvement sec et rapide en direction opposée. Les lamelles sont alors séchées à l'air (Wintrobe M.M. *et al*, 1981). Cette technique présente l'avantage d'une distribution plus uniforme des leucocytes et des plaquettes (Wintrobe M.M., *et al*, 1981 ; Jain N.C., 1986), ce qui la rendait aux yeux de certains auteurs préférable à la technique sur lame (Hoppe B.R. *et al*, 1978). Cependant sa réalisation correcte, de même que l'identification et la conservation des frottis sont plus difficiles, les lamelles étant fragiles, ainsi son utilisation semble être devenue obsolète (Houwen B., 2000).

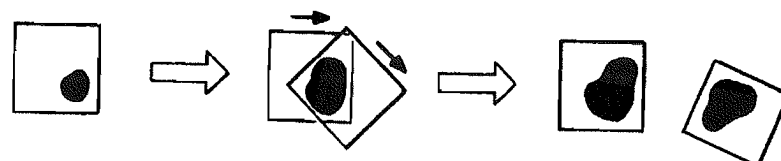


Figure 2 : technique d'étalement sur lamelles (Pratt P.W. ,1998)

- les méthodes automatisées : il existe deux types d'appareils : la cytocentrifugeuse qui permet d'étaler les cellules sanguines par centrifugation et d'obtenir facilement une large zone monocouche, et les appareils d'étalement mécanique qui automatisent la méthode manuelle (Wintrobe M.M. *et al*, 1981).

Artéfacts (Houwen B., 2000 ; Mills J.N., 1998) : les plus communs sont dus à

- une mauvaise réalisation de l'étalement : frottis trop épais (superposition des cellules), trop fin (éclatement des cellules) ou irrégulier avec des trous (graisse) ou des stries
- un séchage trop lent (rétraction des cellules, globules rouges crénelés : les échinocytes)
- de mauvaises conditions de conservation (dégénérescence des cellules telle que vacuolisation du cytoplasme, fragmentation du noyau...).

2.3. Coloration

Les colorants utilisés doivent être de fabrication récente, conservés en récipient étanche, à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur. Ils seront éventuellement filtrés avant emploi (Crespeau F., 1981). On utilisera de préférence une eau neutralisée ou mieux tamponnée. Les frottis sanguins sont habituellement colorés par les colorations de Wright ou de May-Grünwald-Giemsa, qui sont toutes deux issues de la méthode de Romanowsky, à base de bleu de méthylène et d'éosine. Les formes actives du bleu de méthylène, les azurs de méthylène, sont des colorants basiques qui colorent en bleu-violet les composants cellulaires acides, c'est-à-dire les acides nucléiques et les nucléoprotéines. Au contraire l'éosine est un colorant acide qui colore en rose les constituants cytoplasmiques basiques et notamment l'hémoglobine. De meilleurs résultats sont obtenus en colorant les frottis immédiatement après leur réalisation, une fois qu'ils sont parfaitement séchés. Il est parfois recommandé de fixer les étalements dans l'alcool méthylique avant de les colorer (Houwen B., 2000). Les protocoles de coloration varient entre laboratoires et là encore les techniques automatiques sont de plus en plus utilisées pour le gain de temps qu'elles apportent, la procédure à suivre étant précisée par le fabricant. La coloration de May-Grünwald-Giemsa est plus couramment utilisée en Europe que celle de Wright. Lorsqu'elle n'est pas automatisée, cette technique est longue et la détérioration des bains la rend peu utilisée en clientèle. Les praticiens préfèrent souvent les colorations rapides (Diff-Quick®, RAL®) permettant d'obtenir des lames en quelques instants. L'inconvénient principal de ces kits rapides est un certain manque de

nuance des détails intracellulaires qui ne permet pas toujours une analyse cytologique fine (Chuzel T., 2003).

Artéfacts (Houwen B, 2000 ; Groulade P., 1981) :

- frottis trop bleu : insuffisance de lavage, temps de coloration trop long, eau ou colorant trop basique, frottis trop épais.
- frottis trop rouge : coloration insuffisante, lavage et rinçage excessifs, colorant ou eau trop acide.
- frottis terne, brunis ou verdâtre : vieillissement (après un mois).
- précipitation de colorant : évaporation du méthanol de la solution colorante, mauvaise filtration des colorants avant utilisation, présence de poussière sur la lame.

2.4. Examen classique systématique d'un frottis sanguin

Le frottis sanguin est réalisé par étalement sur lame de sang capillaire ou veineux et coloration rapide ou May-Grünwald-Giemsa. La lecture se fait avec méthode, toujours de la même façon afin de ne pas oublier une étape.

- Observation macroscopique, avant coloration :

On vérifie après l'étalement la qualité du frottis à l'œil nu, l'aspect uniforme du sang sur la lame. La présence d'une agglutination macroscopique (sang en « amas pointillé ») peut correspondre à une auto-agglutination (processus hémolytique à médiation immune) ou à la présence de rouleaux érythrocytaires (notamment lors de dysprotéïnémie). Pour distinguer ces deux phénomènes, on dilue le sang au dixième avec un soluté de chlorure de sodium, ce qui provoque la disparition de l'agglutination dans le cas d'une rouleaux-formation (Chuzel T, 2003, Christopher M.M., 2004). La présence de ces rouleaux de globules rouges peut aussi être artéfactuelle si le séchage du frottis est trop lent.

- Observation au microscope du frottis après coloration :

Le frottis est d'abord examiné au faible grossissement (X100 ou X200) dans sa totalité pour vérifier la qualité de l'étalement, de la coloration et l'absence d'éléments volumineux anormaux (microfilaires...). On recherchera notamment la présence, au niveau de la queue du frottis, d'amas plaquettaires (Cf. Fig.3) responsables d'une thrombopénie artéfactuelle (car ces plaquettes ne sont pas comptabilisées par l'automate).

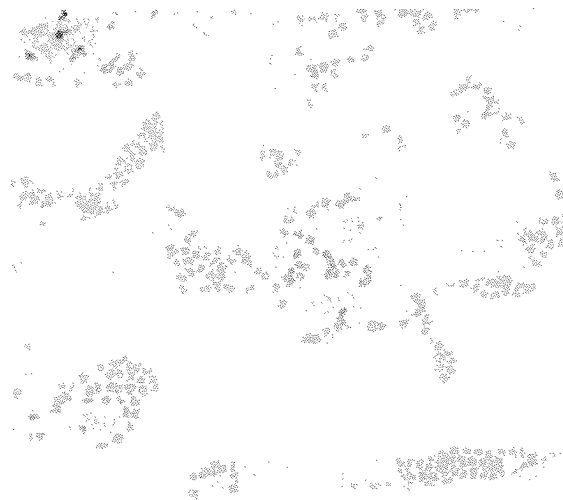


Figure 3 : agrégats plaquettaires en queue de frottis (photo service de Médecine ENVT)

On évalue ensuite la densité et la distribution des différentes catégories cellulaires. Avec l'expérience, on pourra qualifier la densité en globules rouges de plutôt normale, faible ou élevée. La distribution des globules rouges pourra révéler des phénomènes d'agglutination (immune ou par hyperprotéïnémie) éventuellement déjà suspectés macroscopiquement (Christopher M.M., 2004). On estime ensuite au grossissement X400, la richesse du frottis en leucocytes (deux à quatre par champ (Theml H., 2000) et en plaquettes (au moins trois par champ en moyenne, Seybold I.M. *et al*, 1980) en tenant compte de la répartition des cellules. Enfin on détermine la zone de lecture où se réalise le reste de l'examen (zone monocouche où les globules rouges se touchent sans se superposer).

Une étude de la morphologie des cellules (hématies, leucocytes et plaquettes) doit être réalisée au fort grossissement (X1000 avec l'objectif à immersion). La formule leucocytaire classique est établie en comptant au moins une centaine de leucocytes lors du balayage de la zone de lecture (Cf. II/1.).

II/ LA FORMULE LEUCOCYTAIRE

1. METHODES DE LECTURE DU FROTTIS SANGUIN

1.1. Zone de comptage

Un étalement sanguin sur lame de verre correctement réalisé est subdivisé en plusieurs parties :

- la tête est l'extrémité au niveau de la goutte de sang,
- la queue est l'extrémité opposée généralement en pointe, présentant des « barbes » visibles à l'œil nu. C'est une zone très mince où les cellules se regroupent en colonnes, les globules rouges ne présentent plus de zone centrale plus claire (Angulo J. *et al*, 2003), et les globules blancs, nombreux, sont souvent détériorés.
- le corps fait suite à la tête. C'est une zone épaisse qui contient de nombreux globules rouges, ces derniers sont distribués de façon hétérogène, se superposent et forment souvent des rouleaux. Les leucocytes sont de petite taille (ils se sont rétractés) et généralement fortement colorés (Shafer J.A., 1991).
- Une zone dite « monocouche » est située entre le corps et la queue du frottis. Les cellules s'y répartissent en une seule couche sur la lame, les globules rouges ont une distribution uniforme, ne se chevauchent pas et présentent une distorsion minimale (Sirois M., 1995).

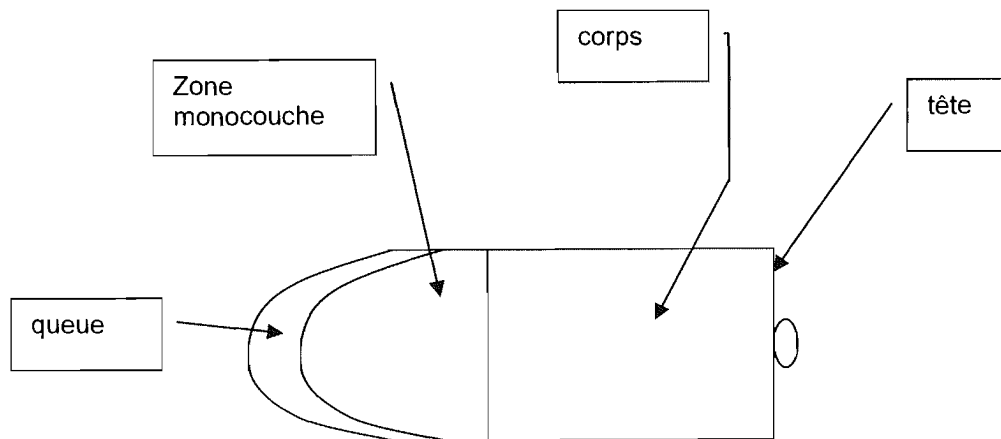


Figure 4 : représentation schématique d'un frottis sanguin sur lame de verre.

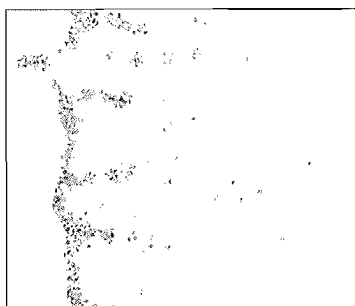


Fig.4.1 : Queue de frottis

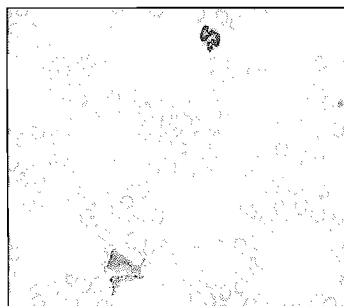


Fig.4.2 : Zone monocouche
(French T.W. *et al*, 1997)

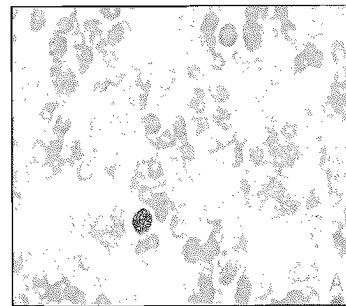


Fig.4.3 : Corps du frottis

Dans la grande majorité des publications, la zone de comptage des leucocytes, lorsqu'elle est précisée, est la zone monocouche (parfois désignée comme le secteur précédant les franges (Fauchet R. *et al*, 1995) ou l'extrémité proche de la queue (Kerr M.G., 1989) ou encore l'endroit où les érythrocytes sont voisins sans cependant se toucher (Lord-Dube H. *et al*, 1983)...). C'est une zone ni trop mince ni trop épaisse qui permet une observation plus facile, moins sujette à des erreurs d'interprétation due à des superpositions ou des artéfacts. Les cellules blanches sanguines y sont aplaties (elles sont comprimées contre la lame lors de l'étalement et le séchage rapide de cette zone les maintient sous cette forme), et exposent ainsi une grande surface cellulaire pour une évaluation optimale des détails cytoplasmiques et nucléaires (Williard M.D. *et al*, 1999).

Cependant les délimitations de cette région et sa taille sont variables en fonction de la qualité de l'étalement (Shafer J.A., 1991, précise qu'elle doit représenter au moins 25% de la surface du frottis). Elle serait deux fois plus grande pour des frottis réalisés par des instruments automatisés (Benattar L. *et al*, 1999). Par ailleurs, à l'intérieur de cette zone, les avis

divergent sur la surface à balayer et notamment sur la prise en compte ou pas des côtés de l'étalement. D'après le schéma donné par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), il faut parcourir la zone monocouche de haut en bas jusqu'à ce que 200 cellules aient été dénombrées (NCCLS, 1992).

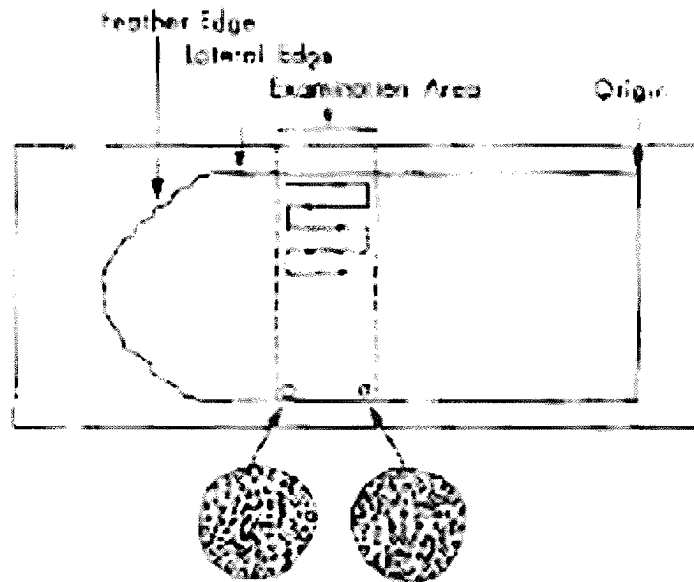


Figure 5 : méthode de balayage de la zone monocouche (NCCLS, 1992)

D'autres méthodes limitent la zone de comptage dans une zone de 1 mm le long des bords (pour la méthode en créneaux décrite par Jain N.C., 1986) ou encore 5 mm au dessous des bords (pour la méthode en ligne droite d'après Kerr M.G., 1989). D'autres enfin, précisent seulement d'inclure plusieurs champs au niveau de ceux-ci (Shafer J.A., 1991).

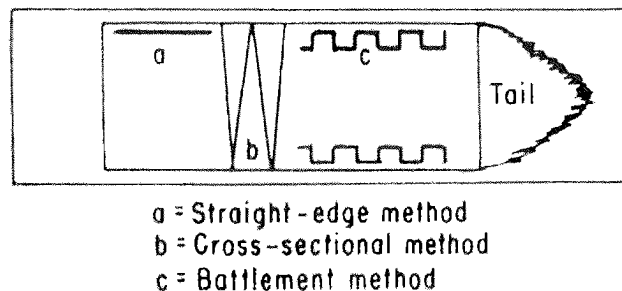


Figure 6 : trois méthodes de balayage (Jain N.C., 1986)

Le choix de la zone de comptage s'avère d'autant plus important pour la numération différentielle des leucocytes que quelques auteurs soulèvent le fait que la distribution de chaque type serait hétérogène sur l'étalement. En effet, d'après Shafer J.A., 1991, les grosses cellules, notamment les monocytes, auraient tendance à s'accumuler sur les bords et dans la zone de la queue, au point que si leur nombre s'avère trois fois plus grand dans ces régions, l'auteur conseille de ne pas utiliser le frottis pour la numération. Lord-Dube H., 1983, précise de son côté que la répartition inégale des leucocytes consisterait en un regroupement des lymphocytes (petits globules blancs) au centre du frottis, des granulocytes sur les bords et des monocytes dans les franges. Enfin, selon Jain N.C., 1986, les lymphocytes se trouveraient préférentiellement dans le corps du frottis, les neutrophiles sur les bords alors que monocytes et éosinophiles auraient tendance à se répartir de façon uniforme. Ces observations se basent sans doute pour la plupart sur les nombreuses expériences faites sur le sujet à partir des années 20. En dénombrant les leucocytes de la totalité de plusieurs lames, MacGregor R.G.S., 1940 ; Davidson E., 1958 ; Humbert F., 1983, observent à chaque fois une différence des proportions leucocytaires entre les bords et le centre du frottis. En réalité cette distribution hétérogène dépendrait de facteurs mécaniques difficiles à identifier, lors de l'étalement du frottis notamment (cf. II/3.3.). Les divergences sur cette répartition ne permettent pas pour l'instant de choisir judicieusement une zone représentative du nombre relatif de chaque type leucocytaire. Puisque plusieurs auteurs s'accordent à dire que la distribution est inégale sur le frottis, on pourrait se demander dans quelle mesure le choix de la zone de comptage (et précisément de la prise en compte des bords) a son importance dans le résultat de la formule.

Il semble par ailleurs que vis-à-vis de ce problème, la méthode utilisant les lamelles pour faire un frottis sanguin présente le net avantage d'une distribution plus uniforme des leucocytes et des plaquettes sur toute la surface (Wintrobe M.M. *et al*, 1981). L'étalement est cependant beaucoup plus difficile à réaliser ce qui explique sans doute sa moindre utilisation.

1.2. Observation au microscope optique : grossissement

On utilise un microscope optique à platine mobile permettant le déplacement de la lame sous l'objectif. Le condenseur est placé en position haute de façon à concentrer la lumière sur le champ observé, l'intensité de la lumière étant ajustée selon l'objectif utilisé. Le frottis sanguin doit être tout d'abord parcouru dans sa totalité au faible grossissement (X100), pour s'assurer de la qualité de l'étalement, de la coloration, et pour juger de la distribution des cellules

(Wintrobe M.M. *et al*, 1981). En général on recherche également la présence d'agglutinats de plaquettes ou de parasites sanguins dans les franges, de rouleaux de globules rouges (en dehors du corps du frottis où ces derniers sont ininterprétables), ceci entrant dans l'examen systématique d'un frottis sanguin (Cf. I/2.4.). Enfin on repère la zone de comptage où les globules rouges sont voisins sans cependant se toucher (Lord-Dube H., 1983). Le grossissement X400 est utilisé pour évaluer la forme et la taille des globules rouges, et avec un peu d'expérience pour faire une estimation de la quantité de leucocytes et de plaquettes (nombre plutôt normal, bas ou élevé) (Jain N.C., 1986).

Ce grossissement est insuffisant pour apprécier les détails morphologiques des cellules et par conséquent, la formule leucocytaire (ainsi que l'examen cytologique minutieux) doit s'établir avec un fort grossissement (X1000 avec l'objectif à immersion). Une goutte d'huile à immersion est pour ce faire déposée sur la lame, à l'endroit du frottis précédemment repéré comme la zone de lecture.

1.3. Nombre de cellules nécessaires pour le comptage

D'après tous les auteurs l'établissement de la formule nécessite le comptage d'une centaine de leucocytes au minimum. Le nombre conseillé varie d'une publication à l'autre entre 100 et 500. La précision augmente avec un grand nombre de cellules comptées mais le comptage devient alors fastidieux (cf. II/3.1.). Le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) fournissant les méthodes standard à suivre dans les laboratoires aux Etats-Unis, recommande de compter et classer systématiquement 200 cellules. Dans le cas où le sang serait leucopénique, il est souvent difficile de parvenir à trouver autant de leucocytes dans la zone de lecture. Il est donc nécessaire de faire un comptage additionnel avec un étalement sanguin supplémentaire (NCCLS, 1992).

Par ailleurs, il est intéressant de comparer l'intervalle de valeurs dites usuelles à la variation des résultats inhérente à l'imprécision de la méthode de comptage. De simples considérations statistiques permettent de conclure que l'imprécision liée au comptage de seulement 100 à 200 cellules peut à elle seule donner un intervalle de résultats aussi large que l'intervalle de valeurs usuelles (Rümke C.L. *et al*, 1975). Ceci est d'autant plus marqué que l'on s'intéresse à des cellules blanches dont le nombre est relativement faible dans la formule (basophiles notamment).

Il est surprenant de remarquer que malgré ces constatations et la précision nécessaire pour une interprétation fiable de la formule par le clinicien, le nombre conseillé de cellules à classer

n'ait pas augmenté : Dubreuil G. *et al* en 1950 recommandaient de compter 400 à 500 cellules contre 100 selon Pratt P.W. en 1998 par exemple. On peut tenter d'expliquer cela par deux hypothèses. La première est que la précision obtenue lorsqu'on augmente le nombre de cellules resterait insuffisante (cf. II/3.1.). La deuxième est que depuis l'apparition du typage automatisé des 5 types leucocytaires dans le milieu des années 70, l'intérêt trouvé dans la numération manuelle a changé, du moins en médecine humaine. Les appareils comptent des milliers de cellules et donc fournissent une bien meilleure précision pour le comptage différentiel que la méthode manuelle. Celle-ci tend à devenir un simple outil de validation des résultats anormaux donnés par les automates (Lantis K.L. *et al*, 2003).

1.4. Méthodes de déplacement au dessus de la lame

Toutes ces méthodes ont pour objectif commun d'éviter de repasser au même endroit et de compter deux fois la même cellule. On remarque une grande diversité des méthodes dites valables d'un ouvrage à l'autre et au sein d'une même publication, certains auteurs décrivent même plusieurs techniques possibles. Ainsi, Kerr M.G.(1989), explicite deux méthodes (comparables à 2 des 3 techniques décrites par Jain N.C.(1986)) :

- **la méthode en ligne droite** (*the straight line method*) consiste à parcourir des champs consécutifs selon une ligne droite à environ 5 mm du bord horizontal, en partant près de la queue et en s'éloignant.

- **la méthode en créneaux** (*the battlement method*) qui consiste à parcourir 3 champs le long du bord horizontal suivis de 2 champs allant vers le centre (qui donnent ainsi 3 champs horizontaux) puis 2 champs horizontaux et 2 champs verticaux remontant vers le bord et ainsi de suite, ceci limitant le comptage des cellules dans une zone de 1 mm au dessous du bord du frottis.

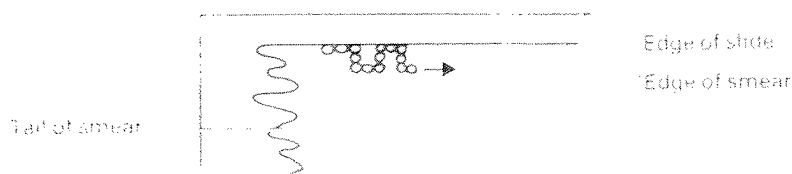


Figure 7 : la méthode en créneaux (*battlement method*) d'après Kerr M.G., 1989

La méthode en créneaux semble l'emporter dans la plupart des publications (et c'est elle que l'on retrouve dans la norme NCCLS, 1992). Cependant la technique précise est rarement décrite. Ainsi Lord Dube H. *et al* (1983) conseillent 3 méthodes en créneaux différentes que l'on peut décrire d'après les figures comme des créneaux dont les grandes lignes sont horizontales (la lecture se fait donc plutôt dans la longueur du frottis), une autre figure représentant une lecture plutôt dans la largeur du frottis, et enfin un trajet en marches d'escaliers s'éloignant d'un bord horizontal pour aller vers celui opposé. D'après les figures, la zone balayée ne comprendrait pas les bords.

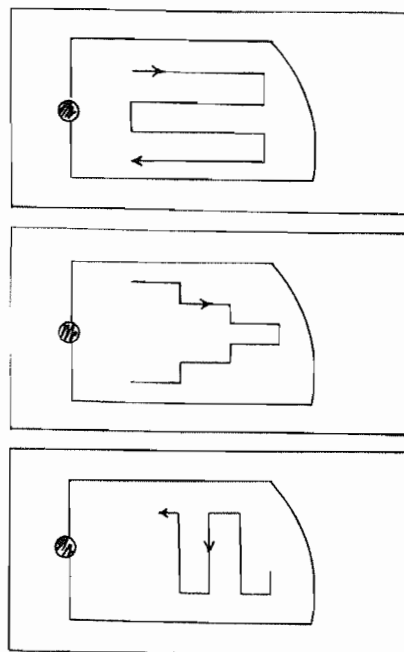


Figure 8 : les trois méthodes en créneaux de Lord-Dube H. *et al*, 1983.

On peut également citer la méthode en « palissades », la méthode des quatre champs de Schilling, la méthode en section transverse (*the cross sectional method*)... Les possibilités de balayage sont ainsi très nombreuses, le choix peut sembler difficile. Mais si la distribution des leucocytes est réellement hétérogène sur la lame, c'est alors surtout la zone balayée qu'il serait important de choisir.

2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les pourcentages établis lors du comptage des leucocytes sont multipliés par la concentration en leucocytes totaux. Les résultats de la formule leucocytaire que le clinicien interprète sont donc exprimés en concentrations (nombre de cellules/L) et non en pourcentages (cf. I/1.1.).

2.1. Intervalles de référence

2.1.1) Etablissement des intervalles de référence

Pour tout test de laboratoire, le clinicien doit comparer le résultat de l'analyse à un intervalle de référence. Pour chaque type leucocytaire, celui-ci se veut représentatif des valeurs physiologiques du chien en bonne santé. Il est obtenu à partir de l'étude d'un échantillon important d'individus. L'échantillonnage des animaux dans la population saine se base dans la plupart des cas sur l'absence de maladie apparente à l'examen clinique. Pour une précision acceptable, on considère qu'au moins 120 individus doivent être étudiés pour établir des intervalles de référence, le nombre nécessaire minimum étant généralement de 40 (Thrall M.A., 2004). L'intervalle de référence est souvent choisi comme l'intervalle central comprenant 95% des résultats. La limite supérieure comme la limite inférieure excluent donc dans ce cas 2,5% des valeurs trouvées chez des animaux en bonne santé (Rümke C.L. *et al*, 1975). Ces limites ne permettent donc pas de faire une distinction stricte entre bonne santé et maladie, puisque 5% des animaux en bonne santé ne sont pas dans l'intervalle de référence (Knoll J.S. *et al*, 1996). Cependant, les courbes de résultats des animaux sains et non sains se chevauchent à leurs extrémités. Exclure 5% des valeurs trouvées chez des animaux sains pour établir l'intervalle de référence permet d'exclure les valeurs d'animaux potentiellement « non sains » de celui-ci. Ainsi, limiter l'intervalle de référence à 95% des valeurs obtenues est un compromis qui rend le test plus sensible pour la détection des animaux « non sains » (Gerstman B.B., 1986 ; Thrall M.A., 2004).

On peut constater des divergences selon les auteurs. Ces désaccords proviennent de plusieurs types de variations : le choix de la population d'animaux dits normaux (prise en compte ou non des variations physiologiques liées à la race, à l'âge et au sexe, au mode de vie, à la

gestation...), le nombre d'individus de l'échantillon, les conditions dans lesquelles est réalisée la collecte, les erreurs analytiques dépendant de la méthode de numération... Ainsi, en ce qui concerne les appareils de comptage automatisé, les valeurs de référence doivent être données par les fabricants. Mais un praticien réalisant une formule manuelle pourra se sentir désorienté face aux différentes valeurs limites proposées par les publications d'hématologie. De plus la méthode manuelle utilisée dans l'établissement de ces résultats est rarement mentionnée dans les manuels, notamment le nombre de cellules comptées, la zone de lecture sur le frottis, la méthode de balayage. La précision du comptage augmente ainsi avec le nombre de cellules comptées mais un intervalle de référence obtenu à partir de numérations de 1000 cellules par exemple ne peut pas être en théorie utilisé par le praticien qui se contentera d'une numération de 100 cellules (Rümke C.L. *et al*, 1975). Un autre facteur influençant les valeurs de référence est la méthode statistique de détermination de l'intervalle : lorsque la distribution des résultats est gaussienne, celui-ci est représenté par l'étendue des valeurs selon deux SD (*standard deviation* ou écart-type) autour de la moyenne.

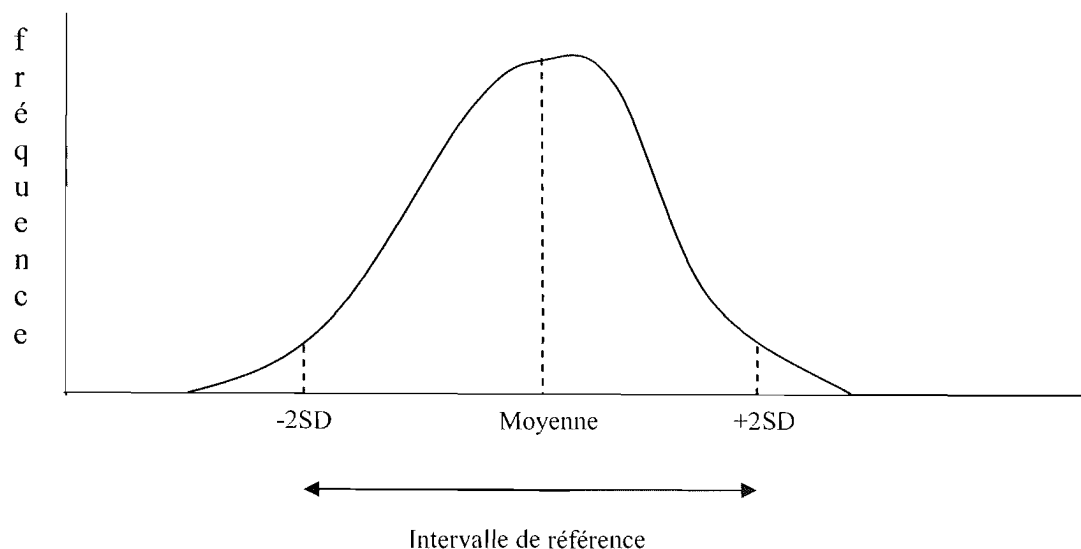


Figure 9 : Courbe des résultats d'un test pour des animaux sains et construction de l'intervalle de référence.

