

HEMATOLOGIE DU RAT : HEMOGRAMME ET MYELOGRAMME

JURY:

Président: M Jacques PRIS, Professeur des Universités.

Membres: M Jean-François GUELFY, Professeur à l'ENVV

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA, Maître de conférence à l'ENVV

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur PRIS,

Professeur des universités
Hématologie et maladies du sang

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE,

Monsieur le Professeur GUELF

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur de pathologie médicale des équidés et des carnivores

Qui nous a guidée dans l'élaboration de ce travail et nous a apporté son bienveillant soutien.
Que ce travail soit le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Madame BOURGES-ABELLA,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Maître de conférence en histologie et anatomie pathologie

Qui nous a fait le plaisir de participer à notre jury de thèse.
Sincères remerciements.

A mes parents, pour leur amour, leur présence et leur soutien de chaque instant.

A mon frère, qui aura soutenu son mémoire avant moi.

A mes tantes, pour leur assistance linguistique et **à mes cousins**, pour leur aide informatique.

A mes grands-parents,

A ma famille,

Aux "niçoises" et "niçois" de Toulouse, pour une amitié de dix ans.

A tous mes amis,

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	p 1
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	p 6
TABLE DES ANNEXES	p 7
Introduction	p 8
1. Le rat : <i>Rattus norvegicus</i>	p 9
1.1. Présentation générale	p 9
1.1.1. Historique	p 9
1.1.2. Le rat de laboratoire	p 9
1.1.2.1. Lignées	p 9
1.1.2.2. Types écologiques	p 10
1.1.3. Le rat animal de compagnie	p 11
1.1.4. Comportement	p 11
1.1.5. Entretien	p 11
1.2. Données physiologiques	p 12
1.2.1. Généralités	p 12
1.2.2. Alimentation et physiologie digestive	p 12
1.2.3. Reproduction	p 13
1.2.4. Autres particularités	p 13
1.3. Organes hématopoïétiques et hématopoïèse	p 13
1.3.1. Localisation de l'hématopoïèse durant le développement embryonnaire	p 14
1.3.2. Histologie des organes hématopoïétiques	p 14
1.3.2.1. Moelle osseuse	p 15
1.3.2.2. Rate et foie	p 15
1.3.3. Physiologie	p 15

1.3.3.1. Cellules souches	p 15
1.3.3.2. Régulation	p 16
1.3.3.3. Hématopoïèse extramédullaire	p 19
1.4. Utilisation du rat en recherche biomédicale	p 19
1.4.1. Importance	p 19
1.4.2. Choix de l'animal: souche, âge, sexe	p 20
2. Hémogramme	p 21
2.1. Définitions et rappels	p 21
2.2. Méthodes d'étude et réalisation de l'hémogramme	p 22
2.2.1. Prélèvements sanguins	p 22
2.2.1.1. Ponction cardiaque	p 22
2.2.1.2. Décapitation	p 23
2.2.1.3. Ponction de l'aorte ou de la veine cave	p 23
2.2.1.4. Ponction du sinus rétro-orbitaire	p 24
2.2.1.5. Ponctions caudales	p 24
2.2.1.6. Ponction de la veine jugulaire	p 26
2.2.1.7. Prélèvement à la veine saphène	p 26
2.2.1.8. Prélèvement à l'artère fémorale	p 27
2.2.1.9. Ponction de la veine sublinguale	p 27
2.2.2. Quantités prélevées	p 28
2.2.3. Réalisation d'un frottis	p 29
2.2.4. Stockage des prélèvements	p 30
2.2.5. Comptage cellulaire	p 30
2.2.5.1. Méthodes manuelles	p 30
2.2.5.2. Analyseurs hématologiques	p 31
2.3. Caractéristiques des cellules sanguines	p 34
2.3.1. Globules rouges	p 34
2.3.2. Globules blancs ou leucocytes	p 36
2.3.3. Plaquettes ou thrombocytes	p 38
2.3.4. Complément: propriétés des hématies	p 38
2.4. Valeurs usuelles des constituants et paramètres de l'hémogramme	p 39
2.4.1. Hémogramme de référence	p 39

2.4.1.1. Hémogramme du Sprague-Dawley	p 40
2.4.1.2. Hémogramme du Fisher rat ou rat F344	p 40
2.4.2. Grandes particularités hématologiques du rat	p 41
2.5. Facteurs de variation physiologiques	p 46
2.5.1. Sexe	p 46
2.5.2. Age	p 46
2.5.3. Race ou lignée	p 47
2.5.4. Prélèvements	p 48
2.5.5. Facteurs environnementaux	p 50
3. Le myélogramme ou médullogramme	p 53
3.1. Méthodes d'étude et réalisation du myélogramme	p 53
3.1.1. Prélèvements	p 53
3.1.1.1. Prélèvements de moelle sur des animaux euthanasiés	p 53
3.1.1.2. Prélèvements de moelle sur des animaux anesthésiés	p 54
3.1.2. Réalisation du myélogramme	p 54
3.1.2.1. Etalement	p 54
3.1.2.2. Coloration	p 55
3.1.2.3. Lecture du myélogramme	p 56
3.1.3. Comptage cellulaire	p 56
3.1.3.1. Cellularité globale	p 56
3.1.4.2. Formule du myélogramme	p 57
3.1.4. Autres méthodes d'étude des organes hématopoïétiques	p 58
3.1.4.1. Préparations histologiques de moelle	p 58
3.1.4.2. Autres organes hématopoïétiques	p 59
3.2. Caractéristiques des cellules du myélogramme	p 60
3.2.1. Description morphologique	p 60
3.2.1.1. Cellules de la lignée rouge = lignée érythroïde	p 60
3.2.1.2. Cellules de la lignée blanche = lignée myéloïde	p 61
3.2.1.3. Cellules des autres lignées	p 62
3.2.2. Paramètres chiffrés	p 65
3.3. Valeurs usuelles	p 65
3.3.1. Cellularité	p 65

3.3.2. Myélogramme	p 67
3.3.3. Particularités du rat	p 70
3.4. Variations physiologiques et principaux facteurs de variation	p 70
3.4.1. Sexe	p 70
3.4.2. Age	p 71
3.4.2.1. Cellularité	p 71
3.4.2.2. Myélogramme	p 71
3.4.3. Lieu de prélèvement	p 71
4. Variations sanguines et hématopoï étiques pathologiques spontanées et induites	p 73
4.1. Une mutation: le rat b/b de Belgrade	p 73
4.1.1. Présentation	p 73
4.1.2. Particularités hématologiques sanguines	p 73
4.1.3. Particularités hématopoï étiques	p 74
4.2. Régimes alimentaires particuliers : surcharges ou carences	p 74
4.2.1. Excès de cholestérol	p 75
4.2.2. Carence en fer	p 75
4.2.3. Carence en cuivre	p 76
4.3. Pathologie d'altitude: le mal chronique des montagnes	p 77
4.3.1. Perturbations physiologiques et hématologiques liées à l'altitude	p 77
4.3.2. Particularités hématologiques lors de CMS chez le rat	p 78
4.3.2.1. Paramètres sanguins	p 78
4.3.2.2. Organes hématopoï étiques	p 78
4.4. Maladies spontanées	p 79
4.4.1. <i>Hemobartonella muris</i>	p 79
4.4.2. Leucémie à grands lymphocytes granuleux (leucémie à mononucléaires)	p 80
4.4.3. Leucémie myéloï de ou chloroleucémie ou leucémie granulocytaire	p 82
4.5. Pertes sanguines ou hémorragie	p 83
4.6. Toxicité ou perturbations hématologiques liées à l'administration de certaines substances	p 84
4.6.1. Hyperplasies	p 84
4.6.2. Hypoplasies et aplasies	p 86

4.6.3. Métaplasies et dyshématopoïèse	p 87
Conclusion	p 89
Annexes	p 90
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p 94
RÉFÉRENCES ÉLECTRONIQUES	p 104

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1:** Hématopoïèse du rat et principaux régulateurs. p 18
- Figure 2:** Exemple de cytogramme obtenu par le Technicon H1 après mise en évidence de l'activité peroxydasique des globules blancs. p 33
- Figure 3:** Distribution des réticulocytes en 10 classes selon le stade de maturation pour des rats Wistar adultes. p 44
- Figure 4:** Exemple de cytogramme obtenu à partir de cellules médullaires de rat après incubation avec du DCF (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate). p 58
- Tableau 1:** Hémogramme de rats Sprague-Dawley, mâles et femelles de 7 à 60 semaines. p 42
- Tableau 2:** Hémogramme de rats Sprague-Dawley mâles et femelles âgés de 100 à 140 semaines. p 43
- Tableau 3:** Pourcentage et nombre de réticulocytes sanguins chez des Sprague-Dawley mâles et femelles âgés de 25 jours à 15 mois. p 44
- Tableau 4:** Variations de l'hémogramme de rats mâles F344 âgés de 9 à 12 semaines en fonction du site de ponction. p 45
- Tableau 5:** Moyenne et valeurs extrêmes du nombre total de cellules médullaires nucléés par fémur et par rapport au poids vif pour des rats Wistar. p 66
- Tableau 6:** Moyenne des pourcentages de l'espace médullaire occupé par les cellules hématopoïétiques sur des coupes histologiques de plusieurs os de rats mâles F 344. p 66
- Tableau 7:** Formule du myélogramme de rats Sprague-Dawley normaux mâles et femelles de 4 et 12 mois ainsi que de femelles gravides au 21^{ème} jour de gestation. p 68
- Tableau 8:** Indices de maturation des lignées érythroïdes et myéloïdes et rapport M/E calculés chez des rats Sprague-Dawley mâles et femelles d'âges différents. p 68
- Tableau 9:** Numérations absolues et relatives (pourcentages) du myélogramme huméral de rats mâles Lewis âgés de 8 à 12 semaines. p 69

TABLE DES ANNEXES:

Annexe 1: Hémogrammes de rats Long Evans mâles et femelles âgés de 26 jours à 15 mois.	p 90
Annexe 2: Hémogrammes de rats Wistar mâles et femelles âgés de 6 à 34 semaines.	p 91
Annexe 3: Principaux paramètres hématologiques du rat de compagnie.	p 92
Annexe 4: Comparaison de la méthode automatisée par cytométrie en flux et de la méthode manuelle pour la détermination de la formule du myélogramme fémoral de rats Wistar mâles et femelles adultes.	p 93

Introduction

Autrefois abhorré et méprisé, considéré seulement comme une créature nuisible, le rat est désormais un animal de compagnie à la mode et surtout un sujet d'expérience indispensable en laboratoire. Il est utilisé comme modèle d'étude dans de très nombreux domaines de la recherche biomédicale. Et la plupart des expérimentations pharmacologiques et toxicologiques sont aussi réalisées sur ce petit rongeur.

La littérature scientifique ne manque pas de références sur cet animal et ce document a pour objectif de présenter une synthèse bibliographique sur le rat pour la spécialité médicale qu'est l'hématologie en se limitant exclusivement à l'étude de l'hémogramme et du myélogramme. Etymologiquement étude du sang, l'hématologie est une discipline qui s'intéresse non seulement aux cellules sanguines mais aussi aux organes hématopoïétiques. Elle s'étend sur un vaste domaine recoupant parfois d'autres domaines comme l'immunologie. C'est pourquoi nous avons volontairement limité le sujet à l'étude de l'hémogramme et du myélogramme, sans aborder l'hémostase ni les fonctions des cellules sanguines qui sont plutôt du ressort de l'immunologie. En revanche, on s'attachera à dégager tout au long de l'exposé les particularités hématologiques du rat en établissant des comparaisons avec l'homme et le chien.

Après avoir exposé quelques particularités et caractéristiques physiologiques du rat, *Rattus norvegicus*, nous allons décrire dans une deuxième partie les techniques de réalisation de l'hémogramme, les valeurs usuelles et les variations physiologiques. De même, sont détaillés les méthodes de prélèvement et d'étude de la moelle osseuse, les valeurs usuelles du myélogramme et les principaux facteurs de variation. Enfin dans la dernière partie sont présentés quelques exemples d'anomalies sanguines et hématopoïétiques spontanées ou provoquées.

1. Le rat : *Rattus norvegicus*

1.1. Présentation générale

1.1.1. Historique [17; 49; 63; 88; 115; 147]

Le rat de laboratoire ou de compagnie, *Rattus norvegicus*, est un rongeur de la famille des Muridés. Son ancêtre, le rat sauvage, est originaire d'Asie centrale. Malgré son nom, il n'a pas d'origine norvégienne. Il s'est propagé en Europe, à partir du Moyen-âge, le long des routes commerciales et militaires. Il a également envahi les différents continents en s'introduisant sur les bateaux de marine. Ces animaux vivaient en général en colonies dans des terriers mais, étant également de très bons grimpeurs, il leur était très facile de gagner la terre depuis les bateaux, le long des câbles retenant les navires au port.

Il a commencé à être élevé en Europe dès le XVII^{ème} siècle par des amateurs, surtout pour le faire combattre contre des chiens terriers. Le jeu consistait à lâcher un chien derrière un rat piégé dans un terrier, à la suite de quoi on prenait des paris pour l'un ou l'autre des animaux. Quand ce jeu a été interdit, certains ont continué à l'élever comme animal de compagnie ou de spectacle.

En revanche, le rat noir domestique, *Rattus rattus*, vivait depuis les croisades en commensal de l'homme. Il a eu un rôle considérable dans les épidémies des époques anciennes. Etant notamment le vecteur de la puce transmettant la peste, il fut à l'origine de la mort d'un européen sur quatre, de 1347 à 1352.

C'est seulement au milieu du XIX^{ème} siècle qu'on a commencé à élever le rat en captivité à des fins expérimentales, d'abord en Europe puis aux Etats-Unis. Les laboratoires américains auraient commencé à utiliser le rat albinos après la visite d'un scientifique allemand, Adolf Meyer, dans les années 1890. Le plus célèbre de ces laboratoires est l'institut Wistar de Philadelphie qui a donné son nom à une souche albinos sélectionnée dans cet institut.

Le rat est donc le premier mammifère à avoir été domestiqué en vue d'expérimentation biologique [115].

1.1.2. Le rat de laboratoire

1.1.2.1. Lignées : [61;63; 70; 88; 96; 115; 121; 147; 150]

Les rats utilisés pour la recherche sont en général dérivés du *Rattus norvegicus*, et parfois du *Rattus rattus*, comme on le verra plus loin. On distingue quatre grandes variétés de souches : les souches consanguines (inbred), les souches non consanguines (outbred), les hybrides de première génération et les souches mutantes. Il existe au total plus de 1400 souches et sous-souches répertoriées et utilisées en recherche biomédicale.

Les **souches consanguines** sont issues des croisements entre frères et sœurs ou parents et descendants, pendant plus de vingt générations. Ces souches sont homozygotes à 97% après vingt générations. Elles sont généralement produites pour obtenir un caractère particulier qui fait l'objet d'études ultérieures. Parmi ces souches, on peut citer le rat **Lewis** ainsi que le **Fisher rat** ou **rat F344**, chez qui on observe une fréquence importante de tumeurs testiculaires et

hypophysaires, de leucémie à lymphocytes granuleux et de dégénérescence rétinienne. Le **rat Buffalo** par exemple, présente une augmentation de l'incidence des thyroïdites dites auto-immunes (maladie d'Hashimoto), ainsi qu'une résistance aux néphropathies. Une autre souche consanguine est souvent utilisée pour des expérimentations dermatologiques: il s'agit du WF/PmWp-"fz" **fuzzy rat** dérivé du Wistar ou encore rat hypotriche parce qu'il ne possède pas de poils.

On rencontre parfois des **souches hybrides F1** qui correspondent aux animaux de première génération issus du croisement entre deux souches consanguines différentes.

Il faut différencier les souches consanguines classiques des **souches mutantes**, comme par exemple le **SHR (spontaneous hypertensive rat)** qui présente une hypertension naturelle ou le **rat Brattleboro** à diabète insipide ou encore le **Gunn rat** à ictère hépatique. On peut également citer le **BB rat** et le **Belgrade rat** dont on parlera par la suite pour leurs particularités hématologiques. Ces souches mutantes sont issues d'individus présentant une modification spontanée d'un ou plusieurs gènes. Les lignées mutantes sont ensuite obtenues en accouplant des animaux possédant la même mutation génétique ou des rats de la même famille jusqu'à ce que le caractère modifié soit présent chez tous les descendants.

Enfin, les **souches non consanguines** sont produites à partir de deux grandes colonies où les accouplements se font au hasard entre mâles et femelles non apparentés (c'est-à-dire n'appartenant pas à la même lignée) de façon à minimiser la consanguinité. Ces souches sont considérées comme génétiquement hétérogènes. Parmi ces souches, on trouve le **Sprague-Dawley**, le **Wistar** et le **Long Evans**. Le Sprague-Dawley est un rat albinos avec une tête allongée et une queue plus longue que le corps, tandis que le Wistar a une tête plus large et une queue plus courte que le corps. Le Long Evans est plus petit que les deux races albinos précédentes et il a des poils plus foncés, du brun au noir, surtout sur la tête, ce qui lui donne l'apparence de porter un capuchon.

On utilise également pour la recherche d'autres espèces comme le rat noir *Rattus rattus* qui est plus petit que le *Rattus norvegicus* et qui s'adapte plus facilement aux climats tropicaux. On rencontre, selon les pays, des souches locales comme par exemple des rats originaires d'Amérique du Nord, de la famille des Cricéidés tels que le **rat des cotonniers (Cotton rat) Sigmodon sp** ou le **rat kangourou Dipodomys sp**. En Afrique, on étudie aussi un rat sauvage, le **rat de Gambie, Cricetomys gambianus**.

1.1.2.2. Types écologiques [88; 150]

Comme chez les souris, les rats de laboratoire appartiennent à différentes variétés écologiques selon les conditions d'élevage. On distingue ainsi quatre grands types écologiques basés sur la flore microbiologique de l'élevage :

- Souche indemne de tout germe (pathogen free).
- Souche gnotobiotique infectée par des germes spécifiques connus, c'est-à-dire que la microflore associée est parfaitement connue.
- Souche indemne de certains agents pathogènes spécifiques (specific pathogen free).
- Souche conventionnelle dont la microflore associée est indéterminée.

1.1.3. Le rat, animal de compagnie [17; 63; 70]

Comme d'autres petit rongeurs, le rat n'est plus seulement un animal de laboratoire mais il fait aussi partie des Nouveaux Animaux de Compagnie (ou NAC) de plus en plus nombreux en consultation vétérinaire. Le nombre total de petits mammifères de compagnie était en France de 1,7 million en 1999. Dans cette population le rat arrive derrière le lapin et le cobaye et il faut compter avec les nouvelles espèces comme le chinchilla, les écureuils de Corée, le dègue du Chili ou octodon, le chien de prairie ou encore le furet. Le rat est surtout prisé par les adolescents.

Le rat de compagnie existe en plusieurs variétés de couleur : on trouve surtout des variétés unicolores ou bicolores et plus rarement une variété agouti c'est-à-dire avec un poil tiqueté brun et fauve. Parmi les unicolores, le plus commun est le blanc albinos mais on peut également trouver des rats noirs, crème, roux, bleus ou chocolats. Pour les animaux bicolores, on distingue: le capucin, blanc avec la tête noire ou fauve; le japonais, blanc avec une bande sombre sur le dos; et l'irlandais, noir avec les membres blancs et un triangle blanc sur le poitrail.

1.1.4. Comportement [70; 88; 150]

Les rats sont des animaux dociles et faciles à manipuler surtout si on les habitue dès leur plus jeune âge. Cependant, il peut arriver qu'ils mordent si on les surprend ou si on les manipule rudement.

Ils ont un caractère prudent mais curieux. Ainsi peuvent-ils parfois sortir de leur cage mais ils y retournent vite après une courte période d'exploration. En outre, leur curiosité leur permet de s'adapter à des environnements différents.

Leur intelligence et leur mémoire en font des animaux de compagnie très faciles à dresser et la richesse de leur répertoire comportemental les rend particulièrement intéressants et attachants.

Entre eux, ils sont en général peu agressifs et sociables. On peut donc les élever en groupe sans problème, à condition qu'il n'y ait pas de surpopulation. Même les mâles s'entendent bien mais il faut veiller à séparer les femelles allaitant une portée car elles sont souvent agressives envers leurs congénères. D'autre part, on peut observer du cannibalisme des adultes sur les jeunes.

Il existe cependant des variations raciales: le Long Evans et le rat F344 sont réputés être plus agressifs et moins faciles à manipuler.

1.1.5. Entretien [150]

Les rats peuvent être élevés dans des cages métalliques ou plastiques. L'utilisation de sols grillagés est plus pratique à entretenir mais il faut un maillage bien adapté. Pour la femelle à terme, il faut prévoir des copeaux ou un matériau analogue afin qu'elle puisse faire son nid.

Les cages doivent être nettoyées et stérilisées une à deux fois par semaine. En laboratoire, on peut élever les rats dans des unités conventionnelles ou bien derrière des barrières microbiologiques, totales ou partielles.

Les rats, comme tous les rongeurs, sont sensibles aux variations thermiques et il convient de maintenir une température comprise entre 19 et 23°C. L'hygrométrie doit être comprise entre 40% et 70%.

Une bonne ventilation est particulièrement importante pour cette espèce chez qui la principale voie de contamination, bactérienne ou virale, est aérienne.

Une durée d'éclairement de 12 heures par jour est suffisante. On conseille, toutefois, pour une meilleure reproduction, d'augmenter cette durée jusqu'à 16 heures par jour. Il est aussi recommandé d'éviter une lumière trop vive pour les variétés albinos.

1.2. Données physiologiques

1.2.1. Généralités [14; 63]

Il existe, à ce propos, de nombreuses variations d'un auteur à l'autre. D'après Harkness et Wagner [63], les données ci-dessous sont des valeurs moyennes; elles ne représentent pas un intervalle de valeurs pour un échantillon particulier.

- Le poids d'un adulte est de 450 à 520 grammes pour les mâles et de 250 à 300 grammes pour les femelles. Le poids d'un petit à la naissance est de 5 à 6 grammes.
- La durée moyenne de vie varie de 2,5 à 3,5 ans. La durée de vie maximale décrite est de 56 mois soit un peu plus de 4 ans et demi [14].
- La température rectale moyenne est comprise entre 35,9 et 37,5 °C.
- La fréquence respiratoire est comprise entre 70 et 115 inspirations par minute, et la fréquence cardiaque entre 250 et 450 battements par minute.
- Le nombre de chromosomes (diploïde) est de 42.

1.2.2. Alimentation et physiologie digestive [63; 70; 116; 127]

Le rat est omnivore. Pour 100 grammes de poids vif, il consomme environ 5 à 6 grammes de nourriture et boit 10 ml d'eau par jour. En outre, il est cœotrophe c'est-à-dire qu'il ingère ses excréments afin de pouvoir digérer complètement la cellulose.

En laboratoire, l'alimentation est standardisée et on utilise des régimes complets commercialisés par les grands groupes d'alimentation animale. Ces régimes sont composés principalement d'une source de protéines, (soit de la caséine soit de la poudre de lait écrémé), d'une source de glucides (qui représentent plus de 60% de la ration) sous forme de saccharose ou d'amidon de maïs et enfin de minéraux et vitamines en plus faibles quantités.

La formule dentaire est la même que pour les autres rongeurs soit : incisives 1/1, canines 0/0, prémolaires 0/0, molaires 3/3. Les incisives ont une croissance continue.

L'estomac est divisé en deux parties dont une seule est glandulaire. Le vomissement est impossible du fait de l'anatomie de l'abouchement de l'œsophage à l'estomac.

Le rat ne possède pas de vésicule biliaire.

Le cæcum est très développé et adapté à la digestion de la cellulose grâce à une microflore particulière. C'est un point important à souligner, car chez les souches indemnes de germes, le cæcum peut parfois se dilater et tourner autour de son axe. Cette torsion est alors fatale.

1.2.3. Reproduction [17; 63; 70; 150]

Les mâles et femelles atteignent leur maturité sexuelle entre 65 et 110 jours [63], c'est-à-dire entre 2 et 4 mois environ, quand les mâles pèsent au moins 300 grammes et les femelles 250 grammes. La reproduction cesse vers 12-18 mois [150].

Le mode de reproduction peut être monogame. Dans ce cas un mâle et une femelle sont élevés dans la même cage et on enlève chaque portée après le sevrage. Si on choisit un mode polygame, un mâle est élevé avec deux à six femelles, chaque femelle est séparée dans une cage individuelle juste avant la mise-bas.

Le cycle œstral de la femelle dure 4 à 5 jours et l'ovulation est spontanée. La durée de gestation est de 21 à 23 jours mais peut être rallongée de 3 à 7 jours si la femelle allaite encore une portée précédente pendant la gestation. L'œstrus post-partum est fécond.

La femelle possède 6 paires de mamelles et le tissu mammaire est très développé. Il s'étend du cou jusqu'en région inguinale, ainsi que sur les flancs et sur le dos.

Les portées comprennent 6 à 12 petits environ car il existe des variations en fonction des souches et de l'âge des parents. Les petits naissent aveugles et sans poils dans le nid préparé par la mère. Ils sont sevrés à l'âge de 21 jours. La croissance est très longue, surtout chez le mâle pour qui les os ne sont complètement ossifiés que vers l'âge de 2 ans [150].

1.2.4. Autres particularités [63; 70; 150]

Le rat a une très mauvaise vue mais un odorat fortement développé. Il possède une glande lacrymale particulière, nommée glande de Harder, qui sécrète des larmes riches en lipides et en porphyrines. En temps normal ces larmes lubrifient l'œil, mais en cas de stress important ou de pathologie aiguë, elles s'écoulent par le canthus interne et par le nez, laissant apparaître des croûtes rouges qui ne sont pas du sang. Ce phénomène est appelé chromodacryorrhée.

Parmi les autres spécificités, on peut citer la présence de masses de graisse brune, situées entre les épaules et en région cervicale, qu'il ne faut pas confondre avec des glandes salivaires ou des ganglions. Leur rôle est métabolique et thermorégulateur.

1.3. Organes hématopoïétiques et hématopoïèse

L'hématopoïèse est le phénomène biologique qui préside à l'élaboration des cellules sanguines circulantes. Il s'agit d'un processus mixte qui associe la prolifération et la maturation progressive et continue des cellules. Elle dure toute la vie d'un individu mais sa localisation varie en fonction des différentes périodes de la vie et en fonction des modifications, spontanées ou provoquées, du statut hématologique.

1.3.1. Localisation de l'hématopoïèse durant le développement embryonnaire

[22; 50; 32; 58; 66; 72; 82; 95; 157]

L'hématopoïèse commence chez le rat, comme chez les autres espèces, durant la gestation. Elle débute dès le huitième jour dans le sac vitellin, donc dans un tissu extra-embryonnaire. Là, l'hématopoïèse a lieu dans des îlots sanguins. En périphérie de ces îlots, on trouve des angioblastes qui se différencieront en cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, et en région centrale, se trouvent les hémoblastes, précurseurs des cellules hématopoïétiques. Le sac vitellin commence à libérer des érythroblastes dans la circulation sanguine dès le dixième jour de gestation [157].

L'hématopoïèse se poursuit alors dans les tissus embryonnaires : elle apparaît dans le foie à partir du dixième jour puis dans la rate dès le quinzième jour.

La moelle osseuse commence à assurer son rôle hématopoïétique à partir du dix-septième jour. La granulopoïèse est d'abord prédominante, puis à partir du dix-huitième jour l'érythropoïèse se développe lentement jusqu'après la naissance [95].

Pendant les premières semaines post-natales, l'hématopoïèse se poursuit dans la moelle tandis que, dans le même temps, elle tend à décliner dans la rate et le foie. Ainsi l'érythropoïèse qui commence à se développer dans la moelle seulement quelques jours avant la naissance s'amplifie progressivement pour atteindre son maximum à la fin de la première semaine de vie puis ralentit pour se stabiliser vers l'âge de 40 à 60 jours. Parallèlement, l'érythropoïèse splénique, déjà bien établie pendant le développement embryonnaire, continue à augmenter pour atteindre également son maximum 6 à 8 jours après la naissance, puis elle diminue progressivement jusqu'à disparaître vers le quarantième jour [32]. Cependant, la pulpe rouge splénique conserve toujours des foyers d'hématopoïèse qui gardent la capacité de reprendre une activité hématopoïétique complète à tout moment si besoin est.

Pour les cellules lymphoïdes, responsables de l'immunité, les précurseurs sont dispersés dans le courant sanguin jusqu'aux organes lymphoïdes primaires. Les lymphocytes B migrent depuis la moelle vers les centres germinaux et les cordons médullaires des nœuds lymphatiques et des follicules spléniques, où ils exerceront leur fonction d'immunité à médiation humorale. Les lymphocytes T dérivés du thymus [22; 58] voyagent jusqu'aux tissus lymphoïdes périphériques où ils assureront l'immunité à médiation cellulaire.

1.3.2. Histologie des organes hématopoïétiques

1.3.2.1. Moelle osseuse [33; 95; 141]

La moelle osseuse est composée d'un stroma très vascularisé et de cellules hématopoïétiques. Le stroma est constitué essentiellement d'adipocytes mais aussi de cellules adventicielles réticulées, de macrophages et de fibres réticulées. Les adipocytes sont plus nombreux au centre de la cavité médullaire tandis que les cellules hématopoïétiques ont surtout colonisé la périphérie. Ces dernières sont disposées en cordons anastomosés entre les artères et les sinus veineux. Le passage des cellules matures vers la circulation sanguine se fait par l'intermédiaire de jonctions gap au niveau de l'endothélium vasculaire car il n'existe pas de pores ni de fenestration.

Toute l'hématopoïèse est extravasculaire et compartimentée. La maturation érythrocytaire se déroule autour d'une cellule réticulée de lignée macrophagique, parfois appelée cellule nourricière, sans qu'il y ait de preuve de cette fonction éventuelle. Les cellules

érythroïdes les plus immatures sont situées près de la cellule réticulée centrale et les cellules les plus différenciées se trouvent en périphérie. Ces formations sont appelées "îlots érythroblastiques". Il existe une classification de ces îlots en classes de maturation, selon leur composition cellulaire, majoritairement immature ou différenciée, qui permet d'objectiver l'intensité de l'érythropoïèse, plutôt stimulée ou inhibée. La thrombopoïèse se fait également en des foyers distincts, le long des endothéliums des sinus veineux, alors que la granulopoïèse se déroule de manière plus diffuse.

1.3.2.2. Rate et foie [40; 46; 66; 141; 145]

Une des grandes particularités du rat est, comme chez la souris, l'existence d'une hématopoïèse physiologique extramédullaire dans le foie et la rate.

D'une part le foie joue un rôle hématopoïétique pendant la vie embryonnaire et conserve aussi chez l'adulte, au sein de son architecture, des cellules hématopoïétiques [46; 66].

D'autre part, la rate maintient son rôle hématopoïétique après la naissance, chez les jeunes rats ainsi que chez les sujets âgés. Chez l'adulte, il persiste toujours des foyers hématopoïétiques qui peuvent se réactiver en cas de besoin.

La rate est partagée en trois zones: la pulpe blanche lymphoïde centrée autour des artères spléniques, la pulpe rouge hématogène localisée près des terminaisons artérielles et enfin la zone marginée contenant des macrophages et lymphocytes non circulants. On retrouve donc les cellules hématopoïétiques essentiellement dans la pulpe rouge où il est possible de distinguer des cellules immatures de lignée érythroïde surtout, mais aussi myéloïde et mégacaryocytaire [40]. On observe également des populations de cellules myéloïdes aux marges de la pulpe blanche [141].

1.3.3. Physiologie

La structure générale du système hématopoïétique est la même que chez les autres mammifères et le système de régulation fait intervenir les mêmes types de facteurs humoraux. Il faut néanmoins préciser que ces mécanismes ont été plus particulièrement étudiés chez le rat et la souris, ce qui a permis de déduire un modèle hématopoïétique pour les autres espèces.

1.3.3.1. Cellules souches [35; 59; 60; 66; 72; 77; 90; 97; 138; 154]

Le modèle de structure du système hématopoïétique pose, comme origine commune de toutes les cellules sanguines, un type cellulaire unique appelé **cellule souche primitive hématopoïétique**. Ces cellules, présentes en faible proportion dans les organes hématopoïétiques, sont capables de se multiplier, de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules précurseurs des différentes lignées. Ces cellules souches sont donc qualifiées de pluripotentes.

Ces cellules pluripotentes ne sont pas identifiables morphologiquement sur un simple frottis, car elles ressemblent à des lymphocytes, mais elles ont été mises en évidence grâce aux techniques récentes de clonage et de phénotypage. On peut notamment citer les premières observations ayant révélé que l'antigène Thy-1 était présent à tous les stades de différenciation des cellules hématopoïétiques mais que sa concentration était variable selon le stade de maturation, ce qui a permis de distinguer les différentes cellules hématopoïétiques en fonction de leur concentration en antigène Thy-1 [60].

Ces techniques ont également permis de révéler l'existence d'autres cellules précurseurs, issues de cette cellule souche pluripotente primitive et appelées progéniteurs. Ces autres cellules, contenant également l'antigène Thy-1, sont nommées CFU (Colony Forming Unit), ce qui signifie "unité pouvant former des colonies cellulaires".

Directement issue de la cellule souche hématopoïétique on a observé, chez la souris, la CFU-S c'est-à-dire l'unité pouvant former des colonies dans la rate (Spleen), et chez l'homme on a décrit la CFU-GEMM c'est-à-dire l'unité commune pouvant donner naissance à des colonies de lignée granulocytaire, érythrocytaire, macrophagique ou mégacaryocytaire. Chez le rat on a également mis en évidence la CFU-S [35; 97; 60] mais, selon les auteurs, on emploie le terme de CFU-S ou de CFU-GEMM [66].

La CFU-S est également pluripotente et donne naissance à d'autres CFU, progéniteurs spécifiques des différentes lignées, qui sont dites cellules souches engagées car la phase de maturation est alors irréversible et unidirectionnelle une fois commencée, c'est-à-dire que leur entrée dans la différenciation d'une lignée sanguine est définitive. Ces CFU sont parfois appelées CFC c'est-à-dire Colony Forming Cell quand elles sont mises en évidence lors d'expériences *in vitro*.

On distingue chez le rat deux précurseurs de la lignée érythroïde : la BFU-E (Burst forming Unit - Erythrocytes) qui donne naissance à la CFU-E (Colony Forming Unit - Erythrocytes). On trouve ensuite la CFU-GM (Colony Forming Unit - Granulocytes Macrophages), car les observations suggèrent en effet une origine commune des neutrophiles et monocytes macrophages [66]. Cette dernière peut se différencier en CFU-Macrophages ou CFU-Granulocytes sous l'action de facteurs de régulation spécifiques. Les précurseurs des lignées éosinophiles, basophiles et mégacaryocytaires sont respectivement les CFU-Eos, CFU-Bas et CFU-Meg. Quant aux mastocytes ils dériveraient soit de la CFU-Bas [66] soit d'une CFU-Mast [97].

Cependant, une lignée ne descend pas du progéniteur CFU-GEMM, il s'agit des cellules lymphoïdes. Comme toutes les autres cellules sanguines, elles ont pour origine la cellule souche hématopoïétique mais ensuite celle-ci se différencie en cellule souche lymphoïde engagée qui engendrera les lymphocytes B et T.

On trouve ensuite les précurseurs directement issus des progéniteurs: ce sont les premières cellules identifiables sur un myélogramme. Les précurseurs les plus immatures sont les myéloblastes, les proérythroblastes, les lymphoblastes, les mégacaryoblastes et les monoblastes.

La figure 1 illustre cette structure du système hématopoïétique du rat ainsi que ses principaux facteurs de régulation.