Mais les résultats ne sont pas toujours distribués de façon « normale » et il est alors nécessaire de faire une analyse statistique utilisant des tests non-paramétriques plus complexes (Knoll J.S., 1996). Par exemple, la distribution des résultats de comptage des éosinophiles n'est pas gaussienne (les valeurs s'étendent plus du côté droit sur l'histogramme) ce qui expliquerait notamment les différences observées pour la limite supérieure de l'intervalle de référence (Tvedten H.W., 1981 ; Lilliehöök I., 2003). De plus, la détermination de l'intervalle dépend également de la prise en compte ou non pour le calcul des valeurs extrêmes éloignées des autres. Celles-ci élargissent l'intervalle de référence et rendent le test moins sensible pour la détection des animaux malades, c'est pourquoi elles sont parfois exclues (Thrall M.A., 2004). Enfin, le praticien vétérinaire sera bien souvent confronté à des difficultés d'interprétation de résultats obtenus par des laboratoires d'hématologie humaine. La numération automatisée est peu fiable puisque les appareils sont calibrés pour l'espèce humaine, et la méthode manuelle dépend de l'expérience du laborantin vis-à-vis de l'espèce canine. En effet la morphologie des cellules sanguines chez l'espèce canine présente quelques particularités et les fluctuations physiologiques et pathologiques du leucogramme des carnivores ne s'interprètent pas toujours de la même manière que celles du leucogramme humain (Crespeau F., 1981). En aucun cas les valeurs usuelles fournies sur les feuilles de résultats de ces laboratoires ne sauraient correspondre aux valeurs usuelles attendues dans une espèce différente de l'Homme.

2.1.2) Valeurs usuelles des leucocytes circulants

Les valeurs normales de l'hémogramme du chien en bonne santé sont données par de nombreux auteurs mais l'ouvrage de référence est bien souvent le « Schalm's veterinary hematology » (Jain N.C., 1986). Ainsi le tableau 2 donne les valeurs usuelles chez le chien adulte (âgé de un à huit ans) d'après Jain N.C., 1986 en caractères gras et celles données par Crespeau F., 1981 et Sodikoff C.H., 1995. Les moyennes et valeurs extrêmes sont exprimées en unités internationales (10^9 cellules/l de sang).

	Valeur moyenne ($10^9/L$)	Valeurs extrêmes ($10^9/L$)	pourcentages
<u>Leucocytes :</u>			
- Jain N.C., 1986	11,5	6 - 17	
- Crespeau F., 1981	11,54	5-18	
- Sodikoff C.H., 1995		6 - 15	
<u>Granulocytes neutrophiles :</u>			
- Jain N.C., 1986	7,5	3 - 11,8	60 à 80%
- Crespeau F., 1981	7,8	2,5 -12,5	40 à 80%
- Sodikoff C.H., 1995		3 – 11,5	
<u>Granulocytes éosinophiles :</u>			
- Jain N.C., 1986	0,6	0,1 - 1,3	2 à 10 %
- Crespeau F., 1981	0,64	0 – 3	0 à 20%
- Sodikoff C.H., 1995		0,1 - 1	
<u>Granulocytes basophiles :</u>			
- Jain N.C., 1986	Rares	Rares	Rares
- Crespeau F., 1981	0,05	0 – 0,3	0 à 2%
- Sodikoff C.H., 1995		0 – 0,1	
<u>Lymphocytes :</u>			
- Jain N.C., 1986	2,8	1 - 4,8	12 à 30 %
- Crespeau F., 1981	2,49	0,5 – 4,8	10 à 34 %
- Sodikoff C.H., 1995		1,5 - 5	
<u>Monocytes :</u>			
- Jain N.C., 1986	0,7	0,1 - 1,3	3 à 10 %
- Crespeau F., 1981	0,6	0 – 1,6	0 à 13%
- Sodikoff C.H., 1995		0 - 2	

Tableau 2 : valeurs usuelles du leucogramme du chien adulte (Jain N.C., 1986 ; Crespeau F., 1981 ; Sodikoff C.H., 1995)

2.2. Variations physiologiques dans l'espèce canine

2.2.1) Liées à l'état comportemental

Dans l'espèce canine, les principales variations physiologiques sont dues à l'excitation ou la peur que peut présenter l'animal pendant la prise de sang, ce qui influence de façon notable les concentrations de leucocytes circulants (Guelfi J.-F *et al*, 1994). En effet l'excitation (qui augmente la concentration sanguine d'adrénaline) entraîne la libération des granulocytes notamment neutrophiles, accolés à la paroi vasculaire. Ainsi ce compartiment dit marginé représente environ un tiers du compartiment sanguin total et peut être immédiatement mobilisé en cas d'excitation ou d'effort brutal, ce qui peut donc se traduire par une neutrophilie dite physiologique. De plus les mêmes stimuli peuvent provoquer une splénocontraction libérant une quantité supplémentaire de globules rouges, de leucocytes et de plaquettes (Crespeau F., 1981). Enfin un stress prolongé (qui augmente la concentration en cortisol circulant) diminue la sortie des neutrophiles vers le secteur tissulaire et favorise leur mobilisation du secteur médullaire vers le secteur circulant. Il est donc nécessaire de réaliser dans la mesure du possible la prise de sang sur un animal calme et au repos et de tenir compte dans le cas contraire de l'état comportemental du chien lors de l'interprétation des résultats du leucogramme.

2.2.2) Liées à l'âge

Le nombre de globules blancs est plus élevé à la naissance (en moyenne $16.10^9/l$) et diminue progressivement jusqu'à la valeur habituellement observée chez l'adulte (en moyenne $11.10^9/l$) vers l'âge de six ou sept mois (c'est-à-dire l'âge de la puberté pour les races de chien de taille moyenne comme les Beagles utilisés dans de nombreuses études). D'après les pourcentages de la formule leucocytaire, on peut constater que c'est plus particulièrement la population lymphocytaire qui est plus importante chez le jeune que chez l'adulte : les lymphocytes représentent 32 à 45% des leucocytes chez le chien de un à trois mois contre 12 à 20% chez le chien de plus de sept mois (Groulade P. *et al*, 1983).

2.2.3) Liées au sexe

Il ne semble pas exister de différence significative entre les individus mâles et femelles (Navaron H., 2002). Cependant pendant la gestation, la chienne présente une nette augmentation de sa population leucocytaire qui atteint environ $19.10^9/l$ au moment du terme, à la huitième semaine de gestation (Andersen A.C. *et al*, 1958). Cette augmentation des globules blancs circulants est due essentiellement à celle des polynucléaires neutrophiles qui diminue ensuite progressivement au cours de la lactation.

2.2.4) Liées à la race

Là encore il ne faut pas oublier que les chiens utilisés dans la plupart des études et notamment celles établissant des valeurs usuelles sont bien souvent des Beagles. D'après Navaron H. (2002), les Labradors et les Golden Retrievers possèdent des proportions de neutrophiles inférieures et de lymphocytes supérieures aux chiens d'autres races.

Ainsi la grande variabilité des valeurs physiologiques de la population leucocytaire impose au clinicien une grande prudence : seuls les écarts nettement grands aux valeurs usuelles seraient aisément interprétables (Jongh O., 1993).

2.3. Variations pathologiques

On s'intéresse ici uniquement aux modifications anormales de la formule leucocytaire c'est-à-dire aux variations en nombre des leucocytes circulants, sachant que seules les valeurs en nombres absolus sont interprétables. Le nombre total et différentiel de globules blancs est utile pour déterminer la cause, la sévérité, la durée, le pronostic d'un processus pathologique ou encore pour vérifier l'absence d'anomalie (lors d'un bilan pré-anesthésique ou lors d'une chimiothérapie par exemple).

Cependant l'interprétation de ces résultats se fait en parallèle avec de nombreux autres paramètres comme toute démarche diagnostique : les commémoratifs de l'animal, l'examen clinique, le reste de l'hémogramme et les résultats d'autres examens complémentaires éventuels (Dunn J., 2000). Notamment lors de l'établissement de la formule leucocytaire, le praticien s'attardera à observer la morphologie des cellules sanguines qui tient une place

prépondérante dans l'interprétation d'un hémogramme et qui permet bien souvent de préciser toute modification en nombre des globules rouges ou blancs.

Par ailleurs les limites des intervalles de référence choisies ici sont celles données dans l'ouvrage d'hématologie vétérinaire « Schalm's veterinary hematology » (Jain N.C., 1986). Ces valeurs ne sont pas toujours les mêmes d'un ouvrage à l'autre et le praticien peut être amené à des difficultés d'interprétation de résultats se rapprochant de ces limites. Dans ces cas là en particulier ils seront à confronter avec le reste des observations afin de déterminer si ces faibles variations sont significatives ou non d'un phénomène pathologique.

2.3.1) Variations du nombre de granulocytes neutrophiles

- Neutrophilie

Une neutrophilie est une augmentation du nombre de granulocytes neutrophiles au-delà de $11,8 \cdot 10^9/l$ chez le chien. Elle s'observe lors d'une augmentation de la production médullaire, de la libération augmentée des neutrophiles du secteur de réserve vers le secteur circulant, du passage des neutrophiles du secteur marginé vers le secteur circulant ou encore lors d'une diminution des sorties vers le secteur tissulaire.

Elle caractérise la plupart des phénomènes inflammatoires aigus ou chroniques, sachant que l'augmentation est généralement plus notable dans les cas aigus (Dunn J, 2000). On peut citer, parmi les causes de neutrophilie inflammatoire d'origine infectieuse (surtout bactérienne) chez le chien, des abcès divers, les pyomètres, pyélonéphrites, pleurésies, une maladie générale comme la leptospirose (Guelfi J.-F., 1981). Parmi les causes non infectieuses on trouve des maladies immunitaires (lupus érythémateux disséminée, polymyosite...), certaines chirurgies (dégâts tissulaires importants, stress), les nécroses tissulaires, les hémorragies, les hyperhémolyses (s'accompagnant d'une déviation de la courbe d'Arnet à gauche), les pancréatites aiguës... Les corticoïdes, d'origine endogène (hypercorticisme) ou exogène (corticothérapie) sont responsables d'une neutrophilie par la combinaison de plusieurs phénomènes : ils entraînent une diminution de la migration hors des vaisseaux et une augmentation de la libération des réserves médullaires. A long terme on observe aussi une augmentation de la production (Kerr M.G., 2002). Enfin, une neutrophilie peut être le signe d'un phénomène néoplasique (par exemple lors de leucémie myéloïde chronique) ou paranéoplasique (fibrosarcome, lymphosarcome...) (Lanore D., 1998).

- Neutropénie

Une neutropénie est une diminution du nombre de granulocytes neutrophiles au dessous de $3.10^9/l$ chez le chien.

Elle s'observe essentiellement lors de diminution de la multiplication et de troubles de la maturation médullaire (granulopoïèse), lors de diminution de la durée de vie des neutrophiles ou de l'augmentation de leur sortie vers le secteur tissulaire.

Les neutropénies sont les causes les plus fréquentes de leucopénie chez les carnivores domestiques. Parmi les causes de diminution de la durée de vie des polynucléaires neutrophiles on trouve le plus souvent des infections bactériennes dans leur phase aiguë, particulièrement celles associées à des phénomènes septiques et endotoxémiques dus aux bactéries Gram négatives, et plus rarement les neutropénies d'origine auto-immune. La neutropénie s'accompagne alors d'une déviation sévère de la courbe d'Arneth à gauche (cf. Annexe 1, 3.1.1.). Si l'animal survit à cette phase aiguë, la neutropénie est généralement suivie dans les trois à quatre jours d'une neutrophilie (Dunn J., 2000). Les neutropénies par diminution ou perturbation de la granulopoïèse sont observées lors de la phase aiguë de certaines infections virales telle que la parvovirose canine, l'hépatite de Rubarth et la maladie de Carré. Les aplasies médullaires peuvent survenir lors d'hyperoestrogénisme (œstrogènes d'origine exogène ou endogène tumorale : tumeur ovarienne, Sertolinome), de chimiothérapie (notamment avec la cyclophosphamide ou l'adriamycine), de réaction idiosyncrasique à certains antibiotiques ou encore d'infection chronique à *Ehrlichia canis*. Enfin la maturation granulocytaire peut être perturbée par infiltration médullaire de cellules tumorales notamment lors d'hémopathies malignes, de myélofibroses ou de métastases médullaires (Lanore D., 1998).

2.3.2) Variations du nombre de granulocytes éosinophiles

- Eosinophilie

Une éosinophilie est une augmentation du nombre de granulocytes éosinophiles au dessus de $1,3.10^9/l$. On l'observe dans la plupart des réactions d'hypersensibilité ou lors d'infestation parasitaire importante. L'éosinophilie observée lors de parasitisme est d'ailleurs une réaction d'hypersensibilité aux protéines libérées par le parasite. On peut citer *Ankylostoma* spp., *Oslerus osleri*, *Angiostrongylus vasorum*, *Dirofilaria immitis*. L'éosinophilie est plus

fréquemment observée lors de migrations des nématodes dans les tissus que lorsqu'ils sont localisés dans l'intestin (Meyer D.J. *et al*, 1998). Certaines réactions d'hypersensibilité ou à médiation immune telles que l'allergie aux piqûres de puces, l'allergie alimentaire, certaines bronchopneumonies allergiques et le pemphigus foliacé peuvent parfois être associées à une éosinophilie. En ce qui concerne les phénomènes tumoraux, l'éosinophilie rencontrée dans certains fibrosarcomes, lymphosarcomes intestinaux, carcinomes mammaires et mastocytomes est un phénomène paranéoplasique, contrairement à la leucémie à éosinophiles qui est une tumeur proliférative maligne. Enfin l'augmentation des éosinophiles se retrouve dans certaines affections mal connues telles que la gastroentérite éosinophilique, certaines myosites, la panostéite éosinophilique des chiens de grande race en croissance, lors de l'oestrus de quelques chiennes (Dunn J., 2000), ou encore lors de syndrome hyperéosinophilique qui est un phénomène chronique idiopathique. On parle d'hyperéosinophilie lorsqu'on constate une forte augmentation du nombre d'éosinophiles : au-delà de $5.10^9/L$, la cause la plus fréquemment associée variant considérablement avec la zone géographique (Lilliehöök I. *et al*, 2003).

- Eosinopénie

Une éosinopénie est une diminution du nombre de granulocytes éosinophiles au dessous de $0,1.10^9/l$. C'est un phénomène classique lorsque la cortisolémie augmente (notamment lors de stress physique ou émotionnel). En effet, ces derniers entraînent une diminution de la concentration en histamine dans le sang ce qui réduit la libération des éosinophiles du secteur médullaire vers le secteur vasculaire et qui à long terme réduit également la production (Kerr M.G., 2002). Ainsi une éosinopénie peut apparaître lors d'hypercorticisme et de corticothérapie mais aussi lors de tout stress chronique causé par la douleur dans des phénomènes aigus infectieux, inflammatoires ou métaboliques variés. On parle également de stress lors d'exercice physique intense et prolongé en particulier l'entraînement à la course des lévriers. Il faut cependant noter que les éosinopénies sont rarement mises en évidence lors du comptage manuel puisque les valeurs usuelles sont relativement basses (Zinkl J.G., 1981).

2.3.3) Augmentation du nombre de granulocytes basophiles : basophilie

Les basophiles étant présents en très faible nombre dans le sang des chiens en bonne santé, leur diminution n'a pas de signification clinique. Seule une basophilie peut être observée, c'est-à-dire une augmentation au dessus de $0,3.10^9/l$. Il est par ailleurs conseillé d'objectiver cette augmentation par plusieurs numérations successives (Jongh O., 1993). Celle-ci est souvent associée à une éosinophilie et plus particulièrement lors de Dirofilariose pour laquelle l'augmentation du nombre de basophiles est assez caractéristique. L'apparition importante de basophiles circulants a été également signalée dans certains désordres allergiques (respiratoires, cutanés) et à la suite de l'administration de médicaments (héparine...) ou lors d'hypercorticisme (Wilkes R.D. *et al*, 1980). Les leucémies à basophiles et l'hyperprotéïnémie chronique sont des causes beaucoup plus rarement mises en évidence.

2.3.4) Variations du nombre de lymphocytes

- Lymphocytose

Une lymphocytose est une augmentation du nombre de lymphocytes au dessus de $4,8.10^9/L$. C'est un phénomène qu'on observe lors de stimulation antigénique (infections chroniques telles que : ehrlichiose, toxoplasmose, pneumonie...) de maladie auto-immune ou d'insuffisance surrénalienne (hypocorticisme s'accompagnant d'une lymphocytose dans moins d'un quart des cas). Cependant l'augmentation en nombre absolu est rarement très élevée (Kerr M.G., 2002). Une lymphocytose marquée est plus souvent la conséquence de pathologies néoplasiques telle que lymphosarcome, leucémies lymphoïdes ou thymome.

- Lymphopénie

Une lymphopénie est une diminution du nombre de lymphocytes au dessous de $1.10^9/L$. C'est une observation plus fréquente que la lymphocytose, elle résulte en général d'une diminution ou d'une altération de la production. Ainsi l'augmentation de la concentration plasmatique de corticoïdes (stress, corticothérapie, hypercorticisme), les infections bactériennes (s'accompagnant également d'une neutropénie) ont tendance à provoquer une lymphopénie plus ou moins marquée (Kerr M.G., 2002). Certains agents pathogènes (virus de la maladie de Carré, de la parvovirose) induisent directement une atrophie ou une destruction des tissus

lymphoïdes (Jongh O., 1993). Lors de phénomène néoplasique, elle peut être due à une destruction de l'architecture ganglionnaire (lymphosarcome ganglionnaire) ou à une fuite de lymphes (lymphosarcome intestinal).

2.3.5) Augmentation du nombre de monocytes : monocytose

De même que pour les basophiles, une diminution du nombre de monocytes dans le sang (monocytopenie) n'a pas de réelle signification clinique. On s'intéresse donc ici à la monocytose qui est une augmentation du nombre de monocytes au dessus de $1,3 \cdot 10^9/l$. La monocytose est typiquement une caractéristique de la réponse inflammatoire subaiguë à chronique, particulièrement celle impliquant suppuration, nécrose (phagocytose importante) ou réaction granulomateuse (Dunn J., 2000). Celle-ci s'accompagne généralement d'une neutrophilie. Chez le chien, elle fait également partie de la « formule de stress » (avec neutrophilie, lymphopénie et éosinopénie) consécutive à l'augmentation de la concentration de glucocorticoïdes circulants. Occasionnellement elle pourrait être le seul signe hématologique lors de bactériémie ou d'endocardite bactérienne (Morgan R.V., 1997). Enfin une monocytose marquée sera évocatrice d'un phénomène tumoral, notamment lors de leucémie de la lignée monocyttaire mais aussi lors de nombreuses tumeurs malignes (notamment les larges tumeurs au centre nécrotique).

Les variations quantitatives de la population leucocytaire circulante sont étudiées grâce à la classique « numération - formule » sanguine, qui représente l'un des examens complémentaires les plus utilisés. Cependant cet examen est rarement pathognomonique d'une maladie et la diversité des causes de variations quantitatives des leucocytes rend son interprétation difficile. L'observation au microscope de la morphologie des éléments cellulaires concernés est ainsi indispensable pour une analyse correcte des données chiffrées et revêt une importance similaire à celle de l'anamnèse et de l'examen clinique.

3. IMPRECISION DE LA FORMULE LEUCOCYTAIRE MANUELLE

La formule leucocytaire établie par lecture d'un frottis sanguin est un test utilisé dès le début du siècle. Barnett C.W., 1933 souligne déjà à cette époque qu'il s'agit d'une des méthodes quantitatives les plus incertaines utilisées en médecine. De nombreux auteurs s'interrogent dès lors sur les raisons d'une telle imprécision et ce jusqu'à l'avènement des méthodes automatisées vers 1975.

La numération leucocytaire manuelle présente comme tout autre test une imprécision analytique inhérente à la méthode utilisée. Son manque de standardisation s'explique par la difficulté de contrôler de nombreux facteurs de variation intervenant tout au long de sa réalisation. Il est possible de regrouper ces facteurs selon trois catégories : l'erreur d'échantillonnage, l'erreur mécanique et l'erreur d'interprétation de la morphologie cellulaire (Barnett C.W., 1933 ; Simmons A. *et al*, 1973 ; Humbert F., 1983).

3.1. Erreur d'échantillonnage

L'erreur d'échantillonnage ou encore « l'erreur due au hasard » est l'erreur minimale inhérente à la méthode. Elle dépend de l'échantillon (les cellules comptées sur le frottis) que l'on considère comme une partie représentative de l'ensemble étudiée (les cellules sanguines circulantes) (Bouyer J., 1996). On considère que l'échantillon est choisi au hasard, et que les proportions notés p de chaque type leucocytaire suivent la loi normale. L'écart – type (ou standard deviation noté SD), utilisé pour quantifier l'imprécision s'écrit alors :

$$SD = \sqrt{(pq/n)} \quad \text{avec :}$$

p = proportion d'un type leucocytaire ($0 < p < 1$)

q = proportion des autres types leucocytaires ($q = 1 - p$)

n = nombre de cellules comptées (avec $n > 30$)

(Barnett C.W., 1933 ; England J.M., 1976, Humbert F., 1983).

L'intervalle de confiance comprenant 95% des valeurs est alors de $m \pm 1.96SD$ avec m la moyenne des résultats (on choisit souvent la formule approchée $m \pm 2SD$). Ainsi pour un échantillon sanguin contenant par exemple 20% de lymphocytes, un grand nombre de frottis avec identification de 100 cellules est réalisé. En théorie, 95% des résultats devraient être compris entre 12 et 28% de lymphocytes.

Ceci est l'erreur minimale car on se place dans le cas idéal où :

- (1) La composition en cellules blanches du frottis est représentative des proportions existant dans le sang
- (2) les cellules identifiées sont un échantillon représentatif des proportions existant dans le frottis
- (3) les cellules sont correctement identifiées (Rümke C.L., 1977).

De plus cette erreur est d'autant plus importante qu'on étudie une proportion extrêmement petite d'un ensemble composé d'un très grand nombre d'unités (Barnett C.W., 1933). L'imprécision d'un comptage de 100 cellules est telle que l'étendue de l'intervalle comprenant 95% des résultats est parfois plus grande que celle de l'intervalle de référence (Rümke C.L. *et al*, 1975). La variation étant inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre de cellules comptées, il faut compter quatre fois plus de cellules pour doubler la précision (Humbert F., 1983).

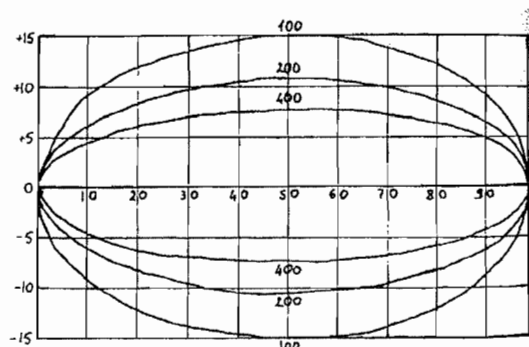


Figure 10 : Erreur maximale due uniquement au hasard lors de formules leucocytaires effectuées sur 100, 200 ou 400 cellules (Humbert F., 1983).

Et même dans ce cas, l'intervalle à 95% calculé reste assez large et l'on peut supposer que les erreurs d'identification de cellules augmentent (England J.M., 1976 ; Mathé G. *et al*, 1960, Rümke C.L., 1977). Cette insuffisance statistique est d'autant plus notable pour les classes leucocytaires faiblement représentées. La méthode manuelle ne permet alors une interprétation clinique que lors d'une forte augmentation de leur nombre (Flandrin G. *et al*, 1993). De même, selon les statistiques et pour un comptage de 100 cellules, la détection de cellules atypiques ne se fera dans 95% des cas que si leur nombre est supérieur ou égal à 5% (Rümke C.L., 1985).

Les appareils d'hématologie donnant une formule leucocytaire automatisée présentent ainsi un net avantage. Le comptage d'un très grand nombre (plusieurs milliers voire dizaine de milliers) de cellules en suspension permet alors de diminuer de façon notable l'imprécision d'échantillonnage. En appliquant la formule ci-dessus au comptage de 10000 cellules par

exemple, pour un échantillon sanguin contenant 20% de lymphocytes, 95% des résultats donnés par l'automate seront compris entre 19,2 et 20,8%.

3.2. Erreur de l'observateur

L'identification du type leucocytaire au cours du comptage manuel est uniquement basée sur l'interprétation de la morphologie des cellules colorées faite par l'observateur.

En pratique les résultats de numérations leucocytaires réalisées sur un grand nombre de frottis d'un même échantillon sanguin donnent des intervalles à 95% plus larges que les intervalles théoriques. Rümke C.L., 1977, suppose que les différences d'identification des cellules d'un observateur à l'autre sont certainement la principale raison de cette imprécision supplémentaire. Barnett C.W., 1933 considérait la magnitude de ce deuxième type d'erreur comme entièrement dépendant du jugement de l'observateur. Cette magnitude serait d'ailleurs constante si la même personne effectuait toutes les lectures (Humbert F., 1983).

Dans les conditions physiologiques, le polymorphisme des monocytes et leur sensibilité aux artefacts de l'étalement (notamment séchage) amènent parfois à des erreurs d'identification (Flandrin G. et al, 1993 ; Banks W.J., 1986). Dans les conditions pathologiques, les formes immatures de neutrophiles et de lymphocytes modifiés seraient sources d'erreur même pour un observateur expérimenté (Pierre R.V., 1985). Cependant l'imprécision due à l'observateur, lorsqu'elle est considérée indépendamment des autres erreurs, serait d'une importance relativement faible par rapport à l'erreur d'échantillonnage et à l'erreur mécanique (Simmons A. *et al*, 1973).

3.3. Erreur mécanique

Les facteurs responsables de cette erreur sont aujourd'hui encore très mal connus. S'ils interviennent dans l'imprécision de la formule leucocytaire c'est parce qu'ils entraînent une distribution hétérogène des différents types de leucocytes dans l'étalement sanguin. Ainsi les cellules identifiées ne seraient pas toujours représentatives des proportions existant dans le frottis entier (cf. II/ 3.1.). MacGregor R.G.S., 1940 observe que le choix de la méthode de lecture et notamment de la zone de comptage influe sur le résultat, conséquence logique d'une répartition hétérogène des cellules blanches. Celui-ci a en effet comparé la méthode en créneaux avec les bords, la méthode en ligne droite 5 mm au dessous des bords et la méthode en lignes transversales partant des bords et plongeant dans le corps du frottis (Cf. fig.11). Il a

ainsi constaté que plus la lecture suivait les bords plus la proportion de neutrophiles était forte et celle des lymphocytes faible.

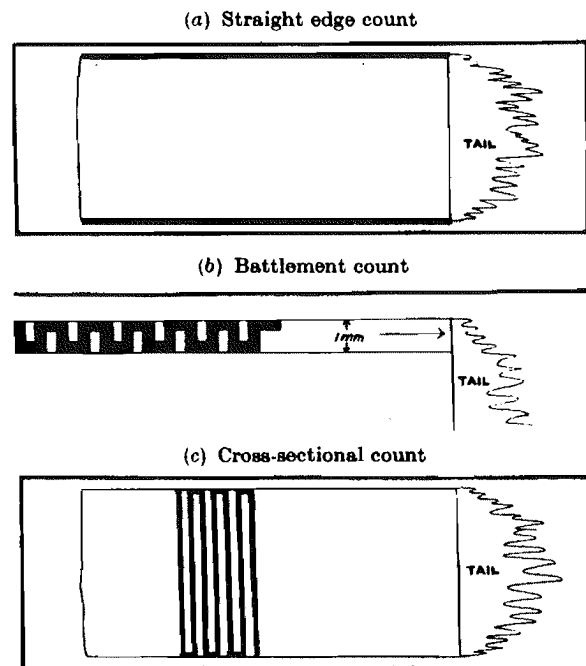


Figure 11 : les trois méthodes de lecture étudiées par MacGregor R.G.S., 1940.

De même, Humbert F. (1983), étudie la répartition des différents types leucocytaires sur des étalements de sang de chien subdivisés en trois zones : la queue, les bords et le corps du frottis. Les GNN, les GNE et les monocytes occupent préférentiellement les bords du frottis ; les lymphocytes prédominent dans le centre de l'étalement.

Parmi les nombreux facteurs de variation responsables de cette distribution hétérogène on peut citer :

- la qualité du sang : MacGregor R.G.S (1940) en étudiant la distribution cellulaire sur un grand nombre de frottis entiers conclue au rôle déterminant de la taille des cellules. Ainsi les « grosses cellules » comme les polynucléaires prédominent sur les extrémités du frottis (bords et queue) alors que les « petites cellules » telles que les lymphocytes se trouvent plus nombreuses dans le corps du frottis. Davidson E. (1958) étudia la répartition de cellules issues de sangs leucémiques sur quatre frottis entiers. Il conclue de la même manière que les facteurs principaux influençant la distribution cellulaire sont la gravité et le volume du type de leucocytes. Par ailleurs, la répartition de ces grandes et petites cellules affecterait la distribution en relation avec les tensions de surface du fluide environnant, c'est-à-dire le plasma, et la tension interfaciale entre les cellules (MacGregor R.G.S., 1940). Selon ces

hypothèses, on peut donc supposer que la distribution des leucocytes varierait lors de modification de la protéinémie (celle-ci conditionnant la viscosité du plasma) ou lors de modification de la concentration en globules rouges (polycythémie, anémie) ou blancs (leucocytose, leucopénie).

- la façon de faire le frottis (temps de contact de la goutte de sang sur la lame, temps de contact de la goutte avec la lame rodée, vitesse et angle pour l'étalement...).

Certains auteurs associent la distribution inégale des leucocytes sur la lame avec un frottis trop épais (Seybold I.M. *et al*, 1980) ou un temps de contact trop grand entre les deux lames lors de l'étalement (Kidd R., 1991). En effet dans ces cas de figures, les grosses cellules auraient le temps de migrer vers les bords avant d'être « fixer » par le séchage.

Par ailleurs, lors de l'étalement certaines cellules sont trop modifiées pour être identifiées. Si un type leucocytaire est préférentiellement touché, la formule leucocytaire sera alors faussée. Ainsi, les GNN et les monocytes seraient plus sensibles aux forces de traction appliquées lors de l'étalement que les lymphocytes (Humbert F., 1983).

En ce qui concerne les monocytes, leur répartition est difficilement définie. Selon les auteurs, elle serait homogène dans tout l'étalement (Jain N.C., 1986) ou hétérogène avec une plus grande proportion sur les bords (Humbert F., 1983) ou encore dans les franges (Lord-Dube H. *et al*, 1983). En raison d'une très grande variation des résultats pour cette catégorie leucocytaire dans les techniques manuelles, Benattar L. *et al* (1999) ont étudié l'influence de l'étalement. Ainsi, le pourcentage de monocytes serait plus bas pour les frottis étalés lentement (mais la méthode et notamment la zone de lecture n'est pas précisée).

Pour certains auteurs (Barnett C.W., 1933 ; Mainland D. *et al*, 1935) cette erreur mécanique, comme l'erreur d'interprétation de la morphologie cellulaire, est cependant négligeable devant l'imprécision due à l'échantillonnage. Les facteurs responsables d'une irrégularité de la distribution cellulaire dans la zone du frottis examinée seraient par ailleurs difficilement contrôlables. C'est pourquoi l'erreur globale est souvent confondue avec l'erreur d'échantillonnage calculée statistiquement. Ainsi la norme NCCLS (1992) se base essentiellement sur les considérations théoriques de Rümke C.L., 1977 (Cf. II/ 3.1.). Aucune mention n'y est faite sur une éventuelle distribution hétérogène des leucocytes dans le frottis au contraire de certains ouvrages d'hématologie (Jain N.C., 1986 ; Lord Dube H. *et al*, 1983 ; Mills J.N., 1998). En regard de l'importance de cette erreur d'échantillonnage, qualifiée d'« insuffisance statistique » par Flandrin G. *et al* (1993), la formule leucocytaire automatisée présente un net avantage.

4. L'AUTOMATISATION EN HEMATOLOGIE

Sans être totalement mis à l'écart, le microscope a laissé la place dans les laboratoires d'hématologie humaine à des automates de plus en plus performants à partir des années 1965 pour la numération globulaire et 1975 pour la formule leucocytaire (Triadou P., 2000). La précision et l'utilité clinique de ces appareils en ce qui concerne la numération des leucocytes, aussi bien totale que différentielle, ont été validées par de nombreuses études. Ainsi leur popularité a beaucoup grandi depuis quelques années et continuera de le faire dans les années à venir (Lantis K.L. *et al*, 2003 ; Hyun B.H. *et al*, 1991). La majorité d'entre eux fournissent actuellement une numération des 5 types de leucocytes voire 6 types avec les granulocytes immatures. Ainsi en hématologie humaine la méthode de comptage manuelle, laborieuse et peu précise, est devenue un outil de vérification des échantillons sanguins déclenchant une alarme par les logiciels intégrés aux automates. Les laboratoires qui appliquent ce type de stratégie démontrent que 70 à 80% des échantillons ne présentent pas d'alarme et qu'un contrôle cytologique est donc inutile lorsque les paramètres quantitatifs sont normaux (Quaranta J.F. *et al*, 1990). Cependant ces appareils sont calibrés pour une espèce donnée, les automates d'hématologie humaine ne peuvent être utilisés pour la formule leucocytaire du chien sans un logiciel adapté. Les laboratoires vétérinaires, lorsque la décision d'investir est prise, peuvent s'équiper d'analyseurs hématologiques adaptés à différentes espèces animales. Mais ces automates ne fournissent pas à l'heure actuelle de numération leucocytaire différentielle aussi complète et fiable qu'en humaine. La formule sanguine automatisée chez le chien est bien souvent une formule à 3 types leucocytaires (monocytes, lymphocytes et granulocytes avec parfois une estimation des éosinophiles) qui est pour de nombreux auteurs une simple approche de la formule leucocytaire. L'examen microscopique resterait à l'heure actuelle indispensable pour établir la formule sanguine (Dewhurst E.C. *et al*, 2003 ; Guelfi J.F. *et al*, 1995).

4.1. Principe de fonctionnement des appareils automatisés

4.1.1) L'analyse d'image

Les premiers systèmes de microscopes automatisés sont apparus dans les années 1960. Ils permettent une analyse morphologique des cellules sur la base d'algorithmes traités par informatique (Houwen B., 2001). Ils constituent un ensemble associant à un microscope un micro-ordinateur capable de classer les cellules en les comparant à des modèles prédéfinis (Wintrobe M.M. *et al*, 1981). La préparation des lames et la coloration nécessaires sont précisées par le fabricant. Ces appareils classent ainsi automatiquement les 5 voire 6 types leucocytaires et sélectionnent les cellules anormales pour un contrôle manuel (Rosvoll R.V. *et al*, 1979). Bien qu'ils soient deux à cinq fois plus rapides que les méthodes manuelles, ce sont des systèmes nécessitant presque toujours un opérateur et dont la précision reste modeste compte tenu du nombre limité de cellules analysées et identifiées pour la formule leucocytaire (pour une question de temps, ils sont généralement réglés pour compter une centaine de cellules). Par ailleurs, de même que pour le comptage manuel, les résultats des comptages sont fonction de la distribution des cellules dans le frottis sanguin et du choix de la zone de lecture, ce qui amène à envisager sa détection précise sur la base d'un algorithme, intégré au système sous forme de logiciel informatique (Angulo J. *et al*, 2003). Compte tenu du développement d'autres techniques de numération plus performantes pour les analyseurs sanguins, l'analyse d'images voit son utilisation évoluer vers la capture et l'archivage d'images de haute qualité (Houwen B., 2001).

4.1.2) La détection volumétrique par variation d'impédance

Communément nommé *principe Coulter*, c'est un procédé qui permet la transformation directe du volume des particules en signal électrique (Quaranta J.F. *et al*, 1990). Les cellules sanguines en suspension dans un électrolyte sont aspirées par un micro-orifice au travers duquel est établi un courant électrique d'intensité constante. Quand aucune cellule ne se trouve dans l'orifice, l'impédance de l'électrolyte à l'intérieur de celui-ci détermine celle du système. Quand une cellule traverse l'orifice, elle va alors déplacer son propre volume d'électrolyte, provoquant de ce fait une variation d'impédance. Le nombre et l'amplitude des impulsions (la variation de différence de potentiel étant proportionnelle au volume cellulaire)

permettent d'obtenir les courbes de distributions plaquettaires, érythrocytaires et leucocytaires. Les appareils *Coulter* actuels permettent ainsi la mesure :

- des 7 paramètres classiques de l'hémogramme :
 - numération des leucocytes,
 - numération des hématies,
 - dosage de l'hémoglobine,
 - calcul de l'hématocrite,
 - mesure du volume globulaire moyen (VGM),
 - calcul du taux corpusculaire moyen en hémoglobine (TCMH),
 - calcul de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) ;
 - d'un paramètre érythrocytaire : l'indice de distribution des globules rouges (IDR)
 - de 4 paramètres plaquettaires :
 - numération des plaquettes,
 - volume plaquettaire moyen (VPM),
 - thrombocrite (PCT)
 - indice de distribution plaquettaire (IDP)
 - de 6 paramètres leucocytaires : pourcentage et valeur absolue des lymphocytes, monocytes et granulocytes.

L'approche de la formule leucocytaire donnée par la plupart des automates est basée sur l'histogramme différentiel des leucocytes. Celui-ci représente la distribution des leucocytes circulants après action lytique différentielle d'un agent de lyse sur la membrane et le cytoplasme cellulaires. La position des cellules sur la courbe est alors fonction de la morphologie du noyau, notamment de son indice de lobularité.

En laboratoire vétérinaire, compte tenu des variations interspécifiques, ces appareils doivent être calibrés selon l'espèce animale dont l'échantillon sanguin est issu, la taille des cellules sanguines pouvant être très différente d'une espèce à l'autre. (Jain N.C., 1993 ; Lepoint B., 2003).

4.1.3) le système QBC

L'analyse quantitative du « buffy coat » (QBC) a pour principe l'appréciation de l'épaisseur des couches cellulaires après centrifugation du sang, les différents types de cellules se répartissant selon leur densité (de haut en bas : plaquettes, agranulocytes, granulocytes, globules rouges). Les différentes couches sont distinguées par fluorescence (Guelfi J.F. *et al*, 1995). Ce système a été adapté à la médecine vétérinaire (QBC® VetAutoread commercialisé par IDEXX) pour le chien, le chat et le cheval ; il donne :

- l'hématocrite,
- l'hémoglobémie,
- la CCMH,
- les numérations plaquettaire et leucocytaire,
- le taux de réticulocytes (chat et chien)
- une approche de la formule leucocytaire à 2 types (polynucléaires d'une part, lymphocytes et monocytes d'autre part) voire 3 types chez le chien (appréciation des éosinophiles).

4.1.4) La détection optique

Une autre classe d'appareils automatisés d'hématologie utilise un système de détection laser couplé à la technique de cytométrie de flux (un fluide « étui » force les cellules à défiler en file indienne) pour mesurer la taille et la complexité interne des cellules (Williard M.D. *et al*, 1999). Au passage de chaque cellule, le faisceau laser est interrompu. Ces interruptions permettent le comptage. L'appareil identifie chaque cellule d'après la façon dont elle diffracte la lumière en mesurant différents angles. L'angle de diffraction de la lumière vers l'avant correspond approximativement à la taille de la cellule alors que l'angle de diffraction des rayons sur le côté reflète plus la structure interne de la cellule et notamment sa granularité. La mesure de ces deux angles permet de distinguer les populations de lymphocytes, monocytes et granulocytes (Grindem C.B., 1996).

Cette méthode est souvent associée à l'utilisation de réactifs interagissant avec les cellules sanguines et révélés par fluorescence. Il peut s'agir de la technique de cytochimie classique, basée sur l'activité enzymatique des leucocytes, utilisée par exemple par le Technicon H1® (commercialisé par Bayer) pour établir une formule leucocytaire complète. Ce dernier est basé sur deux systèmes : la coloration peroxydasique de cellules intactes et l'apparence du noyau après qu'un réactif basophile ait fait disparaître le cytoplasme (Chandelier D., 1987).

Plusieurs études ont permis de montrer que cet appareil, utilisé en laboratoire d'analyse humaine, peut s'adapter à l'hématologie vétérinaire à l'aide d'un logiciel multi-espèces. Il permet ainsi de donner une formule leucocytaire à 5 types relativement fiable chez le chien (Tvedten H, 1993 ; Tvedten H. *et al*, 1994).

Plus récente, l'immunocytochimie utilise des marqueurs immunologiques permettant une identification cellulaire très précise. Les anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules de surface cellulaire permettent d'identifier des groupes fonctionnels spécifiques de leucocytes (à commencer par la distinction lymphocyte-B et lymphocyte-T). A l'heure actuelle ils sont seulement utilisés en recherche immunologique chez le chien. Celui-ci est un excellent modèle pour l'homme (Williams D.L., 1997) afin de caractériser les désordres myélo ou lymphoprolifératifs.

4.2. Automates et formule leucocytaire

4.2.1) Intérêts

Les appareils les plus récents couplent plusieurs de ces techniques afin de fournir une numération leucocytaire complète à 5 voire 6 types. Grâce à eux, dans les laboratoires d'analyse humaine, seuls 25% en moyenne des échantillons nécessitent une vérification au microscope, ce qui représente un gain de temps notable. De plus, la plupart des appareils compte plusieurs milliers de cellules blanches pour établir la numération leucocytaire, ce qui rend cette technique bien plus précise que la méthode manuelle impliquant généralement un comptage de 100 à 200 cellules (Houwen B., 2001). Ainsi la reproductibilité des résultats, notamment pour les cellules peu nombreuses comme basophiles et monocytes, est bien meilleure avec l'appareil (Chandelier D., 1987). Mais ce résultat plus précis pourrait tout à fait être inexact (Tvedten H. *et al*, 1994). Enfin les manipulations nécessaires aux analyses, le contrôle de qualité et la maintenance du matériel sont pour la plupart des appareils d'une grande simplicité et peu contraignants (Guelfi J.F. *et al*, 1995, Dewhurst E.C. *et al*, 2003).

4.2.2) Limites

Les automates les plus courants mis à la disposition des praticiens vétérinaires utilisent les systèmes d'impédance (comme le VetABC® utilisé dans notre étude) ou QBC qui ne donnent qu'une formule à 3 types leucocytaires. De plus certaines études de comparaison avec la

méthode dite de référence (méthode manuelle) montrent parfois des corrélations relativement faibles en particulier pour les lymphocytes et les monocytes (Dewhurst E.C. *et al*, 2003). C'est pourquoi l'examen microscopique resterait encore essentiel en laboratoire vétérinaire pour identifier les globules blancs et établir une formule leucocytaire fiable et complète (Guelfi J.F. *et al*, 1995 ; Dewhurst E.C. *et al*, 2003 ; Lepoint B., 2003). De même les appareils utilisés en humaine et adaptés au laboratoire vétérinaire par contrôle informatique, bien qu'ils donnent une formule leucocytaire complète, peuvent présenter une faible corrélation avec la méthode manuelle dans l'identification des leucocytes relativement peu nombreux dans le sang (monocytes, basophiles, éosinophiles gris, neutrophiles immatures...) (Tvedten H. *et al*, 1994). Cependant l'instrumentation de la cytométrie par flux a considérablement progressé depuis les vingt dernières années. Initialement les appareils, très complexes, nécessitaient un technicien spécialisé expérimenté. La complexité technique, le prix d'achat élevé et les coûts d'entretien empêchaient l'implantation de la cytométrie de flux dans un laboratoire vétérinaire. Des changements dans la conception instrumentale et l'informatisation ont rendu les appareils courants moins chers, plus petits et faciles à manipuler. Les réglages manuels ont été largement remplacés par des contrôles informatiques et beaucoup de réglages se font automatiquement. L'adaptation de l'appareil à différentes espèces est rendue possible par l'utilisation de logiciels (Weiss D.J., 2002).

Mais la décision d'investir dans un automate d'hématologie fournissant la formule leucocytaire (et donc relativement coûteux) doit se raisonner en fonction du nombre de formules faites chaque jour dans la clinique, de l'utilité (gain de temps, précision facilitant l'interprétation) qu'il va apporter par rapport à la réalisation d'un frottis sanguin (Knoll J.S. *et al*, 1996). C'est pourquoi ils sont encore réservés aux grosses cliniques ou aux laboratoires vétérinaires. Même dans ce cas, les appareils ne sont pas capables d'identifier avec fiabilité les cellules anormales.

Les systèmes d'alarmes permettent de signaler les échantillons présentant des résultats anormaux ou des cellules que l'appareil a du mal à identifier. Ils sont gérés par des logiciels, certaines alarmes étant établies par le fabricant lorsque le système est intégré à l'analyseur et les autres pouvant être choisies par l'utilisateur (notamment les seuils inférieurs et supérieurs du nombre de cellules déclanchant l'alarme). Ainsi pour la formule sanguine, il faudra établir une procédure déterminant quels échantillons doivent être réévalués par un comptage manuel et quand un simple balayage du frottis sanguin suffit (Lantis K.L., 2003) ; celle-ci tiendra compte des caractéristiques pathologiques de l'animal en question (chirurgie, hématologie clinique, médecine préventive...).

En ce qui concerne les appareils utilisant des marqueurs fluorescents avec la détection optique, leur utilisation reste encore limitée. Si l'étude enzymatique des leucocytes a apporté de nouvelles données pour l'interprétation d'une formule leucocytaire, ces appareils sont d'un maniement plus complexe. Ils nécessitent une surveillance et une maintenance continues, une formation spécifique des techniciens, et un coût en réactifs majorant le prix de l'hémogramme (Quaranta J.F. *et al*, 1990). Enfin pour la technique de marquage immunologique, la rareté des anticorps monoclonaux canins limite l'utilisation diagnostique et les procédures rigoureuses de contrôle qualité (Grindem C.B., 1996). Les épitopes étant très spécifiques, on ne peut pas utiliser les réactifs utilisés en humaine.

Ainsi, la formule automatisée fournit des renseignements très utiles mais n'est pas encore une alternative à la méthode manuelle en médecine vétérinaire. La lecture du frottis sanguin est nécessaire pour vérifier la pertinence des résultats automatisés et établir une formule leucocytaire complète à 5 voire 6 types (avec la différenciation des neutrophiles matures et immatures). Il reste par ailleurs le seul moyen d'évaluer les modifications morphologiques des cellules sanguines et détecter la présence d'organismes intra ou extra cellulaires (Hyun B.H. *et al*, 1991). Combiné à la précision des résultats automatisés, l'examen microscopique permet au praticien d'accéder à des conclusions fortes. Aucun des appareils d'hématologie n'est capable d'identifier toutes les cellules, quelle que soit l'espèce. Ainsi même pour les plus récents, l'identification des polynucléaires immatures, des changements toxiques dans les neutrophiles, des lymphocytes et monocytes réactifs, des basophiles et des éosinophiles gris et des cellules leucémiques est encore très peu fiable (Williard M.D. *et al*, 1999).

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

I/ ETUDE PRELIMINAIRE : NUMERATIONS LEUCOCYTAIRES SUR FROTTIS ENTIERS

Le but de l'étude préliminaire est de comparer les formules leucocytaires manuelle et automatisée avec les résultats de lecture d'un frottis entier. De plus on cherche à déterminer si la répartition des leucocytes (et de leurs différentes catégories) sur un frottis sanguin de chien observé au microscope optique est homogène ou non sur la totalité de l'étalement.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Spécimens sanguins : collecte

Les frottis sanguins sont réalisés à partir de sang veineux prélevé à la jugulaire à l'aide d'une aiguille montée sur un porte-tube et collecté dans des tubes sous vide (Vacutainers ND) contenant de l'EDTA. Ces tubes une fois suffisamment remplis sont immédiatement retournés plusieurs fois pour homogénéiser le sang et l'anticoagulant puis identifiés. Trois prélèvements sanguins sont choisis parmi ceux réalisés sur des chiens amenés en consultation à l'ENVT et nécessitant une exploration hématologique.

1.2. Numération leucocytaire manuelle et automatisée

Les échantillons de sang sont l'objet d'une analyse hématologique au laboratoire de l'ENVT, classiquement une étude microscopique d'un étalement sanguin et une analyse automatisée. Les frottis sanguins sont réalisés immédiatement après la collecte. La numération manuelle est établie par un technicien du laboratoire. La méthode de lecture consiste à compter 100 cellules au grossissement X1000 selon un trajet en créneau. La zone de lecture se situe au deux tiers du frottis environ, là où les globules rouges se touchent sans se superposer.

L'analyse hématologique est réalisée rapidement après la collecte par un automate d'hématologie vétérinaire : le VetABC®. Les trois spécimens sanguins sont choisis parmi ceux présentant une numération des leucocytes totaux dans les valeurs usuelles de l'appareil. Ainsi parmi les paramètres hématologiques donnés par l'appareil, on note la numération totale

des globules blancs et la numération différentielle. Cette dernière se compose de la numération des granulocytes dans leur ensemble avec une estimation des granulocytes éosinophiles, la numération des lymphocytes et celle des monocytes. L'appareil donne ces résultats en valeur absolue ($10^3/\mu\text{L}$) ainsi qu'en pourcentage.

1.3. Préparation des frottis sanguins

1.3.1) Étalement

Les frottis sanguins sont réalisés dans les 2 à 3 heures suivant la collecte.

Le sang dans les tubes est de nouveau homogénéisé juste avant de faire le frottis par une douzaine de retournements.

Une goutte de sang (prélevée dans le tube EDTA) d'une taille standardisée de 1,5 μL est déposée à l'extrémité d'une lame de verre (parfaitement propre et dégraissée) à l'aide d'une micropipette. La goutte est immédiatement étalée avec une lame rodée d'une largeur de 20mm selon la technique en poussant décrite précédemment (cf. I/ 2.2.).

Les étalements obtenus sont immédiatement séchés par agitation, identifiés puis colorés automatiquement selon la technique de May-Grumwald-Giemsa.

1.3.2) Quadrillage

Compte tenu du nombre très élevé de leucocytes dans la queue du frottis et d'une proportion importante de cellules détériorées, le comptage et l'identification des cellules s'y est avéré extrêmement difficile. C'est pourquoi les cellules de cette zone n'ont pas pu être prises en compte dans le comptage. Ainsi les franges du frottis visibles à l'œil nu sont exclues par une ligne verticale allant d'un bord à l'autre du frottis. La longueur du reste du frottis (approximativement en forme de rectangle) est mesurée de façon à être divisée en zones données ici par 16 rectangles égaux et de taille proportionnelle à celle de l'étalement (Cf. Fig.12). Pour cela un quadrillage est tracé au scapel sur une feuille transparente et assez épaisse le long d'une règle graduée. La précision du tracé se limite aux millimètres. Ce quadrillage est ensuite posé sur la lame de verre, la face sur laquelle se trouvent les incisions du côté de l'étalement (les lignes sont ainsi visualisées plus fines quand le microscope est mis au point sur le plan des cellules sanguines).

La largeur du frottis variant peu, puisque cette dernière est donnée par la largeur de la lame rodée utilisée pour l'étalement (soit 2 cm), celle-ci est divisée dans tous les cas par 3 lignes parallèles distantes de 5 mm.

Le frottis, queue exclue, est par ailleurs divisé dans sa longueur par 3 lignes verticales de façon à obtenir des rectangles de longueur proportionnelle à la taille de celui-ci (par exemple des rectangles de 5mm de largeur sur 7 mm de longueur pour un frottis long de 2,8cm).

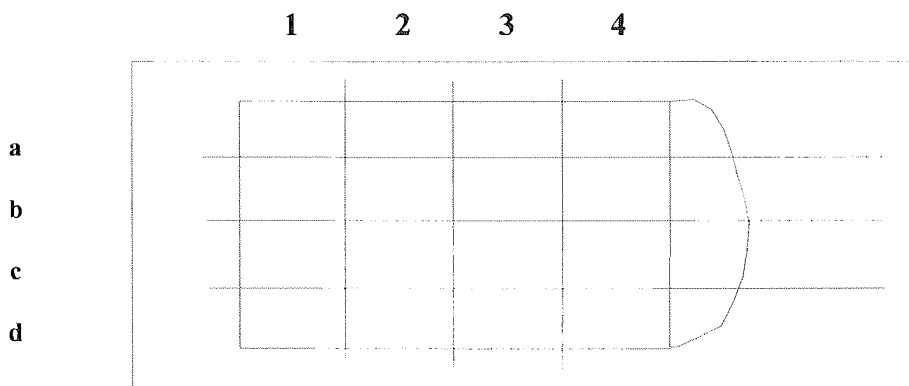


Figure 12 : représentation d'un frottis et de son quadrillage

1.4. Comptage leucocytaire manuel

Pour un frottis le nombre total de chaque type leucocytaire (au nombre de 5 : granulocytes neutrophiles, basophiles, éosinophiles, lymphocytes et monocytes) est déterminé pour chaque rectangle par deux observateurs simultanément, à l'aide d'un microscope optique à plusieurs oculaires. La lecture est réalisée à l'objectif X20 (grossissement d'environ 200) et à l'objectif X40 quand celui-ci s'avère nécessaire pour l'identification d'une cellule. Le comptage dans chaque zone se fait à l'aide d'un compteur à 6 touches : les GNN, les GNE, les GNB, les lymphocytes, les monocytes ainsi que les cellules non identifiables (distorsion, membrane éclatée...) sont ainsi dénombrés. Malgré la difficulté de réalisation de ce comptage fastidieux, chaque zone est étudiée sans interruption pour éviter toute erreur de positionnement de la platine mobile du microscope. Cependant la lecture de la totalité de chaque frottis a dû être réalisée en plusieurs périodes de 2 ou 3 heures.

N° :

Taille frottis :

L quadrillage =

	1	2	3	4
a	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id
b	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id
c	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id
d	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id	GNN GNE GNB Lympho Mono Non Id

Tableau 3 : feuille à remplir lors du comptage total d'un frottis sanguin quadrillé

1.5. Comptage leucocytaire automatisé : VetABC®

Le VetABC® (commercialisé par SCIL) est un appareil d'hématologie vétérinaire fonctionnant d'après le principe Coulter (cf. II/4.1.2). L'analyse du sang après dilution se fait dans deux circuits séparés : le premier bac sert au comptage des leucocytes et à la mesure de l'hémoglobininémie après lyse des globules rouges et des plaquettes ; le deuxième bac permet le comptage des hématies et des plaquettes. L'utilisation d'agents de lyse partielle des leucocytes permet de différencier les sous populations en fonction de la taille de la cellule et du noyau. Les lymphocytes subissent un rétrécissement des membranes sur leurs noyaux (hydrolyse du cytoplasme), les granulocytes restent intacts et les monocytes subissent une action intermédiaire. Le VetABC établit alors un histogramme volumétrique. Sachant que les lymphocytes se trouvent entre 30 et 100 μm^3 , les monocytes entre 100 et 150 μm^3 et les granulocytes entre 150 μm^3 et 450 μm^3 , il donne une approche de la formule leucocytaire à trois types. Lorsqu'ils sont en nombre suffisant l'appareil donne également une estimation du nombre d'éosinophiles (Lepoint B., 2003 ; Caillard A., 2002).

2. RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

2.1. Numérations leucocytaires des frottis entiers

2.1.1) Numérations totales par frottis

On calcule la somme des cellules blanches (GNN, GNE, Lymphocytes, Monocytes et cellules non identifiées) de toutes les zones quadrillées pour chaque frottis. La zone de la queue du frottis où les leucocytes sont très nombreux a été exclue du comptage. Par ailleurs, certaines cellules blanches étaient trop détériorées pour être identifiées.

- T05 1857 : 5355 cellules comptées dont 5256 identifiées.
- T05 1113 : 4612 cellules comptées dont 4319 identifiées.
- T05 1802 : 8517 cellules comptées dont 8313 identifiées.

2.1.2) Numérations différentielles : distribution relative des cellules blanches sur le frottis

Les comptages différentiels des cellules blanches dans chaque zone quadrillée d'un même étalement sont convertis en pourcentage (formule sanguine) de façon à interpréter la distribution relative de chaque population (Cf. Annexe 2). Les cellules non identifiées (cellules détériorées et pour lesquelles l'identification était incertaine) n'ont pas été comptabilisées dans ce pourcentage. Les résultats sont représentés par des camemberts. Chaque camembert correspond à un rectangle de frottis, sa position sur la feuille étant la même que celle du rectangle sur le frottis (ainsi le premier camembert de la figure représente le rectangle de la première rangée et de la première colonne du frottis, de coordonné 1a ; Cf. Fig. 13, 14 et 15). Le nombre de cellules identifiées est précisé pour chaque zone.

Pour chaque frottis on peut donc comparer les formules leucocytaires de chaque rectangle entre elles mais aussi par rapport à la formule leucocytaire générale. Celle-ci, représentée en bas à droite de chaque figure est calculée en tenant compte de toutes les cellules identifiées sur le frottis entier.

- le frottis n° T05 1802 montre une relative régularité dans la distribution de tous les types leucocytaires si on exclue le premier rectangle 1a dans lequel on trouve beaucoup de neutrophiles :

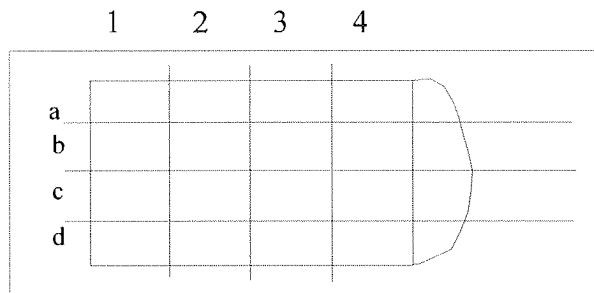


Figure 13 : représentation des différentes proportions de leucocytes (formule leucocytaire) et nombres de cellules identifiées pour chaque zone quadrillée du frottis TO5 1802.

Pour vérifier statistiquement les observations faites sur le graphique, on applique le test du Khideux d'adéquation à la loi normale. On cherche à savoir si les formules leucocytaires de chaque zone du frottis quadrillée sont différentes ou non de la formule générale (frottis entier). La formule donnée par le frottis entier est considérée comme représentative de la véritable valeur, elle est donc constante. En considérant qu'il n'y a pas d'aléa de lecture, si la

distribution sur le frottis était parfaitement homogène on retrouverait cette formule dans chaque zone quadrillée (hypothèse H0). Le test utilisé ici donne l'écart à cette formule leucocytaire de référence (Cf. Annexe 3). Plus l'écart est grand, plus on s'éloigne de l'hypothèse H0. Lorsque cet écart est supérieur à 3.84, on considère qu'il existe une différence significative avec 5% de chance de se tromper ($\alpha=0.05$). Lorsqu'il est supérieur à 6.63, on a 1% de chance de se tromper et lorsqu'il est supérieur à 10.83, on a 0.1% de chance de se tromper (Cf. code de couleur tabl. 4, 5 et 6). Chaque type leucocytaire est testé séparément afin de caractériser la distribution relative des cellules sur le frottis. Cependant, les pourcentages de basophiles n'ont pas pu être pris en compte car leur nombre est toujours insuffisant pour pouvoir utiliser le test.