1.3.3.2. Régulation [31; 32; 35; 66; 73; 74; 77; 85; 95; 97; 110; 123]

Ce processus complexe de renouvellement cellulaire et de maturation est contrôlé par l'intermédiaire de médiateurs et de facteurs spécifiques de croissance. Ces facteurs de croissance sont des polypeptides ou des glycoprotéines parmi lesquels on peut citer l'érythropoïétine, la thrombopoïétine, les facteurs stimulant une colonie ou CFS (Colony Stimulating Factors) et de nombreuses cytokines qui jouent à la fois un rôle de médiateur de l'immunité et de régulateur de l'hématopoïèse. Ces cytokines dont on a démontré le rôle dans

la régulation de l'hématopoïèse du rat sont des interférons (α et γ) et des interleukines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11). L'interleukine-3, plus particulièrement, qui est aussi appelée multi-CFS, est responsable du développement des cellules souches pluripotentes et de leur différenciation en cellules précurseurs des différentes lignées [35; 97].

L'érythropoïétine est certainement le facteur le mieux connu et c'est le principal stimulateur de l'érythropoïèse. Cette hormone est essentiellement synthétisée par le rein et aussi par des cellules hépatiques (hépatocytes et cellules de Küpfer). La grande particularité du rat est que l'érythropoïétine est également produite dans la moelle osseuse [73; 95]. Cette dernière source peut être très importante chez les animaux âgés ayant des affections rénales avancées. Il semblerait aussi que l'érythropoïétine d'une mère soit transmise à ses nouveau-nés par le lait, ce qui implique une régulation de l'hématopoïèse différente chez le nouveau-né par rapport à l'adulte [31; 32]. Son rôle est de stimuler la prolifération et la maturation des cellules érythroïdes mais elle n'exercerait son action qu'au stade CFU-E car elle n'agirait pas sur les BFU-E [97; 31; 32]. En outre, elle paraît également être impliquée dans la régulation de la production des plaquettes en stimulant les précurseurs mégacaryocytaires [16].

En revanche, la thrombopoïétine, facteur humoral stimulant les CFU-Meg c'est à dire la lignée plaquettaire, a été mise en évidence chez le rat puis isolée et purifiée beaucoup plus récemment, dans les années 1990 [85; 97].

D'autres facteurs hormonaux entrent encore en jeu, tels que la thyroxine, les stéroïdes sexuels, les hormones hypophysaires. Ainsi par exemple les androgènes stimulent la production de cellules érythroïdes tandis que les œstrogènes l'inhibent [95].

Par ailleurs l'hématopoïèse est influencée par le rythme circadien et la mélatonine joue un rôle régulateur, notamment sur la prolifération des CFU-GM [74].

L'environnement du tissu hématopoïétique joue également un rôle important dans la régulation. Il existe en effet des interactions cellulaires entre les cellules hématopoïétiques et les cellules réticulées (ou stromales) macrophagiques. Ces interactions sont d'ailleurs particulièrement évidentes au niveau des îlots érythroblastiques dont l'architecture est centrée sur une cellule stromale. Il a, en outre, été démontré [97] que ces cellules stromales produisent des facteurs promoteurs de croissance et inducteurs de la différenciation cellulaire comme le SCF (stromal cell factor) par exemple.

Abréviations utilisées dans la figure 1 et non citées dans le texte :

EPO : érythropoïétine

TPO : thrombopoïétine

IL : interleukine

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor : facteur stimulant les colonies granulocytaire et macrophagique.

G-CFS : granulocyte colony stimulating factor: facteur stimulant la colonie granulocytaire

M-CFS : monocyte colony stimulating factor: facteur stimulant la colonie monocytaire

LIF: leukaemia inhibitory factor: facteur inhibiteur de leucémie

SCF: stromal cell factor: facteur stromal

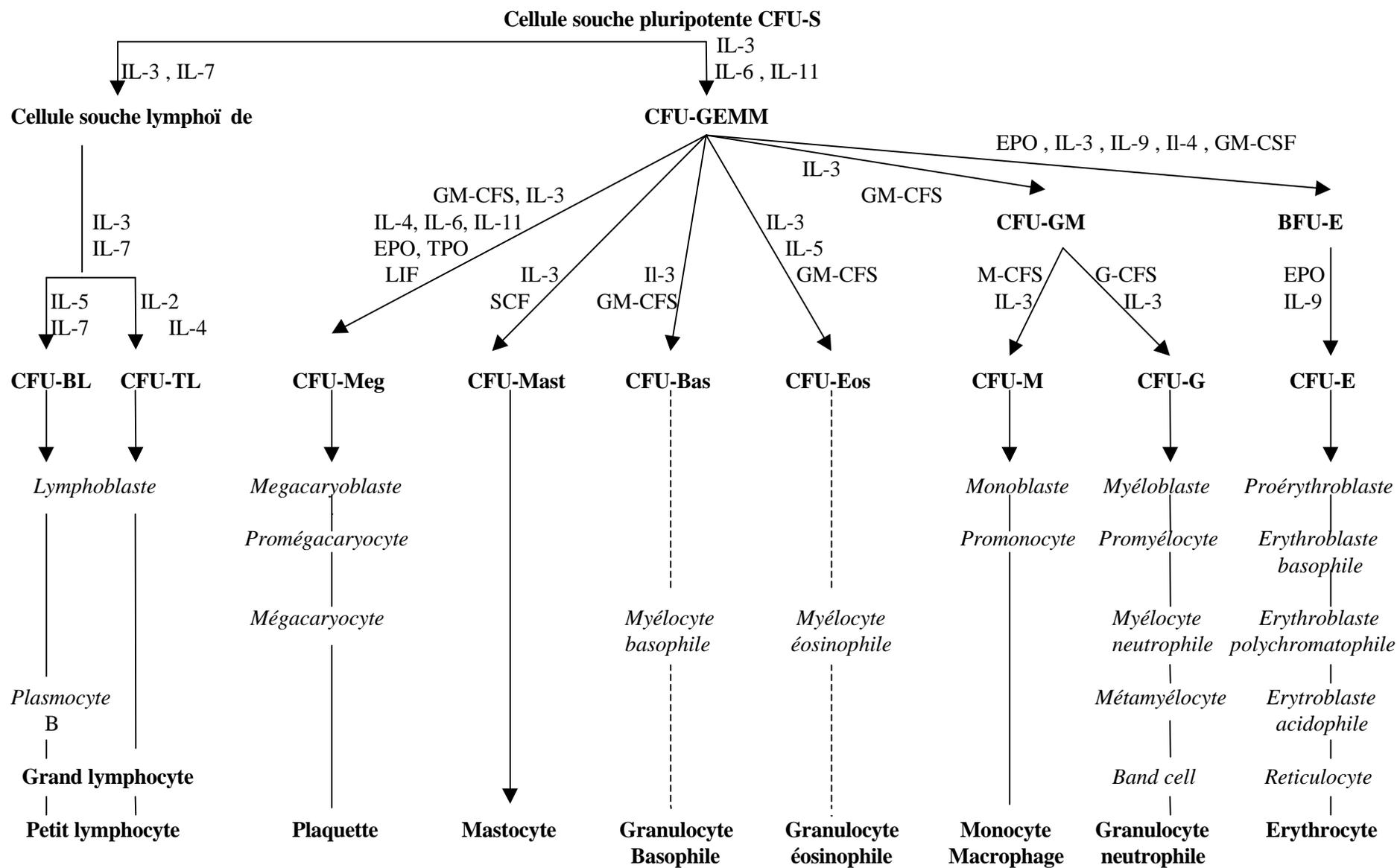


Figure 1: Hématopoïèse du rat et principaux régulateurs [35; 66; 97]

1.3.3.3. Hématopoïèse extramédullaire [71; 92]

Lorsque l'on parle d'hématopoïèse extramédullaire chez le rat, il s'agit essentiellement de l'hématopoïèse splénique. Comme on l'a déjà précisé, la rate joue un rôle hématopoïétique très important durant la période embryonnaire. Ceci est une caractéristique constante chez tous les mammifères. Cependant, après la naissance, la fonction hématopoïétique est très variable d'une espèce à l'autre. Chez l'homme ou les carnivores domestiques, la rate n'a plus d'activité hématopoïétique physiologique après la naissance, mais elle conserve un potentiel hématopoïétique qui peut s'exprimer dans des conditions pathologiques. Cette hématopoïèse extramédullaire est donc, chez ces deux espèces, un processus secondaire qui apparaît en réponse à une incapacité médullaire à satisfaire une demande accrue en cellules sanguines, lors d'anémie hémolytique ou de désordre myéloprolifératif par exemple. Chez la souris, au contraire, il existe une hématopoïèse splénique physiologique qui dure toute la vie de l'animal. Le rat, enfin, représente un cas intermédiaire.

On observe tout d'abord physiologiquement des foyers d'hématopoïèse splénique chez les jeunes rats et chez les sujets âgés sans qu'il y ait d'altération médullaire, ce qui n'existe ni chez l'homme ni chez le chien.

Ensuite, des études [71] menées chez de jeunes rats préalablement irradiés, afin de détruire partiellement les cellules de la moelle osseuse pour induire une hématopoïèse régénérative, ont permis de montrer l'existence de cellules souches et de colonies endogènes spléniques dont la taille diminue avec l'âge à partir de six semaines. Ces colonies sont donc présentes dans la rate durant toute la vie d'un animal mais elles ne se développent chez l'adulte qu'en cas de besoin comme chez l'homme ou le chien. L'absence ou la reprise d'activité hématopoïétique splénique dépend certainement de facteurs humoraux et du stroma; elle se manifeste de manière différente chez le jeune et l'adulte [71]. Contrairement à la souris, la capacité hématopoïétique médullaire est beaucoup plus grande chez le rat et la demande d'hématopoïèse splénique est donc très faible chez l'adulte, sauf en cas de stress ou de destruction massive des cellules hématopoïétiques.

1.4. Utilisation du rat en recherche biomédicale [68; 70; 88; 101; 150]

1.4.1. Importance [70; 88; 101; 150]

Le rat et la souris représentent à eux deux plus de 90% des mammifères utilisés dans la recherche biomédicale, et par ordre d'importance le rat se place en deuxième position juste derrière la souris. Pour donner un ordre d'idées, aux Etats-Unis, plus de quatre millions de rats sont utilisés en laboratoire chaque année.

L'importance du rat en recherche biomédicale est due à plusieurs qualités intéressantes que l'on retrouve également chez la souris: faible durée de vie, grande prolificité associée à une courte durée de gestation, grande diversité génétique des souches, faible coût d'achat et d'entretien. En effet, la gestation courte et la taille importante des portées sont de précieuses prédispositions pour des études de reproduction, de tératogenèse ou de génétique. La faible durée de vie permet des études de toxicité aiguë ou chronique à long terme pendant la durée de vie d'un animal, ou même de plusieurs générations, sur une période de quelques années seulement.

Toutefois, comme le rat a un gabarit plus important que celui de la souris, puisqu'il est huit à dix fois plus gros, sa taille facilite un grand nombre de procédures et par exemple les prélèvements sanguins qui permettent le recueil de quantités plus conséquentes.

Le rat est souvent considéré comme un modèle d'étude et il est donc très largement utilisé dans de nombreux domaines biomédicaux tels que les maladies cardiovasculaires, les désordres métaboliques, les désordres neurologiques, les maladies auto-immunes, la cancérologie, les transplantations, la génétique et parfois aussi l'hématologie. L'hématologie n'est pas toujours le sujet principal de l'expérimentation, mais dans la plupart des cas, que ce soit pour des études toxicologiques, pharmacologiques, cancérologiques ou autres, on prend en compte les caractéristiques hématologiques des animaux testés et on les compare à celles des animaux témoins.

1.4.2. Choix de l'animal: souche, âge, sexe... [68; 101; 115]

Historiquement, les sources majeures de l'expérimentation animale sur le rat sont les souches les plus anciennes, Sprague-Dawley et Wistar, qui ont, à elles deux, fourni la plupart des lignées actuelles. Ces deux souches sont toujours très utilisées dans le monde entier pour des études de toxicité aiguë notamment et pour des expérimentations liées à la reproduction car ce sont des souches très prolifiques. En outre, comme elles ont été largement étudiées auparavant, on dispose de nombreuses données de référence dans la littérature.

Une autre souche très populaire, surtout au Japon, pour les études de cancérologie et carcinogénèse est le Fisher rat ou F344 qui présente la particularité de développer spontanément des leucémies et des cancers prostatiques.

En ce qui concerne l'âge, on choisit en principe des jeunes adultes de plus de huit semaines pour des études de toxicité aiguë et des animaux plus jeunes de trois à six semaines pour débiter des études de toxicité chronique. Pour des expérimentations touchant à la reproduction on attendra évidemment la puberté, soit environ l'âge de trois mois. Si l'âge peut être relativement variable, on peut noter en revanche une certaine constance dans le poids des animaux étudiés, poids presque toujours compris entre 200 et 300 grammes.

Enfin le choix du sexe est très variable d'une étude à l'autre. Les références bibliographiques citées ici utilisent plutôt des mâles sans qu'il soit précisé de raisons particulières. Cependant certaines études sont réalisées sur les deux sexes afin de pouvoir introduire cet éventuel facteur de variation.

Selon la nature de l'expérimentation réalisée et du domaine auquel elle appartient, le choix de la lignée, de l'âge et du sexe de l'animal est donc très variable. L'essentiel est d'avoir, soit des données de référence sur lesquelles se baser, soit utiliser dans tous les cas un lot d'animaux témoins pour établir ces références.

2. Hémogramme

2.1. Définitions et rappels

Par définition l'hémogramme est l'étude cytologique quantitative et qualitative du sang circulant. Il s'agit donc d'un diagramme sanguin qui analyse le nombre, la proportion, la morphologie et les variations des éléments figurés du sang [126; 153].

Il comprend d'abord les numérations absolues érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire.

On établit ensuite pour les globules blancs la formule leucocytaire donnant les pourcentages des différents types de leucocytes : granulocytes neutrophiles, granulocytes éosinophiles, granulocytes basophiles, lymphocytes et monocytes (les granulocytes sont parfois appelés polynucléaires). A côté de la formule leucocytaire on peut évaluer le nombre d'érythroblastes présents sur le frottis. Ce nombre est exprimé en pourcentage du nombre total de globules blancs

Les globules rouges sont aussi caractérisés par les paramètres numériques érythrocytaires suivants:

- L'hématocrite (**Ht**) est le pourcentage du volume sanguin occupé par les globules rouges.
- Le volume globulaire moyen d'un érythrocyte (**VGM**) est exprimé en fentolitres (fl). C'est le paramètre mesuré par la plupart des automates qui en déduisent, connaissant déjà la numération érythrocytaire, l'hématocrite et la CCMH.
- La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (**TCMH**) correspond à la charge moyenne en hémoglobine d'une hématie est exprimée en picogrammes (pg). C'est le rapport de la concentration en hémoglobine sur la numération érythrocytaire.
- La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (**CCMH**) correspond à la charge en hémoglobine pour 100 ml de sang. C'est le rapport de la concentration en hémoglobine sur l'hématocrite. Elle est exprimée en g/100ml ou en pourcentage.
- Le taux de réticulocytes correspond au pourcentage de réticulocytes par rapport au nombre total de globules rouges circulants.
- La concentration en hémoglobine [**Hb**] est déterminée classiquement par spectrophotométrie.

Un autre paramètre érythrocytaire caractérisant une population donnée d'hématie est parfois fourni par certains automates comme le Technicon ou le Coulter S plus. Il s'agit de la **courbe de distribution des globules rouges** (Red Cell Width) établie en fonction de leur taille (donc du VGM) et qui permet d'apprécier le degré d'anisocytose de l'échantillon [126; 153].

Enfin l'hémogramme contient aussi des appréciations qualitatives sur la morphologie des cellules sanguines qui sont toutes aussi importantes que les paramètres chiffrés.

2.2. Méthodes d'étude et réalisation de l'hémogramme

2.2.1. Prélèvements sanguins :

De très nombreuses techniques de prélèvement sanguin sont décrites chez le rat. Le choix d'une technique par rapport à une autre dépend des différents critères à prendre en compte [79]:

- Le volume de sang requis.
- La fréquence des prélèvements à effectuer sur un même animal et donc également la nécessité ou pas de le garder en vie.
- La possibilité ou non d'anesthésier l'animal.
- La nature du sang désiré : artériel, veineux ou mélangé.
- La stérilité éventuelle du prélèvement et de l'échantillon.
- Les effets potentiels de la méthode utilisée sur les paramètres sanguins étudiés.

Il faut également préciser que désormais il existe des règles de bonnes pratiques de laboratoire, visant à minimiser la souffrance animale lors de procédures scientifiques. Notamment depuis 1989, différentes associations scientifiques britanniques ont créé un groupe de travail commun ayant pour but d'améliorer les techniques de laboratoire afin de réduire le plus possible la douleur et la souffrance animale. Elles ont ainsi rédigé en 1993 leur premier article de perfectionnement des procédures de laboratoire sur les prélèvements sanguins chez les petits mammifères et oiseaux [27]. En 1998 a été également créée la Société pour la science animale expérimentale [149] qui donne, elle aussi, des recommandations sur les techniques de prélèvement et les quantités sanguines prélevées. Toutefois ces directives sont parfois très rigides et de ce fait ne sont pas toujours appliquées, particulièrement lorsqu'elles ne satisfont pas aux exigences de certaines études scientifiques [47].

Parmi toutes les techniques décrites, certaines sont terminales telles que les ponctions cardiaques, les ponctions de la veine cave, de l'aorte, des vaisseaux brachiaux, de l'artère carotide, de l'artère rénale ou encore telles que la plus connue, la décapitation.

D'autres techniques peuvent être renouvelées sur un même animal. Parmi celles-ci on peut citer les ponctions ou cathétérisations des veines ou artères, jugulaires, sublinguales, saphènes, fémorales latérales, métatarsiennes dorsales, tarsiennes, caudales, de l'artère péniennne ou bien encore l'amputation d'un doigt de pied, de la queue ou la ponction du plexus orbitaire.

Parmi ces différentes techniques, nous allons décrire les plus courantes, utilisées en routine en laboratoire, en précisant les recommandations actuelles du groupe de travail sur le perfectionnement des méthodes de laboratoire [27] et en indiquant quelles méthodes peuvent être éventuellement employées chez le rat de compagnie.

2.2.1.1. Ponction cardiaque [9; 27; 79; 88]

C'est une méthode de routine qui nécessite une anesthésie et qui est en général suivie d'une euthanasie car même avec des techniciens expérimentés, la mortalité et la morbidité dues aux complications telles que la tamponnade cardiaque sont très importantes. Autrefois on se contentait d'étourdir les animaux par un coup sur la tête avant de réaliser la ponction [88]. Les prélèvements répétés par cette méthode doivent être désormais soigneusement justifiés dans le cadre de projets très précis [27].

L'animal anesthésié est placé en décubitus dorsal, les poils sont tondu ou coupés du côté gauche, entre la quatrième et la sixième côte, c'est-à-dire là où les battements cardiaques sont les plus perceptibles à la palpation. La peau est désinfectée, puis on introduit une aiguille montée dans la paroi thoracique selon un angle de 45° avec l'axe horizontal et l'axe vertical de l'animal. L'extrémité de l'aiguille transmet les battements cardiaques et il faut alors exercer une légère pression supplémentaire afin de pénétrer dans le ventricule gauche. Si la ponction est bonne, le sang doit affluer en jets dans la seringue. Si le flux sanguin n'est pas très puissant ou s'il n'y a que très peu de sang, c'est que l'on a perforé soit le ventricule droit soit le myocarde soit l'atrium gauche, ou que l'on a complètement traversé le cœur. Il faut alors retirer doucement l'aiguille et la repositionner pour ponctionner le ventricule gauche.

Par cette technique, il est possible de recueillir 2 à 5 ml de sang sur de jeunes adultes, en vingt secondes à une minute.

On peut réaliser une ponction cardiaque sur des nouveau-nés à condition d'utiliser une aiguille appropriée. On peut alors obtenir jusqu'à 0,2 ml de sang sur un nouveau-né de 3 à 5 jours, et 0,7 ml sur des petits de 12 semaines.

2.2.1.2. Décapitation [9; 79; 88; 149]

Même si cette méthode peut paraître barbare, elle est pourtant humaine à condition qu'elle soit pratiquée par du personnel entraîné et avec du matériel adéquat. Elle permet de tuer l'animal rapidement tout en facilitant la collecte de sang veineux et artériel, sur un sujet non anesthésié. Néanmoins il est possible de réaliser une anesthésie préalable à l'éther.

La technique consiste à pratiquer une section du cou avec des ciseaux coupants ou une guillotine. On place aussitôt le rat au-dessus d'un récipient adapté pour récolter le sang. Cette méthode présente deux inconvénients majeurs : le prélèvement est souvent contaminé par des débris et liquides tissulaires et il est souvent difficile de réaliser une exsanguination complète.

La décapitation est utilisée pour doser à un instant donné des hormones ou d'autres molécules très labiles, car c'est la seule méthode fiable à l'exception de la mise en place de cathéters à demeure.

2.2.1.3. Ponction de l'aorte ou de la veine cave [9; 79; 88; 149]

Ce sont en général des procédures terminales pratiquées sur des animaux anesthésiés, permettant de réaliser une exsanguination avant l'euthanasie. Il faut pratiquer une laparotomie, puis ponctionner le vaisseau avec une aiguille de diamètre maximum et de longueur minimale pour éviter la coagulation. Les avantages de ces techniques, par rapport à la décapitation, sont la possibilité de collecter du sang stérile et la capacité à réaliser une exsanguination complète.

Il existe aussi des techniques de cathétérisation permanente permettant des prélèvements répétés sans anesthésie. [79]

2.2.1.4. Ponction du sinus rétro-orbitaire

[9; 19; 27; 63; 79; 88; 137; 143; 144; 149]

Cette technique décrite pour la première fois en 1913 [79], a fait l'objet de nombreuses publications depuis 1955 [88] où elle est présentée comme une technique fiable, commode et sans danger. Cependant depuis quelques années, elle est de moins en moins recommandée à cause des effets secondaires sur l'œil et ses annexes.

La ponction peut être réalisée sans anesthésie avec du personnel expérimenté mais il est plutôt recommandé d'anesthésier préalablement l'animal.

L'animal est maintenu d'une main en décubitus latéral et tenu par la peau du cou, entre le pouce et l'index. La pression du pouce sur le cou, derrière l'angle de la mâchoire, permet de réaliser une compression de la veine jugulaire et donc une stase veineuse vers la tête, favorisant le remplissage du sinus rétro-orbitaire. En effectuant une légère traction sur la paupière supérieure avec l'index, on crée une exophtalmie qui facilite le prélèvement.

On utilise des pipettes pasteur héparinées ou des tubes à hématocrite ou microhématocrite selon la quantité à prélever. L'extrémité du tube ou de la pipette est introduite lentement dans l'angle médial ou latéral de l'œil. La progression à travers les tissus est facilitée en imprimant une légère rotation à la pipette. La paroi des vaisseaux est très fragile et dès qu'on atteint le plexus veineux, le sang jaillit dans l'espace périorbitaire et monte par capillarité dans la pipette qu'il faut maintenir horizontale pendant qu'elle se remplit. Il est parfois nécessaire de retirer un peu l'extrémité pour amorcer le flux ou pour obtenir un remplissage plus rapide.

On peut ainsi facilement collecter de 0,5 à 2 ml de sang, suivant le poids et l'âge de l'animal, en remplissant plusieurs tubes à la suite et sans avoir besoin d'aspirer. Avant de retirer la pipette, il faut relâcher la compression, et le saignement cesse spontanément lorsque la pression oculaire se normalise et que le globe empiète sur le sinus veineux. Si ce n'est pas le cas on peut fermer les paupières et exercer quelques instants une légère pression sur le globe oculaire.

Il est possible de répéter les prélèvements en alternant les deux yeux. Cependant, les effets secondaires de cette technique ne sont pas négligeables [9; 27; 143; 144]: écoulements hémorragiques oculaires ou nasaux, anomalie de position du globe oculaire (exophtalmie ou enophtalmie) liée à un hématome rétro-orbitaire, blessure cornéenne ou intraoculaire, réaction inflammatoire sur le trajet de ponction (périoste rétro-orbitaire, muscles oculaires, glande de Harder), sans oublier le stress. Ces lésions éventuelles dépendent en partie de la nature de la pipette ou du tube, mais avant tout de l'expérience du technicien et de la contention de l'animal [143; 144]. Lors d'une ponction unique, les lésions inflammatoires sont encore très marquées tout le long du trajet de ponction quatre jours après le prélèvement et elles ne sont totalement guéries qu'au bout d'un mois [144]. C'est pourquoi cette méthode n'est plus recommandée et doit être réalisée uniquement sous anesthésie.

2.2.1.5. Ponctions caudales [9; 49; 79; 91]

Il existe de nombreuses méthodes permettant d'obtenir du sang à partir de la queue du rat, comme l'amputation ou l'incision de l'extrémité caudale ou bien la ponction de la veine latérale ou de l'artère caudale.

- amputation ou incision de la queue

Si on a uniquement besoin d'une goutte de sang pour un frottis, chez un rat de compagnie par exemple, on peut entailler légèrement le bout de la queue. On peut même, de cette manière, obtenir plusieurs gouttes si on masse avec douceur la queue de la base vers l'extrémité.

On peut aussi couper une petite portion de la queue (moins de 5 mm). Pour faciliter la collecte, il est conseillé de chauffer préalablement la queue ou de la tamponner avec du xylol pour provoquer une vasodilatation. Le sang qui s'écoule est directement recueilli dans un tube collecteur. Certains auteurs [91] préconisent de suturer la coupure pour faciliter la cicatrisation.

C'est une méthode rapide qui permet d'obtenir facilement 0,5 ml de sang en moins d'une minute et jusqu'à 3 ml de sang au maximum sur un adulte [79].

En cas de prélèvements répétés, il est préférable de respecter un intervalle minimum de deux à trois jours [91] ou mieux d'une semaine afin d'éviter la formation de granulomes à l'extrémité de la queue [79].

C'est une technique facile, rapide et reproductible qui ne nécessite pas d'anesthésie et qui permet même le dosage d'hormones labiles [89].

- Ponction des veines caudales latérales [9; 49]

La queue doit obligatoirement être chauffée afin de provoquer une vasodilatation. Pour ce faire, il existe différentes méthodes : placer la queue sous une ampoule pendant une dizaine de minutes (mais il faut prendre des précautions pour éviter les brûlures) ou plus simplement la plonger quelques minutes dans de l'eau à 40°C, ou quelques secondes si l'eau est à 50°C, juste avant le prélèvement. Il existe également des techniques beaucoup plus sophistiquées qui sont même commercialisées par le laboratoire qui les a conçues.

Pour réaliser la compression il suffit de placer un élastique autour de la base de la queue. On utilise une aiguille montée. On ponctionne la veine à 3 cm de l'extrémité de la queue, l'aiguille étant presque parallèle à la queue. Le sang doit apparaître immédiatement mais s'il a du mal à monter dans la seringue, il peut être utile de masser doucement la queue toujours de la base vers l'extrémité, avec du savon humide pour éviter les frottements et ne pas faire bouger l'aiguille.

Cette technique peut être utilisée sans danger sur l'animal de compagnie avec ou sans anesthésie pour faciliter la contention, et c'est la méthode de choix recommandée par le groupe de travail commun sur le perfectionnement des techniques de laboratoire.

- Ponction de l'artère caudale [9; 69; 79; 149]

Cette artère se situe ventralement et juste quelques millimètres sous la peau.

La vasodilatation est obtenue de la même manière que précédemment. L'animal est ensuite placé en décubitus dorsal et la compression réalisée soit à l'aide d'un élastique soit en appuyant l'index sous la queue en amont du site de ponction.

L'aiguille est introduite avec un angle de 20 à 30°, à 2 cm environ de l'index qui comprime. La pression sanguine est telle qu'il n'est pas nécessaire d'aspirer. Il faut par contre comprimer le site de ponction au moins 2 minutes après le prélèvement pour éviter les hématomes.

Comme pour la ponction de la veine latérale, il n'est pas nécessaire d'anesthésier l'animal si la contention est satisfaisante.

Des techniques de pose de cathéter sur une artère ou veine caudale, afin de pratiquer des injections multiples ou des prélèvements successifs, sont décrites mais elles restent plutôt anecdotiques. Le cathéter doit être mis en place sous anesthésie et n'est maintenu que quelques heures au maximum car cette méthode nécessite bien sûr la contention et l'immobilisation de l'animal [149].

2.2.1.6. Ponction de la veine jugulaire [27; 49; 63; 79; 118]

Cette veine est surtout utilisée pour la pose d'un cathéter à demeure, afin de réaliser ultérieurement des prélèvements répétés sur des animaux vigiles. Mais elle est également utilisée, comme l'artère carotide, pour effectuer des prélèvements sur des fœtus ou des nouveau-nés.

Que ce soit pour un simple prélèvement ou la pose d'un cathéter, l'animal doit être anesthésié. Pour poser un cathéter à demeure, il faut pratiquer une incision cutanée et disséquer le tissu sous-cutané jusqu'à la jugulaire. Le cathéter est ensuite mis en place, en direction du cœur, puis fixé et la peau est refermée. Le cathéter doit être nettoyé périodiquement avec une solution saline et hépariné pour éviter qu'il ne se bouche.

Ces méthodes de cathétérisation sont principalement employées pour des études pharmacocinétiques, en considérant qu'elles présentent l'avantage de permettre le recueil de plusieurs échantillons sur un même animal sans interférer avec ses développements physiologiques et comportementaux [79]. Cependant il ne faut pas oublier les risques potentiels d'obstruction du cathéter puis le risque de thrombose ou d'embolie à la levée de l'obstruction, ou encore la possibilité d'infection. En outre, l'animal doit être isolé dans une cage et parfois même harnaché pour éviter qu'il n'arrache le cathéter. Dans ces conditions le rat est obligatoirement stressé et il a même été montré, dans cette espèce, que le fait d'être harnaché ou longtemps maintenu provoquait des ulcères gastriques [27].

Pour un prélèvement unique, on peut également pratiquer une incision cutanée ou bien introduire directement l'aiguille à travers la peau et le muscle pectoral, en direction de la tête de l'animal. Il n'est pas nécessaire d'aspirer beaucoup car le flux est important. C'est une technique rapide : on décrit qu'un technicien expérimenté peut ainsi prélever dix à vingt rats par heure. Cette méthode peut également être utilisée sur l'animal de compagnie mais elle est moins aisée que le prélèvement à la queue [49].

2.2.1.7. Prélèvement à la veine saphène [9; 69; 79;129]

La veine saphène passe d'abord superficiellement à la face médiale de la cuisse puis la saphène latérale passe dorsalement et latéralement sur l'articulation tarsienne.

Pour faciliter le prélèvement il est conseillé de tondre ou raser le site de ponction. Le rat est maintenu en position verticale par un assistant qui comprime la cuisse entre le pouce et l'index de manière à étendre la patte et faire gonfler la veine. L'opérateur maintient également la patte arrière d'une main et, de l'autre, ponctionne la veine avec une aiguille de petit diamètre. Après le prélèvement on retire l'aiguille et on comprime le site de ponction pour

arrêter le saignement. Le temps de contention doit être minimum afin d'éviter le stress qui peut occasionner des saignements excessifs par augmentation de la pression sanguine.

Cette technique ne nécessite pas d'anesthésie.

Une variante [129] de cette technique peut être pratiquée par une personne unique, sur un animal anesthésié. Après avoir préalablement nettoyé la patte postérieure du rat avec de l'alcool, on la frictionne vigoureusement avec une compresse imbibée de salicylate de méthyle afin de créer une vasodilatation qui permet de bien visualiser la veine métatarsienne dorsale et ses ramifications. Avec une aiguille de calibre moyen on ponctionne l'une de ces veines entre deux doigts, puis on retire l'aiguille et on recueille le sang qui s'écoule dans une pipette Pasteur ou un tube capillaire. Il faut ensuite comprimer le site de ponction quelques minutes.

On peut ainsi prélever environ 0,5 ml de sang en une fois et on peut répéter les prélèvements sur la même patte en différents endroits ou sur le membre opposé.

2.2.1.8. Prélèvement à l'artère fémorale [27; 69; 112]

Les artères sont souvent choisies pour mettre en place des cathéters à demeure. Lors d'études nécessitant des prélèvements répétés, il n'est alors plus nécessaire de réanesthésier l'animal et les temps de manipulation sont également diminués. La technique décrite par Pitman et al [112] consiste à placer préalablement un cathéter fémoral sur un rat anesthésié. On profite également de l'anesthésie pour harnacher l'animal à l'aide d'une ceinture en cuir placée autour des hanches. Cette ceinture est elle-même attachée à un anneau fixé sur un arceau en bois au-dessus de la cage. Ce harnachement empêche l'animal d'enlever son cathéter et permet par la suite de réaliser très facilement des prélèvements sanguins sans sortir l'animal de la cage. Par contre les animaux ont très peu de liberté de mouvement dans leur cage ce qui ne semble pourtant pas altérer leurs constantes physiologiques ni leur consommation alimentaire [112].

Néanmoins, comme on l'a déjà signalé précédemment le groupe de travail sur le perfectionnement des techniques de laboratoire ne soutient pas cette méthode qui reste très stressante pour l'animal [27].

2.2.1.9. Ponction de la veine sublinguale [156]

Cette méthode se pratique sur des animaux anesthésiés. L'animal est tenu par la peau du cou ce qui provoque une vasodilatation de la veine sublinguale. On tire ensuite la langue avec de petits forceps, ou de préférence avec les doigts, pour ne pas la blesser. La veine est incisée avec de petits ciseaux ou avec une aiguille, puis l'animal est placé la tête vers le bas au-dessus d'un tube à prélèvement. La blessure est tamponnée avec un coton imbibé d'une solution de chlorure de fer.

Conclusion.

Il existe encore d'autres techniques pour recueillir de petites quantités de sang, comme l'incision d'un doigt ou d'une oreille, mais ont été détaillées ici les méthodes les plus courantes. On peut aussi ajouter que, sur les fœtus, les prélèvements sanguins sont le plus souvent réalisés par ponction cardiaque ou par ponction du cordon ombilical [75].

Selon le site de ponction et la quantité prélevée, qui dépend parfois aussi du site de ponction, on utilise des tubes à microhématocrite pour de très faibles quantités (50 à 100 µl) ou d'autres tubes ou récipients commercialisés. Tous ces tubes sont disponibles avec ou sans anticoagulant. Toutefois, dans le cadre d'analyses hématologiques, les prélèvements se font le plus souvent sur anticoagulant et en particulier sur EDTA, bien que chaque étude définisse ses matériels et méthodes particuliers [69].

2.2.2. Quantités prélevées [9; 24; 47; 49; 69; 99; 119; 126; 149]

Le volume sanguin total d'un rat est de **50 à 70 ml/kg**, ce qui équivaut à **6-7%** du poids corporel, et le volume maximum disponible lors d'une exsanguination est de 20 ml/kg. La quantité de sang ponctionnable s'exprime donc soit en ml/kg, ce qui équivaut à un pourcentage du poids total, soit en pourcentage du volume sanguin total.

Les indications concernant les volumes sanguins prélevés et la fréquence des prélèvements varient selon les auteurs. Le groupe de travail commun sur le perfectionnement [27; 47] recommande de prélever au maximum, en une seule fois 10 % du sang total, tandis que la Société pour la science animale expérimentale propose une limite maximale de 15% du sang total [149]. On retiendra donc qu'on peut effectuer une ponction unique de **10 à 15 % du sang total** ce qui correspond environ à **8 ml/kg** [9]. Un prélèvement supérieur à **15%** du sang total n'est acceptable qu'à condition d'être justifié par des arguments scientifiques [27].

Pour information, pour le rat de compagnie il est conseillé de limiter le prélèvement à 1% du poids corporel au maximum pour éviter tout risque de choc hypovolémique [49].

En revanche, une étude récente [126] a montré qu'il était possible de prélever jusqu'à 40% du sang total sur 24 heures, en fractionnant les prélèvements, et de recommencer la même procédure deux semaines plus tard sans risque vital ni conséquences pathologiques, mais avec des retentissements hématologiques dont on parlera ultérieurement.

Par ailleurs, certains auteurs [24] expriment le volume sanguin en ml par kg ou pour 100 grammes de poids corrigé, c'est-à-dire le poids vif sans le cæcum. En effet, on avait préalablement constaté des différences de volumes sanguins totaux entre des rats élevés de manière conventionnelle et des rats indemnes de germes, plus précisément un volume diminué chez ces derniers, ce qui paraissait révéler une hémococoncentration. Ces variations ont été rattachées à la distension cæcale et la présence importante de matières très liquides chez les rats indemnes de germes, et donc un poids relativement plus important. En conséquence, il faut réévaluer la quantité de sang à prélever en fonction du statut écologique de l'animal de même qu'il faut la diminuer pour les animaux âgés ou obèses.

Enfin, la fréquence des ponctions est, elle aussi, très importante à déterminer car les études pharmacologiques ou toxicologiques nécessitent des prélèvements répétés. En synthèse des différentes publications, il est possible, et recommandé, de réaliser des prélèvements quotidiens de 0,06% du poids corporel soit 0,6 ml/kg/jour ou encore 1% du volume sanguin total. Pratiquement cela correspond pour un rat de 200 grammes à 100µl de sang, ce qui est peu et ne permet pas toujours de réaliser toutes les analyses nécessaires à une étude particulière. On comprend donc que ces valeurs conformes aux directives générales ne sont pas toujours applicables et respectées dans la pratique.

Il est aussi préconisé d'effectuer des ponctions sanguines de 0,5% du poids corporel en une fois, ce qui correspond à 5 ml/kg, à condition de ne répéter ces prélèvements que tous les quinze jours car il n'y a alors aucun risque pour l'animal et aucune perturbation de son statut hématologique.

Enfin un prélèvement de 10% du volume sanguin total ne doit être recommencé que trois à quatre semaines plus tard.

Remarque sur le moment du prélèvement

Pour les études toxicologiques ne nécessitant qu'un seul prélèvement sur la journée par animal, celui-ci est toujours réalisé le matin entre 9 et 11 heures pour ne pas introduire de facteur nyctéméral comme paramètre de variation [6; 89].

2.2.3. Réalisation d'un frottis [9; 66; 99]

Il suffit d'une seule goutte de sang pour réaliser un frottis, prélevée avec [66] ou sans anticoagulant [9]. La goutte est déposée à une extrémité d'une lame de verre propre et dégraissée. On utilise ensuite une autre lame ou une lamelle ou bien encore une lame rodée, qu'on approche juste devant la goutte, en respectant un angle d'inclinaison de 30 degrés avec la première lame. La goutte va alors se répandre le long de la jonction entre les deux lames. Avant qu'elle n'atteigne les bords de la lame rodée, on étale la goutte de sang vers l'autre extrémité de la lame support.

Si le frottis est bien réalisé, il ne doit pas toucher les bords ni occuper plus de trois-quarts de la longueur de la lame. L'angle de 30 degrés est déterminant car l'étalement selon un angle plus obtus fournirait un frottis trop épais, et selon un angle plus aigu, un frottis trop fin, l'idéal étant d'obtenir une monocouche cellulaire.

Le frottis doit être ensuite rapidement séché à l'air pendant une demi-heure au moins. Pour activer l'évaporation et minimiser les artefacts dus au séchage, on peut agiter vigoureusement la lame pendant la première minute de séchage.

Cette méthode manuelle d'étalement demeure la méthode de référence mais certains auteurs [11; 128] utilisent une méthode automatisée à l'aide d'une cyto centrifugeuse (ex : Uni – Smear Spinner) qui permet, d'après eux, d'obtenir plus régulièrement un frottis monocouche.

Après le séchage, le frottis peut être coloré. Il existe de nombreuses techniques de coloration et les plus courantes sont de type Romanowsky, c'est-à-dire qu'elles comprennent des colorants acides et basiques qui font bien ressortir les contrastes de bleu et de rouge. Parmi les colorations de ce type, les plus connues sont les colorations de Wright, de Giemsa et de May-Grünwald-Giemsa qui sont toutes les trois fréquemment utilisées en hématologie [99] et souvent sous forme de colorations rapides (ex : Diff Quick), c'est à dire avec un protocole simplifié.

On peut également employer des colorations plus spécifiques comme par exemple le bleu de méthylène pour mettre en évidence les réticulocytes, ou le méthyle violet pour détecter des corps de Heinz. [66] Il existe aussi des techniques plus récentes de colorations cytochimiques ou immunohistochimiques permettant une classification très précise des cellules selon leurs propriétés.

2.2.4. Stockage des prélèvements [9; 128]

Les prélèvements doivent être analysés aussi rapidement que possible, car plus on attend et plus les cellules se détériorent, à commencer par les plaquettes et les leucocytes [9; 128]. Archer et Jeffcott [9] recommandent donc de ne pas dépasser un temps de stockage maximum afin de réaliser des analyses hématologiques satisfaisantes chez les animaux de laboratoire.

Ce temps varie selon l'examen à faire et correspond à un stockage entre 15 et 20°C. Le frottis sanguin doit être réalisé dans les plus brefs délais suivant le prélèvement et il ne faut pas attendre plus de 24 heures. Les numérations leucocytaires et érythrocytaires ainsi que la détermination du taux d'hématocrite doivent être effectuées dans les 36 heures. Enfin l'hémoglobininémie peut être mesurée avant 96 heures.

Ces valeurs limites peuvent être rallongées d'environ 12 heures si le prélèvement est conservé au frais à 4°C. Dans tous les cas il est conseillé de conserver le prélèvement au frais et de le réchauffer à 20°C au moment de réaliser l'analyse.

2.2.5. Comptage cellulaire

2.2.5.1. Méthodes manuelles [9; 26; 99]

Ce sont les méthodes classiques de référence mais elles ne seront pas détaillées très longuement ici car elles ne comportent pas de caractéristiques spécifiques pour le rat.

Les numérations des différents types cellulaires sont réalisées au microscope à l'aide d'un hémostomètre ou chambre de lecture. Plus précisément l'échantillon sanguin est d'abord dilué dans un réactif spécifique du type cellulaire à recenser, puis on dépose un volume fixé dans une cellule de type Mallassez ou Neubauer. Ces cellules sont des chambres de lecture quadrillées, de volume donné, ce qui facilite le dénombrement des cellules sanguines. Il suffit ensuite de multiplier le nombre de cellules recensées sur le quadrillage par un coefficient de dilution rapporté au volume étudié pour obtenir la numération totale de globules rouges, leucocytes, et plaquettes par unité de volume sanguin.

La formule leucocytaire est réalisée sur un frottis sanguin en déterminant les pourcentages de neutrophiles, d'éosinophiles, de basophiles, de monocytes et de lymphocytes.

L'hématocrite est déterminé sur un tube de Wintrobe ou un tube à microhématocrite, bien pratique lorsqu'on ne dispose que d'un faible volume d'échantillon sanguin comme souvent chez le rat. Le tube est ensuite centrifugé et la mesure de la hauteur occupée par les globules rouges par rapport à la hauteur totale donne le pourcentage d'hématocrite. On obtient également une idée du nombre de leucocytes par la mesure du buffy-coat.

L'hémoglobininémie, enfin, est mesurée par colorimétrie en déterminant la densité optique de l'échantillon pour une longueur d'onde de 540 nm grâce à un spectrophotomètre.

2.2.5.2. Analyseurs hématologiques [48; 53; 62; 56; 89; 128; 139; 148]

L'objectif de cette subdivision est de présenter quelques exemples d'automates utilisés lors d'études toxicologiques chez le rat et leur principe de fonctionnement. Il ne s'agit donc pas d'une liste exhaustive.

Il existe deux principaux types d'automates d'hématologie utilisés par les laboratoires. Certains étudient les variations de l'impédance électrique émise par les cellules étudiées (automate de type Coulter). D'autres, associant des techniques plus complexes comme le laser

et la cytochimie, utilisent le principe de la cytométrie en flux. La cytométrie en flux consiste globalement à faire défiler une à une des cellules devant un faisceau laser. Plus précisément, on utilise d'abord un système d'hydrofocalisation qui va permettre de canaliser les cellules et de les faire passer en file indienne. Pour ce faire, les cellules en suspension à étudier sont envoyées sous pression au centre d'une chambre d'écoulement, à l'intérieur de laquelle arrive un autre liquide qui va enrober la suspension cellulaire sans s'y mélanger et permettre ainsi sa focalisation. Ensuite ces cellules vont traverser les unes à la suite des autres le faisceau laser. Lors de leur passage à travers le laser, elles émettent des signaux lumineux qui sont analysés par l'ordinateur associé au cytomètre. Ces signaux peuvent être de plusieurs natures comme par exemple une diffraction de la lumière par la cellule qui est alors liée à sa taille ou un signal de fluorescence émis spontanément par la cellule ou parce qu'elle a été marquée par un antigène, une coloration...

Ci dessous, sont présentés quelques automates fréquemment cités dans les références bibliographiques; le premier est un analyseur de type Coulter à impédance, les suivants sont des automates de type laser.

- Automate à impédance : Coulter Counter model S-PLUS IV [56; 89; 128]

Cet automate établit les numérations érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire et calcule la concentration en hémoglobine, mais on ne décrit ici que le principe d'étude des paramètres érythrocytaires. L'appareil utilise les variations d'une résistance électrique afin de déterminer la taille des érythrocytes.

Les cellules en passant à travers une ouverture déplacent un volume égal de fluide conducteur. De plus un courant électrique est appliqué au niveau de cette ouverture. Chaque passage d'une cellule à travers l'ouverture provoque alors une augmentation de la résistance électrique. Cette augmentation est traduite en impulsions électriques dont la hauteur est directement proportionnelle au volume cellulaire. La détermination de la taille de la cellule est donc basée sur le déplacement du liquide et on obtient par conséquent la mesure du volume cellulaire (c'est-à-dire le VGM) directement.

Le nombre de globules rouges est déterminé par le total d'impulsions enregistrées. Le taux d'hématocrite est alors déduit selon la formule : $Ht = GR3VGM/10$.

Cet automate, comme la plupart des analyseurs hématologiques, est au départ destiné à l'analyse de cellules humaines. Les limites de précision et le calibrage ne sont pas toujours adaptés à l'animal, et dans ce cas particulier au rat. Plusieurs auteurs recommandent d'ajuster la tension du courant au niveau de l'ouverture, c'est-à-dire d'augmenter le voltage, qui est, pour les automates de médecine humaine, de 150 volts, jusqu'à 175 à 225 volts pour le rat [89; 128].

C'est l'automate le plus utilisé parmi les références bibliographiques citées ici.

- Automate laser : Ortho ELT-8/ds [56]

La numération totale des érythrocytes et leur volume cellulaire sont déterminés à l'aide d'un système laser. Les cellules sont centrées de façon hydrodynamique afin d'obtenir un flux cellulaire laminaire. Chaque cellule va traverser la zone d'étude c'est à dire passer sur la trajectoire du faisceau lumineux émis par le laser. Quand une cellule arrive au niveau du faisceau, la lumière est diffractée, ce qui génère un certain nombre d'impulsions électriques. Lorsque la cellule arrive en plein milieu du faisceau, on atteint le maximum d'impulsions. Puis, quand la cellule commence à quitter cette zone, le nombre et la taille des impulsions diminuent.

Pour chaque cellule l'appareil détermine une intégrale d'impulsions pour la quantité d'impulsions produites et pour le temps de passage de la cellule à travers le faisceau. Cette intégrale donne alors une mesure de la taille de la cellule d'après son diamètre. En effet, les cellules les plus grandes ont un temps de passage plus long et génèrent un nombre d'impulsions plus important. On obtient ainsi la numération érythrocytaire.

Le taux d'hématocrite est déterminé par la somme des intégrales d'impulsions. L'appareil calcule ensuite le volume globulaire moyen (VGM) selon la formule :

$$\text{VGM} = \text{Ht}/\text{GR}310.$$

- Sysmex R-1000 [48; 53]

Cet appareil est destiné à la détermination du nombre absolu et relatif de réticulocytes. Le principe est de colorer les cellules de l'échantillon sanguin à analyser, par une coloration spécifique de l'ARN. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux. En effet, les cellules étudiées passent les unes à la suite des autres à travers un faisceau laser afin de réaliser deux mesures pour chacune des cellules : d'une part l'intensité de la fluorescence émise et d'autre part les indices de la lumière diffractée. La première mesure permet de quantifier la teneur en ARN d'une cellule; la deuxième donne une évaluation de la taille et de la densité de cette cellule. Grâce à la combinaison de ces deux mesures, il est alors possible de distinguer les réticulocytes des érythrocytes et des cellules des autres lignées, et de les dénombrer.

Pour donner un ordre d'idée du temps gagné grâce à cet automate par rapport aux méthodes manuelles, la numération absolue et relative des réticulocytes peut être réalisée sur 30000 cellules sanguines en moins d'une minute.

Cet appareil donne, en outre, une répartition des réticulocytes en dix classes différentes selon leur stade de maturation. La répartition des réticulocytes dans ces dix classes se fait en fonction de leur teneur en ARN donc en fonction de la fluorescence émise. Il calcule également le quotient de distribution, qui est le rapport des classes jeunes sur les classes âgées. La connaissance de cette répartition et du quotient de distribution permet de caractériser la maturation des réticulocytes et d'objectiver, pour une espèce donnée, si cette maturation est plutôt médullaire ou humorale c'est-à-dire si elle a lieu dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique.

Il existe d'autres automates associant une coloration spécifique de l'ARN et la cytométrie en flux. Ces méthodes remplacent de plus en plus les méthodes manuelles et on peut notamment citer la TOFC (Thiazole Orange-Flow Cytometric method), employée par Evans et Fagg [48], qui utilise le thiazole orange comme colorant vital.

- Technicon H1 [62]

Cet analyseur utilise la cytochimie et la cytométrie pour donner une numération sanguine ainsi que les paramètres érythrocytaires et une formule des leucocytes. Ce dernier point est intéressant, car classiquement la formule leucocytaire est obtenue à l'aide du frottis.

1 - Dosage de l'hémoglobine

A partir de 2µl de sang, toutes les cellules sont lysées et le liquide ainsi obtenu est analysé par colorimétrie afin d'obtenir la concentration totale d'hémoglobine de l'échantillon.

2 - Analyse des leucocytes

La première phase est cytochimique. Grâce à un surfactant anionique, on détruit tous les globules rouges de l'échantillon sanguin (12 µl). Les globules blancs restants sont fixés par du formol puis colorés spécifiquement pour mettre en évidence leur activité peroxydasique. Ils

sont ensuite analysés par cytométrie. Ce premier cytomètre utilise deux détecteurs, l'un sensible à la lumière diffractée et l'autre à la lumière absorbée. On obtient alors un cytogramme c'est à dire un ensemble de points représentant les cellules dans un repère géométrique en fonction de l'intensité de la lumière diffractée (axe des Y) et de la lumière absorbée par chaque cellule (axe des X). Un ordinateur analyse ce cytogramme en délimitant les différents amas de points et en les comparant à des données en mémoire afin de déterminer les différents types de globules blancs et leur nombre.

Un exemple de cytogramme obtenu par le Technicon H1 est présenté dans la figure 2.

3 - Analyse des globules rouges et des plaquettes

Les globules rouges sont d'abord transformés en sphères de manière isovolumétrique selon une méthode décrite par Ponder (1948) puis développée par Kim et Ornstein (1983). Les globules rouges et les plaquettes sont ensuite fixés pour être analysés par un second cytomètre. Ce cytomètre utilise un néon laser à l'hélium et deux détecteurs sensibles à la lumière diffractée mais selon deux angles différents. Il permet ainsi de dénombrer les globules rouges et les plaquettes ainsi que le volume des globules rouges. Un ordinateur analyse ensuite les données et les interprète sous forme d'histogrammes afin d'établir les différents paramètres érythrocytaires.

4 - Basophiles et lobulation des leucocytes

Dans une première phase cytochimique les globules rouges et les plaquettes sont détruits ainsi que le cytoplasme des leucocytes excepté les basophiles, mais les noyaux restants des leucocytes pourront alors révéler leur aspect plus ou moins lobulé. Après ces réactions cytochimiques l'effluent est dirigé vers le cytomètre à l'hélium qui analyse séquentiellement les effluents des globules rouges et des plaquettes ou des basophiles.

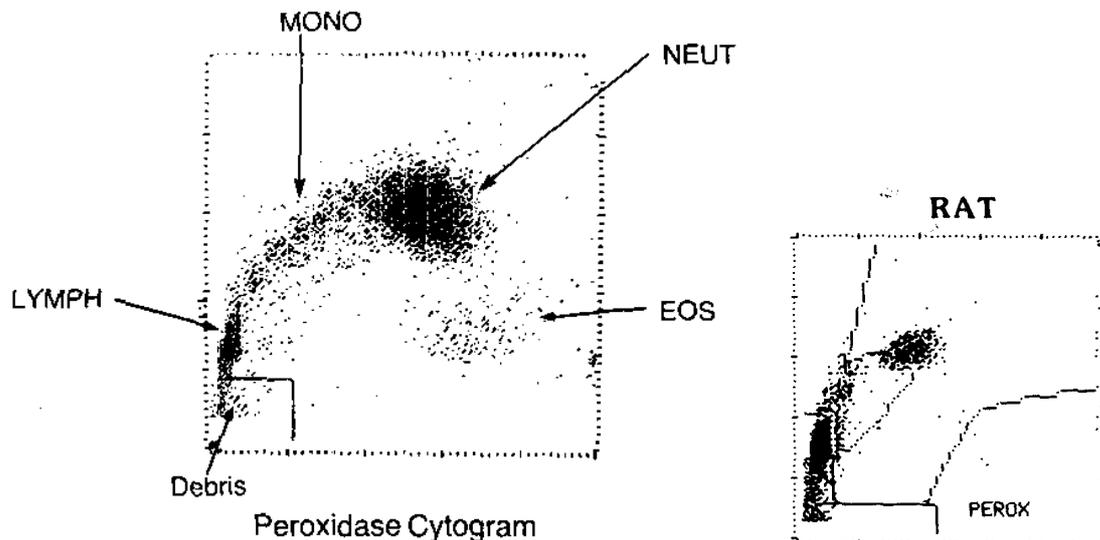


Figure 2: Exemples de cytogramme obtenu par le Technicon H1 après mise en évidence de l'activité peroxydasique des globules blancs.

A gauche cytogramme type (de chien) et à droite exemple de cytogramme de rat
D'après Groner et al [62]

Conclusion.

Habituellement, en laboratoire, tous les paramètres sanguins sont déterminés par les appareils automatisés. Néanmoins la formule leucocytaire est encore souvent établie (ou vérifiée) par la méthode manuelle de lecture du frottis.

Quel que soit le principe de fonctionnement, ces automates d'hématologie sont, au départ, adaptés et calibrés pour le comptage des cellules humaines, il est alors nécessaire de calibrer l'appareil en fonction de la taille spécifique des cellules de l'animal étudié. Il faut toujours vérifier la standardisation de l'appareil pour être sûr que sa sensibilité est adaptée à l'échelle des volumes cellulaires étudiés [43]. Désormais, la plupart des laboratoires commercialisant ces appareils ont validé des banques spécifiques pour le rat. Les automates sont alors déjà réglés.

Certains appareils ne peuvent être ajustés au comptage des cellules de très petite taille, comme les plaquettes, mais ils informent l'opérateur quand la numération est sous-estimée quand les cellules trop petites n'ont pas pu être prises en compte [89].

Tous ces automates sont de plus en plus perfectionnés et donnent maintenant de bonnes approches de la formule leucocytaire en comparaison avec la méthode manuelle de référence. Il existe même des appareils réalisant la formule leucocytaire en analysant un frottis sanguin (ex: Hematrak de Beckmann) [29].

2.3. Caractéristiques des cellules sanguines

On va décrire ici les principales caractéristiques morphologiques des éléments figurés du sang circulant.

Dans le dernier paragraphe sont présentées quelques propriétés et caractéristiques des globules rouges du rat, qui ne font pas partie de l'hémogramme, mais qu'il nous a paru intéressant de mentionner ici, en complément, parce qu'elles révèlent certaines particularités spécifiques et parce qu'elles seront évoquées dans la dernière partie sur les variations pathologiques.

2.3.1. Globules rouges

- **Réticulocyte** [48; 53; 66; 141]

C'est une cellule anucléée qui a un diamètre supérieur à celui de l'érythrocyte et qui apparaît bleutée sur un frottis coloré au May-Grünwald-Giemsa. On peut aussi les identifier grâce à une coloration vitale au bleu de crésyl brillant ou au bleu de méthylène, coloration qui fait apparaître des granulations ou un réseau diffus de fibrilles présents dans le cytoplasme et correspondant à des résidus d'ARN. Cette coloration vitale est utilisée pour réaliser la numération manuelle des réticulocytes.

Les réticulocytes sont des cellules immatures qui, chez le rat, finissent leur maturation dans le sang. On parle donc de maturation humorale par opposition à la maturation médullaire qui prédomine chez les ruminants et les équidés tandis qu'elle est mixte chez le chien.

On a cherché à classer les réticulocytes selon leur stade de maturation. Ulich et Del Castillo [141] en distinguent ainsi quatre types tandis que Fuchs et Eder [53] ont établi à l'aide d'un cytomètre (Sysmex R-1000) dix classes de réticulocytes. La classe numéro 10 correspond aux réticulocytes les plus jeunes c'est-à-dire qui contiennent le plus d'ARN et la classe numéro 1 correspond aux réticulocytes plus âgés et plus matures contenant moins d'ARN. Chez le rat la classe la plus représentée est la première car le compartiment sanguin renferme beaucoup de

réticulocytes matures. Cependant, le quotient de distribution, qui correspond au rapport des classes 3 à 10 sur les classes 1 et 2, est supérieur à 1 : ce qui montre que tous les stades de maturation sont représentés dans le sang et que l'on peut par conséquent qualifier cette maturation d'humorale.

On recherche parfois, sur le frottis sanguin, la présence de micronucleus dans les érythrocytes polychromatophiles (autre nom des réticulocytes) [159; 160]. Ce sont de minuscules noyaux supplémentaires qui correspondent à des fragments de chromosomes, ou des chromosomes entiers, "égarés" et séparés du noyau principal, au stade érythroblaste, pendant l'anaphase de la mitose. Ces fragments ne sont alors pas inclus dans le noyau de la cellule fille pendant la télophase et restent présents dans le cytoplasme sous forme d'un ou plusieurs micronucleus. On en trouve rarement chez les sujets adultes (moins de 1% des érythrocytes) mais c'est plus fréquent chez les jeunes. Toutefois, lorsqu'ils sont trop nombreux ils traduisent des altérations génétiques chromosomiques. Ces inclusions, appelées micronucleus chez les rongeurs, sont aussi classiquement appelées corps de Howell-Jolly chez d'autres espèces telles que l'homme ou le chien.

- **Erythrocyte ou hématie** [11; 13; 66; 73; 119; 141]

C'est une cellule anucléée en forme de disque biconcave aplati en son centre. Ces cellules sont très faciles à reconnaître sur un frottis, mais il est important de les observer minutieusement pour reconnaître les variations de taille, de forme, de couleur, de structure et de répartition.

En microscopie photonique l'érythrocyte apparaît comme un disque gris rosé, plus petit qu'un globule rouge humain avec un diamètre de 5,5 à 7 μm . Ces valeurs extrêmes sont à moduler en fonction de l'âge, les jeunes rats de 2 à 4 semaines ayant des érythrocytes plus gros que ceux des adultes de plus de 8 semaines [66]. On peut caractériser les érythrocytes d'après leur diamètre et leur VGM; on parle alors de macrocytose, de microcytose ou de normocytose. Le terme d'anisocytose est employé lorsqu'il y a une très grande variation du diamètre des hématies sur l'ensemble du frottis.

De même, selon leur couleur, on les qualifie de normochromes ou d'hypochromes lorsqu'ils contiennent peu d'hémoglobine car on observe une forte pâleur centrale. Il y a aussi polychromatophilie lorsqu'on observe une diversité de couleurs souvent associée à une réticulocytose et à la présence d'hématies légèrement bleutées car encore jeunes et contenant un mélange d'hémoglobine et d'ARN. La **polychromatophilie** est une caractéristique du frottis sanguin du rat qui reflète la présence constante de réticulocytes dans le sang [73].

Les variations de formes ou poï kilocytose font décrire:

- des sphérocytes qui sont des cellules de volume normal mais de diamètre diminué et de forme épaissie donc d'aspect sphérique.
- des acanthocytes, ou des échinocytes qui sont des cellules crénelées. Les acanthocytes ont des prolongements peu nombreux aux extrémités arrondies tandis que les échinocytes sont en forme d'étoile avec des prolongements pointus.
- des leptocytes, des annulocytes, des cellules fantômes, des stomatocytes, ou des cellules cibles qui sont, toutes, des cellules à faible teneur en hémoglobine et peu pigmentées. Les trois premières sont des cellules très pâles et il est difficile de faire une mise au point nette sur la cellule fantôme qui reste floue, d'où son nom. Le stomatocyte est une hématie déformée avec une pâleur centrale en

forme de bouche. La cellule cible ressemble à une cocarde car elle est pigmentée en périphérie et colorée en plein centre puisque les parois se touchent.

- des schizocytes qui sont des fragments de globules rouges. On en retrouve en grand nombre si le frottis a été mal réalisé ou chez les rats âgés car les cellules sont plus fragiles et plus facilement abîmées.

D'autre part, on peut observer des modifications de structure et plus particulièrement la présence d'inclusions ou de résidus nucléaires. Ainsi, il est fréquent de rencontrer des hématies nucléées c'est-à-dire des érythroblastes circulants chez les jeunes rats ou chez des adultes anémiés.

Il faut aussi distinguer des inclusions spécifiques telles que les corps de Howell-Jolly (cf supra) ou les corps de Heinz. Le corps de Heinz est une inclusion plus grosse, arrondie, située au contact de la membrane des hématies, engendrée par la formation d'hémoglobine dénaturée instable ou de méthémoglobine. Il est plus facilement mis en évidence grâce à une coloration spécifique au méthyle violet attendu que, sur un frottis classique, il apparaît comme une simple déformation de l'hématie.

Enfin la distribution des hématies doit aussi être remarquée lorsqu'on observe la présence de rouleaux ou d'agrégats de globules rouges.

Ces variations doivent être prises en compte car elles permettent de détecter des anomalies hématologiques mais il faudra faire la différence entre de vraies anomalies et des artefacts liés à la technique d'étalement.

2.3.2. Globules blancs ou leucocytes

- **Granulocyte neutrophile ou polynucléaire neutrophile**
[11; 66; 72; 119; 141]

Il mesure de 9 à 14 μm . Le cytoplasme presque incolore a un aspect poussiéreux dû aux petites granulations neutrophiles rose pâle qui sont moins visibles et moins abondantes que chez l'homme. Le noyau violet foncé est généralement plurilobé dans le sang circulant, mais on peut rencontrer de jeunes cellules immatures possédant encore un noyau en forme d'anneau. Lorsqu'il est lobulé, les filaments de chromatine reliant chaque segment ou lobule sont beaucoup plus épais que chez le chien ou l'homme.

Parmi leurs propriétés cytochimiques, on citera seulement la présence d'une enzyme peroxydase qui permet de mettre en évidence leur activité peroxydasique et qui est utilisée pour leur identification par certains automates tel le Technicon.

Comme chez les autres espèces, le nombre de lobes du noyau augmente au fur et à mesure que la cellule vieillit. On définit donc pareillement, chez le rat, la courbe d'Arneth qui correspond à une distribution du pourcentage de neutrophiles selon leur nombre de lobes. Cette courbe peut être déviée à gauche si on observe surtout des granulocytes peu lobés, majoritairement jeunes, ou à droite s'ils sont très lobés donc plutôt âgés. L'interprétation de la déviation de la courbe d'Arneth est la même que chez les autres espèces et doit toujours être rapportée à la numération leucocytaire: si, lors de leucocytose, elle est déviée à gauche, cela traduit une inflammation récente, et si elle est déviée à droite, cela révèle alors un phénomène plus ancien ou chronique.

On peut aussi rencontrer physiologiquement dans le sang circulant quelques **band-cells** qui sont des granulocytes immatures avec un noyau en forme de fer à cheval.

- **Granulocyte éosinophile ou polynucléaire éosinophile**
[11; 66; 72; 141]

Son diamètre est de 12 à 19 μm . Son noyau est annulaire (ou en U si l'anneau n'est pas fermé) mais n'atteint presque jamais le stade de segmentation ou de lobulation. Le cytoplasme est bien coloré car il contient de nombreuses granulations spécifiques orangées et plus grosses que les granulations neutrophiles. Ces granulations sont cependant beaucoup moins lumineuses au microscope que celles des éosinophiles humains.

- **Granulocyte basophile ou polynucléaire basophile**
[11; 66; 72; 119; 141]

Les avis sont très partagés selon les auteurs à propos de la présence de polynucléaires basophiles sur des frottis sanguins de rat. Ulich et Del Castillo ainsi que Bailly et Duprat [11; 141] n'en ont jamais identifié, ni dénombré, dans le sang périphérique. Par contre Furuhashi, Hasegawa, et Jain [66; 72] en décrivent, tout en précisant qu'ils sont rarement observés dans le sang, toujours en très petit nombre, et que ce sont souvent des cellules fragmentées ou abîmées car leurs granulations sont fragiles et solubles. Il serait plus facile de les mettre en évidence sur des buffy-coats réalisés sur du sang cardiaque ou caudal [119].

Si on en rencontre, le basophile est un granulocyte de même taille que le neutrophile. Son noyau est lobulé et son cytoplasme présente des grosses granulations violet foncé de taille uniforme. Et il ne faut alors pas le confondre avec un mastocyte que l'on peut parfois identifier sur des prélèvements cardiaques.

- **Lymphocyte** [11; 66; 72; 141]

Morphologiquement on peut différencier plusieurs types de lymphocytes.

La population majoritairement représentée sur un frottis est celle des **petits lymphocytes**. Ils mesurent de 6 à 8 μm de diamètre et se caractérisent par un noyau rond à chromatine très dense et une fine bande de cytoplasme bleu clair.

On observe ensuite, en moins grande quantité, des **grands lymphocytes**. Comme leur nom l'indique, leur diamètre est plus grand (12 à 15 μm) que celui des petits lymphocytes, ce qui permet de les différencier. Ils ont à peu près les mêmes caractéristiques générales à l'exception de leur taille et de l'allure du noyau. Celui du grand lymphocyte a une couleur légèrement plus claire et il est souvent placé en position excentrée.

Présents en nombre encore plus réduit, on peut distinguer des **lymphocytes atypiques**, des **grands lymphocytes granuleux** et des **cellules lymphohistiocytaires** [141]. Le lymphocyte atypique est habituellement de taille égale ou supérieure à celle du grand lymphocyte. Il s'en différencie par l'aspect lobulé ou crénelé de son noyau qui présente une chromatine très hétérogène. Le grand lymphocyte granuleux est caractérisé par la présence d'un noyau bien excentré et de quelques grosses granulations cytoplasmiques azurophiles. Enfin les cellules lymphohistiocytaires ont ainsi été nommées en raison de la difficulté à les différencier morphologiquement des monocytes. Pour les identifier, il faut alors avoir recours à une coloration spécifique mettant en évidence l'activité estérasique des monocytes (coloration ANAE: α naphthyl acetate esterase [66]).

Cette différenciation morphologique n'est pas toujours prise en compte en routine d'autant qu'elle n'a pas de corrélation fonctionnelle. Aujourd'hui on s'intéresse beaucoup plus à la classification fonctionnelle des lymphocytes, c'est à dire à l'immunologie, mais on sort alors du domaine de l'hémoGramme.

- **Monocyte** [11; 66; 72]

C'est une cellule de la lignée macrophagique qui mesure de 12 à 20 μm de diamètre. C'est donc le plus gros des globules blancs. Le noyau de forme variable et irrégulière (arrondi ou en haricot) est très gros et sa chromatine est fine. Le cytoplasme est gris bleuté et renferme parfois des vacuoles ou de fines granulations azurophiles.

2.3.3. Plaquettes ou thrombocytes [11; 54; 62; 66; 141]

Les thrombocytes sont de petits fragments anucléés de cytoplasme, issus des mégacaryocytes. Ils sont de taille très variable dans le sang circulant mais toujours comprise entre 1 et 4 μm et leur volume est d'environ 5 fl [62]. Leur couleur est mauve avec quelques granules azurophiles plus roses. Leur rôle étant principalement d'assurer la fonction d'agrégation plaquettaire dans la coagulation, il est fréquent de les trouver agrégés ou en amas sur un frottis sanguin parce qu'ils ont été activés lors de la ponction ou du stockage du prélèvement.

2.3.4. Quelques propriétés des hématies

- **Durée de vie des érythrocytes** [19; 72]

La durée de vie moyenne des globules rouges du rat est de 45 à 68 jours, ce qui est beaucoup plus faible que chez le chien (100 à 120 jours) et que chez l'homme (127 jours) mais cette durée de vie réduite est compensé par un plus grand nombre de globules rouges circulants.

- **Hémoglobine** [73; 119]

Comme chez les autres mammifères il existe plusieurs sortes d'hémoglobines : il n'y a pas d'hémoglobine embryonnaire mais au moins un type d'hémoglobine fœtale (1 ou 2 selon les auteurs) et au moins 4 types chez l'adulte. L'architecture générale comporte cinq chaînes de globines : 2 alpha et 3 bêta.

- **Fragilité osmotique des globules rouges** [9; 72; 106; 107; 117; 124]

La fragilité osmotique (ou résistance osmotique) est déterminée par un test qui consiste à ajouter à un échantillon de sang prélevé sur anticoagulant une solution saline hypotonique de dilution connue et de mesurer ensuite le pourcentage d'hémolyse des globules rouges. Plus concrètement, la solution saline correspond à une dilution décimale d'une solution de NaCl à 1% dans de l'eau distillée et le pourcentage d'hémolyse est apprécié grâce la mesure, par spectrophotométrie, de l'hémoglobine libérée dans la solution.

On évalue le pourcentage d'hémolyse en fonction de la teneur en NaCl de la solution et on établit ainsi des courbes d'hémolyse. D'autre part, ce pourcentage d'hémolyse est défini et étalonné par rapport à l'hémolyse dans l'eau distillée (c'est à dire solution de NaCl à 0%) qui est de 100%. D'autres auteurs enfin n'emploient pas tout à fait les mêmes unités puisqu'ils considèrent le pourcentage d'hémolyse en fonction de la masse de NaCl exprimée en mM et ils utilisent surtout le coefficient H_{50} défini comme étant la concentration en NaCl pour laquelle on observe 50% d'hémolyse [117; 124].

Par ailleurs, ce test doit être réalisé avec des conditions de température et de pH fixés étant donné que ce sont d'importants facteurs de variation.

Pour une température donnée de 10°C et un pH de 7,7 - ce qui signifie que l'échantillon de sang est placé dans une solution tamponnée à un pH de 7,7 - la fragilité osmotique des hématies du rat est bien inférieure à celle des bovins, ovins et même à celle de la souris et du lapin [107]. En termes chiffrés, par exemple dans une solution saline à 0,6%, il n'y a presque pas d'hémolyse pour le rat tandis que pour les autres espèces étudiées le pourcentage d'hémolyse est déjà supérieur à 20%.