T05 1802		colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
rangée a	PNN	80.8	68.7	76.3	72.3
	PNE	2.6	6.0	5.1	4.3
	Lymphocytes	14.6	23.2	15.8	21.0
	Monocytes	1.3	1.9	2.6	2.5
rangée b	PNN	73.5	73.5	74.0	71.2
	PNE	4.7	4.2	5.5	4.8
	Lymphocytes	19.7	19.4	18.0	21.8
	Monocytes	2.2	2.6	2.0	2.2
rangée c	PNN	76.2	73.9	73.7	75.1
	PNE	6.5	3.5	4.1	3.1
	Lymphocytes	13.4	19.4	20.2	19.4
	Monocytes	3.3	2.8	2.0	2.4
rangée d	PNN	75.2	69.4	72.9	69.6
	PNE	1.8	5.4	4.1	5.5
	Lymphocytes	19.4	22.1	20.0	20.2
	Monocytes	3.0	2.6	3.0	4.6

χ^2 ($\alpha=0.05$):	
χ^2 ($\alpha=0.01$):	
χ^2 ($\alpha=0.001$):	

frottis entier	
PNN	73.2
PNE	4.6
Lymphocytes	19.4
Monocytes	2.5

Tableau 4 : Résultats de la lecture du frottis entier T05 1802 convertis en pourcentage. Les résultats significativement différents (d'après le test d'adéquation à la loi normale) sont en grisé.

On constate ainsi qu'il existe des différences significatives (en choisissant $\alpha = 0.05$), surlignées dans le tableau 4. Cependant d'après le code de couleur du tableau 4 l'écart avec la formule leucocytaire théorique (celle qu'on devrait trouver si la distribution était parfaitement homogène) n'est jamais très élevé.

- le frottis n° T05 1113 est représenté par des camemberts légèrement inégaux (par exemple celui de la première colonne et de la dernière ligne) :

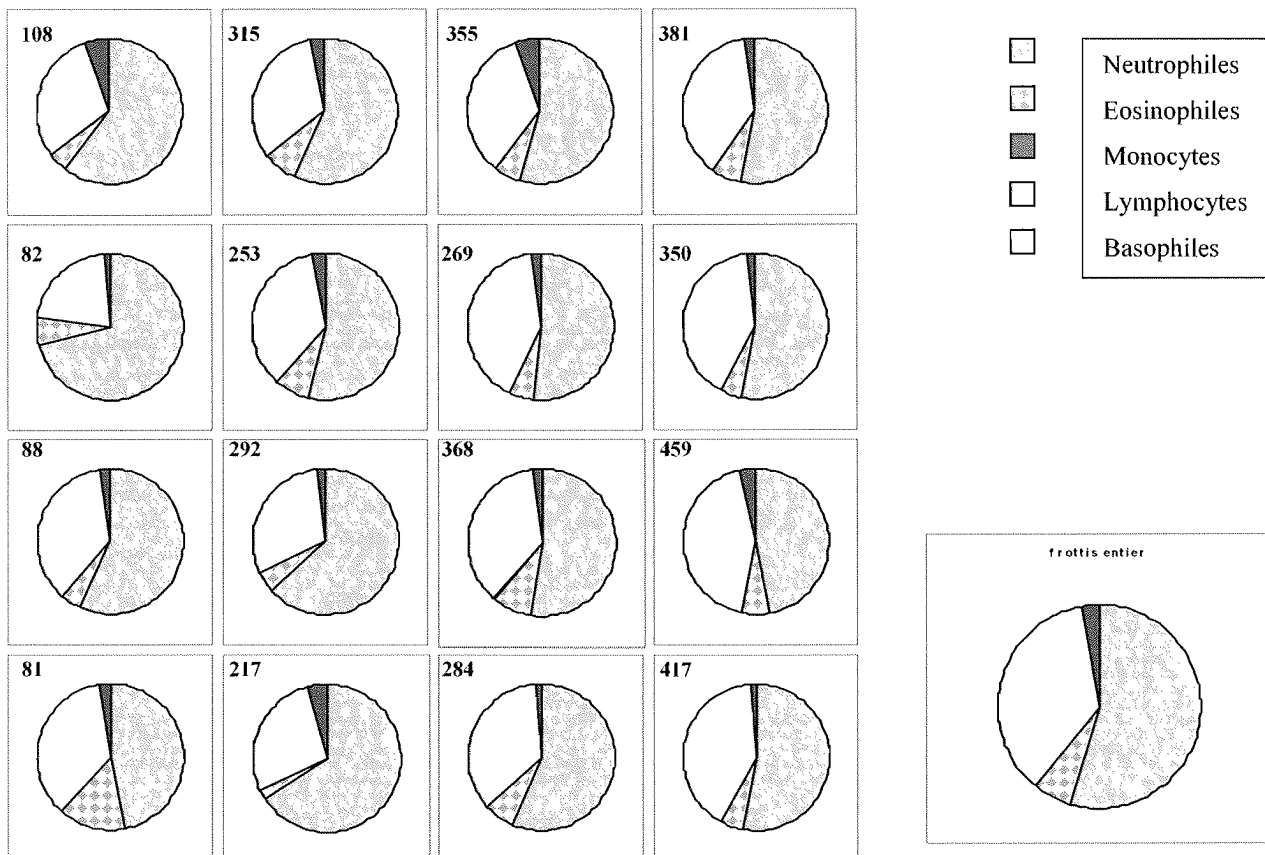


Figure 14 : représentation des différentes proportions de leucocytes (formule leucocytaire) et nombre de cellules identifiées pour chaque zone quadrillée du frottis T05 1113.

Statistiquement on peut mettre en évidence plusieurs différences entre les pourcentages leucocytaires de la formule de chaque zone quadrillée avec ceux du frottis entier. Ces différences concernent surtout les neutrophiles et les lymphocytes.

T05 1113		colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
rangée a	PNN	60.2	56.8	54.4	53.3
	PNE	4.6	7.6	5.9	6.6
	Lymphocytes	29.6	32.4	34.1	37.5
	Monocytes	5.6	3.2	5.4	2.6
rangée b	PNN	70.7	53.8	51.7	53.4
	PNE	6.1	7.5	5.6	4.3
	Lymphocytes	22.0	36.0	40.9	40.3
	Monocytes	1.2	2.8	1.9	2.0
rangée c	PNN	56.8	63.4	52.4	47.3
	PNE	4.5	4.8	8.7	6.1
	Lymphocytes	36.4	30.1	36.4	43.1
	Monocytes	2.3	1.7	2.2	3.5
rangée d	PNN	46.9	65.9	56.7	53.0
	PNE	14.8	1.8	6.7	5.0
	Lymphocytes	35.8	28.1	35.2	40.5
	Monocytes	2.5	4.1	1.4	1.4

χ^2 ($\alpha=0.05$) :	
χ^2 ($\alpha=0.01$) :	
χ^2 ($\alpha=0.001$) :	

frottis entier	
PNN	54.8
PNE	6.1
lymphocytes	36.3
monocytes	2.7

Tableau 5 : Résultats de la lecture du frottis entier T05 1113 convertis en pourcentage. Les résultats significativement différents (d'après le test d'adéquation à la loi normale) sont en grisé.

- le frottis n° T05 1857 montre des différences notables, surtout au niveau du centre du frottis qui semble moins riche en polynucléaires neutrophiles par rapport aux bords du frottis et à l'extrémité précédant la queue (celle-ci est exclue de l'étude). En effet lors de la lecture la présence d'amas de neutrophiles sur les extrémités de la zone quadrillée a pu être constatée :

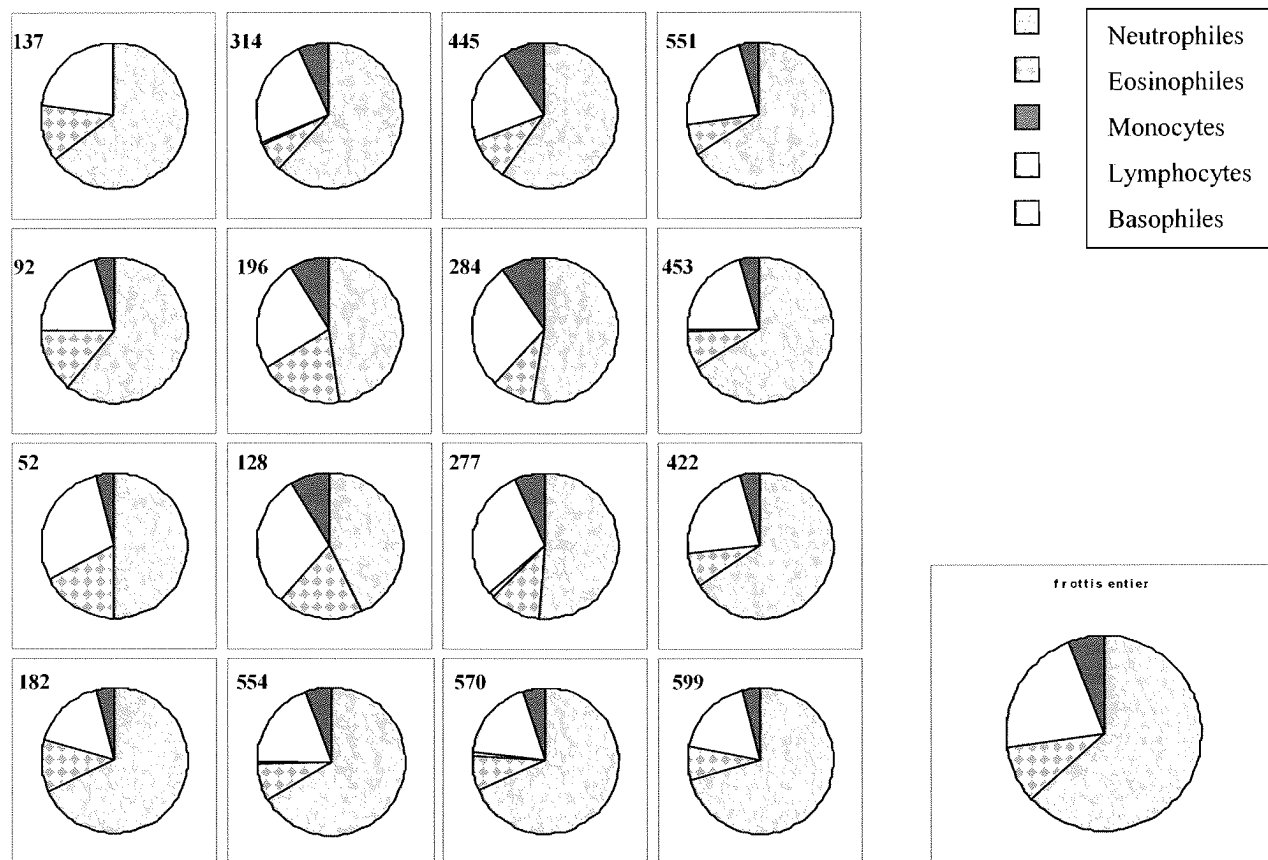


Figure 15 : représentation des différentes proportions de leucocytes (formule leucocytaire) et nombre de cellules identifiées pour chaque zone quadrillée du frottis T05 1857.

T05 1857		colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
rangée a	PNN	65.0	62.1	60.0	66.2
	PNE	12.4	6.4	9.4	6.5
	Lymphocytes	22.6	24.2	21.1	22.3
	Monocytes	0.0	7.0	9.4	4.5
rangée b	PNN	60.9	48.0	52.8	66.7
	PNE	14.1	18.4	9.2	8.2
	Lymphocytes	20.7	25.0	28.2	20.3
	Monocytes	4.3	8.7	9.9	4.6
rangée c	PNN	50.0	43.0	51.3	65.9
	PNE	17.3	18.8	11.6	7.3
	Lymphocytes	28.8	29.7	29.2	22.0
	Monocytes	3.8	8.6	6.9	4.7
rangée d	PNN	68.1	66.2	68.6	70.5
	PNE	11.5	8.3	7.5	7.7
	Lymphocytes	16.5	19.7	18.2	17.9
	Monocytes	3.8	5.6	5.1	4.0

χ^2 (a=0.05) :	
χ^2 (a=0.01) :	
χ^2 (a=0.001) :	

frottis entier	
PNN	63.2
PNE	9.1
Lymphocytes	21.7
monocytes	5.7

Tableau 6 : Résultats de la lecture du frottis entier T05 1857 convertis en pourcentage. Les résultats significativement différents (d'après le test d'adéquation à la loi normale) sont en grisé.

D'après le test du Khideux, le frottis T05 1857 présente une distribution relative des leucocytes très irrégulière. Ainsi les formules au centre du frottis sont statistiquement très différentes de la formule générale. Les neutrophiles ont tendance à s'accumuler sur les bords tandis que les lymphocytes sont plus nombreux au centre. Par ailleurs, c'est la troisième colonne qui présente le plus de différences, l'inégalité de la distribution entre bords et centre du frottis y étant beaucoup plus importante que pour la colonne suivante.

2.2. Formule leucocytaire par colonne

Dans le tableau 7, on compare les formules leucocytaires calculées par colonne avec la formule leucocytaire globale du frottis afin de déterminer la zone la plus représentative de la totalité de l'étalement (du moins ici tout le frottis excepté la queue). La formule par colonne la plus proche de la formule générale est écrite en gras. On constate qu'aucune des colonnes ne présente de résultats véritablement plus représentatifs du frottis entier qu'une autre. On obtient des formules leucocytaires assez proches de la formule générale pour la colonne 3 du frottis T05 1802.

COLONNE		1	2	3	4	FORMULE FROTTIS ENTIER
T05 1857	GNN	63.7	59.6	60.3	67.5	63.2
	GNE	13.0	10.6	9.1	7.4	9.1
	GNB	0.0	0.2	0.4	0.1	0.2
	Lympho	20.5	22.8	22.8	20.5	21.7
	Mono	2.8	6.8	7.5	4.4	5.7
T05 1113	GNN	58.8	59.7	53.8	51.5	54.8
	GNE	7.2	5.7	6.8	5.5	6.1
	GNB	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
	Lympho	30.9	31.8	36.4	40.5	36.3
	Mono	3.1	2.9	2.8	2.4	2.7
T05 1802	GNN	75.6	71.7	74.4	72.0	73.2
	GNE	4.5	4.7	4.7	4.4	4.6
	GNB	0.4	0.4	0.2	0.0	0.2
	Lympho	17.0	20.7	18.4	20.7	19.4
	Mono	2.5	2.5	2.4	2.9	2.5

Tableau 7 : Comparaison des formules de chaque colonne avec la formule leucocytaire de tout le frottis quadrillé (pourcentage par colonne le plus proche du pourcentage général en gras).

2.3. Comparaison des formules leucocytaires manuelles et automatisées avec les résultats sur frottis entier

Le tableau 8 permet de comparer les résultats des formules leucocytaires manuelle et automatisée avec la formule leucocytaire d'un frottis entier. Pour l'appareil d'hématologie VetABC, on considère que les basophiles (non différenciés) sont en nombre négligeable ici. Ainsi le nombre de neutrophiles est obtenu par soustraction des éosinophiles au nombre de granulocytes que fournit l'automate. Ce dernier donne des résultats globalement plus proches de la formule sur frottis entier que la méthode manuelle classique.

		frottis entier	100 cellules	Vet ABC
T05 1857	GNN	63.2	61	62.3
	GNE	9.1	13	11.6
	GNB	0.2	0	
	Lympho	21.7	14	22.4
	Mono	5.7	12	3.7
T05 1113	GNN	54.8	59	58.5
	GNE	6.1	8	3.6
	GNB	0.0	0	
	Lympho	36.3	28	32.1
	Mono	2.7	5	5.8
T05 1802	GNN	73.2	61	74.2
	GNE	4.6	4	4.1
	GNB	0.2	0	
	Lympho	19.4	32	16.5
	Mono	2.5	3	5.2

Tableau 8 : Comparaison de la formule leucocytaire du frottis entier avec les formules leucocytaires manuelle et automatisée pour chacun des 3 chiens (numération la plus proche du frottis entier en gras).

3. DISCUSSION

On peut remarquer que la distribution des populations leucocytaires est parfois assez régulière (frottis n° T05 1802) et parfois beaucoup moins. Lorsqu'elle est hétérogène cette distribution va plutôt dans le sens d'une répartition préférentielle des neutrophiles sur les bords et des lymphocytes au centre (phénomène bien visible sur le frottis T05 1857 et que l'on a tendance à retrouver sur le frottis n° T05 1113). Les monocytes et éosinophiles semblent se distribuer de façon plus homogène. Ces premières observations sont en accord avec les résultats obtenus par Mac Gregor R.G.S. en 1940 (cf. part.1 II/ 3.3).

Cette hétérogénéité peut entraîner des variations de résultats de la formule leucocytaire selon l'abscisse et l'ordonnée de la zone de lecture. En comparant les résultats par colonne aux résultats sur frottis entier, on n'observe pas de zone véritablement plus représentative qu'une autre. La zone de lecture est souvent choisie par commodité à l'endroit où les cellules sont les plus faciles à identifier, c'est-à-dire dans la zone monocouche. Dans le quadrillage, cette zone pourrait être la colonne 3 ou la colonne 4. Or on observe pour le frottis T05 1857 une distribution très hétérogène entre bords et centre de l'étalement notamment pour la colonne 3. Il serait donc plus judicieux de faire le comptage dans la colonne 4, la zone précédant la queue du frottis. Cependant en démarrant le comptage au bord du frottis et en comptant uniquement 100 cellules, le premier rectangle n'est pas lu en entier. L'effet « bords » du frottis pourrait donc être accentué (pour le savoir il aurait fallu faire un quadrillage avec des rectangles plus petits).

Dans notre étude, le frottis n° T05 1802 présente une assez grande régularité dans cette distribution. On peut donc supposer que le ou les facteurs influençant la répartition des leucocytes n'étaient pas présents de la même manière que pour les deux autres frottis. La liste hypothétique de ces quelques facteurs de variations (détaillée en part.1 II/ 3.3) n'est sans doute pas exhaustive. Il semble difficile de pouvoir identifier et contrôler les plus déterminants d'entre eux. C'est pourquoi certains auteurs vont même jusqu'à émettre l'hypothèse d'uniformité de cette répartition (Rümke C.L., 1958, 1960, 1977 ; Rümke *et al*, 1975). Dans la norme NCCLS en vigueur aux Etats-Unis (NCCLS, 1992) la prise en compte des bords n'est nullement précisée dans le texte et l'hypothèse d'une distribution hétérogène ne transparaît que dans le fait qu'il est conseillé de choisir pour la lecture une zone où neutrophiles, monocytes et lymphocytes apparaissent distribués de façon homogène. Cette zone serait la couche monocellulaire citée plus haut (cf. part.1 II/1.1) sans autre précision.

Par ailleurs, on constate que la formule automatisée est plus proche de celle établie à partir du frottis entier que la formule manuelle classique. Ceci est en accord avec les études de comparaisons des méthodes manuelles et automatisées, l'appareil qui compte environ 8000 cellules est toujours plus précis que le technicien qui en compte une centaine. Il est cependant impossible ici de dire, à partir de 3 échantillons, si les résultats donnés par l'automate sont toujours aussi fiables. Ainsi B. Lepoint (2003) montre qu'il existe une différence significative entre les deux méthodes (Cf. part.1 II/4.2.). Cependant la méthode manuelle classique est-elle suffisamment précise pour être considérée encore aujourd'hui comme la méthode de référence ? Et dans quelle mesure la distribution hétérogène des leucocytes sur la lame et le choix d'une méthode de lecture influencent-ils les résultats ?

II/ ETUDE D'UNE METHODE DE LECTURE

Notre étude porte sur la formule leucocytaire manuelle obtenue par une méthode de lecture (ici celle utilisée à l'ENVT, qui est celle recommandée par la norme NCCLS) d'un frottis sanguin de chien. Le but est de déterminer d'une part dans quelle mesure la précision du résultat permet une interprétation fiable de la formule leucocytaire ; d'autre part quelle importance peuvent avoir les effets de l'observateur et du frottis.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Spécimens sanguins : collecte

De même que pour l'étude préliminaire, les frottis sanguins sont réalisés à partir de sang veineux prélevé à la jugulaire à l'aide d'une aiguille montée sur un porte-tube et collecté dans des tubes sous vide (Vacutainers ND) contenant de l'EDTA. Une fois suffisamment remplis, les tubes sont immédiatement agités par une dizaine d'inversions pour homogénéiser le sang et l'anticoagulant, puis identifiés. Deux prélèvements sanguins sont choisis parmi ceux réalisés sur des chiens amenés en consultation à l'ENVT et nécessitant une exploration hématologique. Le premier individu présente des numérations globulaires automatisées normales (données par l'appareil Vet-ABC), c'est-à-dire comptage des globules rouges et des globules blancs totaux dans l'intervalle de valeurs usuelles. Le deuxième individu présente une forte leucocytose (plus de deux fois plus grande que la limite supérieure de l'intervalle de référence de l'appareil) d'après le comptage des leucocytes totaux :

Chien 1618 : $GB=11.10^9/L$

Chien 1619 : $GB=27.10^9/L$

1.2. Préparation des frottis sanguins

Pour chaque échantillon sanguin, dix frottis sont réalisés par le même opérateur dans les 2 heures suivant la collecte. Les méthodes d'étalement et de coloration sont les mêmes que celles utilisées dans l'étude préliminaire.

1.3. Lecture et réalisation de la formule leucocytaire

La zone de lecture se situe approximativement au début du dernier tiers de la longueur du frottis. Elle est choisie plus précisément au faible grossissement en plaçant l'objectif à l'aide de la platine mobile du microscope optique dans une zone où les globules rouges sont les uns à côté des autres sans se superposer. On passe ensuite à l'objectif X50 à immersion. Chaque type leucocytaire est dénombré jusqu'à l'obtention d'un nombre total de 100 cellules blanches, en suivant un trajet en créneaux dans la largeur du frottis et en commençant sur un des bords latéraux. Le comptage se fait à l'aide d'un leucocytomètre. Les cellules détériorées ainsi que les érythroblastes ne sont pas pris en compte.

Chacun des 20 étalements est lu 5 fois par deux observateurs : l'un expérimenté et l'autre non. Pour éviter que l'observateur ne soit influencé par les résultats précédents d'un même échantillon sanguin ainsi que par les lectures successives d'une même lame, l'identification des lames est masquée par un cache en papier et les lectures sont réparties sur plusieurs jours. A la fin de chacune des 5 lectures des 20 lames, les caches sont retirés afin d'attribuer le numéro d'échantillon sanguin et de lame à chaque résultat de formule. Les caches sont ensuite repositionnés et les lames mélangées au hasard. Les deux observateurs travaillent indépendamment et n'ont pas connaissance des résultats de l'autre expérimentateur.

1.4. Analyse statistique des résultats

Les résultats des numérations pour chaque type leucocytaire sont analysés par un logiciel de statistique : Systat Version 10, Copyright© SPSS Inc, 2000.

2. RESULTATS

2.1. ANALYSE DESCRIPTIVE

2.1.1) Distributions des résultats par chien et par observateur

On veut tout d'abord observer la répartition des résultats pour chaque chien et selon chaque observateur, toutes lectures et tous frottis confondus. Pour cela, les résultats en pourcentage des cinquante lectures (cf. Annexe 4) sont convertis en valeurs absolues en multipliant par la numération totale en leucocytes. Cette dernière, donnée par l'appareil d'hématologie Vet-ABC®, est de $11.10^9/L$ pour le chien 1618 et de $27.10^9/L$ pour le chien 1619. Ce calcul permet ainsi de pouvoir comparer les résultats aux valeurs usuelles. Les histogrammes sont présentés en figure 16 et 17 : à chaque valeur de numération en abscisse (les valeurs sont discontinues car obtenues à partir des pourcentages) correspond le nombre de fois où cette valeur a été trouvée parmi les cinquante lectures.

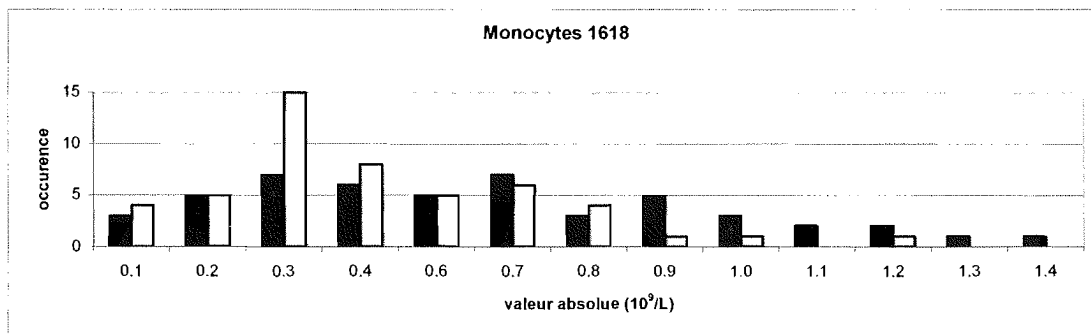
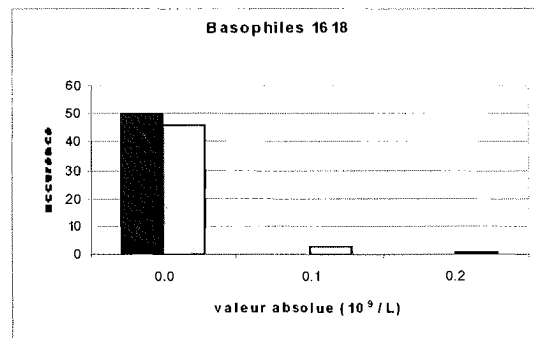
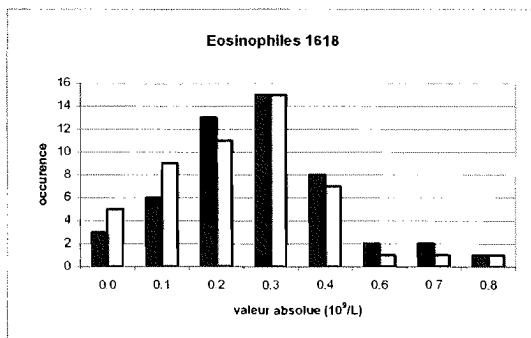
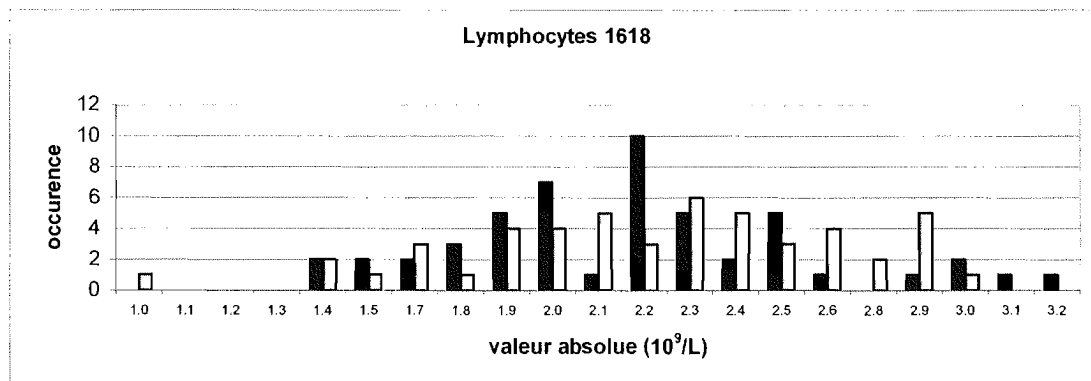
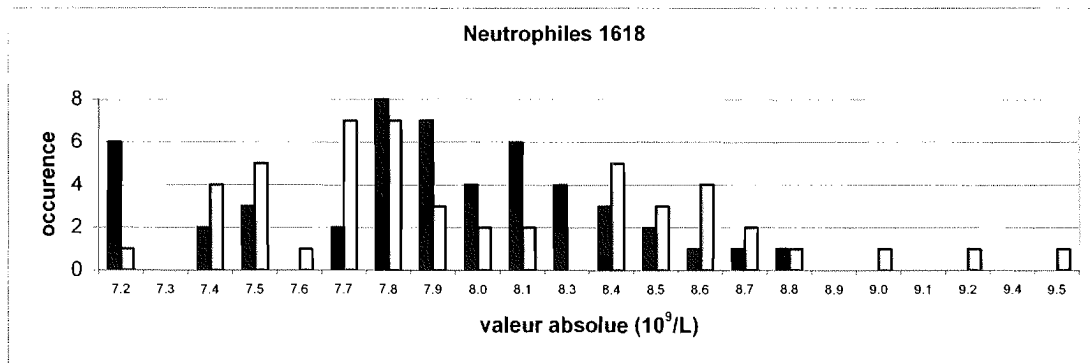


Figure 16 : Occurrence des résultats des numérations leucocytaires en valeur absolue ($10^9/L$) sur 50 lectures faites par l'observateur 1 (en clair) et 2 (en foncé) pour le chien 1618 ($GB=11.10^9/L$).