A partir d'une solution à 0,5% et pour les dilutions inférieures, l'hémolyse des hématies du rat est supérieure à 70% d'après les études d'Oyewale, ce qui est en accord avec les valeurs données par Jain [72] avec un début d'hémolyse à partir de 0,47% et une hémolyse totale dans une solution saline à 0,30%. Ces données correspondent aussi aux valeurs de H_{50} de 0,42% de NaCl obtenus par Saini et al sur des rats Wistar [124].

Oyewale [106] a aussi étudié l'influence des variations de température et de pH sur la résistance à l'hémolyse.

Dans une expérience réalisée à trois températures différentes (10°C, 29°C, 45°C), la résistance osmotique des érythrocytes augmente lorsque la température s'élève pour un pH donné de 7,7. D'autre part, pour une température constante de 29°C, la résistance des érythrocytes diminue en milieu acide (pH=5,6) et augmente en milieu basique (pH=8,9). Ces conclusions correspondent aux variations observées chez l'homme mais pas chez le chien pour qui la résistance osmotique diminue à la fois en milieu acide et basique.

Outre les paramètres température et pH, qu'il faut absolument contrôler pour ne pas avoir de résultats biaisés lors de la réalisation de ce test, il faut aussi tenir compte de la durée séparant le moment du prélèvement et celui du test. En effet, le même auteur a également remarqué, dans une étude postérieure [107], que le stockage de l'échantillon sanguin pendant 24 heures dans les mêmes conditions de température et de pH, diminue la fragilité des érythrocytes par rapport à un échantillon testé dans les minutes suivant le prélèvement.

En conclusion ce test de fragilité osmotique doit être réalisé dans des conditions très strictes avec une température et un pH fixés, et dans les plus brefs délais après le prélèvement pour avoir des résultats fiables.

2.4. Valeurs usuelles des constituants et paramètres de l'hémogramme

2.4.1. Hémogramme de référence

La littérature ne manque pas de références sur les paramètres hématologiques du rat. Cependant, il peut y avoir de grandes variations d'une étude à l'autre et il semblait à priori difficile d'établir un hémogramme de référence pour l'espèce *Rattus norvegicus*. En effet il existe un très grand nombre de facteurs de variation, détaillés dans le paragraphe 2.5., parmi

lesquels on peut déjà citer le sexe, l'âge, le site de ponction, la lignée, le statut médical, et bien sûr la méthode d'étude de ces paramètres sanguins, manuelle ou automatisée. Tous ces facteurs ne peuvent pas être contrôlés de manière semblable par tous les laboratoires et pour toutes les expérimentations. En conclusion, pour citer Ringler et Dabich [119], il est impossible d'établir une quelconque valeur universelle pour un paramètre hématologique ou biochimique.

C'est pourquoi ne seront exposées dans ce paragraphe que les valeurs usuelles de l'hémogramme du rat Sprague-Dawley et du F344, car ce sont les souches les plus étudiées actuellement et pour lesquelles il existe des données de référence récentes obtenues par des méthodes automatisées.

Par ailleurs, sont présentés en annexe, l'hémogramme du Long Evans et du Wistar car ce sont deux souches ayant eu une importance historique en recherche biomédicale, ainsi que les valeurs usuelles considérées comme physiologiques chez le rat de compagnie (cf. annexes 1, 2 et 3).

2.4.1.1. Hémogramme du Sprague-Dawley [11]

Les tableaux 1 et 2 exposent les résultats de Bailly et Duprat [11] qui ont été établis sur des échantillons de taille suffisante (24 individus au minimum) pour chaque sexe et pour cinq périodes différentes correspondant à peu près aux âges des animaux utilisés pour des études toxicologiques.

Les échantillons sanguins ont été prélevés par ponction du sinus rétro-orbitaire et analysés par un Coulter S Plus qui mesure le nombre de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes, ainsi que la concentration en hémoglobine et le VGM, puis en déduit l'hématocrite, la TCMH et la CCMH. La formule leucocytaire est déterminée sur un frottis sanguin obtenu par centrifugation avec un "Uni-Smear-Spinner (ND)" et coloré de manière automatisée par un "Hematek Staining System (ND)".

Chaque paramètre sanguin est représenté dans le tableau par la moyenne des valeurs de l'échantillon et par l'intervalle de confiance à 95% de cet échantillon indiqué entre parenthèses.

Ces résultats de Bailly et Duprat sont tout à fait comparables à ceux obtenus par Leonard et Ruben [89], qui ont utilisé la même méthode de prélèvement au sinus rétro-orbitaire et le même automate (Coulter S Plus) excepté la numération plaquettaire réalisée par un appareil spécialisé (Clay Adams Ultra-Flo Platelet Counter). La seule différence notable est une numération leucocytaire moyenne légèrement plus élevée d'après Leonard et Ruben, qui obtiennent néanmoins une répartition des valeurs comparable.

Toutefois, cet hémogramme ne contient pas le taux de réticulocytes. Celui-ci a été établi par Jain [73] après ponction cardiaque sur des rats Sprague-Dawley anesthésiés à l'éther. Les résultats obtenus sont retranscrits dans le tableau 3 en pourcentage du nombre de globules rouges et en nombre absolu. Sous ce tableau figurent les résultats de Fuchs et Eder [53] sur la distribution du nombre de réticulocytes selon leur classe de maturation et représentés sous forme de graphique (Figure 3).

2.4.1.2. Hémogramme du Fisher rat ou rat F344 [128]

Le tableau 4 présente les paramètres hématologiques de mâles F344 âgés de 9 à 12 semaines en fonction de différents sites de ponction.

Tous les prélèvements ont été réalisés sur des animaux anesthésiés sauf pour la ponction caudale qui a été réalisée sur des rats vigiles par section de l'extrémité de la queue. Les prélèvements cardiaques ont été recueillis dans le ventricule droit et sont numérotés selon l'ordre de prélèvement de deux tubes vacutainers (le n°1 correspond donc au premier tube rempli et le n°2 au second). Les ponctions cardiaques, aortiques et de la veine cave ont nécessité une ouverture chirurgicale et sont des méthodes terminales.

Les paramètres sanguins ont été mesurés par un Coulter S Plus et la formule leucocytaire a été établie manuellement sur 100 cellules du frottis sanguin réalisé par une cytocentrifugeuse pour chaque échantillon.

2.4.2. Grandes particularités hématologiques du rat [11; 43; 62; 72; 73; 98]

Quand on le compare à l'hémogramme de l'homme et à celui du chien, l'hémogramme du rat présente un certain nombre de particularités spécifiques.

La numération érythrocytaire est environ 1,5 fois plus élevée que chez l'homme et le chien, pour des valeurs similaires de concentration en hémoglobine et d'hématocrite. En conséquence on observe également un VGM et une CCMH plus faibles que pour ces deux espèces précédemment nommées.

Le taux de réticulocytes circulants est également plus élevé avec une moyenne de 2% pour les adultes mais avec des taux très élevés chez les nouveau-nés (jusqu'à 99% à la naissance) et chez les jeunes (supérieur à 15% au sevrage) [72; 73].
cf. tableau 3 et graphique 3.

Par rapport à l'homme et au chien, le rat présente, en outre, une thrombocytose physiologique avec des numérations plaquettaires souvent supérieures à $1000.10^9/l$ ce qui représente 5 fois les valeurs humaines et environ 3 fois les valeurs canines.

Quant à la distribution du nombre de leucocytes, elle est plus large que chez l'homme mais comparable à celle du chien. Cependant, la numération leucocytaire moyenne est difficile à comparer car il existe de grandes variations d'une étude à l'autre et notamment en fonction du lieu de prélèvement.

Enfin, l'élément marquant de l'hémogramme du rat est l'inversion de la formule leucocytaire avec un pourcentage de lymphocytes d'environ 80% (contre 20 à 40% chez le chien et 30% chez l'homme), pour un faible pourcentage de neutrophiles, inférieur à 20% (contre 50 à 70% chez le chien et 60% chez l'homme). Il faut également noter que le taux de monocytes chez le rat est plus faible que chez l'homme mais comparable à celui du chien (moins de 5%).

Tableau 1.

Hémogramme de rats Sprague-Dawley, mâles et femelles de 7 à 60 semaines.

Age (semaines)	7 – 10		30 – 34		56 – 60	
Nombre	784	784	89	89	105	105
Sexe	M	F	M	F	M	F
GR (10 ¹² /l)	7.69 (6.53-8.76)	7.77 (6.67-8.8)	9.08 (7.6-10.25)	7.95 (6.84-8.76)	9.28 (7.8-10.29)	8.01 (7.19-8.92)
Ht (%)	45.1 (40.7-50)	46 (41-50)	46 (42-50)	44 (38.4-48.4)	47.5 (41.2-50.9)	45 (40.8-49.6)
Hb (g/dl)	16.6 (15-18.2)	16.6 (15-18)	17 (15.1-18.1)	16.5 (14.4-17.8)	16.6 (14.7-18.3)	16.4 (14.7-17.9)
VGM (fl)	59 (55-64.6)	59 (55-64)	50.7 (47.4-54)	55.6 (52.2-59)	51 (47-54.9)	56 (53-59.1)
TCMH (pg)	21.6 (19.6-24.6)	21.4 (19.4-24.2)	18.8 (16.1-20.7)	20.6 (18.7-23)	18 (15.9-20)	20.3 (19-22.6)
CCMH (g/dl)	36.7 (34.9-39.2)	36.2 (34.3-39)	36.9 (34-39.2)	37.1 (34.8-40.5)	34.8 (33.4-38.2)	36.4 (34.8-39.4)
Plaquettes (10 ⁹ /l)	1291 (995-1713)	1281 (971-1656)	1146 (834-1670)	1189 (880-1515)	1102 (869-1510)	1109 (821-1431)
GB (10 ⁹ /l)	11.6 (6.6-20.5)	8.8 (4.8-16.6)	11.8 (7.9-17.2)	7.4 (4-14.3)	9.9 (6-16.1)	6.2 (3.8-9)
Neutrophiles (%)	9 (3-24.7)	8 (3-21.3)	13 (5.5-34.8)	11 (4.5-34.5)	15 (8-35.5)	17 (8-33.2)
Lymphocytes (%)	89 (73.5-96)	90 (77-96)	84 (58.8-94)	84.5 (62.5-93.5)	81 (58.5-90)	79 (65-87.9)
Eosinophiles (%)	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-4)	1 (0-4)	1 (0-3.5)	1 (0-3.5)
Monocytes (%)	1 (0-4)	1 (0-4)	2 (0-6.1)	2 (0-7)	2 (0-4)	2 (0-5)
Basophiles (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Chaque paramètre sanguin est représenté dans le tableau par la moyenne des valeurs de l'échantillon et par l'intervalle de confiance à 95% de cet échantillon indiqué entre parenthèses. Toutes les données ont été calculées avec une décimale (sauf les GR pour lesquels on donne 2 décimales) et les nombres entiers correspondent à une décimale nulle soit par exemple lorsqu'on lit 8, il s'agit de 8.0.

Tableau 2.

Suite de l'hémogramme de rats Sprague-Dawley mâles et femelles âgés de 100 à 140 semaines.

Age (semaines)	100 – 104		115 – 140	
Nombre	24	24	29	29
Sexe	M	F	M	F
GR ($10^{12}/l$)	8.53 (4.77-9.6)	7 (4.27-8.14)	7.54 (3.53-8.99)	6.58 (3.61-8.41)
Ht (%)	45 (26.2-49)	40.5 (27-47)	41.2 (20.2-48.8)	40 (24.2-49)
Hb (g/dl)	17.1 (10.6-18.6)	15.5 (10.2-18.2)	15.4 (7.8-17.7)	14.9 (9.5-17.8)
VGM (fl)	53 (49-61.9)	58.5 (50-80)	54 (48.5-65.6)	60.4 (54.9-68.8)
TCMH (pg)	20 (17.8-23.6)	22.3 (18.9-31.5)	20.4 (17.8-24.8)	22.6 (20.6-26.3)
CCMH (g/dl)	37.6 (35.5-40.2)	38.4 (35.7-40)	38 (34-39.7)	38 (35.4-39.7)
Plaquettes ($10^9/l$)	1144 (769-1875)	1048 (755-1378)	1236 (771-2122)	973 (605-1419)
GB ($10^9/l$)	10.6 (7.4-21.8)	7.3 (4.3-14.1)	11.7 (5.4-28.6)	8.1 (4.9-22.7)
Neutrophiles (%)	24.5 (6.1-60.7)	27.5 (8-68)	28.5 (13-58)	30 (14-69.5)
Lymphocytes (%)	69.5 (30.4-85)	66.5 (29-85)	65.5 (21-80)	63.5 (25.5-85)
Eosinophiles (%)	1 (0-4)	1 (0-4)	1 (0-9)	1 (0-9)
Monocytes (%)	3 (0-11)	4 (0-7)	4 (0-23)	4 (0.5-8)
Basophiles (%)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Les populations étudiées étant trop faibles les nombres entre parenthèses ne représentent plus l'intervalle de confiance à 95% mais les valeurs extrêmes, mais la première valeur reste toujours la moyenne de l'échantillon.

Tableau 3.

Pourcentage et nombre de réticulocytes sanguins chez des Sprague-Dawley mâles et femelles âgés de 25 jours à 15 mois; d'après Jain [72].

Age	25-35 jours		50-77 jours		3 mois		4-6 mois		7-12 mois		13-15mois	
Sexe	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Nombre	22	20	28	24	29	12	29	30	67	67	26	29
GR ($10^{12}/l$)	5.1	5.2	7	7	7.9	7.1	8.5	7.6	8.2	7.5	8.3	7.3
Réticulocytes %	16.2	16.2	4.6	2.5	2.8	3.4	2.3	2.8	2.1	2.4	2.1	2.6
$10^{12}/l$	0.83	0.84	0.32	0.18	0.22	0.24	0.20	0.21	0.17	0.18	0.17	0.19

Les valeurs indiquées sont les moyennes obtenues sur chaque échantillon.

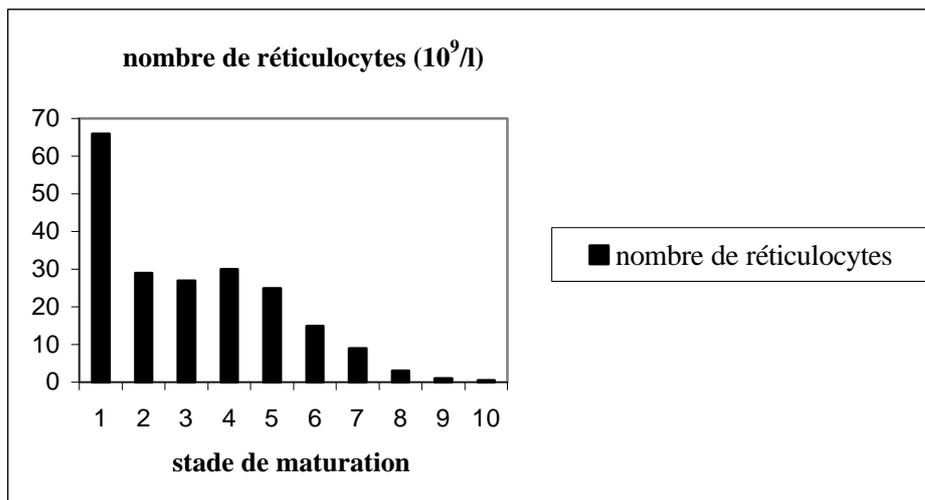


Figure 3. Distribution des réticulocytes en 10 classes selon le stade de maturation pour des rats Wistar adultes. D'après Fuchs et Eder [53]

Commentaire

Ces valeurs correspondent à un nombre absolu moyen de $205,5 \cdot 10^9/l$ pour 20 rats ou encore pour un taux de 2,5% par rapport au nombre de globules rouges. Le quotient de distribution est de 1,18; on rappelle qu'il s'agit du rapport des jeunes réticulocytes (classes 3 à 10) sur les plus âgés (classes 1 et 2).

Tableau 4.

Variations de l'hémogramme de rats mâles F344 âgés de 9 à 12 semaines en fonction du site de ponction. D'après Smith et al [128].

Site de ponction	cœur tube n° 1	cœur tube n° 2	oïl sinus	aorte abdominale	queue	veine cave	toutes méthodes
Nombre	12	12	12	12	12	12	44
GR ($10^{12}/l$)	7.51	7.32	9.14	7.39	9.4	7.2	7.99
Ht (%)	41	39.9	49.3	40.2	52.4	40	43.6
Hb (g/dl)	13.9	13.6	16.2	13.7	17.6	13.5	14.6
VGM (fl)	54.6	54.5	53.9	54.3	55.7	55.5	54.8
TCMH (pg)	18.6	18.6	17.7	18.5	18.8	18.7	18.6
CCMH (g/dl)	34	34.1	32.8	34	33.7	33.7	33.7
Plaquettes ($10^9/l$)	845	824	848	819	775	829	841
GB ($10^9/l$)	3.7	2.6	7.3	3.7	10.1	5	5.1
Neutrophiles (%)	16	16.7	15	15.7	14.7	12	14.8
$10^9/l$	0.6	0.44	1.11	0.56	1.54	0.59	0.71
Lymphocytes (%)	81.3	80.4	81.1	80.3	81.8	85	81.8
$10^9/l$	3	2.12	5.92	2.95	8.23	4.26	4.28
Eosinophiles (%)	0.4	0.8	0.3	0.7	0.7	0.8	0.7
$10^9/l$	0.015	0.024	0.025	0.023	0.068	0.039	0.023
Monocytes (%)	2.3	1.9	3.6	3.1	2.7	2.2	2.6
$10^9/l$	0.085	0.053	0.26	0.11	0.28	0.11	0.13
Basophiles (%)	0	0	0	0	0	0	0
$10^9/l$	0	0	0	0	0	0	0
Métamyélocyte (%)	0	0.2	0	0.2	0.1	0	0.1
$10^9/l$	0	0.007	0	0.007	0.008	0	0

Commentaire.

Les valeurs représentent les moyennes de chaque échantillon et sont arrondies à la première décimale sauf pour le nombre de globules rouges (GR) qui sont arrondies à la deuxième décimale.

2.5. Facteurs de variation physiologiques

2.5.1. Sexe [11; 73; 81; 87; 89; 98; 141]

Globalement, toutes les numérations cellulaires sont plus élevées chez le mâle que chez la femelle.

Pour les globules rouges, la numération érythrocytaire est supérieure chez le mâle mais ceci est compensé par un VGM plus important chez la femelle donc des érythrocytes de plus grande taille. Il n'y a pas de différence significative pour l'hématocrite et la concentration en hémoglobine entre les deux sexes. Par ailleurs, aucune différence n'a été observée pour le taux de réticulocytes même si leur nombre absolu reflète évidemment les écarts de la numération globulaire.

Le nombre total de globules blancs est aussi supérieur chez les mâles mais la formule leucocytaire est semblable pour les deux sexes. Les numérations absolues de chaque type cellulaire sont donc également plus importantes chez le mâle.

Seule la numération plaquettaire ne semble pas présenter de variations liées au sexe.

D'autre part, il existe chez la femelle des modifications hématologiques pendant le cycle menstruel et la gestation. Il semble, selon certains auteurs, qu'il existe des fluctuations du nombre total de leucocytes et du nombre de neutrophiles au cours du cycle menstruel chez la femelle, ce qui expliquerait pourquoi les mâles sont plus souvent utilisés pour les études hématologiques [141].

Pendant la gestation [87] on observe principalement des variations de la numération globulaire et des paramètres érythrocytaires. La numération érythrocytaire, la concentration en hémoglobine et l'hématocrite diminuent régulièrement pendant la gestation puis cette diminution s'accroît autour de la mise-bas pour atteindre un minimum au moment du part. Ensuite les valeurs augmentent progressivement pour atteindre les valeurs initiales (ou de femelles non gravides) environ une semaine après la mise-bas.

Les autres paramètres hématologiques ne subissent pas de variations au cours de la gestation mis à part quelques fluctuations du nombre de globules blancs les deux jours précédant et suivant le part. La seule autre modification observée est un nombre accru de plaquettes juste après la mise-bas mais ces valeurs se normalisent ensuite rapidement en moins d'une semaine.

Enfin, toujours chez la femelle, il semble que l'ovariectomie ou l'ovariohystérectomie entraînent une élévation, légère mais significative, du nombre de globules rouges, de l'hématocrite, de la concentration en hémoglobine et du nombre de globules blancs [81].

2.5.2. Age [5; 6; 11; 71; 73; 98; 151; 152]

- Réticulocytes [72; 73; 98]

Le taux de réticulocytes est de presque 99% à la naissance [72; 73] et reste supérieur à 10% jusqu'à l'âge de quatre à cinq semaines. Il diminue ensuite considérablement pour se stabiliser à partir de la dixième semaine autour de 2%. Ce pourcentage augmente de nouveau chez les animaux âgés.

- Globules rouges [5; 6; 11; 98; 151; 152]

Le nouveau-né présente des particularités morphologiques du frottis sanguin avec une anisocytose et une polychromatophilie marquée des corps de Howell-Jolly et la présence non négligeable d'érythroblastes. Ces caractéristiques disparaissent au bout d'un mois.

Le nombre de globules rouges s'élève fortement à partir de 2 à 3 mois alors que dans le même temps le VGM et la CCMH diminuent. Puis, à partir d'un an, la numération érythrocytaire commence à décroître progressivement avec l'âge. Pendant cette décroissance le VGM et la CCMH augmentent ce qui est logique puisque les globules rouges sont alors moins nombreux mais plus gros.

Les variations de la concentration en hémoglobine et de l'hématocrite suivent celles des globules rouges mais l'élévation initiale est beaucoup moins prononcée, ce qui explique la diminution concomitante du VGM et de la CCMH.

- Globules blancs [6; 11; 72; 73; 151; 152]

Le nombre total de globules blancs est plus élevé chez les jeunes de moins de cinq mois et chez les sujets âgés de plus de 2 ans. Cette tendance est plus marquée chez les femelles.

Le pourcentage ainsi que la numération absolue de lymphocytes diminuent avec l'âge dès 2 mois, tandis qu'au contraire le pourcentage et le nombre absolu de neutrophiles augmentent. Le pourcentage de neutrophiles s'accroît à partir de six mois mais cette augmentation n'apparaît en nombre absolu qu'à partir d'un an. Quant aux éosinophiles, leurs nombres absolu et relatif restent à peu près constants sauf chez les animaux les plus âgés où les valeurs sont souvent élevées [11; 151; 152]. Certains auteurs indiquent pourtant le contraire, c'est à dire une baisse du nombre d'éosinophiles chez les vieux sujets [73].

Ceci permet d'expliquer les variations de la numération leucocytaire: la diminution relative du nombre de globules blancs chez les jeunes adultes est liée à la chute du nombre absolu de lymphocytes, tandis que l'augmentation du nombre de globules blancs chez les animaux âgés est liée à l'élévation du nombre de neutrophiles et d'éosinophiles.

Enfin, on note un léger accroissement du nombre de monocytes en fonction de l'âge mais aucune variation n'est notée pour les basophiles qui sont de toute manière très faiblement représentés.

- Plaquettes [98; 151; 152]

La numération plaquettaire tend à diminuer pendant la première année puis se stabilise chez la femelle tandis qu'on observe une très légère augmentation continue chez le mâle.

2.5.3. Souche ou lignée [10; 94; 98; 99; 113; 153]

Dans des conditions d'élevage similaires, il existe quelques variations de l'hémogramme d'une souche à l'autre mais celles-ci sont en général de faible amplitude et demeurent dans les limites physiologiques. Cependant, un certain nombre de souches consanguines ou mutantes présentent des altérations hématologiques importantes et constantes qui se caractérisent par des paramètres hématologiques de base situés en dehors des valeurs acceptées comme physiologiques.

Pour les souches classiquement utilisées en recherche biomédicale, l'hématocrite, la concentration en hémoglobine et le taux de réticulocytes ne semblent pas être influencés par le facteur racial. En revanche, les numérations cellulaires moyennes varient d'une souche à l'autre tout en restant dans l'intervalle des valeurs physiologiques. Par exemple [98], le nombre total de leucocytes est plus faible chez le F344 que chez le Sprague-Dawley ou le Wistar, tandis que le Sprague-Dawley présente la numération plaquettaire la plus élevée suivi par le Wistar et le F344 dans cet ordre.

Parmi les souches présentant des particularités hématologiques, on peut citer par exemple le rat b/b de Belgrade et le rat BB [153].

La première est une souche découverte en 1985, porteuse d'une mutation radio-induite autosomale récessive appelée "b", qui provoque une anémie microcytaire et hypochrome. Les caractéristiques sanguines et hématopoïétiques de cette souche sont détaillées dans la dernière partie.

Quant au rat BB, c'est un modèle qui a été développé, depuis 1974, à partir d'une colonie non consanguine de rats Wistar qui développaient un syndrome imitant le diabète insulino-dépendant chez l'homme. La souche ainsi sélectionnée présente un taux d'apparition de diabète spontané de 10 à 90%, selon les familles, ainsi que deux caractéristiques constantes: une durée de vie moyenne inférieure par rapport à la souche Wistar classique et une sensibilité accrue aux infections. Les particularités hématologiques spécifiques du rat BB en comparaison avec le Wistar sont essentiellement un nombre de globules blancs plus faible associé à une modification importante de la formule leucocytaire. En effet, la formule révèle une lymphopénie marquée et une neutrophilie, le nombre de lymphocytes et de neutrophiles étant presque identique. On observe également une légère monocytose et une éosinophilie supérieure à 10% dans la moitié des cas. Cette souche a fait l'objet de nombreuses études et publications en tant que modèle du diabète mais aussi pour ses caractéristiques hématologiques afin d'essayer d'expliquer sa sensibilité aux infections et sa durée de vie plus courte.

2.5.4. Prélèvements

- Site de ponction [5; 42; 73; 98; 128; 137]

Plusieurs études ont été réalisées chez le rat à propos des variations hématologiques liées au lieu de prélèvement afin de déterminer quel site est le plus représentatif et donne les résultats les plus constants [42; 128; 137].

Le paramètre le plus sensible au mode de prélèvement est le nombre de leucocytes. Il peut en effet varier du double au triple selon le lieu de ponction. Ainsi on obtient des numérations leucocytaires beaucoup plus élevées sur des échantillons prélevés à la queue ou au sinus orbitaire par rapport à une ponction cardiaque ou aortique. Les numérations absolues des différents types de globules blancs sont, elles aussi, modifiées tandis que les pourcentages de la formule leucocytaire ne révèlent aucune différence significative entre chaque site. Certains auteurs [128] ont associé ces variations au facteur stress ou à l'anesthésie, notamment pour les ponctions caudales qui sont souvent réalisées sans anesthésie et donc jugées plus stressantes pour l'animal. Cependant les mêmes résultats (augmentation du nombre de leucocytes lors de ponction caudale) ont été observés par Duprat [42] sur des animaux tous anesthésiés à l'éther. Le facteur stress et l'anesthésie ne peuvent donc pas être seuls responsables de telles variations qui sont décrites de manière constante par de nombreux auteurs [5; 42; 73; 128; 137].

Le nombre de globules rouges, l'hématocrite et la concentration en hémoglobine présentent aussi des valeurs plus élevées pour des prélèvements caudaux ou rétro-orbitaires par rapport aux autres sites, mais ces modifications sont beaucoup moins marquées que pour les leucocytes.

En revanche la numération plaquettaire ne semble pas être influencée par le site de prélèvement de même que les autres paramètres érythrocytaires.

Si les variations observées sont similaires, les conclusions et les recommandations quant au choix d'un site sont très différentes d'un auteur à l'autre. Smith et al conseillent le prélèvement cardiaque du ventricule droit [128] qui leur paraît plus représentatif car il donne les résultats les plus constants par rapport aux autres méthodes étudiées: ponctions caudale, rétro-orbitaire, aortique ou de la veine cave caudale. Duprat [42], au contraire, préconise l'amputation caudale ou la décapitation. Enfin Suber et Kodell [137] désignent la ponction du sinus orbitaire comme méthode de choix.

- Fréquence des prélèvements et quantité prélevée [15; 83; 126]

Les recommandations concernant les quantités de sang à prélever chez le rat varient d'un auteur à l'autre et selon le nombre et la fréquence de ces prélèvements. C'est pourquoi, ces dernières années, quelques auteurs ont étudié les variations des paramètres hématologiques dans les conditions d'une étude toxicologique, c'est-à-dire en exécutant de multiples prélèvements au cours d'une même journée et sur plusieurs semaines.

La récolte d'une quantité supérieure ou égale à 10% (10, 20, 30 ou 40%) du volume sanguin total, répartie en une dizaine de prélèvements réalisés sur une journée entraîne les perturbations hématologiques suivantes [126].

Tout d'abord on observe une chute brutale du nombre de globules rouges ainsi que de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine, au cours des deux jours suivant la série de prélèvements. Cette diminution est évidemment proportionnelle à la quantité totale prélevée. Parallèlement, le taux de réticulocytes augmente significativement à partir du deuxième jour, de manière plus ou moins importante selon la quantité de sang prélevée. Ainsi pour un prélèvement de 40% du volume sanguin total, le taux de réticulocytes atteint presque les 10%. Ces modifications sont caractéristiques d'une perte sanguine aiguë qui est toujours suivie du relargage de cellules immatures dans la circulation. Le taux de réticulocytes et les paramètres érythrocytaires recouvrent les valeurs initiales au bout de 14 jours. Si on recommence la même expérience, c'est à dire un nouveau prélèvement au bout de 15 jours, les variations sont identiques mais le retour aux valeurs initiales s'effectue plus lentement.

On observe également une leucocytose avec neutrophilie pendant les deux premiers jours mais celle-ci est également présente chez les animaux témoins. Cette leucocytose transitoire est donc plutôt le reflet d'une mobilisation des leucocytes marginaux en réponse au stress. Enfin malgré quelques fluctuations, il n'y aucune variation notable du nombre de plaquettes.

Une autre étude [83] réalisée selon le même principe, pendant un mois, en imitant une étude toxicocinétique sur des animaux âgés de six semaines, rapporte les mêmes modifications et conseille de prélever un volume optimal de 0,9 ml de sang par jour (soit 3 à 5% du volume sanguin total) puisque de tels prélèvements n'entraînent aucune perturbation de l'hémogramme.

- Moment du prélèvement [73; 98]

Il est important de toujours réaliser les prélèvements à un même moment donné de la journée car les paramètres hématologiques du rat varient au cours du cycle nyctéméral [73]. Le nombre de globules blancs notamment, qui varie déjà sous l'influence de nombreux facteurs, augmente à la lumière et diminue à l'obscurité [98].

C'est pourquoi, en laboratoire, les prélèvements sont toujours réalisés le matin entre 9 heures et 11 heures, comme cela a été précisé dans un paragraphe antérieur.

- Stress du prélèvement [141]

Les facteurs stress ou anesthésie au moment du prélèvement ont souvent été incriminés pour expliquer des variations en réalité dues à d'autres facteurs. La seule variation importante reliée au stress d'une injection (ou ponction sanguine) et d'une anesthésie générale est une lymphopénie transitoire.

Conclusion.

Ces variations liées aux méthodes de prélèvement sont certainement responsables d'une grande partie des divergences d'une étude à l'autre, principalement en ce qui concerne la numération leucocytaire qui est la plus sensible à ces facteurs.

Enfin un autre facteur lié aux méthodes d'études peut également induire quelques variations d'une étude à l'autre : c'est le type d'automate utilisé et sa standardisation [146].

2.5.5. Facteurs environnementaux

- Types écologiques et affections intercurrentes [5; 34; 57; 73]

On a vu qu'il existait différents types écologiques c'est-à-dire différentes conditions d'élevage en laboratoire. Ces conditions environnementales ont une influence sur les paramètres hématologiques.

En effet, les rats élevés sous barrière microbiologique et indemnes de germes pathogènes ont un nombre de globules blancs inférieur à celui de rats de même souche mais élevés de manière conventionnelle. De plus, ces rats axéniques présentent également un nombre de globules rouges, un hémocrite et une concentration en hémoglobine supérieurs [73]. En revanche les animaux entretenus de manière conventionnelle ont un nombre de réticulocytes plus important, associé à une anisocytose marquée [57].

Ces différences, et en particulier les variations de la numération leucocytaire, seraient liées essentiellement à des affections sous-jacentes présentes chez les animaux élevés de manière conventionnelle comme par exemple la pneumonie murine chronique [57]. Dans le cas de cette affection très fréquente, d'autres auteurs [34] ont montré que les données hématologiques obtenues sur des rats atteints étaient tout à fait valides car il n'y avait pas de différences significatives par rapport aux animaux témoins tant qu'il s'agissait de formes légères ou modérées. En revanche, il y a effectivement une neutrophilie en cas d'atteinte sévère.

- Alimentation [4; 8; 28; 73; 77; 125]

Généralement, l'alimentation standardisée est distribuée à volonté. Cependant sa composition peut être modifiée volontairement afin d'étudier les effets d'une carence ou d'un excès en un élément particulier.

Dans de nombreuses études, les prélèvements sanguins sont réalisés le matin sur des rats ayant subi une diète hydrique la nuit précédente afin de ne pas fausser la valeur de certains paramètres biochimiques. Cette diète, classiquement préconisée, n'est pas sans effet sur les paramètres hématologiques. Tout d'abord les animaux, qui ne s'alimentent pas, réduisent également leur consommation d'eau, qui leur est pourtant accessible *ad libitum*. Il est alors parfois très difficile d'obtenir des échantillons sanguins de taille suffisante sur les animaux les plus jeunes [8]. On observe aussi une augmentation du nombre de globules rouges, de l'hématocrite et de la concentration en hémoglobine qui reflète une hémococoncentration, et parallèlement la numération leucocytaire est légèrement diminuée [8; 73; 77].

De même, une restriction alimentaire imposée sur plusieurs semaines [125] entraîne une élévation de la numération érythrocytaire, ainsi que du taux d'hématocrite et de la concentration en hémoglobine, plus prononcée chez les femelles et d'autant plus marquée que la restriction est importante. Toutefois la numération leucocytaire demeure inchangée pendant toute la durée de la restriction et de l'expérience alors que d'autres auteurs ont rapporté une légère leucopénie du fait d'une réduction du nombre de lymphocytes.

- Température [73]

Habituellement les rats sont maintenus à une température moyenne autour de 20°C environ qui doit être surveillée, car elle a une influence sur les numérations érythrocytaires et leucocytaires.

Dans un environnement froid, pour des températures inférieures à 16°C, le nombre de globules rouges décroît tandis que le nombre de globules blancs augmente. A des températures plus élevées (32°C) il se produit l'inverse : le nombre de globules rouges augmente et celui des globules blancs diminue. Il faudra donc spécialement en tenir compte lors de ponction caudale, si le protocole implique un réchauffement total de l'animal.

- Immobilisation [102]

Le stress lié à l'immobilisation entraîne un stress oxydatif qui se manifeste pour les globules rouges par une diminution de la numération totale. Une immobilisation de quelques heures sur le dos [102] induit rapidement des perturbations de la numération et de la formule leucocytaires, qui se traduisent par une augmentation du nombre de neutrophiles et de monocytes.

C'est pourquoi il est important de tenir compte de ce facteur lors d'études hématologiques nécessitant la mise en place de cathéters à demeure sur des animaux immobilisés par un harnais.

Conclusion.

Etant donné le nombre de facteurs de variation "physiologiques" ayant une influence non négligeable sur les paramètres hématologiques du rat, il paraît indispensable de préciser explicitement, pour chaque expérimentation portant sur des données hématologiques, au minimum les facteurs suivants: la souche utilisée, le sexe, l'âge, les conditions d'élevage et les méthodes de prélèvement et d'analyse de ces échantillons. C'est une condition obligatoire pour établir des données de référence et pour comparer les résultats des différentes études.

Dans la bibliographie citée ici, les articles les plus récents sont assez rigoureux et précisent généralement tous ces facteurs dans leur paragraphe "matériel et méthodes", tandis que les indications données dans certains articles plus anciens, sont souvent incomplètes. Ce manque de précision est certainement à l'origine des nombreuses contradictions rencontrées, résultant de la comparaison de résultats hématologiques obtenus dans des conditions différentes et non comparables.

3. Le myélogramme ou médullogramme

Par définition, le myélogramme est l'étude cytologique qualitative et quantitative de la moelle osseuse hématopoï étique.

Il nécessite la confection d'un étalement de suc médullaire sur une lame de verre puis sa coloration en vue d'une étude cytologique quantitative et qualitative afin d'établir la formule des différents types cellulaires exprimée en pourcentage.

3.1. Méthodes d'étude et réalisation du myélogramme

Sont décrites ci-dessous les techniques de prélèvement du suc médullaire et de réalisation du myélogramme ainsi que les différentes méthodes de comptage cellulaire. Enfin dans un dernier paragraphe sont présentées brièvement d'autres méthodes d'étude des organes hématopoï étiques qui sortent du cadre du myélogramme, mais qu'il paraît important de faire figurer dans cette partie.

3.1.1. Prélèvements [9; 18; 23; 25; 36; 45; 66; 79; 141; 142]

Que ce soit pour la moelle ou le sang, toute ponction implique le respect des règles courantes d'antisepsie même lors de prélèvements sur des cadavres, afin de ne pas contaminer l'échantillon.

On va distinguer le prélèvement d'échantillons de moelle osseuse ou suc médullaire sur des animaux décédés et la ponction de moelle sur des animaux anesthésiés.

3.1.1.1. Prélèvements de moelle sur des animaux euthanasiés [9; 25; 36; 45; 66; 141]

Différentes techniques ont été décrites pour prélever des fragments de moelle à l'autopsie ou sur des animaux anesthésiés juste avant l'euthanasie. Lorsque l'animal est tué, le prélèvement doit être réalisé dans le quart d'heure qui suit l'arrêt cardiaque afin de pouvoir réaliser ultérieurement un examen satisfaisant des cellules [9].

La technique la plus courante consiste à disséquer un os long comme le fémur, l'humérus, le tibia ou une côte, aussitôt après l'euthanasie. Avec de petites pinces à os, on sectionne l'os choisi transversalement ou longitudinalement, puis on récolte la moelle. Dans tous les cas il faut agir immédiatement après la mort de l'animal car les cellules médullaires s'abîment très vite.

Le recueil des échantillons de moelle peut se faire de diverses manières et le choix de l'une d'elles dépend des examens qui seront effectués ultérieurement: étalement simple et examen au microscope, analyse et comptage cellulaire par un automate...

Une technique élémentaire consiste à aspirer directement la moelle à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue. On détache ensuite la seringue, afin de la remplir d'air pour expulser le contenu de l'aiguille sur une lame et réaliser un étalement [141].

Une autre technique exposée par Burke [7; 25] utilise de petites brosses spéciales (cytobrosses) qui sont introduites dans la cavité osseuse pour récolter un échantillon de moelle. Celui-ci est alors directement étalé par la brosse sur une lame.

La moelle d'un rat en bonne santé est humide et gluante. Pour faciliter la réalisation de frottis par exemple, il est judicieux de la diluer préalablement ou de la mettre en suspension dans un liquide. Pour ce faire, il y a plusieurs alternatives. On peut recueillir la moelle dans l'os avec une petite pince ou avec une aiguille montée, puis on la mélange à une solution saline [141] ou du sérum [45; 66]. Une variante de cette technique consiste à prélever une gouttelette de moelle fraîche puis de passer une petite brosse enduite de sérum sur cette goutte pour prélever un peu de moelle et ensuite l'étaler directement sur un frottis [18]. Ou bien on rince l'os avec une solution saline ou du sérum qu'on injecte directement dans la cavité, puis on recueille la suspension de moelle ainsi obtenue.

Le choix d'une solution saline ou d'un sérum varie selon les auteurs et l'utilisation ultérieure de la moelle. Ainsi Furuhashi et Hasegawa [66] utilisent du sérum de rats naïfs pour éviter des phénomènes d'aggrégation cellulaire sur leurs frottis. Par contre Criswell [36] se sert d'abord de sérum fœtal de bovin pour rincer l'os et récupérer la moelle. La suspension obtenue est diluée avec d'autres solutions avant d'être dirigée vers un analyseur hématologique ou une cytocentrifugeuse qui, respectivement, vont réaliser des numérations cellulaires ou des frottis.

Dans tous les cas si un échantillon n'est pas suffisant on peut prélever l'os controlatéral ou appliquer des techniques différentes sur plusieurs os afin de multiplier les échantillons et par là-même les analyses ultérieures pour un même animal. Il est d'ailleurs recommandé de prélever plusieurs échantillons de moelle car la composition varie d'un endroit à un autre au sein d'une même cavité médullaire et la distribution des cellules n'est pas homogène.

3.1.1.2. Prélèvements de moelle sur des animaux anesthésiés [23; 25; 79]

Après avoir anesthésié l'animal avec un mélange de Fentanyl Dropéridol ND [23] par exemple, on ponctionne la crête iliaque avec une aiguille montée. On aspire ensuite à l'aide d'une seringue de 5 ml et on parvient ainsi à recueillir 0,1 à 0,2 ml de suc médullaire.

On peut également adapter la technique de Burke avec certaines modifications. On se sert d'une fraise de dentiste pour percer un petit trou dans le cortex tibial, en prenant garde de ne pas traverser la moelle. Puis on introduit une brosse encore plus petite à travers l'orifice pour recueillir la moelle ou alors on aspire avec une fine aiguille montée sur une seringue [25; 79].

On peut enfin réaliser une aspiration de moelle au niveau des sternèbres comme chez la souris. Le rat anesthésié est placé en décubitus dorsal et, après tonte et désinfection, on pratique une incision cutanée et musculaire de manière à bien dégager une sternèbre. On fore alors un petit trou avec une fraise de dentiste et on aspire la moelle par l'orifice avec une fine pipette ou une aiguille [79].

3.1.2. Réalisation du myélogramme [25; 36; 66; 141; 142]

3.1.2.1. Etalement

Quelle que soit la technique employée, il faut veiller soigneusement à endommager le moins possible les cellules qui sont très fragiles, beaucoup plus que les cellules sanguines.

Si le prélèvement a été effectué à l'aide d'une petite brosse [25], il suffit alors d'étaler directement la moelle sur une lame avec cette brosse sans appuyer pour éviter des déformations de l'étalement et la détérioration des cellules. Si la quantité de moelle est suffisante, on peut réaliser quatre bandes d'étalement, parallèles, sur une même lame.

Il est également possible d'employer la même technique que pour un frottis sanguin. Il s'agit de déposer une petite quantité de moelle, ou une goutte de suspension de moelle, sur une lame de verre propre et dégraissée, posée bien à plat. Avec une deuxième lame à bords rodés, inclinée à 30 degrés par rapport à la première lame support, on s'approche jusqu'à la goutte qu'on laisse se répandre le long du bord rodé. Puis on repart vers l'autre extrémité du support, en conservant toujours le même angle, ce qui entraîne l'étalement de la moelle [66].

Cette technique n'est pas toujours évidente lorsque la moelle est gluante et épaisse. On peut alors utiliser la technique d'étalement suivante entre deux lames perpendiculaires. L'échantillon est déposé comme précédemment à l'extrémité d'une lame. Puis on pose une deuxième lame à plat, perpendiculairement, sur la première au niveau de la goutte. La diffusion de l'échantillon par force capillaire, entre les deux lames les fait adhérer l'une à l'autre. Il suffit ensuite de faire glisser la deuxième lame jusqu'à l'autre extrémité de la première, réalisant ainsi l'étalement et facilitant la séparation des deux lames. Cette technique est très souvent employée pour la réalisation de frottis de substance épaisse comme le suc ganglionnaire ou la moelle osseuse.

Certains auteurs [25] considèrent qu'il ne faut pas diluer la moelle avant de réaliser un frottis sinon la solution disperse trop les cellules. D'autres [66], au contraire, préfèrent étaler une suspension de moelle pour éviter les agrégations cellulaires ou l'obtention d'un frottis trop épais illisible au microscope.

Une autre méthode [36] récente fait appel à un matériel plus sophistiqué. Après avoir obtenu une suspension de moelle en rinçant un fémur de rat avec du sérum fœtal de bovin, on la dilue plusieurs fois avec une solution tampon, puis on la mélange à une solution à 7,5% d'albumine bovine. Ce mélange est ensuite placé dans une cyto centrifugeuse qui va donc préparer le "frottis". Des études, réalisées chez l'homme seulement, montreraient que, comparativement, il n'y aurait pas de différence significative entre les méthodes traditionnelles et la technique de cyto centrifugation. Il y aurait même beaucoup moins de cellules abîmées.

3.1.2.2. Coloration [66; 99; 141; 142]

L'étalement doit être rapidement séché après son exécution pour éviter les artefacts. On a ensuite la possibilité de fixer la lame avant la coloration mais ce n'est pas obligatoire. Les meilleurs résultats sont obtenus en colorant les prélèvements dans les quatre à cinq heures qui suivent le séchage [66].

Quel que soit le protocole utilisé, il faut souvent allonger les temps de coloration pour les frottis de moelle par rapport aux frottis sanguins, car la cellularité des frottis de moelle est beaucoup plus importante [142].

Selon la coloration utilisée, les descriptions morphologiques des cellules sont quelque peu modifiées mais ces variations restent très faibles lorsqu'il s'agit d'un même type de coloration comme le Romanowsky qui est le plus répandu.

Le prélèvement médullaire, l'étalement et la coloration du frottis sont les trois points critiques qui doivent être exécutés de manière optimale puisqu'ils conditionnent considérablement les résultats de l'examen cytologique [142].

3.1.2.3. Lecture du myélogramme

Au faible grossissement du microscope, on évalue, dans un premier temps, de manière semi-quantitative, la richesse médullaire, c'est-à-dire la richesse en cellules nucléées, du prélèvement. Cette étape est essentielle si on ne dispose pas de la numération totale. Mais cette appréciation reste semi-quantitative et dépend beaucoup de la qualité du prélèvement. En effet une moelle apparemment pauvre peut traduire une aplasie ou une fibrose médullaire aussi bien qu'un échantillon dilué avec du sang ou simplement un prélèvement raté.

Toujours au faible grossissement, on évalue la richesse de la lignée mégacaryocytaire car ces cellules géantes sont souvent situées à la périphérie des frottis et leur nombre peut être sous-estimé pendant la réalisation de la formule. Il est même parfois impossible de déterminer un réel pourcentage et on se contente de donner une appréciation semi-quantitative (nombre normal, abaissé ou élevé) en commentant également l'aspect morphologique.

Ensuite au fort grossissement, à l'objectif à immersion, on réalise la formule des éléments nucléés sur un minimum de 500 cellules (cf paragraphe 3.1.3.) et on note la présence éventuelle d'éléments inhabituels ou d'anomalies morphologiques. Il faut lire plusieurs champs microscopiques pour comptabiliser les 500 cellules; en général, ces champs ne sont pas choisis au hasard, ils ont d'abord été repérés au faible grossissement afin de sélectionner des plages de lecture plus aisées à interpréter où les cellules sont nombreuses mais ne se chevauchent pas trop.

3.1.3. Comptage cellulaire

L'évaluation quantitative de la moelle osseuse est donnée par la cellularité de la moelle et par la formule de répartition des différentes catégories de cellules c'est-à-dire le myélogramme.

3.1.3.1. Cellularité globale [33; 36; 45; 76; 108; 141]

On peut évaluer le nombre total de cellules hématopoïétiques de la cavité médullaire d'un os en déterminant le nombre total de cellules nucléées de la moelle [36; 108].

Pour ce faire, on coupe ou on scie les extrémités d'un os long comme le fémur ou l'humérus, puis on recueille une suspension de moelle en rinçant la cavité osseuse, avec une quantité précise de sérum fœtal de bovin mélangé à une solution tamponnée de phosphate de potassium [36; 108] par exemple ou avec une solution saline tamponnée [141]. La suspension est ensuite centrifugée et le surnageant est retiré pour éliminer les résidus lipidiques ou fibrineux. Les cellules restantes sont remises en suspension dans un volume donné de solution tamponnée, puis cette nouvelle suspension est dirigée vers un analyseur hématologique, de type Technicon ou Sysmex counter, qui va calculer le nombre total de cellules nucléées par fémur ou pour 100 grammes de poids vif, en tenant compte des dilutions.

Par ailleurs, pour calculer la cellularité médullaire globale du squelette entier, il existe plusieurs méthodes [76] basées sur la mesure de la radioactivité émise par les squelettes de rats

auxquels on a préalablement injecté par voie intraveineuse du fer radioactif (^{59}Fe), afin de marquer les cellules hématopoïétiques ayant incorporé cet ion. La détermination du nombre total de cellules nucléées par fémur (ou humérus) ainsi que la mesure de la radioactivité émise par ce seul os étudié et celle émise par l'ensemble du squelette de l'animal permettent de calculer la cellularité médullaire globale pour un animal donné.

3.1.3.2. Formule du myélogramme [36; 37; 45; 142]

La formule du myélogramme, c'est-à-dire les pourcentages respectifs de chaque type cellulaire, est obtenue le plus souvent de façon manuelle, d'après le frottis de moelle coloré, de la même manière qu'on établit la formule leucocytaire du frottis sanguin. En revanche, si la formule leucocytaire est établie sur un minimum de 100 cellules, la réalisation du myélogramme nécessite le recensement d'un minimum de 500 cellules [45; 142].

D'autre part l'identification de chaque type cellulaire est loin d'être aisée car il existe de nombreuses ressemblances morphologiques pour des cellules de lignées différentes. Il est souvent difficile de préciser exactement le stade de maturation car c'est un processus continu. Il n'existe donc pas de barrière stricte permettant de cataloguer exclusivement chaque cellule du myélogramme. Ce recensement doit, de ce fait, être réalisé par un technicien qualifié et expérimenté.

Cette méthode manuelle est toujours la plus répandue mais certains auteurs ont élaboré des méthodes automatisées utilisant le principe de cytométrie en flux. Ainsi, Criswell et al [36; 37] ont développé un protocole, permettant de différencier et comptabiliser les cellules hématologiques, basé sur la détermination cytométrique de leur activité peroxydasique, de leur taille et de leur réactivité en présence d'anticorps lymphocytaires.

La coloration immunohistochimique mettant en évidence l'activité peroxydasique d'une cellule est une méthode couramment employée pour différencier les leucocytes. Ainsi la mesure du niveau d'activité peroxydasique est utilisée par les automates d'hématologie de type Technicon pour déterminer la formule leucocytaire sanguine.

Dans leur protocole Criswell et al mesurent indirectement l'activité peroxydasique des cellules en les laissant réagir avec un composé le DCF (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate). Ce composé est transformé en un dérivé fluorescent lors d'une réaction d'oxydation catalysée par la peroxydase cellulaire. La fluorescence ainsi émise est directement reliée à l'activité peroxydasique. Elle est ensuite analysée par le cytomètre en flux (EPICS-XL) en combinaison avec la détermination cytométrique de la dimension des cellules et de leur interaction avec des anticorps spécifiques des lymphocytes. Le cytogramme ainsi obtenu permet de différencier en des zones bien distinctes les cellules des différentes lignées (érythroïdes, myéloïdes, mégacaryocytaires et lymphoïdes) et en fonction de leur stade de maturation. Il est ainsi possible de réaliser environ 40 myélogrammes par jour par ce procédé.

Si elle permet de gagner du temps par rapport à la méthode manuelle, cette méthode, est encore loin d'être utilisée en routine et nécessite un matériel très perfectionné et coûteux et ne donne pas une formule aussi détaillée que par la méthode manuelle.

Cf. figure 4.

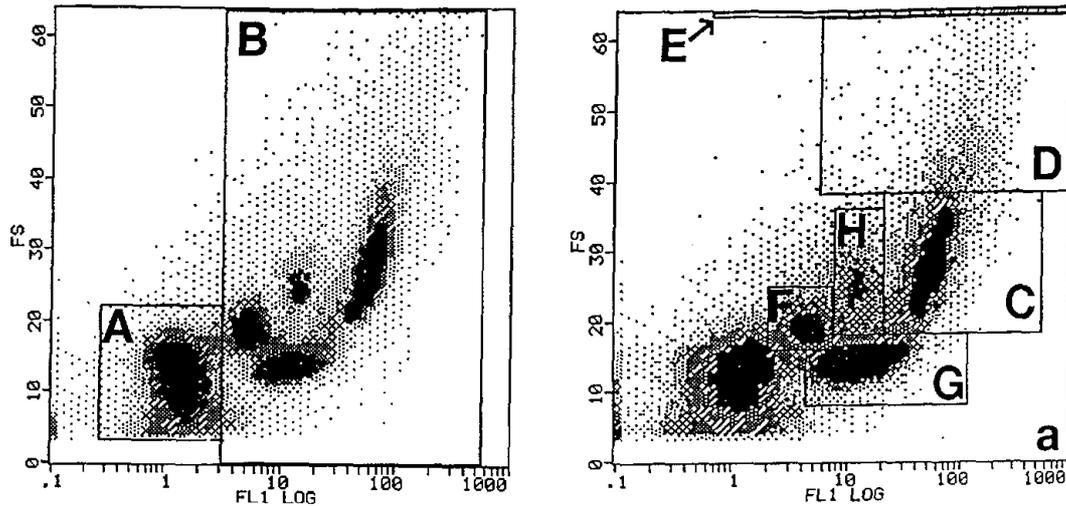


Figure 4: Exemple de cytogramme obtenu à partir de cellules médullaires de rat après incubation avec du DCF. D'après Criswell et al [36].

Commentaires.

Chaque point correspond à une cellule représentée dans ce repère, par l'intensité de la lumière diffractée (FS pour forward scattered light) sur l'axe des ordonnées et le logarithme de l'intensité de la fluorescence émise (FL1 LOG) sur l'axe des abscisses.

On peut donc distinguer clairement plusieurs régions qui correspondent à différents types cellulaires ce qui a été vérifié par l'analyse de l'effluent. Tout d'abord à gauche on différencie aisément les érythrocytes non nucléés (région **A**) de l'ensemble des cellules médullaires nucléées (région **B**).

Sur le cytogramme de droite les différentes régions correspondent aux cellules suivantes:

C: cellules de la lignée myéloïde plutôt matures (métamyélocytes, band-cell et granulocytes neutrophiles).

D: cellules myéloïdes peu différenciées (myéloblastes, promyélocytes et myélocytes).

E: population mégacaryocytaire. Il n'est pas évident de distinguer cette région sur ce diagramme en noir et blanc mais normalement le diagramme analysé par l'ordinateur du cytomètre est en couleur et la région E est alors bien distincte.

F et G: ces deux régions correspondent à la population lymphoïde mais sont constituées d'un mélange de lymphocytes et de lymphoblastes qui seront identifiés par la suite grâce aux antigènes spécifiques.

H: cellules érythroïdes immatures (proérythroblastes, érythroblaste basophiles).

3.1.4. Autres méthodes d'étude des organes hématopoïétiques

Ce paragraphe sort du cadre du myélogramme mais il était important de le faire figurer ici car les méthodes et techniques décrites ci-dessous sont très fréquemment utilisées dans de nombreuses études liées à l'hématologie du rat.

3.1.4.1. Préparations histologiques de moelle [33; 45; 142]

Le myélogramme ne permet d'évaluer qu'un petit échantillon de moelle qui peut, selon les prélèvements, être plus ou moins représentatif. C'est pourquoi la moelle osseuse du rat est examinée par de nombreux auteurs sur des coupes histologiques afin d'observer les aspects cytologiques de la moelle in situ.

Pour ce faire, on sectionne les deux extrémités du fémur puis on le plonge dans une solution de formol afin de fixer la moelle. Durant le temps de fixation, qui peut durer une semaine, il est judicieux d'agiter régulièrement le prélèvement pour que le formol pénètre bien. On peut de la même manière prélever les tibias, les humérus, des côtes, le crâne, des sternèbres, des vertèbres ou encore des os du bassin. Après la période de fixation les os sont décalcifiés, puis inclus dans des blocs de paraffine. On peut alors sectionner ces blocs pour obtenir des coupes histologiques de tronçons de moelle de quelques microns d'épaisseur qui sont ensuite colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Il est ensuite possible d'apprécier la cellularité globale de la moelle d'après ces coupes. La méthode décrite par Endicott et Ott [45] et plus récemment par Cline et Maronpot [33], consiste à évaluer, sur des sections histologiques d'os, l'espace médullaire occupé par les cellules hématopoïétiques par rapport à l'espace médullaire disponible. Les espaces occupés par l'os trabéculaire, les gros vaisseaux ou les espaces artefactuels résultant de rétrécissement ou de déplacement des tissus au cours des manipulations ne sont pas pris en compte comme espace médullaire disponible. L'espace médullaire disponible est de ce fait essentiellement occupé par les cellules hématopoïétiques et les cellules adipeuses. La proportion de cellules hématopoïétiques varie donc inversement avec la proportion d'adipocytes.

Cette approche manuelle de la cellularité médullaire est assez subjective et peu précise, le pourcentage étant attribué, par la personne qui effectue la lecture, par tranches de 10%. On réalise une moyenne lorsqu'il y a plusieurs coupes d'un même os.

Les préparations histologiques d'organes sont très souvent utilisées en première intention dans les études toxicologiques. Lors d'anomalies détectées sur la rate ou la moelle osseuse on réalise alors d'autres études hématologiques avec examens sanguins et frottis de moelle osseuse.

3.1.4.2. Autres organes hématopoïétiques

N'ont été décrites jusqu'ici que les techniques de prélèvement de moelle osseuse, mais il est vrai que, chez le rat, d'autres organes hématopoïétiques majeurs comme la rate et le foie sont aussi obligatoirement analysés lorsqu'on désire étudier les paramètres et les variations hématologiques d'un individu.

Pour décrire brièvement les méthodes d'étude, on peut dire que la rate est classiquement prélevée entière sur des cadavres afin de réaliser ensuite, le plus souvent des coupes histologiques, ou bien des calques, ou encore des suspensions cellulaires à partir d'une petite portion d'organe d'un poids connu [5]. Une telle suspension cellulaire peut être utilisée pour réaliser des frottis souvent à l'aide d'une cyto centrifugeuse, ou bien dirigée vers un analyseur pour déterminer la numération cellulaire totale de l'organe [134]. L'examen du frottis splénique et la connaissance de la cellularité globale permettent alors d'établir la formule des différents types cellulaires hématopoïétiques présents dans cet organe c'est-à-dire le splénogramme.

3.2. Caractéristiques des cellules du myélogramme

3.2.1. Description morphologique [45; 65; 66; 85; 95; 141]

Les descriptions suivantes correspondent à l'observation de cellules hématopoïétiques sur des frottis de moelle osseuse colorés par une technique de type Romanowsky. Pour les différentes lignées, les types de cellules sont présentés dans l'ordre chronologique de maturation, c'est-à-dire des cellules les plus immatures aux cellules les plus différenciées, les cellules du sang circulant exceptées, puisqu'elles ont été décrites précédemment.

Les modifications morphologiques communes, et non spécifiques au rat, au cours de la maturation sont principalement une diminution de la taille cellulaire, une diminution du rapport nucléo-cytoplasmique, la disparition des nucléoles avec simultanément une condensation de la chromatine.

3.2.1.1. Cellules de la lignée rouge = lignée érythroïde [65; 66; 141]

La nomenclature des cellules érythroïdes varie selon les auteurs. On citera ici les termes les plus répandus c'est-à-dire ceux utilisés par Williams chez l'homme, et repris par Furuhashi [66], ainsi que la classification de Schalm.

- **Proérythroblaste** = pronormoblaste = rubriblast

Le premier précurseur de l'érythropoïèse est une grande cellule ronde, de 13 à 25 µm de diamètre, qui ne contient pas d'hémoglobine. Le rapport nucléocytoplasmique est élevé, ce qui signifie que le noyau occupe la majeure partie de la cellule. Il est circulaire, présente une chromatine lâche et quelques nucléoles. Le cytoplasme est très sombre et basophile.

- **Erythroblaste basophile** = normoblaste = prorubricyte

Cette cellule est légèrement plus petite que le proérythroblaste avec un diamètre généralement compris entre 12 et 16 µm. Le cytoplasme est très basophile, mais le noyau occupe moins de place et sa chromatine forme des amas plus condensés donnant un aspect de roue de charrette.

- **Erythroblaste polychromatophile** = rubricyte

Cette cellule est encore plus petite (8-14 µm de diamètre) que les précédentes. Le cytoplasme est toujours basophile mais moins bleu car il prend une couleur plutôt gris rosé, ce qui est dû à la coexistence du matériel basophile et de l'hémoglobine dont la concentration augmente. Le noyau est donc plus petit et apparaît beaucoup plus sombre car la chromatine est très condensée.

- **Erythroblaste acidophile** = érythroblaste orthochromatique = metarubricyte

Cette cellule perd encore de la basophilie par rapport aux précédentes et sa taille se réduit à 7 à 10 µm de diamètre. Le cytoplasme commence à prendre la couleur du globule rouge, selon la concentration en hémoglobine croissante. Le noyau est petit, rond ou en forme

de mûre, éventuellement excentré et presque tout noir car il est picnotique et parfois même déjà partiellement autolysé.

- **Réticulocyte** = érythrocyte polychromatophile
- **Erythrocyte** = globule rouge = hématie

Ces deux dernières cellules ont déjà été décrites parmi les cellules du sang circulant.

On rappelle simplement qu'on peut observer au stade réticulocyte (ou érythrocyte polychromatophile) des micronucleus comme on pouvait en voir sur les frottis sanguins [159; 160]. La recherche de micronucleus, appelée test du micronucleus, est fréquemment utilisée chez les rongeurs de laboratoire pour détecter la toxicité cytogénétique de certaines substances. En effet, une augmentation du nombre d'érythrocytes polychromatophiles micronucléés, chez des animaux exposés à une substance toxique, indique la présence d'altérations génétiques chromosomiques. Ce test est essentiellement pratiqué sur des frottis de moelle. La visualisation des micronucleus sur les étalements médullaires est facilitée par l'utilisation de colorations spécifiques de l'ADN telle l'acridine orange [160].

3.2.1.2. Cellules de la lignée blanche = lignée myéloï de [65; 66; 141]

La grande singularité de la lignée myéloï de du rat par rapport aux autres espèces est la forme très particulière du noyau qui, à partir du promyélocyte, prend une forme en anneau ou en beignet (doughnut), car il est percé en son centre. Le diamètre de ce "trou" ou "vacuole" nucléaire s'élargit progressivement au cours de la maturation. D'après Ulich et Del Castillo [141], il y a un rapport entre le diamètre du trou et celui du noyau qui permet de déterminer le stade de maturation et le type de cellule. Au stade promyélocyte, le diamètre du trou nucléaire est inférieur au tiers du diamètre du noyau; pour le myélocyte, il représente à peu près le tiers du diamètre du noyau; et à partir du métamyélocyte, il est supérieur au tiers de ce diamètre. L'anneau s'amincit donc au fur et à mesure de la maturation.

Un autre aspect qui différencie les cellules myéloï des murines et humaines est la couleur du cytoplasme beaucoup plus basophile chez le rat.

- **Myéloblaste**

C'est le précurseur de la granulopoï èse. Il mesure de 10 à 17 μm de diamètre. La fine bande de cytoplasme est basophile mais généralement plus claire que le cytoplasme du proérythroblaste ou de l'érythroblaste basophile. Ce cytoplasme ne contient pas de granulations, sauf exception parmi les cellules les plus âgées, et ne fixe pas la coloration benzidine. Le noyau est très gros, de forme irrégulière, et contient un ou plusieurs nucléoles. A ce propos, Harris et Burke [65] ont remarqué que les nucléoles étaient plus souvent présents dans des échantillons de moelle préalablement mélangés avec du sérum avant d'être étalés que sur des frottis de moelle fraîche. Cela pourrait expliquer pourquoi les auteurs divergent parfois sur la présence ou non de nucléoles dans un type donné de cellule.

- **Promyélocyte**

Il est généralement plus volumineux que le myéloblaste (diamètre de 10 à 21 μm) car le cytoplasme s'agrandit. Ce dernier, très basophile, contient de nombreuses granulations azurophiles

rougeâtres. Le noyau peut prendre une forme très variable, mais souvent on commence à visualiser le trou et la forme de "doughnut". Par contre on n'observe pas de nucléole.

- **Myélocyte**

Il est plus petit que le précédent et mesure de 9 à 15 μm de diamètre. Le cytoplasme est bleuté et ne contient plus de granulations azurophiliques, mais il commence à se ponctuer de granulations spécifiques de la lignée neutrophile, éosinophile ou basophile. Le noyau est parfois ovale mais le plus souvent en forme d'anneau avec une chromatine très condensée.

A partir de ce stade, il existe toujours trois catégories de cellules pour chaque type, suivant son appartenance à la lignée neutrophile, éosinophile, ou basophile.

L'existence de cellules de lignée basophile est cependant controversée. En effet Ulich et Del Castillo [141] ont observé la présence de cellules contenant des granulations basophiles dans la moelle osseuse de rat, en faible quantité, mais doutent de leur véritable nature et pensent qu'il s'agit plutôt de cellules de la lignée neutrophile modifiées. En revanche, Furuhashi et Hasegawa [66] décrivent des myélocytes basophiles comme étant des cellules de 9 à 15 μm de diamètre dont le cytoplasme contient des granulations métachromatiques ou noires et dont le noyau est plurilobé ou parfois en forme de trèfle.

Quant au myélocyte éosinophile, il est légèrement plus gros que les deux autres (12 à 19 μm) et son cytoplasme plus basophile est rempli de granulations orangées spécifiques.

- **Métamyélocyte**

Il est à peu près de la même taille que le myélocyte, mais le cytoplasme est moins basophile et peut contenir des granulations qui fixent positivement la coloration benzidine. Le noyau est encore annulaire et la chromatine de plus en plus condensée.

- **Band cell**

Son diamètre est de 9 à 14 μm . Le cytoplasme est très pâle et le noyau n'est pas encore segmenté mais prend une forme typique en fer à cheval.

On peut rencontrer ce type de cellule dans le sang circulant ainsi que des cellules plus immatures à l'occasion d'une augmentation du relargage des granulocytes par la moelle osseuse.

- **Granulocyte ou polynucléaire**

La description des différents types de granulocytes ou polynucléaires a été donnée dans le chapitre sur les cellules du sang. On peut néanmoins ajouter qu'on parle souvent de neutrophile segmenté pour le polynucléaire neutrophile.

3.2.1.3. Cellules des autres lignées [66; 85; 95; 141]

- **Lignée lymphoïde [66; 141]**

On trouve parfois dans la moelle osseuse quelques formes immatures c'est-à-dire des **lymphoblastes**, qui ne sont pas facilement identifiables par rapport aux cellules immatures des autres lignées.

On reconnaît plus aisément des petits **lymphocytes** de 5 à 7 μm de diamètre, caractérisés par un noyau rond à chromatine très condensée et une fine bande de cytoplasme bleu pâle.

Enfin il existe un autre type de cellule de la lignée lymphoïde facilement identifiable sur un frottis médullaire: il s'agit du **plasmocyte**. Sa taille est de 8 à 18 μm et sa forme est généralement ronde ou ovale. Le cytoplasme est très bleu avec une zone plus claire en forme de croissant autour du noyau, l'arcoplasme, qui caractérise la plupart des plasmocytes comme chez l'homme et le chien par exemple.

- **Lignée monocyttaire** : monocytes, macrophages, histiocytes [66; 141]

Les précurseurs sont les **monoblastes** qu'il est morphologiquement impossible de différencier des myéloblastes sans avoir recours à des colorations histochimiques.

Le **promonocyte** possède un cytoplasme pâle et abondant ainsi qu'un noyau réniforme ou plurilobé contenant de nombreux nucléoles.

On peut rencontrer quelques monocytes dans la moelle qui sont identiques à ceux du sang circulant.

Les macrophages ou histiocytes dérivent des **monocytes** et sont des cellules de phagocytose présentes dans la moelle de manière isolée ou groupées en amas. Ce sont de grandes cellules ovoïdes pouvant atteindre 20 à 30 μm dans leur plus longue dimension. Elles possèdent un faible rapport nucléocytoplasmique, un noyau très excentré et un cytoplasme abondant bleu gris très pâle et parfois presque incolore. Les macrophages sont encore plus évidents à reconnaître lorsqu'ils contiennent des éléments phagocytés comme des particules de fer, des résidus de noyaux picnotiques, des érythrocytes ou plus rarement un leucocyte entier.

- **Lignée mégacaryocytaire** [66; 85; 141]

Le **mégacaryocyte**, précurseur des plaquettes, est la plus grosse cellule de la moelle. Même si elle est de forme très variable, c'est la plus facilement reconnaissable de par sa taille et la particularité de son noyau, fragmenté et polyploïde.

En effet, les cellules souches de la lignée mégacaryocytaire arrêtent de se diviser, à un moment donné, tout en continuant la réplication de l'ADN. Ce processus appelé endomitose aboutit à la création de cellules contenant de 4 à 32 fois la quantité d'ADN initiale soit des cellules polyploïdes de 8N à 64N. Une fois l'endomitose terminée, le cytoplasme augmente considérablement de volume et on observe alors le mégacaryocyte, tel qu'il a été décrit plus haut.

Il est possible de distinguer trois degrés de maturation en fonction de la fragmentation du noyau, de la basophilie et de la relative abondance de cytoplasme.

Ainsi, la plus immature est le **mégacaryoblaste** qui mesure de 13 à 40 μm de diamètre et présente un cytoplasme basophile peu abondant et un noyau compact formé d'au moins huit lobes.

Le **promégacaryocyte** est encore plus grand (20 à 80 μm), avec un cytoplasme plus bleu et plus large, et un noyau fragmenté en plusieurs lobules.

Enfin le **mégacaryocyte** est, en moyenne, le plus volumineux (40 à 90 μm) et son noyau est divisé en de très nombreux lobules. Quant au cytoplasme, il contient quelques granulations azurophiles qui seront présentes ensuite dans les plaquettes. Celles-ci se forment à partir de prolongements cytoplasmiques des mégacaryocytes.

- **Mastocytes** [65; 141]

Le mastocyte mesure de 15 à 25 μm de diamètre. C'est une cellule aisément identifiable de par ses nombreuses granulations très basophiles qui occupent tout le cytoplasme et peuvent se superposer au noyau. Lorsque ce dernier est visible, il est petit, rond et excentré avec une chromatine très condensée.

- **Cellules adipeuses** [65; 141]

Ce sont de grandes cellules très claires, transparentes, dont le cytoplasme est rempli de gouttelettes lipidiques. Leur noyau est très petit, peu structuré et excentré.

- **Préostéoclastes et préostéoblastes** [65; 141]

Ce sont les précurseurs des ostéoclastes et ostéoblastes. On en observe de temps en temps sur les étalements de moelle. Le préostéoclaste est une cellule énorme (100 μm) et de forme irrégulière. La couleur du cytoplasme varie du bleu légèrement basophile au rouge violet acidophile. Il contient fréquemment plusieurs noyaux et il faut alors le distinguer du mégacaryocyte.

Le préostéoblaste est une cellule oblongue de diamètre inférieur à 30 μm . Le cytoplasme est bleu foncé avec quelques granulations roses. Le noyau excentré contient de nombreux nucléoles. Il ne faut pas le confondre avec un plasmocyte car il possède également une zone plus claire mais qui se situe à l'apex et non pas en zone périnucléaire comme l'arcoplasme du plasmocyte.

- **Cellules réticulées ou stromales** [66; 95; 141]

Cette cellule est souvent située au centre d'un amas de cellules érythroïdes à plusieurs stades de différenciation. C'est une grande cellule apparentée aux macrophages, de 30 à 40 μm de diamètre. Le cytoplasme est bleu clair, il contient de nombreuses vacuoles et parfois de fines granulations. On observe aussi des prolongements cytoplasmiques interdigités qui entourent les cellules érythroïdes. Le noyau est caractéristique car il présente une structure réticulée.