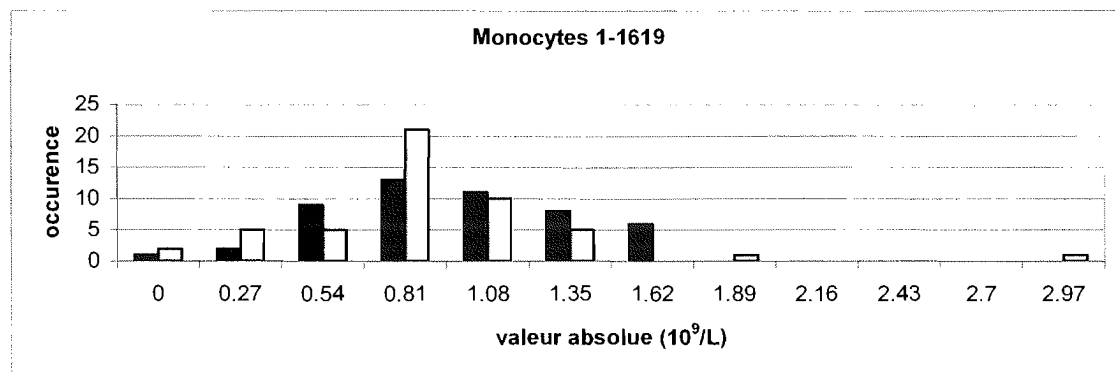
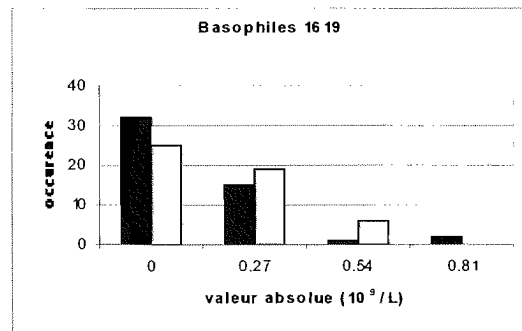
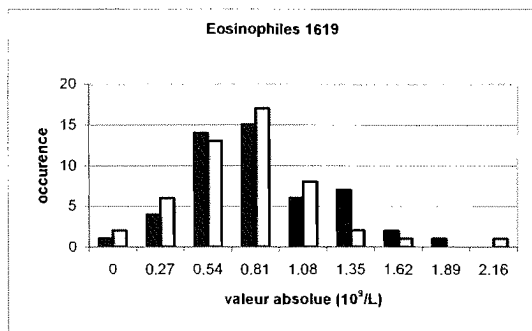
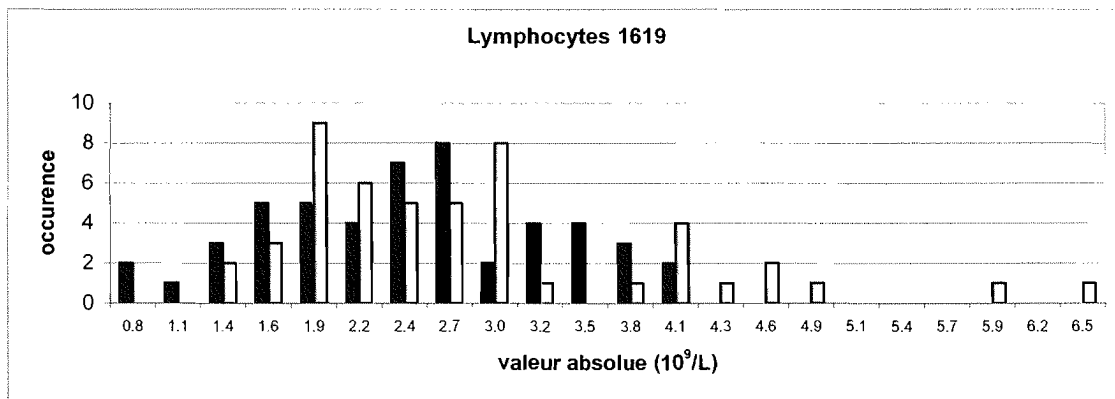
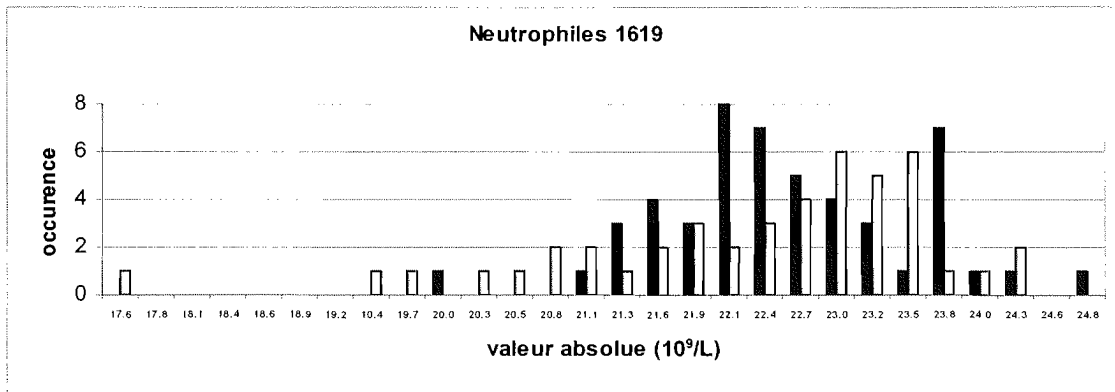


Figure 17 : Occurrence des résultats des numérations leucocytaires en valeur absolue ($10^9/L$) sur 50 lectures faites par les observateurs 1 (en clair) et 2 (en foncé) pour le chien 1619 ($GB=27.10^9/L$).

D'après ces histogrammes, on constate que d'une part l'allure générale de chaque graphique, quelque soit l'observateur et quelque soit le type leucocytaire, n'est pas en faveur d'une distribution gaussienne des résultats. Cette tendance justifie l'utilisation par la suite de tests statistiques non paramétriques. D'autre part, d'après les valeurs extrêmes des histogrammes, la dispersion des résultats est presque toujours plus grande pour l'observateur 1 ; les statistiques descriptives (cf. Annexe 5) avec notamment l'écart-type, confortent à chaque fois cette constatation. L'observateur 1 a trouvé certaines valeurs très éloignées des autres, tels que 1.10^9 lymphocytes/L (cf. Fig.16) ou $17,6.10^9$ neutrophiles/L (cf. Fig.17).

Enfin, la distribution des résultats ne semble pas être la même pour l'observateur 1 et 2. Il convient cependant de vérifier cette constatation par un test statistique.

Ainsi pour mettre en évidence qu'il existe une différence significative entre les deux distributions, on utilise un test non paramétrique (puisque ces courbes ne sont pas gaussiennes) comme le Khi deux, par exemple ici appliqué à la distribution des neutrophiles. Il s'agit de savoir si l'écart entre les deux distributions observées peut être attribué aux fluctuations d'échantillonnage (hypothèse H0) ou s'il correspond à une différence réelle entre les distributions (hypothèse H1) (Bouyer J., 1996). Dans le tableau de contingence ci-dessous, on répartit les effectifs GNN observés O_{ij} pour chaque observateur OBS_i dans plusieurs classes A_j . Nous avons ainsi choisis cinq intervalles (ou classes) de %GNN de façon à ce que les effectifs théoriques calculés C_{ij} (attendus si H0 vraie) soient supérieurs à 5.

chi deux GNN 1618	A1	A2	A3	A4	A5	
%	65-67	68-70	71-73	74-76	77-86	
OBS 1	5 (6.5)	13 (9)	12 (15.5)	7 (10)	13 (9)	50
OBS 2	8 (6.5)	5 (9)	19 (15.5)	13 (10)	5 (9)	50
	13	18	31	20	18	100

$\chi^2(4;0.05)= 11,184 < 9.49$ test non significatif

Tableau 9 : Tableau de contingence : effectifs observés de la variable GNN selon l'observateur, effectifs théoriques entre parenthèses.

Ici la quantité $\chi^2_0 = \sum(i,j) [(O_{ij}-C_{ij})^2/C_{ij}]$ est inférieure à la valeur seuil du χ^2 à 4ddl et $\alpha=5\%$ donc on ne peut pas rejeter H_0 .

Ainsi ce test (ainsi que le test de Kolmogorov-Smirnov appliqué à tous les autres types de leucocytes à l'aide de Systat10, Copyright© SPSS Inc, 2000) ne permet pas d'affirmer qu'il existe une différence entre les distributions de résultats des deux observateurs.

2.1.2) Comparaison aux valeurs usuelles

2.1.2.1) Interprétation des résultats de formule leucocytaire

D'après les histogrammes précédents, certains résultats (hachurés sur les graphiques) peuvent amener à des conclusions différentes si on les compare aux valeurs usuelles données par Jain N.C., 1986 :

Fig.16 : frottis H05 1618

- Dans une lecture, la valeur minimale des lymphocytes est à la limite inférieure des valeurs usuelles qui est de $1.10^9/L$, dans ce cas on ne peut pas conclure catégoriquement à une lymphopénie et l'interprétation reste difficile, contrairement aux 49 autres lectures qui amènent à une conclusion forte. A noter cependant que ce résultat litigieux d'après Jain N.C., 1986 fait partie des valeurs usuelles d'après Crespeau F., 1981.
- Pour les monocytes, 2 résultats sur 50 sont approximativement à la limite supérieure de l'intervalle de référence.

Fig.17 : frottis H05 1619

- 1 résultat sur 50 ($4.9.10^9/L$) est approximativement à la limite supérieure de l'intervalle de référence des lymphocytes (qui est de $4.8.10^9/L$) donc difficilement interprétable, 2 résultats sur 50 sont en faveur d'une lymphocytose ($5.9.10^9/L$ et $6.5.10^9/L$).
- 2 résultats sur 50 ($0.8.10^9/L$) sont juste au dessous de la limite inférieure des lymphocytes donc plutôt en faveur d'une lymphopénie. Là encore ces résultats sont des valeurs usuelles d'après Crespeau F., 1981.
- De nombreux résultats en ce qui concerne les éosinophiles et les monocytes sont au dessus de la limite supérieure de l'intervalle de référence. Ainsi 5 lectures sur 100 sont en faveur d'une éosinophilie et 8 lectures sur 100 sont en faveur d'une monocytose.

Le tableau ci-dessous résume le nombre de lectures en faveur d'une interprétation, en se basant strictement sur les limites de l'intervalle de référence. On considère cependant que les résultats étant à la limite de cet intervalle à $0,1.10^9/L$ sont « normaux » :

	Observateur 1	Observateur 2	Total (sur 100 lectures)
Chien 1618 :			
Numération différentielle normale	50	50	100
Chien 1619 :			
Neutrophilie seule	44	40	84
Neutrophilie+lymphopénie	0	1	1
Neutrophilie+lymphocytose	2	0	2
Neutrophilie+éosinophilie	2	3	5
Neutrophilie+monoeytose	2	5	7
Neutrophilie+lymphopénie+monoeytose	0	1	1

Tableau 10 : nombre de lectures donnant des interprétations différentes d'après les valeurs usuelles (Jain N.C., 1986).

2.1.2.2) Comparaison de l'étendue des intervalles de résultats aux intervalles de référence

On compare les intervalles comprenant les 50 résultats des numérations en neutrophiles et en lymphocytes aux intervalles de référence (d'après Jain N.C., 1986) pour l'observateur 1 (OBS 1) et l'observateur 2 (OBS 2). On constate de nouveau que la dispersion des résultats est plus grande pour l'observateur 1.

a) Chien 1618 (sans leucocytose)

D'après les figures 18 et 19, les résultats (hachurés) sont toujours parmi les valeurs usuelles (en bleu).

On calcule le rapport de l'intervalle des valeurs obtenues sur l'intervalle de référence : $(Maximum - Minimum) / (Limite\ supérieure - Limite\ inférieure)$. Pour les neutrophiles, l'étendue de l'intervalle obtenu par l'observateur 1 représente 26,25% de celle de l'intervalle de référence contre 18,75% pour l'observateur 2 :

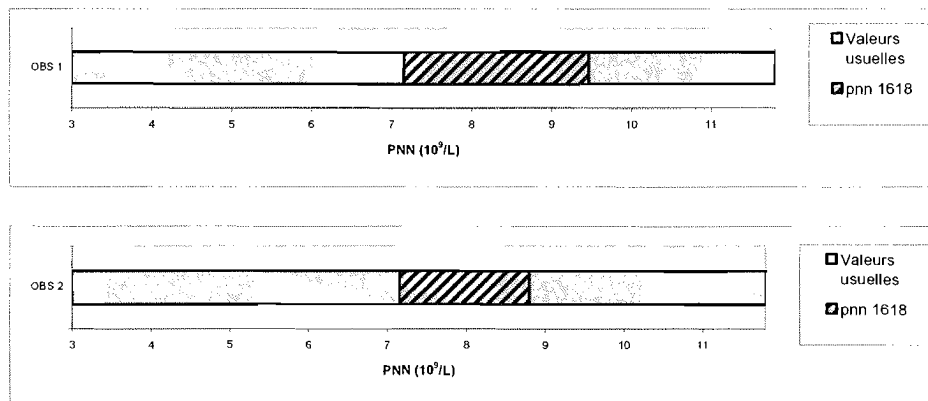


Figure 18 : comparaison des résultats des numérations en neutrophiles (PNN) du chien 1618 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.

Pour les lymphocytes, l'intervalle est beaucoup plus grand relativement aux valeurs usuelles : l'étendue de l'intervalle des résultats de l'observateur 1 représente 52,10% de celle de l'intervalle de référence et 46,32% chez l'observateur 2 :

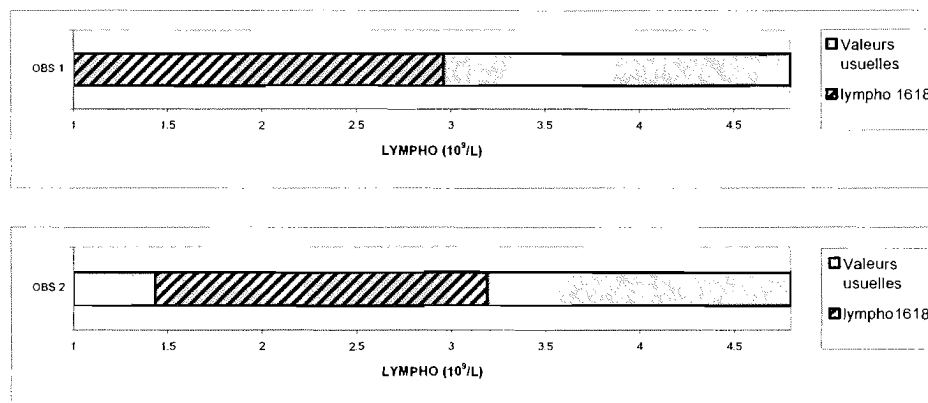


Figure 19 : comparaison des résultats des numérations en lymphocytes du chien 1618 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.

b) Chien 1619 (avec leucocytose)

L'étendue des résultats est bien plus grande que pour le chien 1618, en effet elle est majorée lors de la conversion des pourcentages en valeurs absolues puisque les pourcentages sont multipliés par une numération élevée en leucocytes totaux.

Toutes les numérations de neutrophiles se trouvent au dessus de l'intervalle de référence, c'est-à-dire que la conclusion sera « présence d'une neutrophilie » dans tous les cas de lectures :

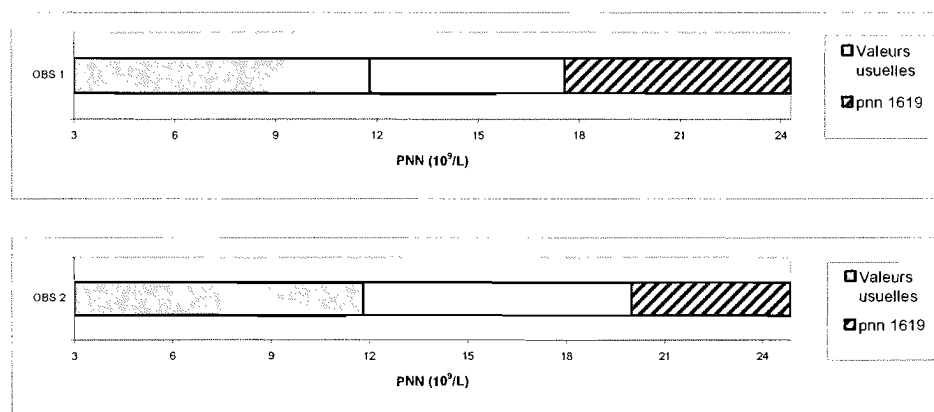


Figure 20 : comparaison des résultats des numérations en neutrophiles (PNN) du chien 1619 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.

L'étendue de l'intervalle englobant toutes les numérations en neutrophiles de l'observateur 1 représente 76,70% de celle de l'intervalle de référence et 55,23% en ce qui concerne l'observateur 2.

Les résultats en numérations de lymphocytes sont plus problématiques puisque certaines valeurs sont dans l'intervalle de référence et d'autres non, ce qui pourrait amener à des conclusions différentes :

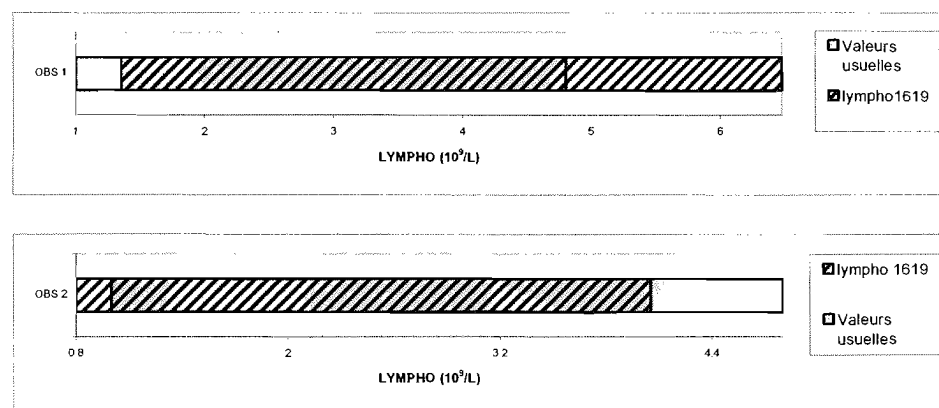


Figure 21 : comparaison des résultats des numérations en lymphocytes du chien 1619 aux valeurs usuelles pour les observateurs (OBS) 1 et 2.

Lorsqu'on les compare à l'étendue des valeurs usuelles, les résultats des numérations en lymphocytes sont très dispersés : pour l'observateur 1, l'écart entre valeurs extrêmes est plus grand que l'écart entre les limites de l'intervalle de référence (soit 133%). Ce rapport reste relativement grand pour l'observateur 2 (85,3%).

2.1.3) Dispersion des résultats en fonction du frottis

a) Chien 1618 (sans leucocytose)

Les données sont représentées en pourcentage, à chaque frottis correspondent 10 lectures, les deux observateurs étant confondus. L'intervalle [moyenne +/- écart-type] pour chaque type de leucocyte est tracé en grisé. Les polynucléaires basophiles ne sont pas représentés ici, compte tenu de leur très faible nombre (entre 0 et 2%), la dispersion est minime. On remarque que selon le frottis, la dispersion des dix lectures ne semble pas être la même : elle est relativement faible pour les neutrophiles et les lymphocytes des frottis n°1 et n°9 par exemple.

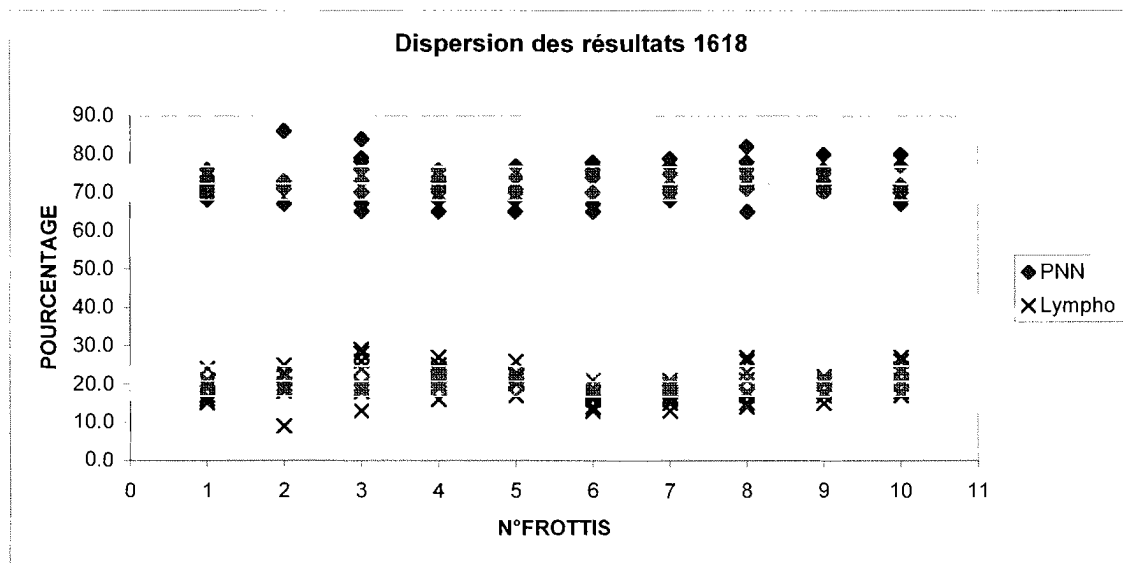


Figure 22 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles et lymphocytes du chien 1618, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne +/- sd] en grisé.

Sur le graphique (Fig.22) les observateurs 1 et 2 ne sont pas différenciables, la dispersion des résultats selon le frottis considéré peut être due à l'un plus qu'à l'autre puisqu'on sait déjà que la dispersion des cinquante lectures est plus grande chez l'observateur 1. Les données de chacun d'entre eux sont donc représentées séparément ci-dessous :

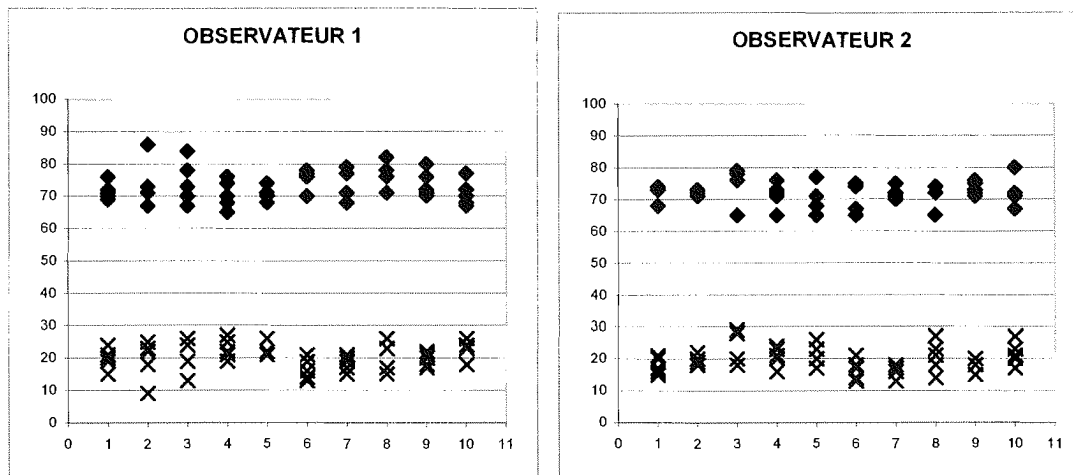


Figure 23 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles et lymphocytes du chien 1618, pour les observateurs 1 et 2.

Là encore on constate des différences de dispersion, bien qu'il soit difficile de mettre en évidence la seule influence du frottis sur la façon dont varient les résultats. En effet les résultats pour chaque frottis ne semblent pas dispersés de la même manière chez l'observateur 1 et 2.

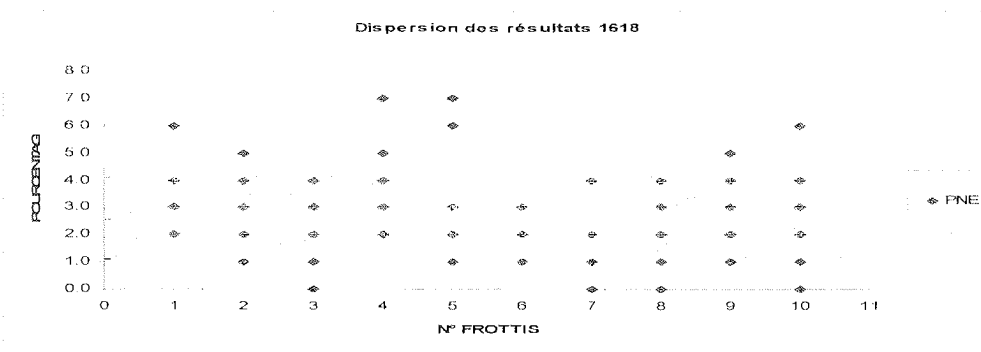


Figure 24 : dispersions des résultats des numérations en éosinophiles du chien 1618, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.

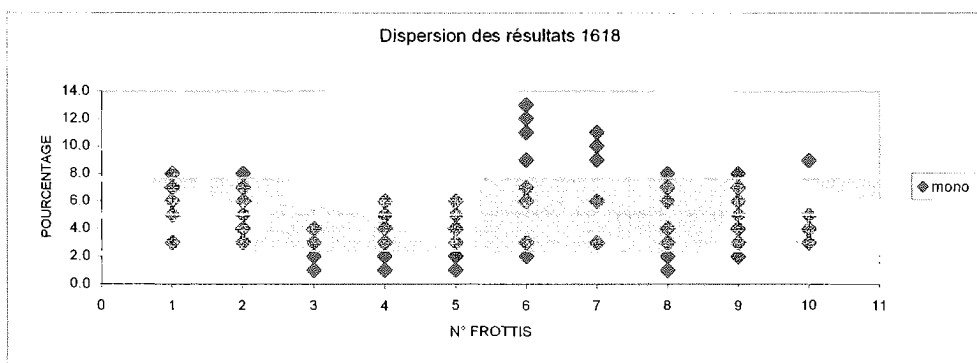


Figure 25 : dispersions des résultats des numérations en monocytes du chien 1618, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.

De même en ce qui concerne les monocytes et les éosinophiles, la dispersion des résultats est relativement grande pour certains frottis.

b) Chien 1619 (avec leucocytose)

Pour le chien 1618, là encore l'étendue des résultats des cinq lectures varie selon le frottis mais il semble difficile de voir si elle a tendance à varier de la même manière chez l'observateur 1 et chez l'observateur 2 :

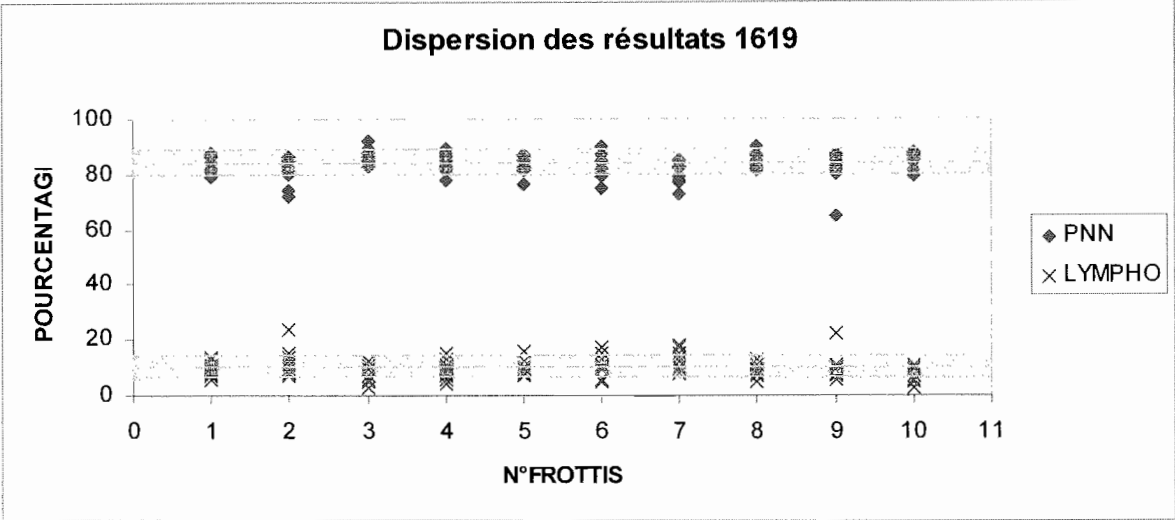


Figure 26 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles et lymphocytes du chien 1619, tout observateur confondu; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.

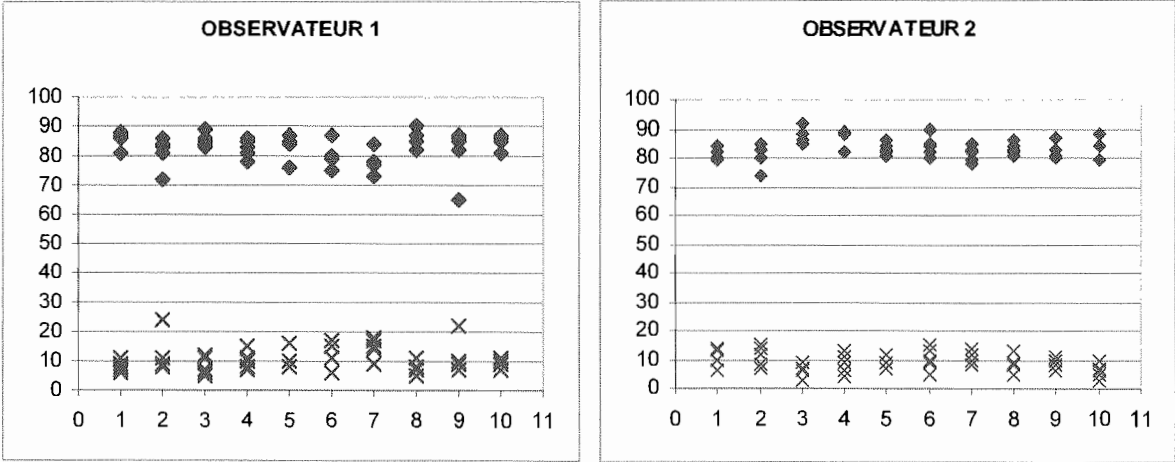


Figure 27 : dispersions des résultats des numérations en neutrophiles, lymphocytes du chien 1619, pour les observateurs 1 et 2.

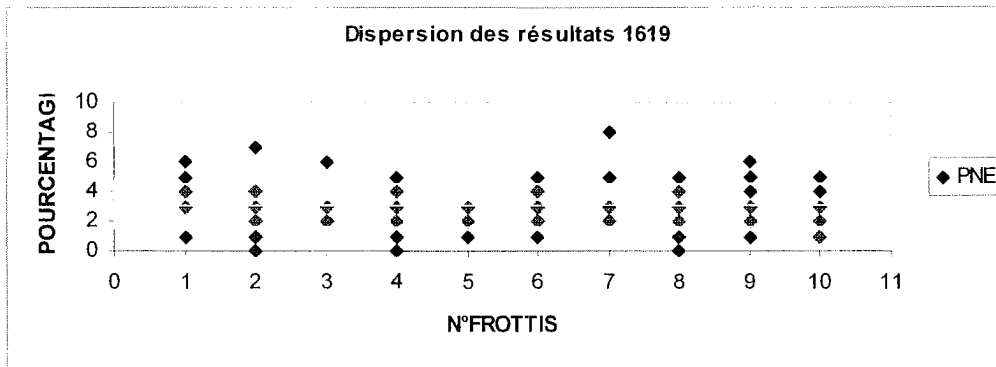


Figure 28: dispersions des résultats des numérations en éosinophiles du chien 1619, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.