Elle est parfois aussi appelée cellule nourricière mais son rôle consiste surtout à phagocyter les noyaux libres d'érythroblastes ou les cellules les plus âgées.

Conclusion.

Toutes ces cellules ne sont pas toujours faciles à différencier sans colorations spéciales et il arrive souvent qu'on regroupe plusieurs catégories au sein d'une même lignée pour donner une approche quantitative du myélogramme. En outre la formule du myélogramme ne fait apparaître que les cellules des lignées myéloïdes, érythroïdes, lymphoïdes, monocytaires et mégacaryocytaires ainsi que, fréquemment une catégorie de cellules abîmées ou non identifiables. Certains auteurs [66] incluent dans cette catégorie les cellules en mitose lorsqu'il est impossible de déterminer leur lignée d'appartenance. Les figures de mitose sont souvent observées sur les frottis de moelle de rat et représentent environ 1% des cellules médullaires dans des conditions physiologiques.

Par ailleurs, tous ces types cellulaires sont décrits d'après des frottis de moelle. Il faut en effet préciser que, sur des coupes histologiques, la différenciation est beaucoup moins

évidente. Généralement on parvient à identifier les cellules les plus matures de chaque lignée ainsi que les cellules stromales et adipeuses mais il est impossible de distinguer les différents stades de maturation au sein d'une même lignée sur une coupe histologique [95].

3.2.2. Paramètres chiffrés [36; 72; 73; 142]

La formule des éléments nucléés du myélogramme fait apparaître les pourcentages des différents types cellulaires qui permettent de calculer les indices de maturation des lignées érythroïdes et myéloïdes ainsi que le rapport M/E.

L'indice de maturation d'une lignée est le rapport du nombre de cellules en phase de prolifération (ou de production) sur le nombre de cellules en phase de maturation. On peut le définir également comme le nombre de cellules immatures divisé par le nombre de cellules en maturation. Ainsi, en pratique, pour la lignée rouge, l'indice de maturation est le rapport entre le nombre de proérythroblastes et d'érythroblastes basophiles sur le nombre d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles. Pour la lignée blanche, c'est le nombre de myéloblastes, de promyélocytes et de myélocytes divisé par le nombre de métamyélocytes, de band-cell et de neutrophiles segmentés.

Ces indices donnent donc une idée de l'aspect de la pyramide d'une lignée. Cette pyramide est classique, avec une base large et un sommet fin, si les cellules les plus mûres sont en plus grand nombre, ou elle est inversée si les cellules jeunes, immatures prédominent.

La détermination de ces indices de maturation ne peut être réalisée correctement qu'à partir d'un étalement médullaire de bonne qualité. En effet, si le prélèvement est dilué avec du sang périphérique, la quantité de cellules myéloïdes matures, par exemple, sera surestimée car on dénumbrera alors aussi les leucocytes sanguins.

Enfin le rapport M/E est le rapport entre le nombre total de cellules myéloïdes sur le nombre total de cellules érythroïdes. Il est, dans les conditions physiologiques, relativement constant pour une espèce donnée et ses variations peuvent indiquer une hyperplasie ou une hypoplasie d'une lignée à condition de toujours interpréter les résultats en fonction de ceux de l'hémogramme.

3.3. Valeurs usuelles

Comme pour l'hémogramme, il est difficile de définir de réelles valeurs de référence, d'autant plus que les références bibliographiques concernant les valeurs usuelles de la cellularité et du myélogramme du rat sont beaucoup moins nombreuses que pour l'hémogramme.

Les études les plus récentes n'ont pas été réalisées sur des rats Sprague-Dawley mais souvent sur des rats Wistar. Dans ce paragraphe seront donc présentées ou commentées non seulement les données recueillies sur le Sprague-Dawley mais aussi sur d'autres souches comme le Wistar, le F344 ou le Lewis.

3.3.1. Cellularité [36; 108; 141]

Le tableau 5 présente les résultats obtenus par Palm et al [108] sur des fémurs de rats Wistar mâles et femelles d'âge différent, la numération totale ayant été réalisée avec un appareil automatisé sur une suspension de moelle obtenue par rinçage de la cavité médullaire.

Ces résultats sont tout à fait comparables avec ceux obtenus par Criswell [36] également sur des fémurs de rats Wistar, mais avec un automate différent. En revanche, Ulich et Del Castillo [141] ont observé un total d'environ 60.10^6 cellules par humérus de rat Lewis mâles âgés de 8 à 12 semaines et pesant de 200 à 300 grammes ce qui, rapporté au poids médian, est inférieur aux résultats exposés ci-dessous pour les fémurs (tableau 5).

Le tableau 6 retranscrit les résultats de Cline et Maronpot sur l'appréciation de la cellularité hématopoïétique en fonction de la nature de l'os examiné et de l'âge de l'animal selon la méthode décrite plus haut.

Tableau 5.

Moyenne et valeurs extrêmes (entre parenthèses) du nombre total de cellules médullaires nucléées par fémur et par rapport au poids vif pour des rats Wistar. D'après Palm [108].

Age (semaines)	9		20		32	
Nombre	6		10		10	
Sexe	M	F	M	F	M	F
NTC $\cdot 10^6$ / fémur	114 (100-130)	78 (67-96)	120 (103-146)	80 (57-99)	139 (110-160)	86 (66-103)
NTC $\cdot 10^6$ /100g PV	41 (35-46)	40 (31-58)	32 (27-36)	34 (26-40)	30 (25-34)	34 (27-42)

Tableau 6.

Moyenne des pourcentages de l'espace médullaire occupé par les cellules hématopoïétiques sur des coupes histologiques de plusieurs os de rats mâles F 344. D'après Cline et Maronpot [33].

Age	2 mois	4 mois	7 mois	16 mois	24 mois
Nombre	5	6	9	6	8
<i>Site osseux:</i>					
Fémur proximal	78	68.3	68.3	62.5	65.7
Fémur distal	77.5	55	55.6	64.2	71.4
Tibia	77	55.8	58.3	58.3	70
Humérus	84	62.5	65.6	68	73.8
Vertèbre	84	73.3	73.3	74	72
Sternum	77	70.2	72.2	68.3	70.7
Côte	88	71.7	72.2	63.3	65.7

Commentaire.

Il faut ajouter que les écarts-types non précisés dans ce tableau sont en réalité très variables.

3.3.2. Myélogramme [36; 141; 142]

Les tableaux 7 et 8 correspondent aux données recueillies par Valli et al [142] sur des groupes témoins de rats Sprague-Dawley mâles et femelles. Le tableau 7 expose les résultats du myélogramme, c'est-à-dire les pourcentages obtenus après examen microscopique de 500 cellules sur un frottis de moelle fémorale obtenue par aspiration. Malheureusement, on ne dispose pas de plus de détails sur la méthode particulière employée pour déterminer ces résultats. De plus, il faut signaler que n'y figurent seulement que les lignées myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes et qu'il n'y a aucune donnée ni commentaire sur la lignée mégacaryocytaire.

Dans le tableau 8 on peut voir les indices de maturation calculés d'après les données du myélogramme précédent ainsi que les rapports M/E obtenus par les mêmes auteurs et la même technique sur des échantillons différents de ceux du tableau 7, et de taille plus importante.

Le tableau 9 présente les moyennes des numérations absolues et relatives de cellules hématopoïétiques humérales de jeunes rats mâles Lewis, une souche consanguine dérivée du Wistar, réalisées par Ulich et Del Castillo [141] sur un lot de 50 animaux témoins utilisés lors de leurs nombreuses études sur les régulateurs de l'hématopoïèse du rat.

La méthode utilisée pour recueillir la moelle consiste à exciser l'humérus immédiatement après le sacrifice de l'animal, puis d'en sectionner les épiphyses avant d'injecter une solution saline tamponnée dans la cavité médullaire afin de recueillir une suspension de moelle. Un volume fixé de cette suspension est ensuite dirigé vers un automate de type Coulter qui va déterminer la numération totale des cellules nucléées. L'autre humérus est préparé de la même manière pour réaliser le frottis médullaire et établir la numération relative des différents types cellulaires.

Le myélogramme présenté dans ce tableau 9 est plus complet que le précédent (tableau 7) dans la mesure où il fait apparaître toutes les lignées mais il est tout de même surprenant qu'il n'y ait pas de classe "cellules non identifiées," étant donné la fragilité des cellules médullaires et les nombreuses ressemblances morphologiques décrites précédemment.

Enfin en annexe sont présentés les résultats obtenus par Criswell [36] sur des rats Wistar par cytométrie en flux en comparaison avec la méthode manuelle traditionnelle (annexe 4).

Tableau 7.

Formule du myélogramme de rats Sprague-Dawley normaux mâles et femelles de 4 et 12 mois ainsi que de femelles gravides au 21^{ème} jour de gestation. D'après Valli [142].

Age	4 mois		1 an		femelle
Sexe	mâle	femelle	mâle	femelle	gravide
Nombre	12	13	10	10	10
<i>Pourcentages cellulaires</i>					
Erythroblastes	0.2	0.7	0.3	0.5	0.4
Erythroblastes basophiles	6.9	7.9	8	5.8	8.2
Erythroblastes polychromatophiles	15.2	17	14.3	15.2	20.7
Erythroblastes acidophiles	15.4	14.5	13.2	14.8	9.2
Myéloblastes	0.6	0.2	1	0.9	0.3
Promyélocytes	3.4	1.5	2	1.9	2
Myélocytes	4.5	3.8	4.4	6	7
Métamyélocytes	9.5	7.7	6.8	8.5	9.9
Band cells	17.6	17.1	14.8	10.9	14.4
Neutrophiles segmentés	5.3	4.6	11.9	9.9	9
Eosinophiles	3.4	5.4	2.7	3.2	2.5
Lymphocytes et monocytes	14.8	14.2	18.7	20.4	15.1
Plasmocytes	0.3	0.5	0.4	0.5	0.9
Cellules non identifiées	3	4.8	0.4	0.5	0.3

Les valeurs indiquées sont les moyennes établies sur chaque échantillon après examen de 500 cellules du frottis médullaire de chaque individu.

Tableau 8.

Indices de maturation des lignées érythroï des et myéloï des et rapport M/E calculés chez des rats Sprague-Dawley mâles et femelles d'âges différents. D'après Valli [142].

Age	2 mois		4 mois		1 an		femelle
Sexe	mâle	femelle	mâle	femelle	mâle	femelle	gravide
Nombre	0	0	12	13	10	10	10
% Cellules myéloï des immatures			8.5	5.5	7.4	8.8	9.3
% Cellules myéloï des en maturation			32.4	29.4	33.4	29.3	33.3
<i>Indice de maturation</i>			<i>0.27</i>	<i>0.21</i>	<i>0.21</i>	<i>0.28</i>	<i>0.26</i>
% Cellules érythroï des immatures			7.1	8.6	8.3	6.3	8.6
% Cellules érythroï des en maturation			30.6	31.5	28.2	20	29.9
<i>Indice de maturation</i>			<i>0.24</i>	<i>0.28</i>	<i>0.3</i>	<i>0.22</i>	<i>0.3</i>
Nombre	9	10	81	63	20	18	68
<i>Rapport M/E</i>	<i>1.2</i>	<i>1.3</i>	<i>1.1</i>	<i>1.17</i>	<i>1.22</i>	<i>1.06</i>	<i>1.28</i>

Les pourcentage de cellules immatures et de cellules en maturation sont calculés d'après les résultats du tableau 7. Les indices de maturation en italique sont calculés d'après les valeurs des pourcentages cellulaires pour chaque tranche d'âge. Enfin les rapports M/E en italiques sont des valeurs moyennes obtenues sur d'autres échantillons.

Tableau 9.

Numérations absolues et relatives (pourcentages) du myélogramme huméral de rats mâles Lewis âgés de 8 à 12 semaines. D'après Ulich et Del Castillo [141].

Catégories de cellules	Nombre.10 ⁶ /humérus	Pourcentage
Erythroï des		31
Proérythroblastes	0.47 (0.29)	0.8 (0.47)
Erythroblaste basophile	0.95 (0.41)	1.6 (0.69)
Erythroblaste polychromatophile	6.02 (1.41)	10.09 (0.29)
Erythroblaste acidophile	11.57 (2.29)	18.96 (4.05)
Myéloï des		41
Myéloblastes	1.45 (0.45)	2.44 (0.68)
Promyélocytes	0.92 (0.27)	1.52 (0.41)
Myélocytes	4.98 (1.04)	8.02 (1.74)
Métamyélocytes	2.21 (0.61)	3.7 (0.88)
Band-cell	2.04 (0.57)	3.42 (0.8)
Neutrophiles segmentés	11.01 (1.8)	18.57 (2.21)
Eosinophiles	1.96 (0.66)	3.22 (1.09)
Basophiles	0 (0)	0 (0)
Lymphoï des		20
Lymphocytes	11.3 (0.31)	18.8 (1.96)
Plasmocytes	0.81 (0.53)	1.36 (0.91)
Mégacaryocytes	0.4 (0.23)	0.66 (0.4)
Monocytes	1.2 (0.48)	2.03 (0.85)
Mastocytes	0.92 (0.6)	1.53 (0.96)
Histiocytes	1.52 (0.72)	2.55 (1.13)
Nombre total de cellules nucléées	59.74 (8.03)	

Commentaire.

Les valeurs correspondent aux moyennes et aux écarts-types (entre parenthèses) calculés sur un échantillon de 50 animaux.

Calculé d'après les données ci-dessus le rapport M/E est de 1,3 et les indices de maturation sont respectivement pour les lignées érythroïdes et myéloïdes de 0,08 et 0,47.

Dans les trois tableaux précédents, la nomenclature et la classification des cellules de la lignée rouge sont les mêmes que décrites précédemment mais ne correspondent pas toujours aux nomenclatures originales utilisées par les auteurs des publications citées, dont certaines classes ont été regroupées délibérément afin de respecter la classification actuelle.

3.3.3. Particularités du rat [1; 66; 72; 73; 141; 142]

Au vu des différentes données bibliographiques, le myélogramme physiologique du rat adulte se décompose pour les trois grandes lignées de la manière suivante:

- 25 à 40% de cellules érythroïdes
- 35 à 50% de cellules myéloïdes
- 8 à 25% de cellules lymphoïdes

En comparaison avec le myélogramme humain ou canin, on remarque notamment une lignée lymphoïde plus importante surtout par rapport au chien et une population myéloïde légèrement inférieure à ces deux espèces. Parmi la population lymphoïde les plasmocytes représentent environ 1% de l'ensemble de la population cellulaire médullaire [66].

Les mastocytes sont présents dans les mêmes proportions que les plasmocytes mais leur population augmente lors d'inflammations sévères [66].

Les mégacaryocytes représentent entre 0,6% et 1% des cellules du myélogramme [141; 36].

Le rapport M/E paraît relativement constant pour les adultes, dans les études les plus récentes. Il est compris entre 1,1 et 1,3 et est similaire à celui du chien.

Quant aux indices de maturation, ils sont plutôt intéressants lors d'atteinte pathologique ou toxicologique de la moelle, avec des cellularités augmentées ou diminuées, donc une phase de prolifération stimulée ou réduite, afin d'objectiver la phase de maturation normale ou asynchrone. Mais il ne faut pas se limiter aux valeurs chiffrées car il est aussi important d'examiner l'aspect de la pyramide de maturation (ou courbe de maturation) dans son ensemble ainsi que la morphologie des cellules.

Dans des conditions normales, pour les lignées rouges et blanches, la pyramide a un aspect classique chez le rat avec, placées au sommet car peu nombreuses, les cellules blastiques immatures et à sa base, en proportion majoritaire, les cellules les plus différenciées. Les indices de maturation des deux lignées se situent entre 0,2 et 0,3 d'après Valli et al [142].

3.4. Variations physiologiques et principaux facteurs de variation

Les trois principaux facteurs de variation physiologiques influençant la cellularité globale médullaire et la formule du myélogramme sont le sexe, l'âge et le lieu de prélèvement.

3.4.1. Sexe [33; 37; 108; 142]

Plusieurs auteurs [33; 108] ont observé une tendance chez les femelles à avoir une cellularité hématopoïétique inférieure à celle des mâles.

Cependant, d'après Palm et al. [108], le nombre total de cellules nucléées varie en fonction du poids et s'il apparaît des différences liées au sexe sur le comptage de cellules par fémur, c'est explicable par la différence de poids. En effet, les femelles ont un nombre inférieur de cellules par fémur par rapport aux mâles (autour de $80 \cdot 10^6$ cellules pour les femelles et supérieur à $110 \cdot 10^6$ cellules pour les mâles) et leur poids est également inférieur. Il n'y a pas de différence significative entre les deux sexes, lorsque l'on considère le nombre de cellules par rapport au poids vif qui est situé entre 30 et $40 \cdot 10^6$ cellules nucléées de la moelle du fémur pour 100g de poids vif. (cf. tableau 6).

Il existe certainement aussi des variations liées au sexe pour les numérations absolues des différentes catégories de cellules, c'est-à-dire du myélogramme, puisque sont décrites des variations de la cellularité globale. Cependant, les modifications éventuelles des pourcentages cellulaires du myélogramme en fonction du sexe sont très peu documentées. Seuls les articles de Valli [142] et Criswell [37] présentent des résultats obtenus sur des populations de sexes opposés pour les mêmes tranches d'âge, mais aucune étude statistique n'a été réalisée mettant en évidence des écarts significatifs.

3.4.2. Age [33; 45; 108; 142]

3.4.2.1. Cellularité [33; 108; 142]

Les jeunes rats de 2 mois ont la cellularité la plus élevée, quelque soit l'os examiné: leur espace médullaire renferme environ 80% de cellules hématopoïétiques et le nombre total de cellules nucléées par fémur, rapporté au poids vif, est significativement supérieur à celui d'animaux plus âgés.

De 4 à 16 mois, le rapport entre l'espace occupé par les cellules hématopoïétiques et celui occupé par les cellules adipeuses reste relativement constant, compris entre 60 et 67%.

A deux ans, la cellularité semble augmenter à nouveau, tout en restant inférieure aux valeurs rencontrées chez les jeunes animaux. Il existe néanmoins une très grande variabilité individuelle qui peut être imputée aux effets de maladies, traumatismes ou troubles endocriniens plus fréquents chez les vieux sujets.

3.4.2.2. Myélogramme [31; 45; 142]

Les plus grandes variations du myélogramme en fonction de l'âge se situent juste après le sevrage. Jusqu'à un mois environ la moelle est majoritairement érythropoïétique. Puis entre un et deux mois d'âge, la population prédominante est désormais la lignée myéloïde [45]. Ensuite, comme le montre les tableaux 7 et 8, il n'y a pas de gros écarts entre les différentes périodes.

3.4.3. Lieu de prélèvement [33]

Tous les os n'ont pas la même cellularité hématopoïétique (cf tableau 7) mais les os qui sont les plus fréquemment utilisés pour examiner le suc médullaire ont une cellularité équivalente: il s'agit du fémur, du sternum, de l'humérus et des côtes. Les deux principaux sites recommandés pour les études de toxicité sont le fémur et le sternum car ils autorisent des prélèvements relativement aisés et de bonne qualité.

On remarque par ailleurs que certains os comme le radius, l'ulna ou la portion distale du tibia ne renferment presque pas de cellules hématopoïétiques, ce qui s'expliquerait par une production hématopoïétique suffisante par les autres sites chez l'adulte, sans avoir à faire appel à des sites plus distaux.

D'autre part, lorsqu'on ne prélève qu'une petite portion de moelle, par aspiration ou par cytobrosse, un seul échantillon n'est pas toujours représentatif, il faut donc réaliser plusieurs prélèvements.

Conclusion.

Même s'il existe peu d'études précises et récentes sur les facteurs de variation physiologiques du myélogramme, là encore, comme pour l'hémogramme, les résultats révèlent une grande variabilité physiologique. Outre le sexe, l'âge et le lieu de ponction, il existe certainement aussi d'autres facteurs de variations comme la souche ou la lignée [141]. Afin d'établir une interprétation correcte de l'examen de la moelle et des autres organes hématopoïétiques dans le cadre d'études toxicologiques ou de mécanismes pathologiques, il est tout aussi indispensable de se référer aux résultats obtenus sur des lots d'animaux témoins.

D'autre part, s'il est facile d'identifier et de recenser les cellules sanguines pour établir l'hémogramme, de manière manuelle ou automatisée, il est beaucoup plus difficile d'identifier précisément toutes les cellules d'un frottis médullaire. La formule du myélogramme est par conséquent plus difficile à établir et dépend beaucoup du technicien qui la réalise. C'est pourquoi l'utilisation d'automates qui se basent sur la cytométrie en flux [37], pour dénombrer les grandes catégories cellulaires, permettra peut-être dans l'avenir de limiter ce facteur subjectif. Cependant elle ne dispensera pas d'un examen qualitatif du frottis médullaire, car l'appréciation morphologique des cellules est une étape essentielle et déterminante de toute étude hématologique.

4. Variations sanguines et hématopoïétiques pathologiques, spontanées et induites

4.1. Une mutation: le rat b/b de Belgrade [20; 51;109; 113; 122; 132]

4.1.1. Présentation [51; 113; 122]

Le rat b/b de Belgrade est une souche dérivée du Wistar, qui présente une mutation radio-induite autosomique récessive qui entraîne chez les sujets homozygotes un syndrome anémique sévère résultant d'une déficience intracellulaire de la lignée rouge en fer. De plus, les sujets homozygotes sont caractérisés par une taille et un poids très inférieurs par rapport aux sujets hétérozygotes (b/+) ou "normaux"(+/+) de la même lignée : ainsi le poids moyen d'un rat b/b correspond au tiers du poids moyen d'un rat +/+ ou hétérozygote.

Deux mécanismes à l'origine de cette déficience intracellulaire en fer ont déjà été mis en évidence. Il existe d'une part un défaut d'absorption intestinale du fer et d'autre part un défaut de transport intracellulaire du fer. Ce défaut est dû à une mutation précise d'un gène codant pour une protéine de transport du fer, la Nramp2 [51].

Ce syndrome ressemble aux anémies par carence en fer (cf. paragraphe correspondant) ou aux thalassémies décrites chez l'homme et son étude peut permettre de développer des traitements chez l'homme.

4.1.2. Particularités hématologiques sanguines

Les principales caractéristiques de l'anémie du rat de Belgrade sont une hypochromie, une microcytose et une réticulocytose marquée, associées à une poï kilocytose.

L'anémie est sévère. La concentration en hémoglobine est très faible surtout chez les jeunes (parfois inférieure à 3g/dl) et se situe autour de 6g/dl chez les adultes. La numération érythrocytaire est aussi très faible (environ $3.10^{12}/l$) et représente la moitié de la numération érythrocytaire des animaux +/+ quel que soit l'âge des animaux. En revanche, le pourcentage de réticulocytes est considérablement élevé avec un taux supérieur à 30% chez les adultes [113]. Les autres caractéristiques sanguines sont une concentration plasmatique en fer très élevée ainsi qu'une forte capacité de fixation du fer aux protéines plasmatiques et une saturation élevée, ce qui confirme que la déficience intracellulaire des globules rouges et réticulocytes en fer serait due à une anomalie de transport inter-membranaire du fer [20] puisque le fer présent dans le sang et fixé sur la transferrine ne parvient pas à pénétrer dans les cellules. On observe également une légère thrombocytopénie et une leucocytose essentiellement liée à une lymphocytose car le nombre de neutrophiles est similaire à celui des sujets normaux [132].

Les rats hétérozygotes (b/+) présentent une morphologie normale et leurs valeurs hématologiques sont similaires à celles des rats normaux, excepté chez les jeunes où on observe une réticulocytose plus importante mais très inférieure à celle de jeunes rats b/b.

L'anémie des sujets b/b semble être améliorée par l'administration quotidienne d'un complexe fer dextran mais leurs paramètres hématologiques ne retournent pas à des valeurs physiologiques. En effet, les rats traités par le fer ont une numération érythrocytaire plus élevée et une concentration en hémoglobine située autour de 11g/dl, ce qui est bien supérieur aux

concentrations des rats b/b, mais qui reste significativement plus faible que chez les rats +/- . De plus, les anomalies morphologiques des hématies demeurent, malgré l'apport de fer.

4.1.3. Particularités hématopoï étiques

Si les modifications de l'hémogramme du rat de Belgrade touchent essentiellement les paramètres érythrocytaires, l'examen des organes hématopoï étiques révèle aussi des anomalies sur les autres lignées.

La cellularité médullaire totale des rats b/b anémiés est très faible puisqu'elle représente environ le tiers du nombre total de cellules nucléées par fémur des animaux hétérozygotes ou normaux [109]. Cependant ces différences peuvent aisément s'expliquer car elles sont certainement liées aux fortes différences de poids entre les sujets homozygotes et les autres [132]. D'un autre côté, le nombre total de cellules spléniques est à peu près le même pour les rats anémiques et normaux, ce qui, rapporté au poids vif, correspond à plus de 3 fois plus de cellules nucléées spléniques pour les rats b/b.

La lignée rouge est prédominante dans la moelle de rats b/b avec un rapport M/E inférieur à 0,5. Le nombre élevé de cellules érythroï des en maturation par rapport aux cellules immatures serait dû à un allongement du temps de maturation. L'activité érythropoï étique extramédullaire splénique est également plus élevée chez les sujets anémiques. Les études réalisées sur les cellules progénitrices de la lignée rouge tendent à montrer que les symptômes du rat b/b ne sont pas seulement la conséquence d'une anomalie de synthèse de l'hémoglobine par manque de fer intracellulaire mais qu'il existe aussi des altérations du stade de prolifération des cellules souches érythroï des [109].

La granulopoï èse du rat de Belgrade est, elle aussi, perturbée de même que la mégacaryopoï èse [132]. La granulopoï èse des sujets b/b est fortement diminuée dans la moelle, et spécialement les pourcentages de métamyélocytes et de granulocytes ainsi que le nombre de cellules en mitose, ce qui semble indiquer une réduction de l'activité proliférative de la lignée myéloï de, tandis qu'au contraire, le nombre de cellules myéloï des dans la rate est plus élevé que celui des sujets non anémiques. La rate joue donc un rôle régulateur et compensateur en développant la granulopoï èse. Quant au nombre de mégacaryocytes de la moelle des rats anémiques, il est diminué de moitié par rapport aux rats normaux et leur taille est plus importante, ce qui révèle un trouble de la thrombocytopoï èse.

Ces altérations de la fonction hématopoï étique sont encore souvent étudiées, et plus particulièrement les premiers stades - c'est-à-dire les cellules souches et colonies formant unité (CFU) des différentes lignées - afin de déterminer les mécanismes précis à l'origine des symptômes.

4.2. Régimes alimentaires particuliers : surcharges ou carences

Les trois exemples suivants illustrent les variations hématologiques du rat soumis à un de ces régimes particuliers qui sont connus pour avoir des effets sur d'autres espèces animales.

4.2.1. Excès de cholestérol [3; 66]

Chez de nombreuses espèces dont le chien et certains rongeurs comme le lapin ou le cobaye, il a été montré qu'une hypercholestérolémie persistante, engendrée et entretenue par un régime alimentaire enrichi en cholestérol provoquait une anémie hémolytique. Chez le rat, en revanche, très peu d'études ont été réalisées à ce propos, car il est très difficile d'induire une hypercholestérolémie par une simple augmentation du pourcentage de cholestérol dans la ration. En effet, un régime hypercholestérolémiant pour le rat nécessite non seulement un apport accru de cholestérol mais aussi de graisses saturées, d'acide cholique et de substances antithyroïdiennes.

Un tel régime entraîne déjà au bout d'une semaine une concentration en cholestérol sérique, plus de 5 fois supérieure à la concentration sérique mesurée sur des animaux témoins, qui se maintient autour de ces valeurs tant que le régime est poursuivi.

Dès deux semaines de régime apparaissent les premiers signes d'une microcytose avec d'abord une simple diminution de l'hématocrite. Puis l'anémie va se développer graduellement en quelques semaines avec, au bout d'un mois et demi, une réduction légère mais significative de la concentration en hémoglobine et du nombre total de globules rouges. Cette anémie se caractérise par une microcytose donc une diminution du VGM, une augmentation de la résistance osmotique des hématies mais peu de modifications morphologiques si ce n'est l'identification de cellules cibles et quelques acanthocytes sur les frottis. Le taux de réticulocytes demeure inchangé bien que la durée de vie des érythrocytes diminue sensiblement, parallèlement à une augmentation du volume splénique. Cette splénomégalie s'accompagne, en outre, de nombreux dépôts d'hémosidérine dans cet organe. Dans la moelle, le rapport M/E est sensiblement diminué et se situe autour de 0,8 ce qui révèle une augmentation de la lignée érythroïde puisque la lignée blanche et le nombre de leucocytes sanguins ne sont pas modifiés.

Le mécanisme étiopathogénique précis de cette anémie n'est pas encore élucidé mais plusieurs auteurs envisagent une augmentation de la surface et de la rigidité de la membrane érythrocytaire par incorporation excessive de cholestérol au sein de cette membrane, ce qui diminuerait les capacités rhéologiques des hématies qui seraient alors plus facilement capturées par la rate.

Le rat présente donc des réactions hématologiques particulières, en réaction à un régime hypercholestérolémiant, puisqu'on observe chez cette espèce une anémie peu sévère plutôt microcytaire, tandis que chez le chien ou d'autres rongeurs il s'agit d'une anémie hémolytique, macrocytaire.

4.2.2. Carence en fer [76; 116]

Le fer est un élément essentiel de l'érythropoïèse puisqu'il est nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine mais il joue aussi un rôle dans la phase de prolifération cellulaire. La carence en fer ou anémie ferriprive est d'ailleurs une entité pathologique reconnue chez de nombreuses espèces. Toutefois, le rat et la souris ont fait l'objet du plus grand nombre d'études sur le développement de cette anomalie et le rat a été utilisé comme modèle de la carence en fer.

Cette carence peut être induite de deux façons, soit par un régime alimentaire très pauvre en fer, soit par saignées. La deuxième méthode est plus compliquée car elle nécessite de compenser les pertes sanguines si on ne souhaite vraiment étudier que les effets de la seule déficience en fer. C'est donc la méthode de restriction d'apport qui est la plus couramment utilisée et très souvent sur de jeunes rats, dès le sevrage, étant donné que leurs besoins en fer sont plus importants à cet âge. Le temps de développement de la maladie dépend de la teneur en fer du régime alimentaire. Habituellement, quatre à six semaines d'un régime contenant moins de 10 mg/kg de fer sont nécessaires pour engendrer les signes cliniques et l'anémie ferriprive, sachant qu'une alimentation traditionnelle contient plus de 300 mg/kg de fer.

Les principaux signes cliniques associés sont des yeux oedémateux, une chute de poils ou un poil terne peu entretenu, et une pâleur des muqueuses et des organes viscéraux à l'autopsie. L'anémie observée est particulièrement sévère avec une concentration en hémoglobine inférieure à 7 g/dl et un hémocrite situé autour de 15%. Cette anémie ferriprive, microcytaire et hypochrome est aussi caractérisée par une diminution de la concentration sérique en fer et une augmentation de la capacité totale de fixation du fer. L'érythropoïèse médullaire et splénique est activée. Le nombre total d'érythroblastes de la moelle de rats carencés en fer est 1,7 fois supérieur à celui d'animaux témoins nourris normalement. Néanmoins l'érythropoïèse ne se déroule pas parfaitement car le nombre de progéniteurs (CFU-E) est bien supérieur à celui du nombre d'érythroblastes puisqu'il représente 3,5 fois le nombre de progéniteurs des animaux témoins, ce qui semble indiquer une mortalité cellulaire lors des premiers stades de maturation des érythroblastes[76]. En revanche il n'existe pas de variation quantitative des autres lignées.

Une expérimentation récente sur l'anémie ferriprive induite de deux manières différentes (régime carencé en fer ou série de prélèvements sanguins) montre que les caractéristiques générales de cette anémie sont les mêmes quelque soit la méthode d'induction; cependant elle n'est pas régénérative (peu de réticulocytes et hypoplasie médullaire avec un rapport M/E augmenté) et s'accompagne d'une thrombocytose chez les animaux carencés en fer à l'inverse de ce que l'on observe chez les sujets saignés (réticulocytose, hyperplasie médullaire). (BURCHARD et al- Evaluation of the erythroid regenerative response in two different models of experimentally induced iron deficiency anemia- *Vet Clin Pathol* 2001,30,76-85)

4.2.3. Carence en cuivre [21]

L'anémie liée à une carence, sévère ou prolongée, en cuivre est un trouble décrit chez la plupart des espèces domestiques ou de laboratoire. Néanmoins, les caractéristiques de cette anémie sont très variables d'une espèce à l'autre.

On peut ainsi observer une anémie chez les rats nourris pendant plusieurs semaines avec une alimentation très pauvre en cuivre et à fortiori chez des jeunes rats dont les mères ont elles-même reçu ce régime carencé. Cette anémie peu sévère microcytaire et hypochrome se développe au bout de trois semaines de régime carencé et s'accompagne d'une poikilocytose importante, essentiellement due à la présence d'acanthocytes, de leptocytes et de stomatocytes sur le frottis sanguin. L'anémie est généralement minimale. La concentration en hémoglobine ne descend pas en dessous de 10 g/dl, l'hémocrite reste supérieur à 30% et la numération érythrocytaire baisse très légèrement, pas toujours de manière significative. Cette anémie est toutefois plus marquée chez les rats carencés en cuivre issus de mères également soumises à ce régime, puisque leur concentration en hémoglobine est inférieure à 8g/dl et leur hémocrite inférieur à 30%.

D'autre part, lorsque le régime alimentaire est aussi carencé en sélénium, l'anémie prend alors un caractère normochrome et normocytaire avec les mêmes modifications

morphologiques érythrocytaires si ce n'est, en plus, la présence éventuelle de corps de Howell-Jolly et d'érythroblastes circulants.

Même si ces deux éléments, le cuivre et le sélénium, interviennent tous deux dans les systèmes enzymatiques anti-oxydants, un défaut d'apport concomitant n'aggrave en rien les effets de la simple carence en cuivre. D'ailleurs un défaut d'apport en sélénium seul ne provoque aucune anémie chez le rat alors qu'une telle anémie est décrite chez d'autres espèces comme les bovins.

Il existe encore d'autres exemples de carences entraînant des perturbations hématologiques parmi lesquelles on peut citer les carences en acide folique ou en vitamine B12 qui provoquent chez le rat une anémie macrocytaire [127]. La carence en vitamine B12 à l'origine d'une anémie qualifiée de mégaloblastique est connue chez de nombreuses espèces et notamment chez l'homme puisqu'elle est responsable de l'"anémie pernicieuse". Elle est toutefois moins documentée chez le rat que chez la souris et chez l'homme.

4.3. Pathologie d'altitude: le mal chronique des montagnes [7; 41; 86; 105; 120]

4.3.1. Perturbations physiologiques et hématologiques liées à l'altitude [41; 105; 120]

Plus on monte en altitude, plus la pression de l'oxygène dans l'air inspiré diminue. A une altitude de 500 mètres, la pression en oxygène est déjà diminuée de moitié par rapport à celle observée en plaine ou au niveau de la mer.