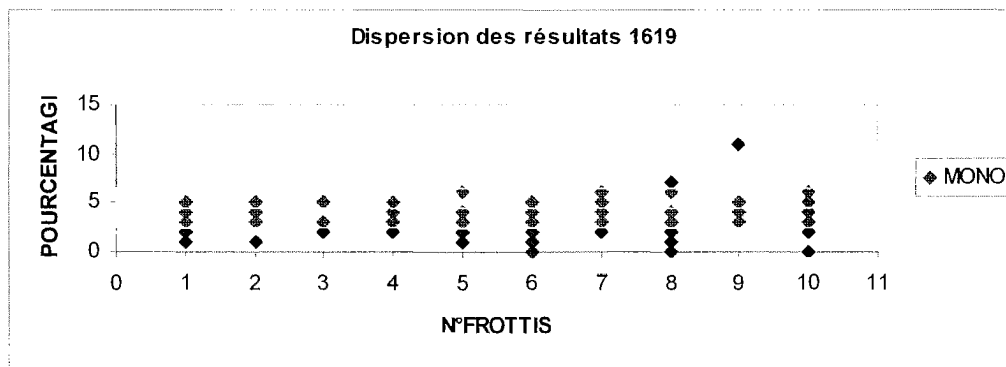


Figure 29: dispersions des résultats des numérations en monocytes du chien 1619, tout observateur confondu ; intervalle [moyenne+/- sd] en grisé.

2.1.4) Moyennes des cinq lectures par frottis

Pour visualiser plus facilement la dispersion des résultats, on néglige l'effet lecture. On représente ainsi la variation de la moyenne des cinq lectures selon le frottis pour déterminer si son comportement est le même pour les deux observateurs.

a) Chien 1618 (sans leucocytose)

Les valeurs moyennes des cinq lectures ne sont pas les mêmes selon les frottis, et ce quelque soit l'observateur. Celles-ci varient de façon relativement importante dans les cas des neutrophiles pour l'observateur 1 et des monocytes pour l'observateur 2. Ainsi l'allure des courbes de chaque observateur est assez similaire pour les lymphocytes, les éosinophiles et les basophiles mais très différente pour les neutrophiles et les monocytes. On constate de plus que l'allure de la courbe en neutrophiles de l'observateur 1 ressemble à celle en monocytes de l'observateur 2 :

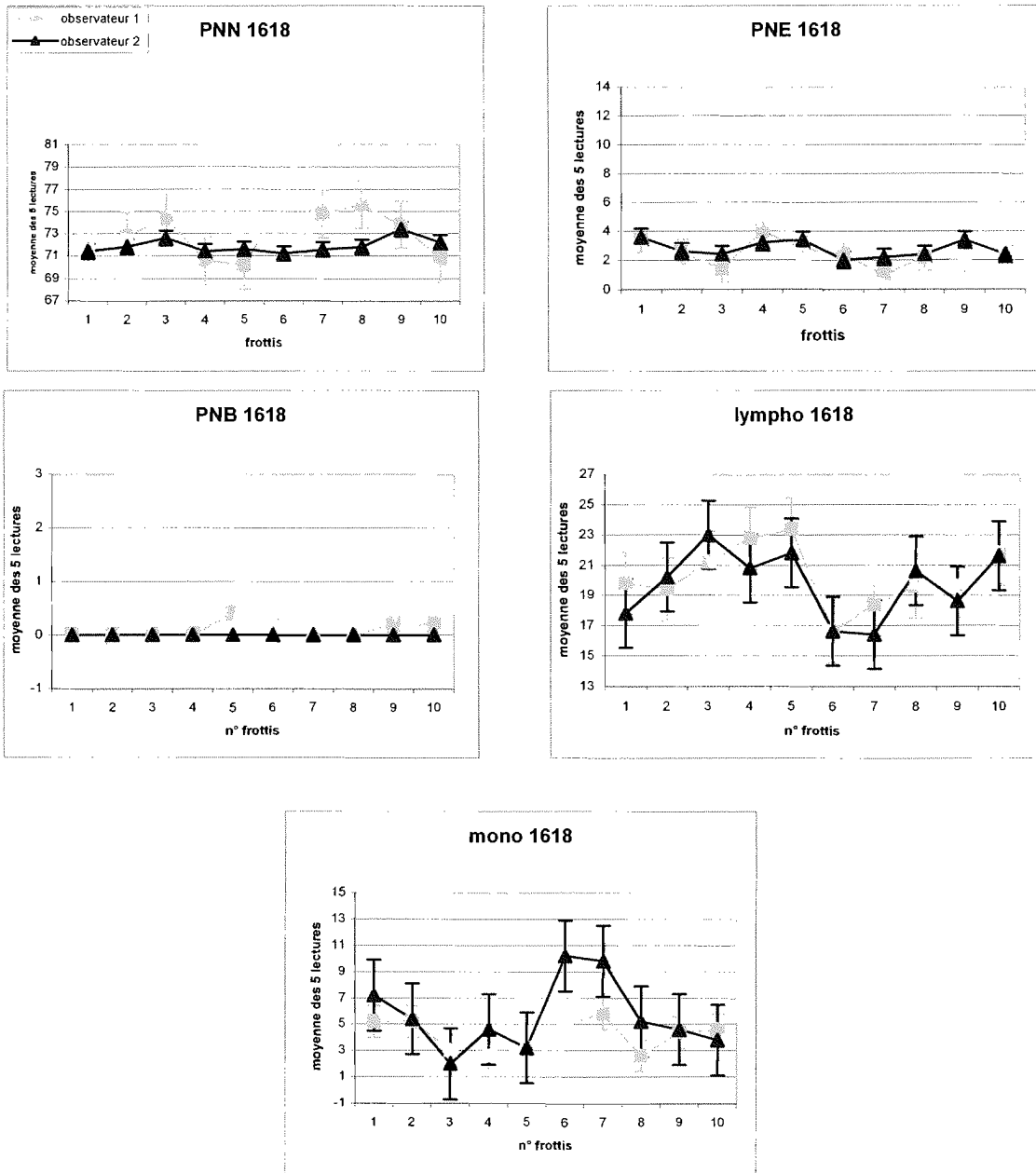


Figure 30 : comparaison des moyennes (+/- sd) des 5 lectures par frottis pour les observateurs 1 et 2.

b) Chien 1619 (avec leucocytose)

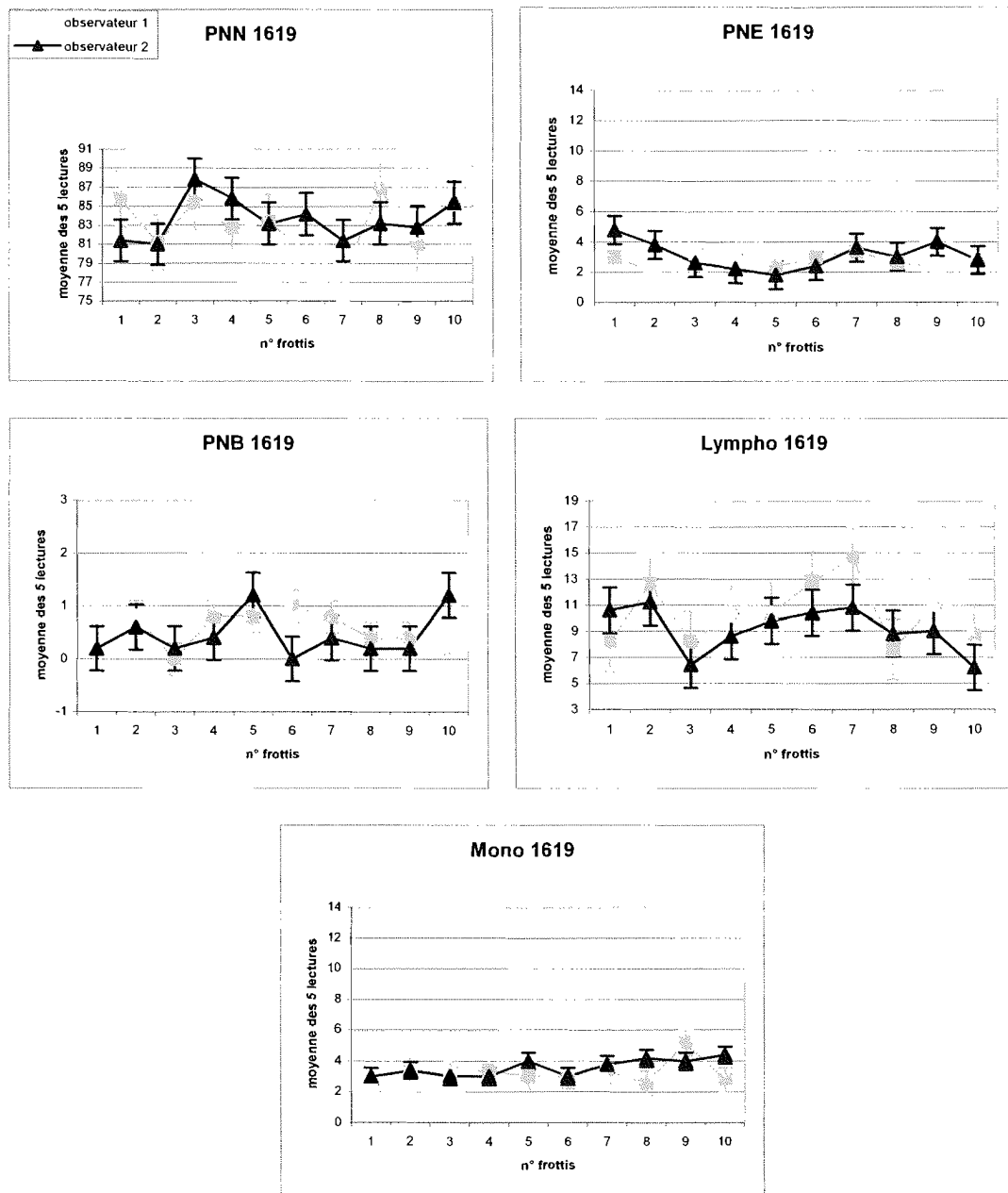


Figure 31 : comparaison des moyennes (+/- sd) des 5 lectures par frottis pour les observateurs 1 et 2.

Les courbes de neutrophiles se croisent à plusieurs endroits ce qui voudrait dire que les moyennes des résultats par frottis ne varient pas de la même manière pour l'observateur 1 et 2 ; il en est de même pour les courbes de monocytes, éosinophiles et basophiles bien qu'elles soient beaucoup plus proches. Les courbes de lymphocytes ont un comportement un peu plus similaire, sans les frottis 1 et 8 elles seraient approximativement parallèles. Il convient donc

d'étudier cet effet frottis par un test statistique afin de déterminer s'il est véritablement significatif (cf. part 2. II/ 2.2).

2.1.5) Comparaison à la formule leucocytaire automatisée donnée par le VetABC

	Formule moyenne du frottis (10 ⁹ /L)	Formule automatisée (10 ⁹ /L)	Ecart-type formule moyenne/formule automatisée
CHIEN 1618			
granulocytes...	8.3	8.1	0.14
dont éosinophiles	0.3	0.3	0.00
lymphocytes	2.2	2.4	0.14
monocytes	0.5	0.6	0.07
CHIEN 1619			
granulocytes...	23.4	20.4	2.12
dont éosinophiles	0.8	1.8	0.71
lymphocytes	2.6	5.4	1.98
monocytes	1.4	1.3	0.07

Tableau 11 : comparaison des formules leucocytaires moyennes du frottis (5 lectures de 10 frottis par 2 observateurs soit 100 lectures) à la formule donnée par l'analyseur hématologique VetABC®.

Pour le chien 1618, l'appareil donne une formule leucocytaire très proche de celle obtenue en faisant la moyenne des 100 lectures. Les écart-types de ces deux formules sont très faibles, bien plus que ceux caractérisant les 50 lectures par observateur (cf. Annexe 5). Par contre, pour le chien 1619 avec leucocytose, la formule automatisée est beaucoup moins fiable. Les écart-types des granulocytes et lymphocytes sont plus grands que ceux observés en comparant les différentes lectures des observateurs. L'appareil sous-estime les granulocytes et surestime les lymphocytes. Pour ces derniers notamment, la formule moyenne manuelle donne une numération dans l'intervalle de référence, alors que d'après l'appareil on conclut à une lymphocytose. Par contre l'estimation des numérations en éosinophiles et monocytes est relativement bonne.

2.2. ANALYSE STATISTIQUE

2.2.1) Modélisation des résultats

Les distributions des numérations en leucocytes ne suivent pas une loi normale (les histogrammes n'ont pas une allure gaussienne) donc les résultats sont analysés au moyen d'un test non paramétrique. Grâce à des informations auxiliaires, on construit un modèle linéaire fonction de sous population gaussiennes et représenté par l'équation ci-dessous. Les effets observateur (O), frottis (F), l'effet croisé observateur avec frottis (O*F) et le reste des autres facteurs de variation (le résidu) sont analysés séparément.

Ainsi, on modélise le résultat obtenu pour chaque type leucocytaire par :

$$Y_{ijk} = \mu + O_i + F_j + (O*F)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{avec : } \begin{aligned} i &= [1 ; 2] \\ j &= [1 ; 10] \\ k &= [1 ; 100] \end{aligned}$$

μ : la moyenne de toutes les données (100 lectures) par chien.

O_i : l'écart entre le résultat moyen trouvé par l'observateur i et la moyenne générale μ .

F_j : l'écart entre le résultat moyen obtenu pour le frottis j et la moyenne générale μ .

$(O*F)_{ij}$: l'effet de l'interaction de l'observateur avec le numéro de frottis.

ε_{ijk} : le résidu

2.2.2) Analyse de variance

Les résultats obtenus par l'exploitation de ce modèle par le logiciel de statistique Systat10© sont présentés en Annexe 6 (chien 1618) et 7 (chien 1619).

2.2.3) Importance des facteurs de variation considérés

Parmi les résultats donnés par le logiciel, on trouve R^2 , compris entre 0 et 1, qui donne la proportion de résultats qui sont simplement explicables par les facteurs du modèle (c'est-à-dire le pourcentage de variance expliquée).

Ainsi pour les neutrophiles du chien sans leucocytose (GNN 1618), $R^2 = 0,137$ signifie que 13,7% des pourcentages de neutrophiles sont simplement explicables par les facteurs O, F et (O*F). Ce qui revient également à dire que 86,3% des résultats dépendent d'autres facteurs que l'observateur ou la qualité du frottis.

Le pourcentage de résultats expliqués par les facteurs étudiés ici est toujours très faible (souvent inférieur à 30%) sauf pour les monocytes 1618 pour lesquels 60,6% de la variation autour de la moyenne est imputable aux facteurs observateur et frottis.

2.2.4) Effets significatifs

On s'intéresse ici à la valeur de « p » donnée dans les tableaux d'analyse de variance en annexe 6. On considère qu'un facteur a un effet sur les résultats lorsque p est inférieur à 0,05 (on choisit le risque de se tromper $\alpha \leq 5\%$).

	Observateur	Frottis	Observateur*Frottis
GNN 1618	p = 0.210	p = 0.746	p = 0.816
GNN 1619	p = 0.384	p = 0.004	p = 0.202
GNE 1618	p = 0.281	p = 0.056	p = 0.797
GNE 1619	p = 0.264	p = 0.295	p = 0.219
GNB 1618	p = 0.062	p = 0.694	p = 0.694
GNB 1619	p = 0.249	p = 0.177	p = 0.205
LYMPHO 1618	p = 0.478	p = 0.003	p = 0.946
LYMPHO 1619	p = 0.072	p = 0.006	p = 0.702
MONO 1618	p = 0.000	p = 0.000	p = 0.004
MONO 1619	p = 0.274	p = 0.430	p = 0.658

Tableau 12 : Résultats de l'analyse de variance effectuée sur les 100 lectures de frottis des chiens 1618 et 1619: p-value de l'effet croisé Observateur avec Frottis et des effets simples Observateur et Frottis (p<0.05 considéré comme significatif en gras).

D'après le tableau ci-dessus il existe un effet frottis sur les résultats des lymphocytes aussi bien pour le chien 1618 (p=0.003) que le chien 1619 (p=0.006). A l'inverse l'effet frottis observé ici pour les neutrophiles (p=0.004) et les monocytes (p=0.000) ne concerne à chaque fois qu'un seul des deux chiens, respectivement 1619 et 1618. Pour les éosinophiles, la valeur de p (0.056) est à la limite de celle fixée pour que l'effet soit considéré significatif. Enfin, seuls les monocytes du chien 1618 sont soumis aux effets observateur et frottis ainsi que l'effet croisé observateur avec frottis (c'est-à-dire qu'il y a une différence des résultats entre les deux observateurs pour certains frottis en particulier).

Par ailleurs, l'effet frottis, lorsqu'il est présent, peut être plus important chez un observateur plus que chez l'autre. Une nouvelle analyse de variance est donc réalisée, cette fois-ci en considérant les 50 lectures de chaque observateur séparément.

Effet Frottis	Observateur 1	Observateur 2
GNN 1618	p = 0.470	p = 0.999
GNN 1619	p = 0.062	p = 0.020
GNE 1618	p = 0.066	p = 0.705
GNE 1619	p = 0.935	p = 0.020
GNB 1618	p = 0.693	Pas de variation
GNB 1619	p = 0.496	p = 0.074
LYMPHO 1618	p = 0.218	p = 0.038
LYMPHO 1619	p = 0.111	p = 0.093
MONO 1618	p = 0.099	p = 0.000
MONO1619	p = 0.426	p = 0.718

Tableau 13 : Résultats de l'analyse de variance effectuée sur les 50 lectures de frottis des chiens 1618 et 1619 pour chaque observateur : p-value de l'effet Frottis. (p<0.05 considéré comme significatif en gras).

D'après le tableau 13, les effets frottis significatifs considérés précédemment ne se retrouvent que chez l'observateur 2. Par ailleurs il n'existe pas d'effet significatif d'après notre modèle pour les lymphocytes du chien 1619, contrairement au cas où les observateurs sont confondus.

3. DISCUSSION

L'observateur 1 a obtenu certains résultats très éloignés des autres, tels que $0,99.10^9$ lymphocytes/L (cf. Fig.16) ou $17,55.10^9$ neutrophiles/L (cf. Fig.17). Pour tenter d'expliquer cette différence entre observateurs, on peut déjà émettre les hypothèses suivantes : l'observateur inexpérimenté a commis des erreurs de comptage par manque de connaissance ou d'attention ; il a mal choisi la zone de lecture sur certains frottis et la distribution relative des leucocytes est généralement hétérogène sur un même étalement, ce qui a engendré des résultats différents ; il a mal choisi la zone de lecture sur certains frottis avec parmi eux des étalements de mauvaise qualité présentant une distribution hétérogène inhabituelle, ce qui a conduit à des résultats erronés.

L'observateur 1 montre clairement une plus grande dispersion des résultats des 50 lectures que l'observateur 2. Hors l'observateur 2 est beaucoup plus expérimenté que l'observateur 1, ce dernier ayant appris à établir une formule sanguine au cours de cette étude. Ainsi, il est légitime de penser que l'expérience de l'observateur permet d'améliorer la précision des résultats.

Lorsque l'on compare les numérations leucocytaires obtenues aux valeurs usuelles, on remarque d'une part que certains résultats peuvent conduire à des conclusions différentes (notamment dans le cas des lymphocytes du chien 1619), d'autre part que la dispersion des résultats est relativement grande (comme le dit Rümke C.L., 1975). Ceci fait de la formule leucocytaire manuelle un test très imprécis pouvant amener à des interprétations inexactes, d'autant plus si la valeur moyenne des résultats (en considérant qu'elle approche la valeur exacte) est à la limite de l'intervalle de référence (cf. Fig.32). Ainsi on peut imaginer un chien dont la numération en neutrophiles est à la limite supérieure de l'intervalle de référence soit $11,8.10^9/L$:

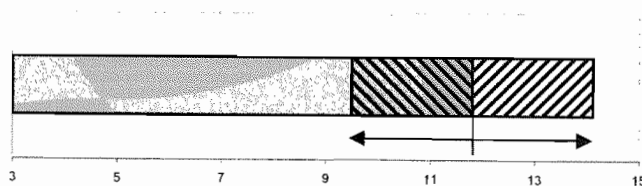


Figure 32 : intervalle de valeurs en numération de neutrophiles (hachuré) dans lequel un résultat ne peut être interprété avec certitude (Intervalle de référence en grisé)

Ce résultat amène généralement à conclure que le chien est « sain ». Cependant en tenant compte de l'imprécision obtenue dans le cas 1618-1, on peut supposer que la véritable valeur se situerait dans un intervalle allant de $9,49.10^9/L$ à $14,11.10^9/L$. Donc l'interprétation fiable d'un résultat obtenu dans cet intervalle est en réalité impossible.

Enfin cette imprécision rend le suivi d'un animal délicat. Par exemple (cf. Fig.33) d'après le cas des neutrophiles du chien 1619, une augmentation de 38,5% (c'est à dire dans le cas extrême où on obtiendrait $17,55.10^9/L$ pour la première mesure et $24,3.10^9/L$ pour la deuxième) pourrait tout à fait n'être qu'une variation analytique :

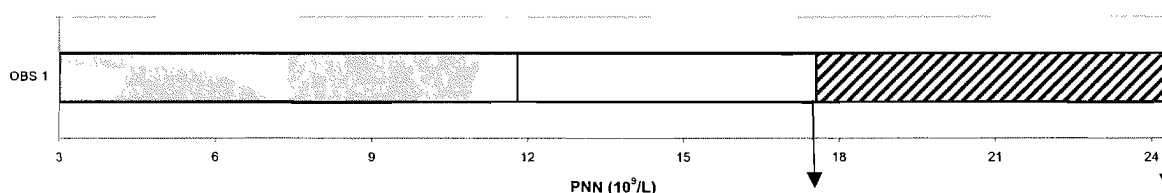


Figure 33 : exemple de résultats possibles en numération de neutrophiles (hachuré), chez un même chien, et simplement dus à la variation analytique (Intervalle de référence en grisé).

En regard de cette importante imprécision dans les résultats de la formule manuelle, la formule automatisée pourrait présenter un net avantage. Cependant, d'après les résultats donnés par l'appareil VetABC® pour le chien en leucocytose, sa fiabilité reste à nuancer.

Les facteurs susceptibles d'affecter les résultats et d'expliquer la variation analytique dans cette étude sont de trois types : l'erreur minimale due à l'échantillonnage aléatoire de 100 cellules, l'erreur mécanique incluant toute variation dans la qualité du frottis notamment les irrégularités de distribution cellulaire dans l'étalement et enfin l'erreur attribuée à l'interprétation de la morphologie cellulaire dépendant uniquement de l'observateur (Cf. part.1 II/ 3.).

La répétabilité de la méthode de lecture (en créneaux, suivant les normes NCCLS, 1992) est difficile à étudier ici puisqu'il n'y a que 5 lectures par frottis. En observant la distributions des résultats pour chaque frottis et chaque observateur, on constate que la dispersion ne semble pas être la même. Il est légitime de penser que le choix de la zone de lecture est essentiel : la dispersion des résultats dépend alors du jugement de l'observateur mais aussi de la qualité du frottis (si la distribution cellulaire dans cette zone est très irrégulière, les résultats des lectures seront très différents). Il serait d'ailleurs intéressant de

voir dans quelle mesure la répétabilité de la lecture s'améliore lorsqu'on augmente le nombre de cellules lues. En effet, pour le chien 1619 notamment, la lecture de 100 cellules comprenait parfois un seul bord, parfois deux. En supposant que les proportions leucocytaires ne sont pas les mêmes le long des bords et dans le corps du frottis, augmenter le nombre de cellules aurait alors plus d'intérêt que si l'on présume d'une distribution homogène comme le fait Rümke C.L., 1977, lors de considérations statistiques (Cf. part.1 II/3.1.).

L'analyse de variance en données répétées a révélé que:

- l'effet de l'interaction entre frottis et observateur et l'effet observateur sont significatifs uniquement dans le cas des monocytes du chien 1618. On peut supposer que la différence entre observateur est essentiellement due au manque d'expérience de l'observateur 1, qui présente des difficultés à différencier parfois neutrophiles et monocytes (cf. Fig.30). Ainsi on recommence l'analyse de variance en regroupant neutrophiles et monocytes dans la même variable (pour ne pas tenir compte des erreurs d'identification entre ces deux types de cellules). Les effets observateurs disparaissent en analysant la somme des résultats neutrophiles + monocytes :

1618	Effet Observateur	Effet Frottis	Effet Observateur*Frottis
Monocytes	p = 0.000	p = 0.000	p = 0.004
Monocytes+Neutrophiles	p = 0.716	p = 0.002	p = 0.939

Tableau 14 : résultats de l'analyse de variance sur les numérations en monocytes et la somme des numérations en monocytes et neutrophiles d'après les 50 lectures des frottis du chien 1618 (effet significatif en gras)

Par ailleurs, lorsque les résultats des observateurs sont différenciés, l'analyse de variance ne montre des effets frottis significatif que pour l'observateur 2 (expérimenté). On peut supposer que ces effets sont masqués chez l'observateur 1 par les erreurs d'identification.

- l'effet frottis est significatif pour les lymphocytes (cas 1618 et 1619), pour les monocytes (cas 1619) et les neutrophiles (cas 1618). Lorsque c'est le seul effet présent, il explique à chaque fois environ 30% des résultats. La répartition de ces groupes cellulaires (que l'on peut classer en petites et grosses cellules blanches) varie donc en fonction du frottis. Plusieurs expériences antérieures ont montré que les grosses cellules sont plus nombreuses aux extrémités de l'étalement (queue de frottis et parfois bords latéraux) (MacGregor R.G.S., 1940 ; Davidson E., 1958 ; Humbert F., 1983). On a vu que Seybold I.M. *et al*, 1980 et Kidd R., 1991 pensent que les grosses cellules ont parfois le temps de migrer vers les bords du frottis (cf. part.1 II/ 3.3.).

CONCLUSION

Il est donc important de retenir que :

- la formule sanguine manuelle est très imprécise. Seule une forte augmentation ou une forte diminution du nombre d'un type leucocytaire permettent de conclure. La choisir comme méthode de référence pour évaluer un appareil d'hématologie pourrait être discutable.
- il existe de nombreux facteurs de variation regroupés sous les termes d'erreur mécanique, d'erreur due à l'observateur, et d'erreur d'échantillonnage qui est elle inévitable pour un nombre de cellules à compter fixé. On a vu ici que les deux premières erreurs ont un poids relativement faible (en général pas plus de 30% de l'erreur globale). Mis à part une mauvaise identification des monocytes, il n'y a pas d'effet observateur notable.
- pour diminuer l'erreur globale, il faut donc soit contrôler les facteurs entrant en jeu dans l'erreur mécanique (on aura au mieux une amélioration de 30%), soit diminuer l'erreur d'échantillonnage, en comptant un grand nombre de cellules (c'est ce que font les automates d'hématologie).
- l'erreur mécanique (l'effet frottis) pourrait s'expliquer par une distribution hétérogène des différents types leucocytaires, les grosses cellules seraient plus ou moins nombreuses aux extrémités, et notamment sur les bords. Selon de nombreuses publications et notamment celle du NCCLS, la zone de lecture comprend les bords. En fonction de la méthode de lecture utilisée, ils seront plus ou moins balayés par l'objectif, d'où des résultats très différents de l'une à l'autre. MacGregor R.G.S., 1940 affirme que c'est la méthode en créneaux qui serait la plus représentative de la totalité du frottis. Cependant dans notre étude, le manque de répétabilité et de reproductibilité de cette méthode de lecture pourrait s'expliquer par le fait que le nombre de cellules lues est fixe. En effet, en s'arrêtant à 100 cellules, le trajet du microscope comprenait parfois 1 bord et s'arrêtait au centre du frottis, parfois 2 bords voire plus lorsque la densité cellulaire était plus faible. En considérant que le frottis présente un axe de symétrie dans sa longueur (MacGregor R.G.S., 1940 ; Humbert F., 1983), respecter cette symétrie dans le trajet de balayage pourrait diminuer l'effet de cette distribution hétérogène (l'effet « bords »). Le comptage pourrait alors s'arrêter lorsque le trajet comprend un nombre pair de bords balayés, ceci en fixant seulement un nombre minimum de cellules à compter, par exemple 100.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle PICAUT Céline

a été admis(e) sur concours en : 2000

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 16/06/05

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, A. DIQUELOU, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle PICAUT Céline

intitulée :

« Contribution à l'étude statistique de la formule leucocytaire manuelle chez le chien : effet frottis et effet observateur. »

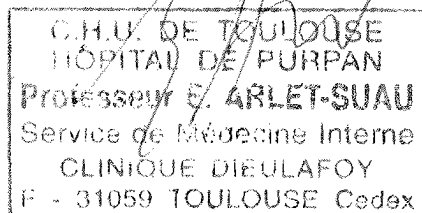

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Armelle DIQUELOU**



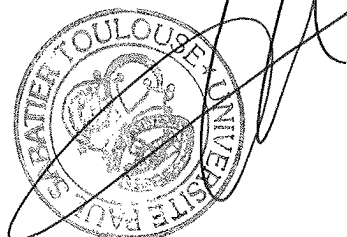
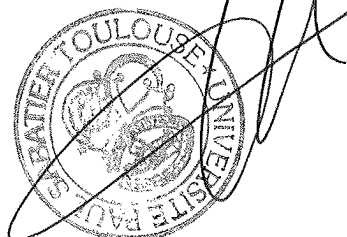
**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Elisabeth ARLET-SUAU**



**Vu le : 07 JUIN 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



Annexe 1 : ELEMENTS FIGURES DU FROTTIS SANGUIN

Les cellules sanguines, en suspension dans le plasma, se classent en trois catégories fonctionnelles, les globules rouges (érythrocytes), les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes (thrombocytes). Elles sont toutes formées dans la moelle osseuse au cours du processus d'hématopoïèse.

- les érythrocytes ont pour fonction principale le transport d'oxygène et de dioxyde de carbone dans le système vasculaire.
- les leucocytes participent aux défenses de l'organisme et transitent grâce au sang jusqu'à leur principal lieu d'action, les tissus. Ainsi, le nombre et la nature des leucocytes circulants dépendent des demandes tissulaires et de la production médullaire.
- les plaquettes jouent un rôle fondamental dans le contrôle des saignements (hémostase primaire) en colmatant les brèches vasculaires (formation de thrombus) et en contribuant à l'activation des facteurs de la coagulation sanguine (Burkitt H.G. *et al*, 1993).

3.1. Les érythrocytes

Les érythrocytes, ou encore hématies et communément appelés globules rouges sont des cellules anucléées (elles perdent leur noyau avant leur libération dans la circulation sanguine), biconcaves, la plupart du temps de forme ronde chez les mammifères et notamment chez le chien. Chez ce dernier, les hématies normales ont un diamètre de l'ordre de 5 à 7 μm (Fritz D., 2000). Elles apparaissent rose clair (éosinophilie de l'hémoglobine, protéine basique remplissant le cytoplasme) lorsqu'elles sont colorées au moyen de techniques standards de coloration polychromatique type *Romanovsky* (telle que les méthodes de *Giemsa*, *Wright* ou *Leishman*) (Burkitt H.G. *et al*, 1993). Sur les frottis sanguins de chien, la bi-concavité de ces disques apparaît du fait de la différence de transmission de la lumière de la périphérie par rapport au centre du corpuscule, ce qui se traduit par une pâleur centrale (Banks W.J., 1986). Cette forme particulière de disque biconcave est responsable d'un rapport surface /volume cellulaire élevé, ce qui optimise les échanges gazeux inter-membraires. De légères crénelures artefactuelles peuvent être observées dans certains frottis sanguins mais les autres modifications de forme sont anormales. De même la formation de quelques rouleaux de globules rouges est commune. Occasionnellement on observe également une légère polychromatophilie (certains globules rouges sont bleutés). Elle est considérée comme normale dans la mesure où elle concerne moins de 2% des hématies sur le frottis, ce qui correspond à la proportion physiologique de réticulocytes (hématies immatures encore chargées d'organites de synthèse tels que mitochondries, ribosomes et appareil de Golgi) dans le sang périphérique. Rarement, on peut rencontrer quelques érythrocytes nucléés (erythroblastes) ou des globules rouges avec un corps de Howell-Jolly (reste de matériel nucléaire persistant après l'expulsion du noyau) (Navaron H., 2002), notamment chez le chien de moins de 6 mois. Enfin, des cristaux d'hémoglobine peuvent parfois être observés à l'intérieur ou à l'extérieur des hématies dans le sang de jeunes chiens, leur présence étant attribuée à l'immaturité du système phagocytaire mononucléé (Jain N.C., 1986).

3.2. Les leucocytes

Ils ont pour origine la lignée myéloïde et lymphoïde. La population leucocytaire est subdivisée en trois catégories : les polynucléaires au noyau polylobé, les lymphocytes et les monocytes.

3.1.1 Les polynucléaires (ou granulocytes)

Les polynucléaires ou granulocytes regroupent trois types : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles, leur nom étant dérivé des propriétés tinctoriales de leurs granulations cytoplasmiques spécifiques. Leurs diamètres varient de 10 à 20 μm en fonction du type. Leur rapport nucléo-cytoplasmique est d'environ 1 et le noyau présente des lobes plus ou moins nombreux. On peut remarquer que le terme polynucléaire est trompeur dans la mesure où ces cellules ne présentent pas plusieurs noyaux comme le pensaient les premiers microscopistes.

- Les granulocytes neutrophiles (GNN) :

Chez le chien, ils sont les plus nombreux des leucocytes sanguins. Ce sont des cellules d'environ 10 à 15 μm de diamètre (Lepoint B., 2003), soit environ deux fois plus grandes qu'un globule rouge.

Chez le chien adulte et sain, ils sont produits exclusivement dans la moelle osseuse en 3 à 5 jours au cours du processus de granulopoïèse. Une fois libérés dans le sang périphérique, ils peuvent migrer dans les tissus pour exercer leurs fonctions principales : la phagocytose et la

destruction de tissus endommagés et des micro-organismes impliqués, en particulier les bactéries lors de la réponse inflammatoire aiguë. Ce sont les constituants majeurs des collections purulentes.

Le noyau, caractéristique du neutrophile, se compose de plusieurs lobes distincts, réunis les uns aux autres par de fins filaments de substances nucléaires, excepté pour les granulocytes immatures ou « band cell » au noyau incurvé en forme de fer à cheval, que l'on retrouve normalement en très faible quantité dans le sang circulant (de 0 à 300 par μl). Le nombre de lobes augmente avec la maturation de la cellule (ainsi un neutrophile mature présente 5 lobes voire plus). La fréquence de répartition des polynucléaires neutrophiles en fonction de leur ancienneté est représentée par la courbe d'Arneth donnant la distribution des cellules en fonction du nombre de lobes nucléaires. Lorsque les formes plurilobées sont majoritaires, on dit que la courbe se déplace à droite (peu de régénération de la population neutrophile), lorsque les formes jeunes prédominent, la courbe se déplace vers la gauche (régénération importante de la moelle) (Fritz D., 2000). La chromatine est très condensée (en motte) ce qui reflète une faible activité de synthèse protéique. Chez la chienne, quelques noyaux (environ 4,5% d'après Jain N.C., 1986) présentent un petit appendice nucléaire appendu à l'un des lobes et représentant le chromosome X inactif ou corpuscule de Barr (Stevens A. *et al*, 1993). Le cytoplasme d'aspect incolore à grisâtre, contient trois types de vésicules (primaires, secondaires et tertiaires) limitées par une membrane d'où le terme de granulation. Les granulations primaires azurophiles (mauves), dites non spécifiques, sont analogues aux lysosomes des autres cellules et leur nombre décroît au cours de la maturation par rapport aux granulations secondaires, elles sont donc rarement visualisées au microscope optique. Chez le chien, les granulations secondaires (apparaissant plus tard au cours de la maturation) ou spécifiques, plus petites et de coloration légèrement brunâtre (neutrophiles) restent elles aussi difficilement visibles au microscope optique (Jain N.C., 1993). Enfin des granulations tertiaires ont été plus récemment identifiées chez l'homme, au microscope électronique (Borregaard N. *et al*, 1997).

Pour mieux comprendre les variations en nombre des neutrophiles lors de phénomène pathologique, il est utile de connaître les différents compartiments avec leurs « pools » cellulaires et les transits de l'un à l'autre. Il existe trois territoires pour les granulocytes : médullaire, sanguin et tissulaire.

Le compartiment médullaire comprend les pools de cellules souches, de prolifération (myéloblastes, progranulocytes et myélocytes), de maturation (métamyélocyte, neutrophiles à noyau non segmenté) et de réserve (neutrophiles à noyau segmenté) (Thrall M.A. *et al*, 2004). Le passage de l'un à l'autre de ces pools est régulé par un système complexe de cytokines (notamment l'interleukine IL-3) et de facteurs de croissance (ou Colony Stimulating Factor : CSF). Les neutrophiles migrent ensuite de façon irréversible vers le compartiment sanguin qui se divise en pool circulant et en pool marginé (de taille approximativement similaire chez le chien). Le pool circulant qui compose les échantillons sanguins réalisés par ponction veineuse, se localise dans les larges vaisseaux où les interactions entre neutrophiles et endothélium vasculaire n'ont normalement pas lieu. Le pool marginé correspond aux polynucléaires adhérant aux parois des capillaires et pouvant être instantanément mobilisés lors de stimulation adrénergique physiologique (Navaron H., 2002). Le passage de l'un à l'autre des pools sanguins peut se faire dans les deux sens. Enfin la sortie (diapédèse) des neutrophiles du secteur sanguin vers les tissus adjacents est définitive.

- Les granulocytes éosinophiles (GNE) :

Ils représentent les granulocytes les plus souvent rencontrés après les polynucléaires neutrophiles, et leur nombre circulant peut augmenter lors d'affections parasitaires, de phénomènes allergiques ou paranéoplasiques. Après leur libération dans la circulation sanguine où ils transitent plusieurs heures, ils migrent préférentiellement vers la peau, les poumons et le tube digestif (Stevens, 1993). Ils jouent de nombreux rôles notamment dans la destruction de parasites, et dans la régulation des phénomènes inflammatoires et allergiques en inhibant les effets délétères des mastocytes (Sodikoff C.H., 1995).

Leur diamètre est de 12 à 15 μm , ce sont des cellules légèrement plus grandes que les neutrophiles. Ils ont un noyau le plus souvent bi-lobé et présentent des granulations cytoplasmiques rose-orange bien rondes. Ces dernières (des lysosomes) sont extrêmement variables chez le chien, elles peuvent être abondantes, petites et régulières ou bien, mais plus rarement, peu nombreuses et de grande taille (soit environ 3-4 μm de diamètre). Avec la technique de coloration de May-Grünwald-Giemsa, ces granulations éosinophiles apparaissent d'un rose légèrement plus intense que celui des globules rouges. Le cytoplasme, entre les granulations, apparaît faiblement bleuté. (Jain N.C., 1986).

- Les granulocytes basophiles (GNB) :

Ils interviennent lors d'exposition aux allergènes dans une réaction d'hypersensibilité immédiate dite anaphylactoïde. Les mécanismes précis de leur production et de leur fonction restent mal connus.

Ce sont des cellules de diamètre comparable à celui des neutrophiles, caractérisés par de grosses granulations cytoplasmiques intensément basophiles. Le noyau est segmenté mais à un moindre degré que pour les neutrophiles matures. Ils sont rarement mis en évidence sur le frottis d'un chien normal par les techniques classiques et ne doivent pas être confondus avec des mastocytes normalement absents dans le sang, aux granulations bleu-nuit à pourpre mais dont le noyau est rond non lobulé (Stevens A. *et al*, 1993 ; Fritz D., 2000).

Les granulations varient en taille et en nombre, mais ne sont jamais suffisamment nombreuses pour remplir la totalité du cytoplasme qui apparaît gris bleuté (basophile).

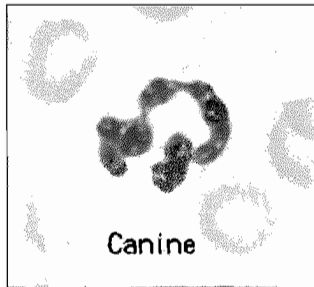


Fig.34.1 : Polynucléaire neutrophile : noyau plurilobé et granulations neutrophiles

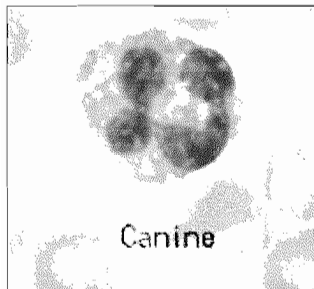


Fig. 34.2 : Polynucléaire éosinophile : noyau plurilobé et granulations éosinophiles

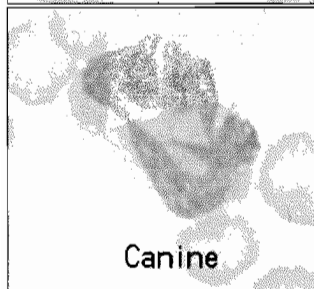


Fig. 34.3 : Polynucléaire basophile : noyau plurilobé et granulations basophiles

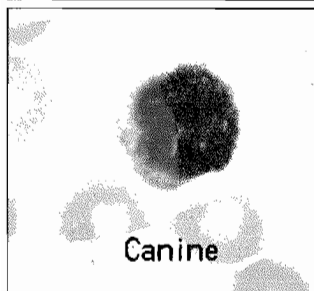


Fig. 34.4 : Lymphocyte : noyau rond et cytoplasme basophile

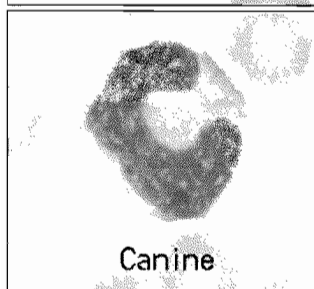


Fig. 34.5 : Monocyte : noyau de forme variable et cytoplasme basophile

Figure 34 : Les leucocytes du chien au microscope optique (objectif à immersion)
(French T.W. *et al*, 1997)

3.1.2) les lymphocytes

Chez le chien adulte, les lymphocytes sont après les polynucléaires, les leucocytes les plus nombreux dans le sang. Il en existe deux types principaux, jouant tous deux un rôle différent dans le système immunitaire mais qu'on ne peut différencier avec un simple examen du frottis sanguin. Les lymphocytes B interviennent dans la réponse immunitaire humorale alors que les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Thrall M.A. *et al*, 2004).

Les lymphocytes sont des cellules rondes généralement plus petites que les neutrophiles et présentant un noyau ovoïde de grande taille par rapport au cytoplasme (rapport nucléo-cytoplasmique élevé). Leur diamètre varie de 10 à 15 μm en fonction de leur état. Ainsi la plupart des lymphocytes circulants sont de petite taille et environ 3% seulement sont de grande taille chez le chien sain. Le noyau contient des zones plus dense où la chromatine forme des amas grossiers, il est généralement de forme ronde à ovale et peut parfois être légèrement indenté. Il laisse la plupart du temps apercevoir une petite quantité de cytoplasme légèrement bleuté (Reagan W.J. *et al*, 1998). Les lymphocytes peuvent présenter occasionnellement de petites granulations azurophiles. L'activation du lymphocyte se traduit par une augmentation de la taille du cytoplasme contenant les organites de synthèse des immunoglobulines. Parallèlement le cytoplasme devient basophile et prend une teinte bleutée plus intense (Fritz D., 2000).

3.1.3) les monocytes

Les monocytes, présents en faible nombre dans le sang circulant, appartiennent au système des phagocytes mononucléaires et sont les précurseurs des macrophages que l'on retrouve dans les tissus et les organes lymphoïdes. On leur attribue communément trois fonctions principales : la destruction des micro-organismes, la destruction des débris et déchets cellulaires (ils peuvent phagocyter de plus larges particules que peuvent le faire les neutrophiles), et des interactions avec le système immunitaire (Zinkl J.G., 1981), notamment par la présentation d'antigène aux lymphocytes T. Ils sont responsables de la destruction physiologique des globules rouges et du métabolisme de recyclage du fer.

Ce sont les plus grandes cellules sanguines avec un diamètre d'une vingtaine de micromètres. Ils possèdent un cytoplasme basophile gris bleuté, dit « ciel d'orage », présentant souvent de multiples vacuoles claires de dimension variable. Ce sont les cellules sanguines les plus difficiles à identifier sur un frottis sanguin (Thrall M.A. *et al*, 2004). En effet, le noyau aux contours irréguliers peut assumer de nombreuses formes : ovale, ovale avec une encoche, en fer à cheval, en trèfle ou encore avec de multiples incisions ou lobulations. La chromatine est généralement plus diffuse que dans les polynucléaires, notamment les jeunes neutrophiles au noyau incurvé (band-cell) avec lesquels on les confond parfois (Jain N.C., 1986 ; Stevens A. *et al*, 1993). De plus, ils sont généralement de plus grande taille et le cytoplasme est légèrement plus foncé que celui des neutrophiles adjacents. Lorsque leur identification est incertaine, on peut éventuellement repasser au plus faible grossissement afin de comparer leur taille aux autres cellules.

3.3. Les plaquettes

Les plaquettes interviennent dans le processus d'hémostase en obstruant la brèche vasculaire (formation d'un thrombus), en offrant un support à l'assemblage des protéines de la coagulation et en sécrétant des facteurs impliqués dans la réparation du vaisseau (Burkitt H.G. *et al*, 1993).

Elles sont plus nombreuses que les globules blancs mais on les distingue moins bien sur les étalements sanguins, et sont parfois regroupés en amas dans la queue du frottis. Ce sont des éléments anucléés issus de la fragmentation de précurseurs médullaires : les mégacaryocytes. De forme très variable, elles sont limitées par une membrane irrégulière émettant souvent de fins pseudopodes et dont le cytoplasme est finement granuleux (Fritz D., 2000) : le plus souvent elles apparaissent comme des structures arrondies présentant une accumulation au centre du cytoplasme (granulomère) de fines granulations pourpres (azurophiles) entourées d'une matrice (hyalomère) bleu pâle peu visible. Leur taille varie de 2,5 μm de diamètre (pour les formes rondes) à 3,5 μm de longueur pour les formes ovales. On peut parfois observer des mégaplaquettes de taille égale à supérieure à une hématie lors de thrombopénie régénérative (Jain N.C., 1986).

Annexe 2 : RESULTATS DE L'ETUDE PRELIMINAIRE

Résultats des comptages de la totalité des 3 frottis sanguins par zone quadrillée (longueur et largeur divisées en 4 segments numérotés de 1 à 4 et de a à d respectivement). Les résultats convertis en pourcentages sont précisés en grisé :

T05 1113		1		2		3		4	
a	GNN	65	60.2	179	56.8	193	54.4	203	53.3
	GNE	5	4.6	24	7.6	21	5.9	25	6.6
	GNB	0	0.0	0	0.0	1	0.3	0	0.0
	Lympho	32	29.6	102	32.4	121	34.1	143	37.5
	Mono	6	5.6	10	3.2	19	5.4	10	2.6
	Non Id	7		20		13		22	
b	GNN	58	70.7	136	53.8	139	51.7	187	53.4
	GNE	5	6.1	19	7.5	15	5.6	15	4.3
	GNB	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Lympho	18	22.0	91	36.0	110	40.9	141	40.3
	Mono	1	1.2	7	2.8	5	1.9	7	2.0
	Non Id	9		3		14		22	
c	GNN	50	56.8	185	63.4	193	52.4	217	47.3
	GNE	4	4.5	14	4.8	32	8.7	28	6.1
	GNB	0	0.0	0	0.0	1	0.3	0	0.0
	Lympho	32	36.4	88	30.1	134	36.4	198	43.1
	Mono	2	2.3	5	1.7	8	2.2	16	3.5
	Non Id	9		28		49		21	
d	GNN	38	46.9	143	65.9	161	56.7	221	53.0
	GNE	12	14.8	4	1.8	19	6.7	21	5.0
	GNB	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	Lympho	29	35.8	61	28.1	100	35.2	169	40.5
	Mono	2	2.5	9	4.1	4	1.4	6	1.4
	Non Id	2		12		37		25	

T05 1802		1		2		3		4	
a	GNN	122	80.8	367	68.7	718	76.3	289	72.3
	GNE	4	2.6	32	6.0	48	5.1	17	4.3
	GNB	1	0.7	1	0.2	2	0.2	0	0.0
	Lympho	22	14.6	124	23.2	149	15.8	84	21.0
	Mono	2	1.3	10	1.9	24	2.6	10	2.5
	Non Id	8		16		13		4	
b	GNN	299	73.5	600	73.5	447	74.0	326	71.2
	GNE	19	4.7	34	4.2	33	5.5	22	4.8
	GNB	0	0.0	3	0.4	3	0.5	0	0.0
	Lympho	80	19.7	158	19.4	109	18.0	100	21.8
	Mono	9	2.2	21	2.6	12	2.0	10	2.2
	Non Id	7		29		9		4	
c	GNN	234	76.2	500	73.9	604	73.7	313	75.1
	GNE	20	6.5	24	3.5	34	4.1	13	3.1
	GNB	2	0.7	3	0.4	0	0.0	0	0.0
	Lympho	41	13.4	131	19.4	166	20.2	81	19.4
	Mono	10	3.3	19	2.8	16	2.0	10	2.4
	Non Id	7		27		21		4	
d	GNN	124	75.2	396	69.4	459	72.9	289	69.6
	GNE	3	1.8	31	5.4	26	4.1	23	5.5
	GNB	1	0.6	3	0.5	0	0.0	0	0.0
	Lympho	32	19.4	126	22.1	126	20.0	84	20.2
	Mono	5	3.0	15	2.6	19	3.0	19	4.6
	Non Id	6		25		19		5	

T05 1857		1		2		3		4	
a	GNN	89	65.0	195	62.1	267	60.0	365	66.2
	GNE	17	12.4	20	6.4	42	9.4	36	6.5
	GNB	0	0.0	1	0.3	0	0.0	2	0.4
	Lympho	31	22.6	76	24.2	94	21.1	123	22.3
	Mono	0	0.0	22	7.0	42	9.4	25	4.5
	Non Id	9		2		10		2	
b	GNN	56	60.9	94	48.0	150	52.8	302	66.7
	GNE	13	14.1	36	18.4	26	9.2	37	8.2
	GNB	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.2
	Lympho	19	20.7	49	25.0	80	28.2	92	20.3
	Mono	4	4.3	17	8.7	28	9.9	21	4.6
	Non Id	7		4		5		5	
c	GNN	26	50.0	55	43.0	142	51.3	278	65.9
	GNE	9	17.3	24	18.8	32	11.6	31	7.3
	GNB	0	0.0	0	0.0	3	1.1	0	0.0
	Lympho	15	28.8	38	29.7	81	29.2	93	22.0
	Mono	2	3.8	11	8.6	19	6.9	20	4.7
	Non Id	6		2		2		2	
d	GNN	124	68.1	367	66.2	391	68.6	422	70.5
	GNE	21	11.5	46	8.3	43	7.5	46	7.7
	GNB	0	0.0	1	0.2	3	0.5	0	0.0
	Lympho	30	16.5	109	19.7	104	18.2	107	17.9
	Mono	7	3.8	31	5.6	29	5.1	24	4.0
	Non Id	6		9		17		11	

Annexe 3 : RESULTATS DU TEST KHI2 D'ADEQUATION A LA LOI NORMALE

On donne ici les résultats du test bilatéral :

$\chi^2_o = (O_i - C_i)^2 / C_i + (O_o - C_o)^2 / C_o$ avec O : effectifs observés et C : effectifs calculés.

i : leucocyte d'une case et o : leucocyte du frottis entier

avec C_i et $C_o \geq 5$ (quand cette condition n'est pas remplie, le résultat est remplacé par « ? » dans les tableaux ci-dessous)

On rejette H_0 : la distribution est homogène si $\chi^2_o \geq \chi^2(1, \alpha)$ avec $\alpha = 0.05$.

T05 1857		colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
rangée a	GNN	0.18	0.16	1.96	2.19
	GNE	1.81	2.83	0.06	4.39
	LYMP	0.07	1.16	0.09	0.13
	MONO	8.28	1.00	11.57	1.39
rangée b	GNN	0.21	19.58	13.16	2.34
	GNE	2.81	20.35	0.00	0.48
	LYMP	0.06	1.26	6.99	0.52
	MONO	0.31	3.22	9.14	0.95
rangée c	GNN	3.90	22.53	16.97	1.30
	GNE	4.23	14.41	2.01	1.57
	LYMP	1.56	4.81	9.27	0.03
	MONO	?	1.99	0.69	0.72
rangée d	GNN	1.90	2.21	7.14	13.54
	GNE	1.31	0.43	1.67	1.46
	LYMP	2.91	1.34	4.00	5.19
	MONO	1.16	0.01	0.40	3.20

Résultats du test Khi2 d'adéquation des pourcentages de la formule leucocytaire de chaque zone avec les pourcentages de la formule leucocytaire du frottis entier : $\chi^2 (\alpha=0.05) > 3.84$ (différence entre les deux pourcentages significative) en surligné.

T05 1113		colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
rangée a	GNN	1.26	0.52	0.03	0.35
	GNE	0.41	1.27	0.02	0.14
	LYMP	2.08	2.09	0.75	0.25
	MONO	?	0.27	9.50	0.01
rangée b	GNN	8.40	0.11	1.06	0.27
	GNE	0.00	0.88	0.13	2.01
	LYMP	7.30	0.01	2.45	2.40
	MONO	?	0.00	0.72	0.65
rangée c	GNN	0.14	8.63	0.82	10.49
	GNE	0.37	0.87	4.33	0.00
	LYMP	0.00	4.80	0.00	9.28
	MONO	?	1.08	0.39	1.08
rangée d	GNN	2.03	10.79	0.41	0.55
	GNE	10.74	6.86	0.17	0.82
	LYMP	0.01	6.29	0.15	3.22
	MONO	?	1.73	1.80	2.52

Résultats du test Khi2 d'adéquation des pourcentages de la formule leucocytaire de chaque zone avec les pourcentages de la formule leucocytaire du frottis entier : $\chi^2 (\alpha=0.05) > 3.84$ (différence entre les deux pourcentages significative) en surligné.

T05 1802		colonne 1	colonne 2	colonne 3	colonne 4
rangée a	GNN	4.42	5.51	4.55	0.19
	GNE	1.32	2.33	0.52	0.12
	LYMP	2.26	4.98	7.67	0.65
	MONO	?	0.96	0.00	0.00
rangée b	GNN	0.01	0.04	0.19	0.98
	GNE	0.00	0.36	1.01	0.04
	LYMP	0.02	0.00	0.71	1.73
	MONO	0.18	0.00	0.74	0.23
rangée c	GNN	1.41	0.14	0.08	0.72
	GNE	2.54	1.74	0.40	2.11
	LYMP	7.18	0.00	0.37	0.00
	MONO	0.64	0.20	1.14	0.03
rangée d	GNN	0.31	4.36	0.04	2.72
	GNE	2.92	0.88	0.33	0.83
	LYMP	0.00	2.59	0.14	0.19
	MONO	?	0.02	0.58	6.98

Résultats du test Khi2 d'adéquation des pourcentages de la formule leucocytaire de chaque zone avec les pourcentages de la formule leucocytaire du frottis entier : $\chi^2 (\alpha=0.05) > 3.84$ (différence entre les deux pourcentages significative) en surligné.