L'hypoxie ressentie alors par un organisme humain ou murin engendre, dans un premier temps, des réactions physiologiques d'accommodation, si l'exposition est brève, afin d'assurer un apport suffisant d'oxygène aux cellules. Ces réactions sont principalement une augmentation des fréquences respiratoires et cardiaques, et provoquent, selon les sujets, des effets transitoires plus ou moins graves, caractéristiques du mal aigu des montagnes chez l'homme. Chez le rat, lors d'hypoxie non prolongée ou intermittente, c'est-à-dire par exemple lors d'une exposition une heure par jour en milieu hypoxique [86], on observe simplement une augmentation de la concentration en hémoglobine sous l'effet d'une contraction de la rate afin d'améliorer la distribution de l'oxygène aux différents tissus de l'organisme. Cette augmentation est réversible car la concentration en hémoglobine retrouve sa valeur initiale de base dès l'arrêt de l'exposition, et elle ne s'accompagne pas de polyglobulie.

Si l'exposition se prolonge, l'hypoxie devient alors chronique et entraîne des perturbations ventilatoires et hématologiques. Ces modifications sont essentiellement une hypertension pulmonaire et une augmentation de la production de globules rouges, c'est-à-dire une polycythémie (ou polyglobulie), qui permet ainsi d'accroître la capacité de transport de l'oxygène dans le sang. Il s'agit normalement d'une phase transitoire d'acclimatation qui doit conduire à un état acclimaté, une fois ces processus stabilisés.

Toutefois, on a découvert chez l'homme, depuis 1926, que certains individus sont beaucoup plus sensibles à l'hypoxie en altitude et présentent une hypoxémie marquée, associée à des perturbations cardiorespiratoires et hématologiques exagérées, responsable d'un

syndrome appelé Mal Chronique de Montagnes ou CMS en anglais (Chronic Mountain Sickness).

Chez le rat [41; 105], on a identifié deux sous-souches de Sprague-Dawley, le Hilltop (H) et le Madison (M), qui présentent des réponses hématologiques et cardiorespiratoires bien différentes en milieu hypoxique, c'est-à-dire plus précisément lorsqu'elles sont placées dans un milieu simulant une altitude de 5000 mètres. Après une exposition chronique en milieu hypoxique, les rats H développent une polycythémie sévère ainsi qu'une hypervolémie, une hypoxémie marquée et une forte hypertension pulmonaire ainsi qu'un taux de mortalité élevé. Cette maladaptation à l'altitude du rat Hilltop est similaire par de nombreux aspects au CMS décrit chez l'homme. En revanche, les rats Madison qui présentent les mêmes caractéristiques physiologiques que les rats Hilltop, lorsqu'ils sont tous deux situés au niveau de la mer, présentent en altitude des changements hématologiques et cardiorespiratoires plus modérés avec un taux de mortalité tout à fait négligeable.

4.3.2. Particularités hématologiques lors de CMS chez le rat [41; 105]

Ou L.C. et ses collaborateurs [105] ont étudié les différentes variations hématologiques et ventilatoires chez ces deux souches de rats H et M pendant 50 jours d'hypoxie chronique provoquée par une exposition simulée à une altitude de 5000 mètres.

4.3.2.1. Paramètres sanguins

La polyglobulie est beaucoup plus sévère chez les rats H. De même, le pourcentage de réticulocytes double dès le début de l'exposition puis diminue progressivement tout au long de cette période, en restant néanmoins toujours supérieur aux valeurs initiales mesurées au niveau de la mer. La réticulocytose est également présente chez les rats M mais ce n'est qu'un phénomène transitoire puisque le pourcentage retourne aux valeurs initiales dès le quatorzième jour.

L'hématocrite augmente régulièrement pendant les 50 jours pour les deux souches sans différence significative au début. Ceci s'explique en partie du fait que le volume sanguin augmente en même temps que le nombre de globules rouges. Ce paramètre sous-estime donc un peu la réponse érythropoïétique.

Chez ces deux espèces, l'hypoxie induit aussi une thrombopénie qui est plus accentuée chez la souche Hilltop.

Enfin la numération leucocytaire ne présente pas de variations particulières, comme on l'observe chez l'homme, puisqu'il n'y a pas d'atteinte de la granulopoïèse.

4.3.2.2. Organes hématopoïétiques

L'activité érythropoïétique est appréciée par la détermination du nombre de cellules érythroïdes nucléées médullaires et spléniques pour 100 grammes de poids vif, c'est-à-dire le nombre total de cellules de la lignée rouge exceptés les hématies et les réticulocytes.

Le nombre de cellules rouges nucléées de la moelle augmente dès le début de l'hypoxie chez les deux souches. Les numérations de la souche Hilltop demeurent toutefois toujours plus élevées que celles de la souche Madison et elles ne reviennent aux valeurs initiales qu'au bout de 50 jours tandis que celles des rats M se normalisent dès le quatorzième jour.

Dans la rate, le nombre total de cellules érythroïdes nucléées augmente de manière beaucoup plus importante et continue chez les rats H. En outre, pour cette souche, ce nombre

représente jusqu'à plus de 50% du nombre de cellules rouges nucléées médullaires au cours de la période d'hypoxie, alors qu'au départ il n'atteint que 2% de la quantité de cellules rouges nucléées médullaires lorsque les animaux vivent au niveau de la mer.

L'activité érythropoï étique exagérée chez les rats Hilltop ne se manifeste pas seulement par des numérations absolues plus élevées, mais elle reste aussi développée tout au long de la période d'hypoxie, alors que cette activité augmente de manière plus faible et surtout transitoire chez les rats Madison. De plus, cette étude révèle l'importance du rôle joué par la rate lors de cette réponse érythropoï étique excessive à l'hypoxie.

Remarque.

Le milieu de vie peut donc avoir une influence sur les paramètres hématologiques des animaux. Désormais on ne s'intéresse pas seulement aux milieux de vie terrestres [121; 140] et de nombreuses études se penchent sur les variations hématologiques du rat dans l'espace, lors de vols spatiaux [7].

4.4. Maladies spontanées

Dans ce paragraphe sont présentés quelques exemples de maladies sanguines spontanées: une maladie infectieuse et deux leucémies dont la leucémie à grands lymphocytes granuleux qui est une entité tout à fait originale. Il existe beaucoup d'autres tumeurs du système hématopoï étique décrites chez le rat mais on a volontairement choisi les deux leucémies les plus fréquentes dont l'une présente des particularités spécifiques au rat. Parmi les autres types de tumeurs hématopoï étiques, on peut citer les lymphomes malins et plasmocytomes, les thymomes, les mastocytomes, les sarcomes histiocytaires, les érythroleucémies ou d'autres désordres myéloprolifératifs. Si les lymphomes ou lymphosarcomes, sont assez communs les plasmocytomes et mastocytomes sont extrêmement rares et les érythroleucémies par exemple n'ont jamais été décrites en tant que pathologie spontanée [1; 64; 130; 155].

4.4.1. *Hemobartonella muris* [12; 44; 52; 80]

Hemobartonella muris est un agent infectieux sanguin extracellulaire de l'ordre des Rickettsiales qui est transmis au rat par des insectes piqueurs. Dans de bonnes conditions d'élevage, on ne doit plus rencontrer cette infection parce que, sous forme latente ou active, elle peut biaiser les résultats d'expérimentations.

Ces organismes en forme de coque et de couleur violacée au May-Grünwald-Giemsa, mesurent de 0,2 à 0,7 μm de diamètre et sont présents à la surface des hématies, parfois agglomérés entre eux ou formant des chaînettes. Leur identification sur un frottis sanguin n'est pas toujours évidente du fait de leur petite taille et de leur ressemblance avec des inclusions intracellulaires comme les corps de Howell-Jolly par exemple. Il est très rare d'observer des formes libres dans le plasma.

Il s'agit le plus souvent d'une infection latente. Elle peut toutefois se développer chez des sujets, stressés ou affaiblis, qui présentent déjà une affection intercurrente, tumorale fréquemment, ou bien chez des animaux splénectomisés. On remarque chez les rats infectés une splénomégalie ainsi qu'une anémie de type hémolytique caractérisée par une diminution de la concentration en hémoglobine et de l'hématocrite, une réticulocytose et une hémoglobinurie.

L'anémie est le seul symptôme observé chez les rats splénectomisés qui sont atteints de manière plus sévère. Ce sont, en effet, les sujets les plus sensibles à cette infection qui est alors souvent mortelle.

L'anémie observée est non seulement due à la destruction des hématies par les hémobartonelles mais aussi à une hyperphagocytose érythrocytaire.

Cette infection n'est pas une particularité du rat puisqu'elle touche de nombreuses espèces animales mais elle a eu une grande importance en recherche expérimentale par le passé et a contribué à améliorer la prévention contre les ectoparasites en élevage de laboratoire.

4.4.2. Leucémie à grands lymphocytes granuleux (leucémie à mononucléaires) [2; 66; 84; 93; 131; 133; 134; 135; 136]

- Incidence

La leucémie à grands lymphocytes granuleux, anciennement appelée leucémie à mononucléaires, est une entité pathologique tout à fait singulière qui atteint de manière spontanée plusieurs souches de rats âgés.

Elle a été mise en évidence pour la première fois en 1969 sur un rat de souche Wistar Furth, souche créée par Furth à partir du stock Wistar, qui souhaitait développer une souche présentant une incidence élevée de leucémies. Cette affection touche le rat Wistar Furth avec une incidence moyenne de 20%, mais elle a surtout été décrite chez le Fisher rat qu'elle atteint avec une incidence de 20,5 à 24,4% selon les auteurs [2; 133]. Elle a également été observée avec des incidences beaucoup plus faibles chez le Wistar (2%) et le Sprague-Dawley (0,03%). En revanche, il n'y a aucune variation de l'incidence ou de la sévérité de la maladie en fonction du sexe. Cette maladie ne touche que des animaux âgés de 14 à 30 mois [93].

L'étiologie de cette leucémie ainsi que la sensibilité particulière du Fisher rat restent encore inexplicables, bien qu'on suspecte une origine génétique du fait que seul le rat Wistar Furth présente une incidence aussi élevée. Cependant l'incidence de la maladie n'est pas augmentée chez les descendants issus de multiples croisements consanguins [93].

- Caractéristiques cliniques et pathologiques

Cliniquement, chez les sujets atteints, cette maladie se traduit par un abattement, des difficultés locomotrices, une respiration rapide et surtout une splénomégalie majeure associée à une pâleur des muqueuses parfois accompagnée d'un ictère. L'évolution, toujours fatale, s'étend sur quelques semaines.

A l'autopsie on constate systématiquement que la rate, énorme, est congestionnée, très friable et complètement envahie par les cellules cancéreuses. Tous les organes fortement vascularisés peuvent aussi être infiltrés, notamment le foie, dans 98% des cas, et les poumons, dans 66% des cas [135]. La moelle osseuse et les nœuds lymphatiques mésentériques ne sont souvent infiltrés qu'à partir d'un stade avancé de la maladie.

Le point de départ de cette leucémie paraît bien être la rate, ce qui en fait toute son originalité. Des études ont montré chez le Fisher rat, que son incidence était fortement diminuée chez les animaux ayant été splénectomisés à l'âge d'un mois (incidence de 2% seulement [135]) ou ayant été irradiés au même âge.

Les cellules tumorales disséminées ensuite, à partir de la rate, dans la circulation sanguine, peuvent alors coloniser d'autres organes.

Les cellules tumorales, anciennement appelées mononucléaires lorsque leur nature exacte était mal définie, semblent être, morphologiquement, histochimiquement et immunologiquement, identiques aux grands lymphocytes granuleux présents à l'état physiologique, en faible quantité, sur les frottis sanguins du rat. Néanmoins, l'origine exacte de cette cellule n'est pas certaine puisqu'elle présente à la fois des caractéristiques des lymphocytes T mais aussi des macrophages [66].

Morphologiquement, ce sont des cellules de 10 à 20 μm de diamètre qui possèdent un noyau souvent excentré, de forme ronde ou ovale, avec des contours irréguliers. Ce noyau est même parfois indenté et contient un ou deux nucléoles. Le cytoplasme bleu pâle est plutôt abondant. Il renferme des granulations azurophiles qui peuvent varier en nombre et en taille et occasionnellement quelques vacuoles cytoplasmiques contenant des particules éosinophiles. On observe aussi, souvent, sur les frottis sanguins ou médullaires, des images d'érythrophagocytose c'est-à-dire la présence d'hématies phagocytées dans le cytoplasme de ces cellules leucémiques.

- Caractéristiques hématologiques et hématopoï étiques

Outre la présence presque systématique de cellules tumorales dans le sang, cette leucémie s'accompagne d'autres perturbations hématologiques importantes [84; 136].

La numération leucocytaire est fréquemment élevée bien que certains rats atteints présentent des valeurs normales. Cette numération des globules blancs peut varier de $4,2 \cdot 10^9/\text{l}$ à $370 \cdot 10^9/\text{l}$ (valeurs extrêmes des différents auteurs) avec de 20 à 90% de cellules anormales c'est-à-dire de grands lymphocytes granuleux. Il est d'ailleurs impossible d'identifier des lymphocytes normaux sur un frottis sanguin. Et il est fréquent d'observer des images d'érythrophagocytose dans les cellules anormales.

La leucocytose est associée à une importante neutrophilie, avec une courbe d'Arneth déviée à gauche, qui pourrait être liée au développement de l'anémie hémolytique.

Cette leucémie s'accompagne, en effet, d'une anémie hémolytique sévère [84; 131; 136] qui se traduit cliniquement par une coloration des muqueuses très pâle et l'apparition d'un ictère. L'hémogramme confirme la sévérité de l'anémie avec une concentration en hémoglobine avoisinant les 5g/dl, une numération érythrocytaire souvent inférieure à $2 \cdot 10^{12}/\text{l}$ ainsi qu'un hématocrite inférieur à 20%.

Les autres paramètres érythrocytaires, tout comme l'examen du frottis permettent, de préciser les caractéristiques de cette anémie qui est macrocytaire, normochrome et régénérative. En effet le VGM est augmenté (en moyenne supérieur à 70 fl) de même que la TCMH tandis que la CCMH conserve une valeur normale. La lecture du frottis révèle une polychromatophilie, une forte anisocytose, la présence de sphérocytes, de nombreux érythroblastes (entre 50 et 70 pour 100 leucocytes) et de rouleaux d'hématies. La réticulocytose est marquée avec un pourcentage de réticulocytes quelquefois supérieur à 80%.

La fragilité osmotique des hématies augmente tout au long de l'évolution de la maladie et parallèlement à l'aggravation de l'anémie c'est-à-dire au fur et à mesure de la diminution de la concentration en hémoglobine [132; 134].

Le caractère hémolytique se manifeste cliniquement par un ictère, et au niveau biochimique par une augmentation de la concentration plasmatique en bilirubine et en bilirubine conjuguée et par l'apparition d'une bilirubinurie et d'une hémoglobinurie. Sur le plan hématologique, le nombre élevé d'érythroblastes circulants, la sphérocytose, la présence de

rouleaux d'hématies et la diminution de la résistance osmotique associés à la positivité des réactions d'autoagglutination et du test de Coombs direct [133; 136] confirment l'hémolyse et prouvent également qu'il s'agit d'un phénomène à médiation immune.

L'hémogramme révèle aussi une forte thrombopénie avec des numérations plaquettaires souvent inférieures à $200.10^9/l$ et la présence sur le frottis de nombreuses plaquettes géantes. Cette thrombopénie n'est pas due à un défaut de production, comme l'indique la présence de plaquettes géantes dans le sang et de nombreux mégacaryocytes dans la moelle osseuse, mais à une consommation accrue ou une destruction massive liées soit à la médiation immune soit à des phénomènes de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

Au niveau des organes hématopoïétiques, on observe également des anomalies et pas seulement dans la rate. En début d'évolution, les cellules tumorales envahissent d'abord les zones spléniques marginales et la rate conserve encore des foyers hématopoïétiques extra-médullaires actifs. Puis, progressivement, la pulpe blanche, et par conséquent les follicules lymphoïdes, sont envahis; la population lymphocytaire normale devient extrêmement réduite.

Quant à la moelle osseuse, même si elle n'est pas toujours infiltrée par les grands lymphocytes granuleux, elle possède toujours une cellularité plus élevée comparée à celle d'animaux sains du même âge. On observe, en effet, une prolifération, non tumorale, des lignées myéloïdes et érythrocytaires et la présence de nombreux mégacaryocytes, ce qui prouve que toutes les lignées sont très actives et notamment la lignée érythroïde au début de la maladie en réponse à l'anémie hémolytique. Toutefois le rapport M/E semble augmenter progressivement tout au long du processus pathologique [95; 134].

Quelques désordres lymphoprolifératifs impliquant des grands lymphocytes granuleux et présentant des similitudes avec cette leucémie particulière, ont été décrits chez l'homme et le chat mais cette pathologie hématologique demeure une grande particularité du rat.

4.4.3. Leucémie myéloïde ou chloroleucémie ou leucémie granulocytaire [55; 67]

Cette leucémie décrite chez plusieurs souches de rats a une incidence spontanée très faible. Celle-ci augmente chez les rats exposés à des agents cancérigènes ou des radiations ionisantes et chez les sujets carencés en magnésium. La forme spontanée touche les animaux âgés et la forme expérimentale débute généralement entre 5 et 8 mois après l'administration du produit cancérigène.

Comme chez l'homme, on distingue des formes aiguës, subaiguës et chroniques. Cette classification n'est pas réellement basée sur la durée d'évolution de la maladie mais essentiellement sur le degré de maturation des cellules anormales. Chez le rat, la forme aiguë prédomine et le temps de survie est alors inférieur à trois semaines.

La maladie se caractérise par la présence de cellules blastiques de lignée myéloïde dans le sang et une élévation du nombre total de leucocytes sanguins. Cette augmentation est parfois très légère en début d'évolution. Par la suite, la numération leucocytaire est fréquemment supérieure à $100.10^9/l$. Dans les formes aiguës, on observe une prédominance d'éléments immatures c'est-à-dire de myéloblastes et promyélocytes dans le sang périphérique, et une numération leucocytaire comprise entre 25 et $190.10^9/l$. En revanche, dans les formes

chroniques on rencontre plus de myélocytes et métamyélocytes et le nombre de globules blancs peut atteindre jusqu'à $600.10^9/l$ [55]. En même temps que cette élévation drastique du nombre de globules blancs, les numérations érythrocytaires, lymphocytaires et plaquettaires s'effondrent en fin d'évolution de la maladie.

Une telle numération leucocytaire peut se rencontrer lors d'une réaction leucémoïde liée au développement important d'un processus septique ou cancéreux.

Le diagnostic est donc principalement basé sur l'identification, à partir du frottis sanguin, de cellules myéloïdes à différents stades de maturation et en quantité considérable (jusqu'à plus de 50% de formes immatures dans la formule leucocytaire). Certaines de ces cellules présentent des atypies; quelques myéloblastes par exemple ont un grand noyau très pâle et légèrement lobulé qui contient fréquemment plusieurs nucléoles. On note aussi la présence d'hématies nucléées.

Les organes hématopoïétiques sont évidemment atteints. La moelle osseuse présente une cellularité très élevée et le tissu adipeux est supplanté par l'infiltration de cellules tumorales. Seule l'identification de quelques rares mégacaryocytes permet de reconnaître la nature de la moelle puisqu'on n'observe aucune image d'érythropoïèse ou de myélopoïèse normale. Les sujets encore vivants présentent systématiquement une splénomégalie et parfois une hépatomégalie palpable, liées à l'infiltration de ces organes par les cellules tumorales.

D'autres organes sont pareillement envahis comme les reins, les nœuds lymphatiques, les organes génitaux ou encore les poumons et le pancréas [67].

Les caractéristiques morphologiques des leucémies myéloïdes du rat et de l'homme sont similaires: les cellules tumorales envahissent les mêmes organes et on retrouve dans le sang les mêmes proportions de cellules à divers degrés de maturation. En revanche, les évolutions de cette maladie sont différentes chez ces deux espèces. Chez l'homme, on observe de nombreux cas notamment chez les enfants qui présentent souvent des formes chroniques alors que chez le rat, on a vu qu'il existait surtout des formes aiguës sur des animaux âgés.

4.5. Pertes sanguines ou hémorragie [15; 27; 66; 111; 117]

On a vu qu'il existait de nombreuses recommandations quant aux quantités de sang à prélever sur le rat sans entraîner de perturbations hématologiques [27]. Lorsque ces quantités sont trop importantes ou les prélèvements trop nombreux, on induit une anémie dont l'intensité et la durée varient selon la quantité de sang prélevée et le nombre de prélèvements réalisés mais dont les caractéristiques générales sont les suivantes.

Même si la principale conséquence d'une perte sanguine importante est l'anémie, la première perturbation hématologique qui apparaît dans les 24 heures suivant l'hémorragie ou le prélèvement, est une leucocytose transitoire principalement due à une augmentation du nombre absolu de neutrophiles relargués dans le courant sanguin. Dans le même temps, on observe une réduction du nombre de neutrophiles segmentés dans la moelle [15].

Les paramètres hématologiques érythrocytaires n'apparaissent comme significativement diminuées qu'au bout de deux ou trois jours lors de prélèvements répétés. La numération érythrocytaire est effectivement diminuée de même que la concentration en hémoglobine et l'hématocrite tandis que le taux de réticulocytes augmente. Sur le frottis sanguin, on observe

une anisocytose et une polychromatophilie ainsi que la présence de quelques érythroblastes et de corps de Howell-Jolly. La fragilité osmotique des hématies et le VGM ne sont pas modifiés en comparaison avec des animaux témoins. Il s'agit donc d'une anémie normocytaire et régénérative sauf lorsqu'il s'agit de prélèvements répétés sur une longue période où l'on peut alors induire une anémie ferriprive.

L'examen de la moelle ne révèle pas d'augmentation significative de la cellularité globale mais une diminution marquée du rapport M/E ainsi qu'une augmentation de la proportion d'érythroblastes polychromatophiles, ce qui révèle un renforcement de l'activité érythropoï étique médullaire qui est cependant limitée puisque la cellularité globale n'augmente pas. En revanche l'érythropoï èse extramédullaire splénique est manifeste. Elle est caractérisée par une augmentation de volume et une congestion de la rate associées à une importante élévation du nombre de cellules érythroï des nucléées dans cet organe. Habituellement, aucun signe d'érythropoï èse hépatique n'est observé sauf en cas d'hémorragie massive aiguë lorsque les capacités spléniques sont à leur tour dépassées.

Il est évident que la sévérité de l'anémie provoquée par des pertes sanguines varie en fonction des quantités de sang perdues ou de la durée de pertes chroniques, mais le but de ce paragraphe était de montrer les aspects principaux de cette anémie d'origine périphérique, afin de pouvoir la distinguer, par ses caractéristiques, d'autres anémies périphériques comme les anémies hémolytiques.

4.6. Toxicité ou perturbations hématologiques liées à l'administration de certaines substances [16; 37; 66; 85; 95; 103; 104; 142]

Les modifications hématologiques liées à l'administration de certains produits résultent soit d'effets primaires directs de la substance sur les cellules sanguines, soit d'effets secondaires liés à l'altération d'un ou plusieurs autres tissus organiques ayant des retentissements sur le tissu sanguin et hématopoï étique.

Ce paragraphe a pour but de présenter les grands types de variations pathologiques non spontanées, à partir d'une classification morphologique médullaire, illustrés par des exemples particuliers d'actions de quelques substances.

4.6.1. Hyperplasies

Le terme d'hyperplasie est employé lorsqu'on observe une augmentation de la production hématopoï étique médullaire, c'est-à-dire de la cellularité, parallèlement à l'apparition dans le sang de cellules jeunes en proportion plus importante. Le plus souvent les hyperplasies apparaissent en réponse à une demande périphérique accrue en cellules sanguines ou sous l'action de molécules stimulant directement l'hématopoï èse.

Selon la nature de la lignée médullaire active, on distingue les trois types d'hyperplasie suivants mais il est aussi possible de rencontrer deux ou trois de ces types associés.

- Hyperplasie myéloï de [37; 66; 95; 142]

Elle est, en général, la conséquence d'une consommation accrue de granulocytes entraînant une stimulation de la myélopoï èse, ce qui se traduit par une augmentation du

rapport M/E avec un indice de maturation myéloïde normal. L'examen du sang révèle une courbe d'Arnet des granulocytes déviée à gauche avec une numération leucocytaire normale ou augmentée.

Cette réaction a été observée, par exemple, lors d'application de produits dermatologiques irritants à l'origine d'une inflammation de la peau, ce qui nécessite un apport considérable de polynucléaires circulants. La moelle osseuse répond alors en conséquence en intensifiant la myélopoïèse.

Une hyperplasie myéloïde peut être déclenchée par l'action de substances particulières qui sont régulièrement utilisées lors d'études ayant tout spécialement trait à l'hématologie: ce sont des molécules recombinantes de facteurs de croissance des colonies granulocytes-macrophages comme par exemple le facteur recombinant **GM-CSF** (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) ou le **rm-SCF** (recombinant murine Stem Cell Factor). Ces deux facteurs agissent d'ailleurs de manière synergique afin de provoquer in vivo une stimulation de la granulopoïèse.

- Hyperplasie mégacaryocytaire [16; 85;142]

On la rencontre lors de consommation excessive de plaquettes ou de diminution de leur temps de demi-vie. Sur les frottis de moelle on observe alors une hyperplasmie des mégacaryocytes et une maturation normale, et dans le sang, une thrombopénie associée à la présence de jeunes plaquettes plus grandes et de forme ovale, avec une basophilie plus marquée et des granulations plus nombreuses.

Expérimentalement, on peut induire une hyperplasie mégacaryocytaire par injection de sérum antiplaquettes (APS) ou par injection d'érythropoïétine. Cette dernière, cependant, n'a pas une action spécifique puisqu'elle stimule également l'érythropoïèse.

- Hyperplasie érythroïde [37; 56; 66; 100; 117; 142]

Elle se caractérise par une augmentation synchrone de l'érythropoïèse, c'est-à-dire avec un indice de maturation normal, et un rapport M/E diminué. La numération sanguine des hématies peut-être augmentée (hypoxie) ou diminuée (hémolyse), selon la cause et les mécanismes mis en jeu, mais le frottis sanguin révèle toujours une anisocytose et une polychromatophilie avec la présence de cellules jeunes (réticulocytes) ou immatures (érythroblastes).

Elle apparaît lorsqu'il existe une amplification du renouvellement des globules rouges avec un temps de demi-vie diminué, lors d'hémolyse par exemple, ou avec une durée de vie normale, lors d'hypoxie. Cette dernière a déjà été abordée dans un paragraphe précédent. On va surtout s'intéresser ici à un exemple particulier, l'action de la **phénylhydrazine** (PHZ). Cette molécule est bien connue pour ses capacités à induire une hémolyse, par oxydation de l'hémoglobine, et elle a très souvent été utilisée en recherche pour établir des modèles d'anémie et de réticulocytose chez de nombreuses espèces. Il est donc intéressant de présenter les caractéristiques de cette anémie hémolytique, ainsi induite, chez le rat.

L'anémie hémolytique provoquée par une ou plusieurs administrations de phénylhydrazine [66; 117] a un caractère aigu et se manifeste par une diminution brutale de la concentration en hémoglobine (inférieure à 10g/dl), de l'hématocrite (inférieur à 30%) et de la numération érythrocytaire qui peut être presque diminuée de moitié. En revanche, la résistance osmotique des hématies rescapées est plus élevée en comparaison avec des lots d'animaux témoins ou saignés. Le frottis sanguin met en évidence une forte polycytose et la présence

d'échinocytes de morphologie très caractéristique, c'est-à-dire des hématies crénelées avec de nombreux spicules, et aussi quelques corps de Heinz. On note également une anisocytose car il y a en réalité deux types de populations érythrocytaires, une population normocytaire de cellules matures et abîmées, et une population de jeunes hématies macrocytaires, contenant parfois encore des résidus nucléaires (corps de Howell-Jolly), mêlée de réticulocytes et de quelques érythroblastes.

Quant au frottis de moelle, il montre une hyperplasie érythroïde avec un rapport M/E pouvant être inférieur à 0,3 et la présence d'érythroblastes polychromatophiles ou de cellules immatures atypiques, en quantité plus importante que la normale. Il faut ajouter qu'on observe aussi une hématopoïèse extramédullaire splénique importante et même hépatique, contrairement aux anémies provoquées par saignée.

Dans les 15 jours suivant la dernière administration de phénylhydrazine, cette anémie fortement régénérative disparaît et les valeurs hématologiques des animaux testés reviennent dans les normes.

Ce type de réaction médullaire et d'anémie hémolytique peut être induit de la même manière par d'autres substances comme le **2-butoxyéthanol** [56] ou encore l'**oxyde d'éthylène** qui est un agent alkylant fréquemment employé pour la stérilisation de matériel médical ou chirurgical et qui, toxique par inhalation, provoque chez le rat une anémie macrocytaire [100].

Une autre méthode d'induction d'hyperplasie érythroïde fréquemment employée lors d'études hématologiques et physiologiques des organes hématopoïétiques est l'administration d'**érythropoïétine** [37; 66].

4.6.2. Hypoplasies et aplasies [4; 37; 39; 66; 77; 142]

L'hypoplasie est définie par une activité réduite de la moelle, reflétée par une diminution du nombre de cellules du sang périphérique. Quant à l'aplasie médullaire, c'est le stade ultime lorsqu'on observe un frottis de moelle désertique où chaque lignée n'est presque plus représentée. L'hypoplasie ou l'aplasie peuvent ne toucher qu'une seule lignée mais c'est un phénomène assez rare. Dans ce cas, l'hypoplasie érythroïde est tout de même relativement plus fréquente que l'hypoplasie myéloïde isolée. Par ailleurs, l'aplasie myéloïde, si elle se prolonge, entraîne une mortalité inévitable.

Il existe de nombreuses molécules hématotoxiques parmi lesquelles certaines sont employées à des fins thérapeutiques chez l'homme ou les carnivores domestiques. Ainsi, l'hypoplasie médullaire peut aisément être provoquée chez le rat par des agents myélosuppresseurs classiques comme la **doxorubicine** ou le **cyclophosphamide** qui sont largement utilisés dans les protocoles de chimiothérapie. Ces deux molécules entraînent des perturbations hématologiques similaires et doses-dépendantes [37; 66]. Toutes les numérations cellulaires de l'hémogramme sont fortement diminuées et sur le frottis sanguin, il est possible d'observer quelques lymphocytes mais très rarement des granulocytes dont la population est presque épuisée. Quant aux globules rouges, ils sont caractérisés par une nette poikilocytose avec de nombreux érythrocytes anormaux crénelés.

Au niveau médullaire, le nombre total de cellules nucléées est fortement diminué, et ce d'autant plus que la dose administrée est élevée. Il est par contre intéressant de remarquer que le rapport M/E est augmenté puisqu'il est souvent supérieur à 4, et que le pourcentage de cellules myéloïdes du myélogramme est beaucoup plus élevé que celui des cellules érythroïdes. Dans cette situation le rapport M/E est trompeur et ne doit pas être interprété

individuellement, mais par rapport à la cellularité globale et en fonction des conditions pathologiques éventuelles, car en réalité, ici, les deux lignées rouges et blanches sont hypoplasiques.

Enfin, parmi les substances hématotoxiques, on ne peut manquer de citer le **benzène** et ses dérivés aromatiques qui sont les molécules les plus connues pour leur capacité à induire chez le rat, et d'autres espèces, une aplasie médullaire. Leur action se manifeste par une pancytopenie périphérique associée à une réduction des cellularités médullaires et spléniques de toutes les lignées, érythroïde, myéloïde, lymphoïde et mégacaryocytaire [39; 77].

4.6.3. Métaplasies et dyshématopoïèse [37; 95; 142; 30]

A la différence des hyperplasies, on parle de métaplasie, lorsqu'on observe une prolifération des cellules médullaires, c'est-à-dire une apparente hyperplasie, ne s'accompagnant pas de modifications visibles du nombre et de la nature des cellules relâchées dans la circulation sanguine. La métaplasie n'est toutefois décrite que pour la lignée myéloïde et d'occurrence plutôt rare.

En cas de dyshématopoïèse, il existe également une stimulation de la prolifération d'une ou plusieurs lignées mais la maturation est défectueuse, ce qui se traduit par une augmentation de la valeur des indices de maturation de la lignée considérée, et parallèlement, on observe fréquemment des anomalies morphologiques cellulaires. Pour identifier une dyshématopoïèse, il est par conséquent important de prendre en considération les indices de maturation de chaque lignée obtenus grâce au myélogramme, mais aussi de réaliser une lecture microscopique attentive du frottis médullaire.

La dysmyélopoïèse se traduit, d'une part, par une augmentation de la proportion de cellules immatures comprenant des cellules anormales géantes. D'autre part, les cellules différenciées peuvent elles aussi présenter des anomalies: les granulocytes sont parfois hypersegmentés [142]. Simultanément, dans le sang, la courbe d'Arnet est déviée à droite.

Lors de dysérythropoïèse, le frottis médullaire montre une lignée rouge inhabituelle. Il est alors possible d'observer de nombreuses atypies cellulaires; certaines cellules sont binucléées ou possèdent un noyau "bourgeonnant"; d'autres contiennent des micronucleus; de nombreuses images de mitoses aux derniers stades sont également visibles. Au niveau périphérique, on remarque parfois une anémie normochrome et normocytaire.

Enfin la dysthrombocytopoïèse peut être identifiée sur le frottis de moelle par l'augmentation éventuelle du nombre de noyaux des mégacaryocytes. Ces noyaux hyperchromatiques peuvent aussi fusionner entre eux. On observe surtout une diminution du volume cytoplasmique de ces mégacaryocytes. Dans le sang, les plaquettes sont très petites, pâles et peu granuleuses.

Ces trois entités peuvent être provoquées, séparément ou simultanément, par l'ingestion ou l'administration de produits contenant des métaux lourds, comme le **plomb** qui a été plus particulièrement étudié [30; 142]. Ainsi des rats auxquels on a administré, pendant plusieurs semaines (90 jours), du plomb inorganique dosé à 300mg/kg, présentent une dysmyélopoïèse et une dysérythropoïèse caractérisée par les atypies cellulaires décrites ci-dessus [142].

Conclusion.

Pour évaluer la toxicité directe de certaines substances ou leurs effets secondaires sur le système hématopoï étique, il est nécessaire de réaliser, sur les animaux testés, des examens sanguins périodiques quantitatifs et qualitatifs, c'est-à-dire des hémogrammes accompagnés d'observations qualitatives morphologiques afin de vérifier l'intégrité ou l'atteinte des cellules sanguines. Cependant, en cas de toxicité hématologique avérée, les anomalies médullaires hématopoï étiques pourraient apparaître plus précocement que les anomalies sanguines. Il est alors indispensable de procéder, de la même manière, à des examens quantitatifs et qualitatifs des organes hématopoï étiques c'est-à-dire, chez le rat, non seulement de la moelle osseuse mais aussi de la rate et éventuellement du foie. C'est pourquoi certaines études de substances toxiques font l'objet de myélogrammes systématiques.

Si les méthodes automatisées de réalisation de l'hémogramme et du myélogramme, de plus en plus perfectionnées, permettent un gain de temps certain par rapport aux méthodes manuelles, on ne peut se passer d'un examen qualitatif, donc de l'observation microscopique d'un frottis sanguin ou de moelle afin de déceler des particularités ou anomalies morphologiques.

Conclusion générale

Le rat possède des particularités hématologiques spécifiques tout à fait intéressantes. Outre la lymphocytose sanguine physiologique commune à d'autres rongeurs, il se distingue par ses organes hématopoïétiques qui ne sont pas simplement représentés chez l'adulte par la moelle osseuse, puisqu'il existe une hématopoïèse extramédullaire splénique. On retiendra aussi, sur le plan morphologique, l'originalité de toute la lignée myéloïde avec leur noyau si particulier en forme d'anneau ou de beignet.