Annexe 4 : RESULTATS DES LECTURES
OBSERVATEUR 1, chien 1618

Les formules leucocytaires des 5 lectures (réalisées sur plusieurs jours) de chacun des dix frottis (F1 à F10) sont donnés ici en pourcentages :

H05-1618 F1	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	71	3	0	20	6
02/06/2005	76	4	0	15	5
03/06/05 M	70	3	0	21	6
03/06/05 AM	69	4	0	24	3
06/06/2005	72	3	0	19	6

H05-1618 F2	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	67	1	0	25	7
02/06/2005	71	4	0	18	7
03/06/05 M	73	1	0	22	4
03/06/05 AM	67	5	0	23	5
06/06/2005	86	2	0	9	3

H05-1618 F3	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	73	1	0	24	2
02/06/2005	67	4	0	26	3
03/06/05 M	84	0	0	13	3
03/06/05 AM	78	0	0	19	3
06/06/2005	70	2	0	24	4

H05-1618 F4	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	65	7	0	25	3
02/06/2005	68	3	0	27	2
03/06/05 M	70	4	0	21	5
03/06/05 AM	76	3	0	19	2
06/06/2005	74	3	0	22	1

H05-1618 F5	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	68	1	0	26	5
02/06/2005	68	6	0	22	4
03/06/05 M	74	1	0	22	3
03/06/05 AM	70	3	0	26	1
06/06/2005	71	3	2	21	3

H05-1618 F6	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	70	3	0	21	6
02/06/2005	78	2	1	16	3
03/06/05 M	78	1	0	19	2
03/06/05 AM	77	3	0	13	7
06/06/2005	76	3	0	14	7

H05-1618 F7	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	79	0	0	15	6
02/06/2005	71	2	0	21	6
03/06/05 M	77	0	0	20	3
03/06/05 AM	68	2	0	19	11
06/06/2005	79	1	0	17	3

H05-1618 F8	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	82	0	0	17	1
02/06/2005	71	2	0	26	1
03/06/05 M	71	2	0	23	4
03/06/05 AM	78	4	0	15	3
06/06/2005	76	3	0	17	4

H05-1618 F9	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	71	2	1	22	4
02/06/2005	80	1	0	17	2
03/06/05 M	72	2	0	21	5
03/06/05 AM	76	3	0	18	3
06/06/2005	70	2	0	20	8

H05-1618 F10	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
01/06/2005	68	4	1	24	3
02/06/2005	77	2	0	18	3
03/06/05 M	67	3	0	26	4
03/06/05 AM	70	3	0	23	4
06/06/2005	72	1	0	18	9

Annexe 4 (2) : RESULTATS DES LECTURES

OBSERVATEUR I, chien 1619

	GNN	GNE	GNB	Lympho	Mono
H05-1619 F1					
01/06/2005	87	3	0	9	1
02/06/2005	86	4	2	7	1
03/06/05 M	88	1	0	8	3
03/06/05 AM	87	4	0	6	3
06/06/2005	81	3	2	11	3
H05-1619 F2					
01/06/2005	83	1	0	11	5
02/06/2005	84	4	1	8	3
03/06/05 M	81	3	2	11	3
03/06/05 AM	86	2	0	9	3
06/06/2005	72	0	1	24	3
H05-1619 F3					
01/06/2005	85	6	0	7	2
02/06/2005	86	3	0	6	5
03/06/05 M	83	2	0	12	3
03/06/05 AM	89	3	0	5	3
06/06/2005	84	2	0	11	3
H05-1619 F4					
01/06/2005	85	2	0	8	5
02/06/2005	78	3	1	15	3
03/06/05 M	86	4	0	7	3
03/06/05 AM	83	3	1	10	3
06/06/2005	81	3	2	11	3
H05-1619 F5					
01/06/2005	87	2	0	8	3
02/06/2005	84	3	1	8	4
03/06/05 M	76	3	1	16	4
03/06/05 AM	85	3	1	10	1
06/06/2005	85	1	1	10	3
H05-1619 F6					
01/06/2005	79	3	2	15	1
02/06/2005	87	2	1	6	4
03/06/05 M	75	5	1	17	2
03/06/05 AM	80	1	0	15	4
06/06/2005	80	4	1	11	4
H05-1619 F7					
01/06/2005	77	3	1	14	5
02/06/2005	78	2	0	18	2
03/06/05 M	84	2	2	9	3
03/06/05 AM	73	8	0	15	4
06/06/2005	77	2	1	17	3
H05-1619 F8					
01/06/2005	85	0	1	7	7
02/06/2005	87	3	0	8	2
03/06/05 M	90	4	0	5	1
03/06/05 AM	82	3	1	11	3
06/06/2005	90	3	0	7	0
H05-1619 F9					
01/06/2005	85	1	1	10	3
02/06/2005	82	5	0	9	4
03/06/05 M	87	2	0	7	4
03/06/05 AM	86	2	1	7	4
06/06/2005	65	2	0	22	11
H05-1619 F10					
01/06/2005	81	4	0	10	5
02/06/2005	87	3	0	7	3
03/06/05 M	86	2	1	11	0
03/06/05 AM	85	1	1	9	4
06/06/2005	87	4	0	7	2

Annexe 4 (3) : RESULTATS DES LECTURES
OBSERVATEUR 2, chien 1618

	GNN	GNE	GNB	L	M
H05-1618 F1					
17/07/2005	74	2	0	17	7
18/07/05 M	68	3	0	21	8
18/07/05 AM	74	3	0	15	8
19/07/05 M	68	4	0	20	8
19/07/05 AM	73	6	0	16	5
H05-1618 F2					
17/07/2005	73	3	0	19	5
18/07/05 M	72	2	0	20	6
18/07/05 AM	71	4	0	22	3
19/07/05 M	71	3	0	18	8
19/07/05 AM	72	1	0	22	5
H05-1618 F3					
17/07/2005	78	1	0	20	1
18/07/05 M	76	2	0	20	2
18/07/05 AM	65	3	0	29	3
19/07/05 M	79	2	0	18	1
19/07/05 AM	65	4	0	28	3
H05-1618 F4					
17/07/2005	72	3	0	21	4
18/07/05 M	73	2	0	23	2
18/07/05 AM	65	5	0	24	6
19/07/05 M	71	3	0	20	6
19/07/05 AM	76	3	0	16	5
H05-1618 F5					
17/07/2005	68	3	0	23	6
18/07/05 M	71	3	0	23	3
18/07/05 AM	77	2	0	20	1
19/07/05 M	65	7	0	26	2
19/07/05 AM	77	2	0	17	4
H05-1618 F6					
17/07/2005	65	2	0	21	12
18/07/05 M	74	2	0	18	6
18/07/05 AM	75	1	0	13	11
19/07/05 M	67	3	0	17	13
19/07/05 AM	75	2	0	14	9
H05-1618 F7					
17/07/2005	71	0	0	18	11
18/07/05 M	75	2	0	13	10
18/07/05 AM	70	4	0	17	9
19/07/05 M	70	4	0	16	10
19/07/05 AM	72	1	0	18	9
H05-1618 F8					
17/07/2005	65	1	0	27	7
18/07/05 M	74	4	0	14	8
18/07/05 AM	74	3	0	21	2
19/07/05 M	74	0	0	23	3
19/07/05 AM	72	4	0	18	6
H05-1618 F9					
17/07/2005	76	2	0	15	7
18/07/05 M	72	4	0	20	4
18/07/05 AM	71	5	0	18	6
19/07/05 M	73	3	0	20	4
19/07/05 AM	75	3	0	20	2
H05-1618 F10					
17/07/2005	80	0	0	17	3
18/07/05 M	67	2	0	27	4
18/07/05 AM	72	1	0	23	4
19/07/05 M	71	3	0	21	5
19/07/05 AM	71	6	0	20	3

Annexe 4 (4) : RESULTATS DES LECTURES

OBSERVATEUR 2, chien 1619

H05-1619 F1	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	82	4	0	10	4
18/07/05 M	80	4	1	14	1
18/07/05 AM	82	6	0	10	2
19/07/05 M	84	5	0	6	5
19/07/05 AM	79	5	0	13	3
H05-1619 F2	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	83	4	0	8	5
18/07/05 M	83	2	0	14	1
18/07/05 AM	74	7	1	15	3
19/07/05 M	85	3	1	7	4
19/07/05 AM	80	3	1	12	4
H05-1619 F3	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	86	3	0	9	2
18/07/05 M	88	2	0	7	3
18/07/05 AM	85	3	0	7	5
19/07/05 M	88	3	0	6	3
19/07/05 AM	92	2	1	3	2
H05-1619 F4	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	82	5	0	11	2
18/07/05 M	82	3	0	13	2
18/07/05 AM	88	0	1	9	2
19/07/05 M	88	1	1	6	4
19/07/05 AM	89	2	0	4	5
H05-1619 F5	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	82	2	1	12	3
18/07/05 M	81	2	3	12	2
18/07/05 AM	84	2	1	7	6
19/07/05 M	83	2	0	9	6
19/07/05 AM	86	1	1	9	3
H05-1619 F6	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	82	3	0	15	0
18/07/05 M	85	3	0	10	2
18/07/05 AM	84	2	0	9	5
19/07/05 M	90	2	0	5	3
19/07/05 AM	80	2	0	13	5
H05-1619 F7	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	85	3	0	8	4
18/07/05 M	79	3	1	14	3
18/07/05 AM	83	5	0	10	2
19/07/05 M	82	2	0	10	6
19/07/05 AM	78	5	1	12	4
H05-1619 F8	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	83	5	0	9	3
18/07/05 M	84	2	0	8	6
18/07/05 AM	86	4	1	5	4
19/07/05 M	82	1	0	13	4
19/07/05 AM	81	3	0	9	4
H05-1619 F9	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	81	6	0	10	3
18/07/05 M	83	3	1	10	3
18/07/05 AM	87	3	0	6	4
19/07/05 M	83	4	0	8	5
19/07/05 AM	80	4	0	11	5
H05-1619 F10	GNN	GNE	GNB	L	M
17/07/2005	88	3	1	5	3
18/07/05 M	84	2	3	7	4
18/07/05 AM	88	3	0	3	6
19/07/05 M	79	5	0	10	6
19/07/05 AM	88	1	2	6	3

Annexe 5 : VALEURS STATISTIQUES DESCRIPTIVES DONNEES PAR SYSTAT10©

L'intervalle des valeurs comprenant 100% des lectures (minimum et maximum), la moyenne, l'intervalle comprenant 95% des lectures (limite supérieure (upper) et inférieure (lower)) ainsi que l'écart-type (standard deviation) sont donnés en 10⁹/L. A chaque type leucocytaire correspondent 50 lectures faites par les observateurs 1 et 2 pour les chiens 1618 et 1619 :

	GNN-1-1618	GNE-1-1618	GNB-1-1618	LYM-1-1618	MONO-1-1618
N of cases	50	50	50	50	50
Minimum	7.15	0.00	0.00	0.99	0.11
Maximum	9.46	0.77	0.22	2.97	1.21
Mean	8.02	0.27	0.01	2.23	0.46
95% CI Upper	8.17	0.32	0.02	2.35	0.52
95% CI Lower	7.87	0.22	-0.00	2.10	0.39
Standard Dev	0.53	0.17	0.04	0.44	0.24

	GNN-2-1618	GNE-2-1618	GNB-2-1618	LYM-2-1618	MONO-2-1618
N of cases	50	50	50	50	50
Minimum	7.15	0.00	0.00	1.43	0.11
Maximum	8.80	0.77	0.00	3.19	1.43
Mean	7.91	0.30	0.00	2.17	0.62
95% CI Upper	8.03	0.35	0.00	2.29	0.71
95% CI Lower	7.79	0.26	0.00	2.05	0.52
Standard Dev	0.42	0.17	0.00	0.41	0.34

	GNN-1-1619	GNE-1-1619	GNB-1-1619	LYM-1-1619	MONO-1-1619
N of cases	50	50	50	50	50
Minimum	17.55	0.00	0.00	1.35	0.00
Maximum	24.30	2.16	0.54	6.48	2.97
Mean	22.39	0.75	0.17	2.82	0.87
95% CI Upper	22.77	0.86	0.22	3.14	1.00
95% CI Lower	22.01	0.64	0.11	2.50	0.73
Standard Dev	1.34	0.39	0.19	1.13	0.47

	GNN-2-1619	GNEAD1619	GNB-2-1619	LYM-2-1619	MONO-2-1619
N of cases	50	50	50	50	50
Minimum	19.98	0.00	0.00	0.81	0.00
Maximum	24.84	1.89	0.81	4.05	1.62
Mean	22.58	0.84	0.12	2.48	0.97
95% CI Upper	22.84	0.95	0.18	2.72	1.08
95% CI Lower	22.31	0.72	0.07	2.24	0.85
Standard Dev	0.94	0.40	0.20	0.84	0.40

Annexe 6 : RESULTATS DE L'ANALYSE DE VARIANCE DONNES PAR SYSTAT10© POUR LES FORMULES LEUCOCYTAIRES DU CHIEN 1618

NEUTROPHILES

Dep Var: GNN1618 N: 100 Multiple R: 0.370 Squared multiple R: 0.137

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	32.490	1	32.490	1.600	0.210
FROTTIS	119.810	9	13.312	0.656	0.746
OBSERVATEUR*FROTTIS	104.610	9	11.623	0.573	0.816
Error	1624.000	80	20.300		

EOSINOPHILES

Dep Var: GNE N: 100 Multiple R: 0.482 Squared multiple R: 0.232

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	2.560	1	2.560	1.180	0.281
FROTTIS	38.200	9	4.244	1.956	0.056
OBSERVATEUR*FROTTIS	11.640	9	1.293	0.596	0.797
Error	173.600	80	2.170		

BASOPHILES

Dep Var: GNB N: 100 Multiple R: 0.413 Squared multiple R: 0.170

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	0.250	1	0.250	3.571	0.062
FROTTIS	0.450	9	0.050	0.714	0.694
OBSERVATEUR*FROTTIS	0.450	9	0.050	0.714	0.694
Error	5.600	80	0.070		

LYMPHOCYTES

Dep Var: LYMPHO N: 100 Multiple R: 0.537 Squared multiple R: 0.288

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	6.760	1	6.760	0.508	0.478
FROTTIS	379.200	9	42.133	3.169	0.003
OBSERVATEUR*FROTTIS	44.440	9	4.938	0.371	0.946
Error	1063.600	80	13.295		

MONOCYTES

Dep Var: MONO N: 100 Multiple R: 0.779 Squared multiple R: 0.606

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	51.840	1	51.840	14.380	0.000
FROTTIS	295.360	9	32.818	9.103	0.000
OBSERVATEUR*FROTTIS	96.960	9	10.773	2.988	0.004
Error	288.400	80	3.605		

NEUTROPHILES+MONOCYTES

Dep Var: GNNMONO N: 100 Multiple R: 0.545 Squared multiple R: 0.297

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	2.250	1	2.250	0.133	0.716
FROTTIS	508.650	9	56.517	3.346	0.002
OBSERVATEUR*FROTTIS	58.650	9	6.517	0.386	0.939
Error	1351.200	80	16.890		

Annexe 7 : RESULTATS DE L'ANALYSE DE VARIANCE DONNES PAR SYSTAT10© POUR LES FORMULES LEUCOCYTAIRES DU CHIEN 1619

NEUTROPHILES

Dep Var: GNN1619 N: 100 Multiple R: 0.578 Squared multiple R: 0.334

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	11.560	1	11.560	0.766	0.384
FROTTIS	403.760	9	44.862	2.974	0.004
OBSERVATEUR*FROTTIS	190.040	9	21.116	1.400	0.202
Error	1206.800	80	15.085		

EOSINOPHILES

Dep Var: GNE1619 N: 100 Multiple R: 0.484 Squared multiple R: 0.235

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	2.560	1	2.560	1.264	0.264
FROTTIS	22.240	9	2.471	1.220	0.295
OBSERVATEUR*FROTTIS	24.840	9	2.760	1.363	0.219
Error	162.000	80	2.025		

BASOPHILES

Dep Var: GNB1619 N: 100 Multiple R: 0.503 Squared multiple R: 0.253

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	0.640	1	0.640	1.347	0.249
FROTTIS	6.240	9	0.693	1.460	0.177
OBSERVATEUR*FROTTIS	5.960	9	0.662	1.394	0.205
Error	38.000	80	0.475		

LYMPHOCYTES

Dep Var: LYMPHO1619 N: 100 Multiple R: 0.553 Squared multiple R: 0.306

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	39.690	1	39.690	3.316	0.072
FROTTIS	306.090	9	34.010	2.841	0.006
OBSERVATEUR*FROTTIS	76.010	9	8.446	0.706	0.702
Error	957.600	80	11.970		

MONOCYTES

Dep Var: MONO1619 N: 100 Multiple R: 0.421 Squared multiple R: 0.177

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	3.240	1	3.240	1.211	0.274
FROTTIS	24.600	9	2.733	1.022	0.430
OBSERVATEUR*FROTTIS	18.160	9	2.018	0.754	0.658
Error	214.000	80	2.675		

NEUTROPHILES+MONOCYTES

Dep Var: GNNMONO N: 100 Multiple R: 0.565 Squared multiple R: 0.319

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OBSERVATEUR	27.040	1	27.040	1.900	0.172
FROTTIS	368.560	9	40.951	2.878	0.005
OBSERVATEUR*FROTTIS	137.760	9	15.307	1.076	0.390
Error	1138.400	80	14.230		

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSEN A.C., WILLIAM GEE B.S., Normal blood values in the Beagle.
Vet Med, 1958 March, 53, 135-156.
2. ANGULO J., FLANDRIN G., Automated detection of working area of peripheral blood smears using mathematical morphology.
Anal Cell Pathol, 2003, 25, 37-49.
3. BANKS W.J., Applied Veterinary Histology, 2nd Ed.
Baltimore (USA) : Williams and Wilkins, 1986, 583 p.
4. BARNETT C.W., The unavoidable error in the differential count of the leukocytes of the blood.
J Clin Invest, 1933, 12, 77-85.
5. BENATTAR L., FLANDRIN G., Comparison of the classical manual pushed wedge films, with an improved automated method for making blood smears.
Hematol Cell Ther, 1999, 41, 211-215.
6. BORREGAARD N., COWLAND J.B., Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.
Blood, 1997 (May 15), 89 (10), 3503-3521.
7. BOUYER J., Méthodes statistiques, Médecine – Biologie.
Paris (FRA) : INSERM Editions, 1996, 353 p.
8. BURKITT H.G., YOUNG B., HEATH J.W., DEAKIN P.J., Histologie fonctionnelle Wheater, 3^{ème} Ed.
Paris (FRA) : Arnette, 1993, 408 p.
9. CAILLARD A., Influence du temps de conservation du sang sur l'hémogramme réalisé avec le VetABC chez le chien et le chat.
Th. : Med. vet. : Toulouse, 2002, n°104, 115 p.
10. CHANDELIER D., La numération – formule sanguine et son automatisation, utilisation du Technicon H1 chez le chien.
Th. : Med. vet. : Alfort, 1987, 126 p.
11. CHRISTOPHER M.M., Evaluation of the blood smear.
In : 2004 WSAVA/FECAVA/HVMS World congress, Scientific proceedings vol I.
Acharnes (GREECE) : 2004, Alta Grafica S.A., 461p.
12. CHUZEL T., Le frottis sanguin : ses apports et ses limites.
Point Vet, 2003, 235 (34), 28-36.
13. CRESPEAU F., Le leucogramme normal du chien et du chat.
L'Animal de Compagnie, 1981, 16(5), 463-476.

14. DAY M.J., Disorders of Leucocyte Function.
In : DAY M.J., MACKIN A., LITTLEWOOD J.D., Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine.
Gloucester (GRB) : British Small Animal Veterinary Association, 2000, 320 p.
15. DAVIDSON E., The distribution of cells in peripheral blood smears.
J Clin Path, 1958, 11, 410-411.
16. DEWHURST E.C., CRAWFORD E., CUE S., DODKIN S., GERMAN A.J., PAPASOULIOTIS K., Analysis of canine and feline haemograms using the VetScan HMT analyser.
J Small Anim Pract, 2003, 44, 443-448.
17. DUBREUIL G., BAUDRIMONT A., Manuel théorique et pratique d'histologie, 4eme Ed.
Paris (FRA) : Vigot Frères, 1950, 627 p.
18. DUNCAN J.R., PRASSE K.W., Veterinary laboratory medicine : clinical pathology, 2nd Ed.
Ames (USA): Iowa State University Press, 1986, 285 p.
19. DUNN J., Disorders of leucocyte number, 93-104.
In : DAY M.J., MACKIN A., LITTLEWOOD J.D., Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine.
Gloucester (GRB) : British small animal veterinary association, 2000, 320 p.
20. ENGLAND J.M., Total and differential leucocyte count.
Br J Haematol, 1976, 33, 1-7.
21. FAUCHET R., IFRAH N., Biologie médicale : hématologie.
Cachan (FRA): Editions Médicales Internationales, 1995, 437 p.
22. FLANDRIN G., VALENSI F., MAZON C., SASSIER P., Les progrès de la détermination de la monocytose sanguine et ses perspectives d'application clinique en pathologie.
Ann Biol Clin, 1993, 50, 787-791.
23. FRENCH T.W., BLUE J.T., STOKOL T., Hematology Atlas.
Cornell University College of Veterinary Medicine, 1997. Available from World Wide Web : <http://www.diaglob.vet.cornell.edu/clinpath/modules/heme_1/intro.htm>
24. FRITZ D., Le frottis sanguine du chien, quelques éléments de lecture.
Prat Med Chir Comp, 2000, 35, 185-187.
25. GERSTMAN B.B., Evaluating the reliability of diagnosis test results.
JAVMA, 1986 Feb, 188(3), 248-251.
26. GRINDEM C.B., Blood cell markers.
Vet Clin North Am : Small Anim Pract, 1996 Sep, 26(5), 1043-1064.

27. GROULADE P., Frottis sanguins, Prélèvements – Etalements – Coloration – Artefacts.
L'animal de compagnie, 1981, 16(5), 449-461.
28. GROULADE P., GUELFY J.-F., Atlas d'hématologie et de cytologie du chien et du chat.
Paris (FRA) : CNVSPA, 1983, 249 p.
29. GUELFY J.F., Renseignements fournis par l'examen d'un étalement de sang en pathologie du chien et du chat (leucoses exclues).
L'animal de compagnie, 1981, 16(5), 479-484.
30. GUELFY J.-F., Le frottis sanguin : examen des leucocytes chez le chien et le chat.
Point Vet, 1993, 25(154), 85-86.
31. GUELFY J.-F., TRUMEL C., MEDAILLE Ch, L'hémogramme.
Point Vét, 1994, 26 (numéro special), 495-499.
32. GUELFY J.F., TRUMEL C., Evaluation d'un appareil d'hématologie, le QBC VetAutoread. Comparaison avec les méthodes de références.
Rev Med Vet, 1995, 146, 765-770.
33. HOPPE B.R., LASSEN E.D., Blood smears and the use of Wright's stain.
Iowa State Univ Vet, 1978, 40(3), 113-116.
34. HOUWEN B., Blood Film Preparation and Staining Procedures.
Lab Hematol, 2000, 6, 1-7.
35. HOUWEN B., The Differential Cell Count.
Lab Hematol, 2001, 7, 89-100.
36. HUMBERT F., Matériel et méthodes pour la réalisation de l'hémogramme chez le chien.
Th. : Med. vet. : Toulouse, 1983, n°115, 89 p.
37. HYUN B.H., GULATI G.L., ASHTON J.K., Differential Leukocyte Count : Manual or Automated, What Should It Be?
Yonsei Med J, 1991, 32(4), 283-291.
38. JAIN N.C., Schalm's veterinary hematology, 4th Ed.
Philadelphia (USA) : Lea and Febiger, 1986, 1221 p.
39. JAIN N.C., Essentials of veterinary hematology.
Philadelphia (USA): Lea and Febiger, 1993, 417 p.
40. JONGH O., Les variations quantitatives de la population leucocytaire sanguine.
Point Vet, 1993, 25(154), 277-284.
41. KERR M.G., Veterinary laboratory medicine.
London (GBR): Blackwell Scientific Publications, 1989, 270 p.

42. KERR M.G., Veterinary laboratory medicine, 2nd Ed.
London (GBR) : Blackwell Science, 2002, 368 p.
43. KIDD R., The basic components of a leukogram.
Vet Med, 1991, 86(3), 263-274.
44. KNOLL J.S., ROWELL S.L., Clinical Hematology : In-Clinic Analysis, Quality Control, Reference Values, and System Selection.
Vet Clin North Am : Small Anim Pract, 1996 Sep, 26(5), 981-1002.
45. LANTIS K.L., et al, Elimination of instrument-driven reflex manual differential leukocyte counts : optimization of manual blood smear review criteria in a high-volume automated haematology laboratory.
Am J Clin Pathol, 2003 May, 119(5), 656-662.
46. LANORE D., Intérêts des examens complémentaires en hématologie et en hémostase dans le diagnostic des tumeurs chez les carnivores domestiques.
Dans : Congrès national CNVSPA.
Nice (FRA) : CNVSPA, 1998, 61-64.
47. LEPOINT B., Contribution à l'évaluation de l'approche de la formule leucocytaire, chez le chien et le chat, donnée par un automate d'hématologie à impédance (Vet ABC).
Th. : Med. vet. : Lyon, 2003, 6609-2003-065, 109 p.
48. LILIEHOOK I., TVEDTEN H., Investigation of hypereosinophilia and potential treatments.
Vet Clin North Am : Small Anim Pract, 2003, 33(6), 1359-1378.
49. LORD-DUBE H., L'ITALIEN R., Hématologie.
Paris (FRA) : Maloine, 1983, 335 p.
50. MACGREGOR R.G.S., The differential leukocyte count.
J Path Bact, 1940, 51, 337-368.
51. MAINLAND D., COADY B.K., JOSEPH S., Observational Variation in the Differential Blood Count.
Folia Haematol, 1935, 54, 8-21.
52. MATHE G., KLINE D.L., Valeur de la formule leucocytaire, comparaison des resultants obtenus par la numeration différentielle directe en cellules et par la lecture d'un frottis.
Rev Hematol, 1960, 15, 352-355.
53. MEDAILLE C., Le prélèvement sanguine : hématologie et biochimie.
Point Vet, 1992, 24(148), 81-82.

54. MEYER D.J., HARVEY J.W., *Veterinary Laboratory Medicine : Interpretation and Diagnosis*, 2nd Ed.
Philadelphia (USA) : W.B. Saunders Company, 1998, 373 p.
55. MILLS J.N., Interpreting blood smears (or what blood smears are trying to tell you!).
Aust Vet J, 1998 Sept, 76(9), 596-600.
56. MORGAN R.V., *Handbook of small animal practice*, 3rd Ed.
Philadelphia (USA) : W.B. Saunders Company, 1997, 1436 p.
57. NAVARON née BERGOIN H., Valeurs usuelles en hématologie canine et féline. Données du laboratoire d'hématologie clinique de l'école nationale vétérinaire de Lyon.
Th. : Med. vet. : Lyon, 2002, 6609-2002-124, 130 p.
58. NCCLS, Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods.
Villanova (USA) : NCCLS approved standard document H20-A vol 12 no 1, 1992, 51p.
59. PIERRE R.V., The Routine Differential Leukocyte Count Vs Automated Differential Counts.
Blood cells, 1985, 11, 11-23.
60. PRATT P.W., *Principles and practice of veterinary technology*.
London (GBR): Mosby, 1998, 707 p.
61. QUARANTA J.F., PESCE A., CASSUTO J.P., L'Hémogramme, de la lecture au diagnostic.
Paris (FRA) : Editions Masson, 1990, 140 p.
62. REAGAN W.J., SANDERS T.G., DENICOLA D.B., *Veterinary Hematology, Atlas of common domestic species*.
Ames (USA) : Iowa State University Press, 1998, 75 p.
63. ROSVOLL R.V., et al, Visual and Automated Differential Leukocyte Counts, A comparison Study of Three Instruments.
Am J Clin Pathol, 1979 June, 71(6), 695-703.
64. RÜMKE C.L., BEZEMER P.D., KUIK D.J., Normal values and least significant difference for differential leukocyte counts.
J Chron Dis, 1975, 28, 661-668.
65. RÜMKE C.L., The Statistically Expected Variability in Differential Leukocyte Counting.
In : KOEPKE J.A. ed., *Differential Leukocyte Counting. CAP Conference/Aspen*.
Shokie Illinois (USA) : College of American Pathologists, 1977, 39-46.
66. RÜMKE C.L., Statistical Reflections on finding Atypical Cells.
Blood cells, 1985, 11, 141-144.

67. SEYBOLD I.M., GOLDSTON R.J., WILKES R.D., The basic clinical laboratory-5 : Evaluation of the blood smear.
Vet Med : Small Anim Clin, 1980, 75(5), 781-789.
68. SHAFER J.A., Preparation and interpretation of peripheral blood smears.
In : HOFFMAN R., BENZ E., SHATTIL S., FURIE B., COHEN H., Hematology basic principles and practice, 1st Ed.
New York (USA): Churchill Livingstone, 1991, 1790-1797.
69. SIMMONS A., LEAVERTON P., HILDENRANT J., ELBERT G., Factors Affecting Manual White Cell Differential Counts.
Am J Med Technol, 1973 Sep, 39(9), 354-359.
70. SIROIS M., Veterinary clinical laboratory procedures.
New York (USA): Mosby, 1995, 160 p.
71. SODIKOFF C.H., Laboratory profiles of small animal diseases, a guide to laboratory diagnosis, 2nd Ed.
St Louis (USA) : Mosby, 1995, 435 p.
72. STEVENS A., LOWE J., Histologie.
Paris (FRA) : Pradel, 1993, 378 p.
73. THEML H., Atlas de poche d'hématologie.
Paris (FRA) : Medecine Sciences Flammarion, 2000, 197 p.
74. THRALL M.A. *et al*, Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.
Philadelphia (USA) : Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 518 p.
75. TRIADOU P., Quelques éléments d'histoire de l'hématologie biologique.
Ann Biol Clin, 2000, 58(1), 19-28.
76. TVEDTEN H.W., Hematology of the Normal Dog and Cat.
Vet Clin North Am : Small Anim Pract, 1981 May, 11(2), 209-217.
77. TVEDTEN H., GRABSKI S., FRAME L., Estimating Platelets and Leukocytes on Canine Blood Smears.
Vet Clin Pathol, 1988, 17(1), 4-6.
78. TVEDTEN H., Advanced Hematology Analysers Interpretation of Results.
Vet Clin Pathol, 1993, 22(3), 72-80.
79. TVEDTEN H., HAINES C., Canine Automated Differential Leukocyte Count : Study Using a Hematology Analyser System.
Vet Clin Pathol, 1994, 23(3), 90-96.
80. WEISER M.G., Hematologic Techniques.
Vet Clin North Am : Small Anim Pract, 1981, 11, 189-208.

81. WEISS D.J., Application of Flow Cytometric Techniques to Veterinary Clinical Hematology.
Vet Clin Pathol, 2002, 31(2), 72-81.
82. WILKES R.D., GOLDSTON R.T., SEYBOLD I.M., The Clinical Pathology Laboratory, Interpretation of the leukocytic hemogram.
Vet Med, 1980 Sept, 75(9), 1355-1358.
83. WILLIAMS D.L., Studies of Canine Leukocyte Antigens: A Significant Advance in Canine Immunology.
The Veterinary Journal, 1997, 153, 31-39.
84. WILLIARD, TVEDTEN, TURNWALD, Small animal clinical diagnosis by laboratory methods, 3rd Ed.
Philadelphia (USA): W.B. Saunders, 1999, 380 p.
85. WINTROBE M.M., et al, Clinical hematology, 8th Ed.
Philadelphia (USA): Lea and Febiger, 1981, 1181 p.
86. ZINKL J.G., The leukocytes.
Vet Clin North Am : Small Anim Pract, 1981 May, 11(2), 237-63.

Toulouse, 2005

NOM : PICAUT

PRENOM : Céline

TITRE : Contribution à l'étude statistique de la formule leucocytaire manuelle chez le chien. Analyse des effets frottis et observateur.

RESUME :

La formule leucocytaire manuelle établie à partir d'un frottis sanguin, est un test couramment utilisé par le praticien vétérinaire. En hématologie humaine, diverses études soulignent cependant son manque de précision par rapport à la formule automatisée aujourd'hui communément utilisée. De nombreux facteurs de variations pourraient expliquer une telle imprécision. L'étude préliminaire a conforté les résultats d'expériences préalables ayant mis en évidence une distribution non homogène des leucocytes dans le frottis. Le but de l'étude principale est d'évaluer la fiabilité de la méthode de lecture utilisée à l'ENVV. Deux séries de 10 frottis (issus de deux chiens) ont été lues cinq fois par deux observateurs. L'étendue des résultats est parfois plus grande que l'intervalle de référence. Hormis une difficulté à différencier monocytes et neutrophiles pour un observateur, l'analyse statistique a mis en évidence un effet frottis, celui-ci pouvant expliquer jusqu'à 30% des résultats.

MOTS-CLES : formule leucocytaire, frottis sanguin, chien.

ENGLISH TITLE : Contribution to the statistical study of the differential leukocyte count in dog. Analyse of the smear and observer effects.

ABSTRACT : The manual differential leukocyte count established from a blood smear is a test usually performed by veterinary clinicians. However, in human haematology, various studies have emphasized its loss of accuracy compared to the automatic differential count commonly used nowadays. Numerous factors of variation could account for such inaccuracy. The preliminary study confirmed the results of previous experiments in which an uneven distribution of leukocytes in the film had been highlighted. The purpose of the main study was to assess the reliability of the counting method applied at ENVV. Two series of 10 smears (obtained from two different dogs) were read five times by two observers. The range of results is sometimes more significant than the reference range. Except monocytes and neutrophils which were sometimes difficultly differentiated by one observer, the statistical analyze concludes to the existence of a smear effect, which can explain up to 30% of results.

KEY WORDS : differential leukocyte count, blood smear, dog.

Imp. SARL NOTREL – 84 Chemin des Capelles – 31300 TOULOUSE