Sur le plan qualitatif, il existe des caractéristiques aisément reconnaissables. En revanche, il est très difficile d'établir des valeurs de référence aussi bien pour l'hémogramme que pour le myélogramme du fait de l'existence de nombreux facteurs de variation. En dehors des fluctuations classiques, comme chez l'homme et le chien, en fonction de l'âge et du sexe, on observe de grandes disparités selon les méthodes de prélèvements et plus particulièrement le lieu de ces prélèvements sanguin ou médullaire, qui génère de nombreuses contradictions entre auteurs. Et surtout, même si le rat *Rattus norvegicus* est une espèce à part entière, les différentes souches et lignées ne présentent pas toujours les mêmes paramètres hématologiques, notamment les souches mutantes ou consanguines.

Ceci nous permet donc de rappeler qu'il est fondamental, pour toute expérimentation incluant des données hématologiques, d'établir au préalable ou simultanément des valeurs de base sur des échantillons de taille suffisante de rats témoins.

ANNEXES

Annexe 1

Hémogrammes de rats Long Evans mâles et femelles âgés de 26 jours à 15 mois.
D'après Jain [72].

Age (mois)	26 – 30		37 – 80 jours		3 mois	
Nombre	10	10	23	25	11	13
Sexe	M	F	M	F	M	F
GR ($10^{12}/l$)	5.4	5.54	7.25	6.85	8.57	7.46
Ht (%)	37.7	39	46.1	45.5	47.1	46.7
Hb (g/dl)	11.5	11.8	14.3	14.3	15.6	15
VGM (fl)	69.9	70.4	64.2	66.6	57.2	62.7
TCMH (pg)	21.2	21.2	19.9	21	18.3	20.1
CCMH (g/dl)	30.3	30.1	31.1	31.5	31.9	32.1
réticulocytes (%)	21.1	17.6	5.8	5	2.6	2.4
Plaquettes ($10^9/l$)	1099	1089	923	949	840	969
GB ($10^9/l$)	4	3.8	8.54	7.1	8.81	8.31
Neutrophiles (%)	16.1	13.6	16.6	15.3	21.4	17.9
Lymphocytes (%)	78.8	82.5	78.3	80.9	74.6	77.5
Eosinophiles (%)	0.9	0.3	1.5	2.1	1.7	2
Monocytes (%)	4.2	3.7	3.4	1.6	2.2	2.5
Basophiles (%)	0.1	0.1	0.6	0	0.1	0

Age (mois)	4 – 6 mois		7 – 12 mois		13 – 15 mois	
Nombre	10	10	23	25	11	13
Sexe	M	F	M	F	M	F
GR ($10^{12}/l$)	8.46	7.74	8.69	7.85	8.49	7.92
Ht (%)	48.2	47.7	48.2	46.7	47.1	46.5
Hb (g/dl)	15.1	15.4	15.3	15.1	14.8	14.5
VGM (fl)	57.6	61.9	54.8	59.6	55.4	58.7
TCMH (pg)	17.8	20	17.6	19.2	17.5	18.4
CCMH (g/dl)	31.5	32.3	31.6	32.3	31.5	31.2
réticulocytes (%)	2.2	2.6	1.7	2.9	2	4.3
Plaquettes ($10^9/l$)	882	1016	953	984	980	1038
GB ($10^9/l$)	10.25	8.48	9.6	7.08	9.6	6.98
Neutrophiles (%)	20.1	18.6	26.7	23.3	35.4	22.9
Lymphocytes (%)	75.9	76.3	66.8	69.8	56	69.2
Eosinophiles (%)	2.1	3.7	3.4	3.9	3.1	5.3
Monocytes (%)	1.8	1.3	3.1	2.9	5.2	2.8
Basophiles (%)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0

Commentaire. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes de chaque échantillon. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Kozma et al [78] mais sont plus complets.

Annexe 2

Hémogrammes de rats Wistar mâles et femelles âgés de 6 à 34 semaines. D'après CRL [158].

Age (mois)	6 – 8 semaines		19 – 21 semaines		32 – 34 semaines	
Nombre	170	170	30	29	15	15
Sexe	M	F	M	F	M	F
GR ($10^{12}/l$)	6.46 5.79-7.14	6.92 6.2-7.64	8.31 7.37-9.25	7.81 6.86-8.75	8.4 7.74-9.72	7.8 6.92-8.78
Ht (%)	36 32-40	38 34-42	41 36-46	40 35-44	42 39-48	40.7 35-44
Hb (g/dl)	13.5 12.2-14.8	14.1 12.9-15.3	16 14.4-17.6	15.6 14.1-17.1	15.5 14.7-18	16.3 15.2-19.3
VGM (fl)	56 53-59	55 52-59	50 47-52	53 49-56	50.1 48-53	52.4 50-57
TCMH (pg)	20 18-22	20 19-21	19 17-21	20 18-22	18.6 17-20	21 18-23
CCMH (g/dl)	37 33-41	36 34-39	39 35-43	38 34-42	37 34-38	40.3 36-45
Plaquettes ($10^9/l$)	700 estimé	700 estimé	700 estimé	700 estimé	700 estimé	700 estimé
GB ($10^9/l$)	8.66 5.1-12.1	6.96 4.19-9.73	9.37 6.19-12.55	8.43 4.77-12.08	7.8 5.29-10.8	6 4.6-13
Neutrophiles (%)	12 2-22	13 1-25	15 1-29	17 1-32	18 12-34	23 10-40
Lymphocytes (%)	85 76-98	84 74-89	82 70-99	80 67-98	80 65-86	75 59-90
Eosinophiles (%)	1 0-3	1 0-3	1 0-3	1 0-3	2 0-3	2 0-6
Monocytes (%)	2 0-6	2 0-6	2 0-6	2 0-6	0 0-0	0.1 0-1
Basophiles (%)	0 0-2	0 0-2	0 0-2	0 0-0	0 0-0	0 0-0
GR nucléés pour 100GB	0 0-2	0 0-2	0 0-2	0 0-0	0 0-1	0 0-0

Les valeurs principales sont les moyennes de chaque échantillon sous lesquelles sont indiqués les intervalles de confiance correspondants, sauf pour les plaquettes pour lesquelles il s'agit d'une estimation.

Annexe 3

Principaux paramètres hématologiques du rat de compagnie. D'après Boussarie [19].

Erythrocytes ($10^{12}/l$)	5 - 12,5
Hb (g/dl)	11 - 18
Ht (%)	36 - 52
VGM (fl)	44,5 - 69
TCMH (pg)	12 - 24,5
CCMH (g/dl)	21,6 - 42
Réticulocytes (%)	0,5 - 3
Diamètre des hématies (μm)	5,8 - 6,8
Leucocytes ($10^9/l$)	3 - 15
Neutrophiles (%)	4 - 50
Eosinophiles (%)	0 - 4
Basophiles (%)	0 - 2
Lymphocytes (%)	40 - 95
Monocytes (%)	0 - 8
Plaquettes ($10^9/l$)	500 - 1300

Les données ci-dessus sont des intervalles de valeurs usuelles établies d'après plusieurs références bibliographiques [9].

Annexe 4

Comparaison de la méthode automatisée par cytométrie en flux et de la méthode manuelle pour la détermination de la formule du myélogramme fémoral de rats Wistar mâles et femelles adultes. D'après Criswell [37].

Méthode	Cytométrie en flux		Lecture du frottis	
Nombre de rats	29	36	29	36
Sexe	M	F	M	F
Catégories de cellules:				
% Myéloï des immatures	11.26	11.54	11.53	12.11
% Myéloï des en maturation	40.98	38.76	40.57	39.23
% Erythroï des immatures	7.51	8.82	7.59	8.34
% Erythroï des en maturation	34.1	32.25	32.37	31.28
% Lymphoï des	7.2	8.77	7.34	8.34
% Megacaryocytes	0.72	1.09	0.61	0.77
Rapport M/E	1.28	1.25	1.3	1.3

Ces données chiffrées sont les moyennes calculées sur chaque échantillon.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 ABBOT,D.P., CHERRY,C.P.- Malignant mixed thymic tumor with metastases in a rat- *Vet. Pathol.*, 1982, **19**, 721-723
- 2 ABBOT,D.P., PRENTICE, D.E., CHERRY,C.P.- Mononuclear cell leukemia in aged Sprague-Dawley rats- *Vet. Pathol.*, 1983, **20**, 434-439
- 3 AKAHANE,K., FURUHAMA,K., ONODERA,T.- Simultaneous occurrence of hypercholesterolemia and hemolytic anemia in rats fed cholesterol diet- *Life. Sci.*, 1986, **39**, 499-505.
- 4 AKINGBEMI,B.T., AIRE,T.A.- Haematological and serum biochemical changes in the rat due to protein malnutrition and gossypol-ethanol interactions- *J. Comp. Pathol.*, 1994, **111**, 413-426.
- 5 ALDER,V.A., YU,D.Y., SU,E.N., CRINGLE,S.J.- Comparison of hematologic parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats- *Lab. Anim. Sci.*, 1992, **42**, 2, 170-173.
- 6 ALEMAN,C.L., MAS,R.M., RODEIRO,I., et al - Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months- *Lab. Anim.*, 1998, **32**, 457- 466.
- 7 ALLEBBAN,Z., GIBSON,L.A., LANGE,R.D., et al - Effects of spaceflight on rat erythroid parameters- *J. Appl. Physiol.*,1996, **81**, 1, 117-122.
- 8 APOSTOLOU,A., SAIDT,L., BROWN,W.R.- Effect of overnight fasting of young rats on water consumption, body weight, blood sampling, and blood composition- *Lab. Anim. Sci.*, 1976, **26**, 2, 959-960.
- 9 ARCHER,R.K.- Technical methods- In: ARCHER,R.K., JEFFCOTT,L.B.- *Comparative Clinical Hematology*- Blacwell Scientific -1977- Chap 14, 537-609.
- 10 ASANO,Y., SUSAMI,M., HONDA,K., SERIKAWA,T.- Haematological and serum biochemical values in spontaneously epileptic male rats and related rat strains-*Lab. Anim.*, 1998, **32**, 2, 214-218.
- 11 BAILLY,Y., DUPRAT,P.- Normal blood cell values, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*- Springer Verlag - 1990, 27-38.
- 12 BAKER,H.J.- Hemobartonellosis and Eperythrozoonosis - In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*-Springer Verlag - 1990, 88-91.
- 13 BASKURT,O.K., TEMIZ,A., MEISELMAN,H.J.- Red blood cell aggregation in experimental sepsis- *J. Lab. Clin. Med.*, 1997, **130**, 2, 183-193.
- 14 BAUCK,L.- Basic anatomy, physiology, husbandry, and clinical techniques. Part I.- In HILLYER, QUESENBERRY- *Ferrets,Rabbits and Rodents. Clinical Medecine and Surgery*.-Saunders- 1997- Chap 26, 291-297.
- 15 BERGER,J.- The effects of repeated bleedings on bone marrow and blood morphology in adult laboratory rats- *Folia Haematol.*, 1986, **5**, 685-691.
- 16 BERRIDGE,M.V., FRASER,J.K., CARTER,J.M., LIN,F-K.- Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on platelets production in the rat- *Blood*, 1988, **72**, 3, 970-977.
- 17 BEYNON,P.H., COOPER,J.E.- *Manuel of exotic pets*- New edition: Small Animal Veterinary Association, 1991- pages 91-92.

- 18 BONO,C.D., ELWELL,M.R., ROGERS,K.- Necropsy techniques with standard collection and trimming of tissues- In: KRINKE,G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal*-Academic press- 2000, Chap 28, 570-572.
- 19 BOUSSARIE, D.- Hématologie des rongeurs et lagomorphes de compagnie- *Bull. Acad. Vét. de France*, 1999, **72** , 209-216
- 20 BOWEN,B.J., MORGAN,E.H.- Anemia of the Belgrade rat: evidence for defective membrane transport of iron- *Blood*, 1987, **70**, 1, 38-44.
- 21 BOYNE,R., ARTHUR,J.R.- Anaemia and changes in erythrocyte morphology associated with copper and selenium deficiencies and dietary restriction in rats- *Res. Vet. Sci.*, 1990, **49**, 151-156
- 22 BRELINSKA,R., KACZMAREK,E., WARCHOL,J.B., JAROSZEWSKI,J.- Distribution of different cell types within the rat thymus in the neonatal period of life- *Cell. Tissue. Res.*, 1985, **240**, 473-478.
- 23 BRODSKY,S.G., ARSENAULT,A.- A rapid method for bone marrow aspiration in the rat- *Lab. Anim.Sci.*, 1976, **26**, 5, 826-827.
- 24 BRUCKNER-KARDOS,E., WOSTMAN,B.- Blood volume of adult germfree and conventional rat- *Lab. Anim.Sci.*, 1974, **24**, 4, 633-635
- 25 BURKE,W.T., BROTHURSTON,G., HARRIS,C.- An improved technic for obtaining bone marrow smears from the rat- *Am. J. Clin. Pathol.*, 1955, **25**, 1226-1228.
- 26 BURNS,K.F., DE LANNOY,C.W.- Compendium of normal blood values of laboratory animals, with indication of variations- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1966, **8**, 429-437.
- 27 BVA/FRAME/RSPCA/UFAW JOINT WORKING GROUP ON REFINEMENT - Removal of blood from laboratory mammals and birds- *Lab. Anim.*, 1993, **27**, 1-22.
- 28 CALDER,C.C., COSTA-ROSA,L.F.B.P., CURI, R.- Effects of feedings lipids of different fatty acid compositions upon rat lymphocyte proliferation- *Life. Sci.*, 1995, **56**, 6, 455-463.
- 29 CARAKOSTAS,M.C., BANERJEE,A.K.- Interpreting rodent clinical laboratory data in safety assesment studies: biological and analytical components of variation- *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1990, **15**, 744-753.
- 30 CARDONA,E., LESSLER,M.A.- Time course of hematologic changes during chronic lead poisoning- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1974, **145**, 663-668.
- 31 CARMICHAEL,R.D., LOBUE,J., GORDON,A.S.- Neonatal erythropoiesis. I. Peripheral blood erythropoietic parameters : data suggest erythropoietin transfer via maternal milk- *Endocr. Regul.*, 1992, **26**, 83-88.
- 32 CARMICHAEL,R.D., LOBUE,J., GORDON,A.S.- Neonatal erythropoiesis. II. Bone marrow and splenic erythropoietic activity: data suggest erythropoietin transfer via maternal milk- *Endocr. Regul.*, 1992, **26**, 143-149.
- 33 CLINE,J.M., MARONPOT,R.R.- Variation in the histologic distribution of rat bone marrow cells with respect to age and anatomic site- *Toxicol. Pathol.*, 1985, **13**, 4, 349-355.
- 34 COLEMAN,E.J., ZBIJEWSKA,J.R., SMITH,N.L.- Hematologic values in chronic murine pneumonia- *Lab. Anim. Sci.*, 1971, **21**, 5, 721-726.

- 35 CRAMER,D.V.- Regulation of Hemopoiesis- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic System* -Springer Verlag- 1990, 3-8.
- 36 CRISWEL, K.A., BLEAVINS, M.R., ZIELINSKI, D., ZANDEE, J.C.- Comparison of flow cytometric and manual bone marrow differentials in Wistar rats- *Cytometry*, 1998, **32**, 9-17.
- 37 CRISWEL, K.A., BLEAVINS, M.R., ZIELINSKI, D., ZANDEE, J.C., WALSH,K.M.- Flow cytometric evaluation of bone marrow differentials in rats with pharmacologically induced hematologic abnormalities- *Cytometry*, 1998, **32**, 18-27.
- 38 DANSE,L.H.J.C., CRICHTON,D.N.- Pigment deposition, Rat , Mouse- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*- Springer Verlag - 1990, 226-232.
- 39 D'AZEVEDO,P.A., TANNHAUSER,M., TANNHAUSER,S.L., BARROS, H.M.T.- Hematological alterations in rats from xylene and benzene-*Vet. Hum. Toxicol.*, 1996, **38**, 5, 340-344.
- 40 DIJKSTRA,C.D., VEERMAN,A.J.P.- Spleen: normal anatomy, histology, ultrastructure, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*- Springer Verlag - 1990, 185-193.
- 41 DU,H.K., LEE,Y.J., COLICE,G.L., et al - Pathophysiological effects of hemodilution in chronic mountain sickness in rats- *J. Appl. Physiol.*, 1996, **80**, 2, 574-582.
- 42 DUPRAT,P., GRADISKI,D., BAILLOT,M., LORIETTE,C. - Etude de quelques paramètres sanguins chez le rat . Influence du lieu de prélèvement- *Revue de Médecine Vétérinaire*, 1975, **126**, 1159-1179.
- 43 ECCLESTON,E.- Normal hematological values in rats, mice and marmosets- In: ARCHER,R.K., JEFFCOTT,L.B.- *Comparative Clinical Hematology*- Blacwell Scientific -1977-Chap 15, 611-617.
- 44 ELKO,E.E., CANTRELL,W.- Phagocytosis and anemia in rats infected with *Haemobartonella muris*-*J. Infect.Dis.*, 1968, **118**, 324-332
- 45 ENDICOTT,K.M., OTT,M.- The normal myelogram in albinos rats- *Anat. Rec.*, 1945, **22**, 61-69.
- 46 EUSTIS,S.L., BOORMAN,G.A., HARADA,T., POPP,J.A.- Liver- In:BOORMAN, EUSTIS, ELWEL, MONTGOMERY Jr, Mac KENZIE- *Pathology of the Fisher rat: reference and atlas*- Academic Press-1990- Chap 7, 71-81.
- 47 EVANS,G.O.- Letters to the Editor: removal of blood from laboratory mammals and birds- *Lab. Anim.*, 1994, **28**, 178-179.
- 48 EVANS,G.O., FAGG,R.- Reticulocyte count in canine and rat blood made by flow cytometry- *J. Comp. Pathol.*, 1994, **111**, 107-111.
- 49 FALLON,M.T.-Rats and Mice- In: LABER-LAID, SWINDLE, FLECKNELL - *Handbook of rodent and rabbit medicine*-Pergamon- 1996- Chap 1, 1-12.
- 50 FERRY,A., RIEU,P., LAZIRI,F., et al- Immunomodulations of thymocytes and splenocytes in trained rats- *J. Appl. Physiol.*, 1991, **71**, 3, 815-820.
- 51 FLEMING,MD, ROMANO,M.A., SU,M.A., GARRICK,L.M., et al....- Nramp2 is mutated in belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport- *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, **95**, 3, 1148-1153.
- 52 FORD,J.A., MURRAY,T.J.- Studies on *Haemobartonella* infection in the rat- *Canadian Journal of Microbiology*, 1959, **5**, 345-350.

- 53 FUCHS,A., EDER,H.- Zahl und Reifegradverteilung de Retikulozyten von sechs Tierarten- *J.Vet. Med. A*, 1991, **38**, 749-754.
- 54 FUJIMORI,H., OZAKI,K., NOMURA,S., et al - Characterisation of platelets abnormalities of Tester Moriyama (TM) rats with storage pool deficiency- *Lab. Anim. Sci.*, 1998, **48**, 5, 490-495.
- 55 GAL,F., SUGAR,J., CZUKA,O.- Granulocytic leukemia, Rat-- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*-Springer Verlag - 1990, 40-45.
- 56 GHANAYEM,B.I., WARD,S.M., BLAIR,P.C., MATTHEWS,H.B;- Comparison of the hematologic effects of 2-Butoxyethanol using two types of hematology analyzers- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1990, **106**, 341-345.
- 57 GODWIN,K.O., FRASE, F.J., IBBOTSON,R.N.- Hematological observation on healthy (SPF) rats- *Br. J. Exp.Pathol.*, 1964, **45**, 514-524.
- 58 GOLDSCHNEIDER,I., Mc GREGOR,D.D.-Anatomical distribution of T and B lymphocytes in the rat- *J. Exp. Med.*, 1973, **138**, **6**, 1443-1465.
- 59 GOLDSCHNEIDER,R.I., BATTYE,F., MANDEL,T., BOLLUM, F.J.- Analysis of rat hemopoietic cells on the fluorescence-activated cell sorter.Part II- *J. Exp. Med.*, 1980, **152**, 438-446.
- 60 GOLDSCHNEIDER,R.I., METCALF,D., BATTYE,F., MANDEL,T.- Analysis of rat hemopoietic cells on the fluorescence-activated cell sorter.Part I- *J. Exp. Med.*,1980, **152**, 419-437.
- 61 GRETILLAT,S.,MATTEI,X., MARCHAND,B.- Une rickettsiale nouvelle (*Ehrlichiae*) des leucocytes du sang du rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*) au Sénégal: *Cytoecetes kamtchoulii n sp- Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*,1981, 391-396.
- 62 GRONER,W., BOYETT,J;, JOHNSON,A., SCANTLEBURY,M. - Variability of erythrocyte size and hemoglobin content observed in Man and four selected animals- *Blood. Cells.*, 1986, **12**, 65-80.
- 63 HARKNESS,J.E., WAGNER,J.E.- *The biology and medecine of Rabbits and Rodents*- 4 Edition- Philadelphie: Lea and Febiger,1994- pages 65-73, 93-96, 130-136.
- 64 HARLEMAN,J.H;, JAHN,W.- A Morphologic classification of hemopoietic tumors, Rats- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*- Springer Verlag - 1990, 149-154.
- 65 HARRIS,C., BURKE,T.B.- The changing cellular distribution in bone marrow of normal albino rat between one and fifty weeks of age-*Am. J. Pathol.*, 1957, **33**, 5, 931-951.
- 66 HASEGAWA,A., FURUHAMA,K.-*Atlas of the hematology of the laboratory rat*- Elsevier- 1998- 152 pages.
- 67 HEATH, J.E.- Granulocytic leukemia in rats: a report of two cases- *Lab. Anim. Sci.*, 1981, **31**, 504-506.
- 68 HEDRICH,H.J.- History, strains and models- In: KRINKE,G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal*-Academic press- 2000, Chap 1, 3-16.
- 69 HEM,A., SMITH,A.J., SOLBERG,P.- Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guineapig, ferret, and mink- *Lab. Anim.*, 1998, **32**, 364-368.

- 70 HRAPKIEWICZ,K., MEDINA,L., HOLMES,D.D.-*Clinical medicine of small mammals and primates*-2nd Edition- 1998- Chap 2, Rats, 31-39.
- 71 INOUE,T., HIRABAYASHI,Y., KANISAWA,M., et al - Haemopoietic spleen colony formation in the rat: Effect of ⁸⁹SR-induced bone marrow aplasia- *J. Comp. Pathol.*, 1994, **110**, 195-205.
- 72 JAIN,N.C.- *Essentials of veterinary hematology* -Philadelphie: Lea and Febiger, 1993- Chap 1, 7-77 , Chap 3, 55-71, Chap 4, Chap12, 288-298.
- 73 JAIN,N.C.- *Schalm's veterinary hematology* - 4^{ème} Edition-Philadelphie: Lea and Febiger, 1986- 25-27, 91-94, 383, 518.
- 74 KARIMUNGI,M.G., JOSHI,B.N.- Diurnal sensitivity in melatonin-induced hematological changes in the male albino rat- *Biol. Signals.*, 1996, **5**, 283-290.
- 75 KAWAMURA,S., YOSHIOKA,T., KATO,T. et al.- Histological changes in rat embryonic blood cells as a possible mechanism for ventricular septal defect produced by an N-Phenylimide herbicid- *Teratology*, 1996, **54**, 237-234.
- 76 KIMURA,H., FINCH,C.A., ADAMSON,J.W. - Hematopoiesis in the rat: quantitation of hematopoietic progenitors and the response to iron deficiency anemia- *J. Cell. Physiol.*,1986, **126**, 298-306.
- 77 KOCIBA,R.J., KOCIBA, G.J.- Assessment of toxicologic effects upon bone marrow and related tissues- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*-Springer Verlag - 1990, 79-87.
- 78 KOZMA,C.K., WEISBROTH,S.H., STRATMAN,S.L., CONEJEROS,M.- Normal biological values for Long-Evans rats- *Lab. Anim. Care.*, 1969, **19**, 5, 746-755.
- 79 KRAUS,A.L.- Research methodology- In BAKER,H.J., LINDSEY,J.R., WEISBROTH,S.H. - *The Laboratory Rat Vol 2*- Academic Press- 1980- Chap 1, 5-19.
- 80 KREIER,J.P., HALL,L.- The relationship of parasitemia to the life span of erythrocytes of rats infected with *Hemobartonella muris*- *J. Infect. Dis.*, 1968, **118**, 5, 443-448.
- 81 KUHN,G., HARDEGG,W.- Quantitative studies of haematological values in long-term ovariectomized, ovariohysterectomized and hysterectomized rats- *Lab. Anim.*, 1991, **25**, 1, 40-45.
- 82 KUPER,C.F., BEEMS,R.B., HOLLANDERS,V.M.H.- Development and aging, Thymus, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*-Springer Verlag - 1990, 257-262.
- 83 KURATA,M., MISAWA,K., NOGUCHI,N., et al - Effect of blood collectionimitating toxicokinetic study on rat hematological parameters- *J. Toxicol. Sci.*, 1997, 22, 3, 231-238.
- 84 KUSEWITT,D.F., HAHN,F.F., PICKRELL,J.A.- Hematologic and serum chemical characteristics of mononuclear leukemia in Fisher 344 rats- *Lab. Anim. Sci.*, 1982, **32**, 3, 275-277.
- 85 KUTER,D.J., ROSENBERG,R.D.- Regulation of megakaryocyte ploidy in vivo in the rat- *Blood*, 1990, **75**, 1, 74-81.

- 86** KUWAHIRA,I., KAMIYA,U., IWAMOTO,T., et al - Splenic contraction-induced reversible increase in hemoglobin concentration in intermittent hypoxia- *J. Appl. Physiol.*, 1999, **86**, 1, 181-187.
- 87** LABORDE,J.B., WALL,K.S., BOLON,B., et al - Haematology and serum chemistry parameters of the pregnant rat- *Lab. Anim.* , 1999, **33**, 3, 275-287.
- 88** LAROCHE,M.J., ROUSSELET,F.- *Les animaux de laboratoire. Ethique et bonnes pratiques*- Masson- 1990- Chap 7,167-187.
- 89** LEONARD, R., RUBEN,Z.- Hematology reference values for peripheral blood of laboratory rat -*Lab. Anim. Sci.*, 1986, **36**, 3, 277-281
- 90** LIKOVSKY,Z., SMETANA,K.- Asymmetric mitoses revealed by AgNORs in developing rat blood cells- *Life. Sci.*,1995, **56**, 10, 729-734.
- 91** LIU,J.Y., DIAZ III,T.G., VADGAMA,J.V., HENRY,J.P.- Tail sectioning: a rapid and simple method for repeated blood sampling of the rat for corticosterone determination- *Lab. Anim. Sci.*, 1996, **46**, 2, 243-245
- 92** LOMAX,L.G., KEYES,D.G., KOCIBA,R.J.- Extramedullary hemopoiesis, Spleen, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*-Springer Verlag - 1990, 232-235.
- 93** LOSCO,P.E., WARD,J.M.- The early stage of large granular lymphocyte leukemia in the F344 rat- *Vet. Pathol.*, 1984, **21**, 286-291.
- 94** LOVELL,D.P., ARCHER,R.K., RILEY,J., MORGAN,R.K.- Variations in haematological parameters among inbred strains of rat- *Lab. Anim.*, 1981, **15**, 243-249.
- 95** MacKENZIE,W.F., EUSTIS,S.L.-Bone marrow- In: BOORMAN, EUSTIS, ELWEL, MONTGOMERY Jr, Mac KENZIE- *Pathology of the Fisher rat: reference and atlas*- Academic Press-1990- Chap 23, 395-403.
- 96** MARIT,G.B., YOUNG,S.M., HADICK,C.L.- Anatomic and physiologic characterisation of the WF/PmWp-"fz" (fuzzy) rat - *Lab. Anim.Sci.*, 1998, **45**, 2, 184-190.
- 97** MATSUDA,H., TANAKA,A., IKATURA,A;- Immunology and Hematology- In: KRINKE,G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal*-Academic press- 2000, Chap 22, 439-445.
- 98** MATSUZAWA,T., NOMURA,M., UNNO,T.- Clinical pathology reference ranges of laboratory animals- *J. Vet. Med Sci.*, 1993, **55**, 3, 351-362.
- 99** MITRUKA,B.M., RAWNSLEY,H.M.- *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals*-New-York: Masson pub. USA,1977- pages 3, 23-24, 41-57, 71-75.
- 100** MORI,K., INOUE,N., FUJISHIRO,K., et al - Biochemical changes in rat erythrocytes caused by ethylene oxide exposure- *Fundam. Appl. Toxicology*, 1990, **15**, 441-447.
- 101** MUTAI,M;- National and international guidelines for the conduct of chemical safety studies: choice of strain- In: KRINKE,G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal*-Academic press- 2000, Chap 2, 17-27.
- 102** OISHI,K., YOKOI,M., MAEKAWA,S., et al - Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats- *Acta. Physiol. Scand.*, 1999, **165**, 65-69.

- 103** OTTOLENGHI,A., BARNETT,H.D.- The effect of drugs on the eosinophilic leukocyte population of rat tissue. I. Dexamethasone.- *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 1974, **189**, 2, 303-311.
- 104** OTTOLENGHI,A., BARNETT,H.D.- The effect of drugs on the eosinophilic leukocyte population of rat tissue. II. Cyclophosphamide.- *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1974, **189**, 2, 312-316.
- 105** OU,L.C., CHEN,J., FIORE,E., et al - Ventilatory and hematopoietic responses to chronic hypoxia in two rat strains- *J. Appl. Physiol.*, 1992, **72**, 6, 2354-2363.
- 106** OYEWALE, J.O.- Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH- *J.Vet.Med. A.*, 1992, **39**, 2, 98-104.
- 107** OYEWALE, J.O.- Effect of storage of blood on the osmotic fragility of mammalian erythrocytes- *J.Vet.Med. A.*, 1993, **40**, 258-264.
- 108** PALM, M., SAAD, A.,LUNDBLAD, A., et al - Total nucleated cell count in bone marrow from rats- *Revue de Médecine Vétérinaire* , 2000, **151**,7, 751.
- 109** PAVLOVIC-KENTERA,V., BASARA,N., BILJANOVIC-PAUNOVIC,L., VASILJEVSKA,M.- Erythroid progenitors in anemic Belgrade laboratory (b/b) rats- *Exp. Hematol.*, 1989, **17**, 815-812.
- 110** PILIERO, S.J.- The interrelationships of the endocrine and hemopoietic system in the Long-Evans rat- *Lab. Anim. Care*, 1969, **19**, 5, 703-709.
- 111** PIROSO,E., ERSLEV,A.J., FLAHARTY,K.K., CARO,J.- Erythropoietin life span in rats with hypoplastic and hyperplastic bone marrow- *Am. J. Hematol.y*, 1991, **36**, 105-110.
- 112** PITMAN,D.L., NATELSON,B.H., PITMAN,J.B., et al- A methodological improvement for experimental control and blood sampling in rats- *Physiol. Behav.*, 1989, **45**, 205-208.
- 113** POPOVIC,Z.B., RAJIC,N.V., SAVKOVIC,S.D., GLISIN,V.R.- The "b" mutated gene in heterozygous Belgrade anaemic rat- *Exp. Hematol.*, 1993, **21**, 21-24.
- 114** POPP,J.A.- Fibrosarcoma, spleen, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*-Springer Verlag - 1990, 216-219.
- 115** RAO,G.N.,BOORMAN,G.A.- History of the Fisher Rat- In: BOORMAN, EUSTIS, ELWEL, MONTGOMERY Jr, Mac KENZIE- *Pathology of the Fisher rat: reference and atlas*- Academic Press-1990-Chap 2, 5-7.
- 116** RAO,J., JAGADEESAN,V.- Development of rat model for iron deficiency and toxicological studies: comparison among Fisher 344, Wistar, and Sprague-Dawley strains- *Lab. Anim. Sci.*, 1995, **45**, 4, 393-397.
- 117** REDONDO,P.A., ALVAREZ,A.I., DIEZ,C., et al - Physiological response to experimentally induced anemia in rats : a comparative study- *Lab. Anim. Sci.*, 1995, **45**, 5, 578-583.
- 118** RENAUD, S.- Jugular vein technique for blood collection and intravenous injection in the rat- *Lab. Anim.Care.*, 1969, **19**, 5, 664-665.
- 119** RINGLER,D.H., DABICH,L.- Hematology and biochemistry- In: BAKER,H.J., LINDSEY,J.R., WEISBROTH,S.H.- *The Laboratory rat , Volume I*- Academic Press-1979, Chap 5, 105-121.

- 120** RIVERA,M., LEON-VELARDE,F., HUICHO,L., MONGE,C.- Bone marrow oxygen consumption and erythropoiesis in chronically hypoxic rats- *Life. Sci.*, 1994, **55**, 13, 1027-1032.
- 121** ROBEL,G.L., LOCHMILLER,R.L., McMURRY,S.T., QUALLS,C.W.- Environmental, age, and sex effects on Cotton rat (*Sigmodon Hispidus*) hematology- *J. Wild. Dis.*, 1996, **32**, 2, 390-394.
- 122** ROLOVIC,Z., BASARA,N., PAVLOVIC-KENTERA,V., et al - Letter to the Editor: The extent of anemia in Belgrade (b/b) rat- *Exp. Hematol.y*, 1993, **21**, 1401-1402.
- 123** SACHS,L.- The molecular control of blood cell development- *Science*, 1987, **238**, 1374-1379
- 124** SAINI,M., DASH,S., NAGPAUL,J.P.- Hematological alterations in propylene glycol-dosed female rats are minimal- *Vet. Hum. Toxicol.*, 1996, **38**, 2, 81-87.
- 125** SCHWARTZ,E., TORNABEN,J.A.,BOXILL,G.C.- The effects of food restriction on hematology, clinical chemistry and pathology in the albino rat- *Toxicol. Appl.Pharmacol.*, 1973, **25**, 515-524.
- 126** SCIPIONI,R.L.,DITERS,R.W., MYERS,W.R., HART,S.M.- Clinical and clinicopathological assessment of serial phlebotomy in the Sprague-Dawley rat-*Lab. Anim. Sci.*,1997, **47**, 3, 293-299
- 127** SEI,A.- Experimental Rhazya Stricta toxicosis in rats- *Vet Human Toxicol*, 1999, **41**, 1, 5-8.
- 128** SMITH,C.N., NEPTUN,D.A., IRONS,R.D.- Effect of sampling site and collection method on variations in baseline clinical pathology parameters in Fisher-344 rats: II. Clinical hematology- *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1986, **7**, 658-663.
- 129** SNITILY,M.U., GENTRY,M.J., MELLENCAMP,M.A., PREHEIM,L.C.- A simple method for collection of blood from the rat foot- *Laboratory Animal Science*, 199&, 41, 3, 285-287.
- 130** SQUIRE,R.A.- Histiocytic sarcoma, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*- Springer Verlag - 1990, 54-58.
- 131** STEFANSKI,S.A., ELWELL,M.R., STROMBERG,P.C.-Spleen, lymph node, and thymus- In BOORMAN, EUSTIS, ELWEL, MONTGOMERY Jr, Mac KENZIE- *Pathology of the Fisher rat: reference and atlas*- Academic Press-1990-Chap 22, 369-393.
- 132** STOJANOVIC,N., JOVCIC,G., BASARA,N., PAVLOVIC-KENTERA,V.- Granulopoiesis in anemic Belgrade laboratory (b/b) rats- *Exp. Hematol.*, 1990, **18**, 379-383.
- 133** STROMBERG,P.C.- Large granular lymphocyte leukemia, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*-Springer Verlag - 1990, 194-198.
- 134** STROMBERG,P.C., KOCIBA, G.J., GRANTS,I.S., et al- Spleen cell poulation changes and hemolytic anemia in F344 rats with large granular lymphocyte leukemia- *Vet. Pathol.*, 1990, **27**, 397-403
- 135** STROMBERG,P.C., VOGTSBERGER,L.M.- Pathology of the mononuclear cell leukemia of Fisher rats. I. Morphologic studies- *Vet. Pathol.*, 1983, **20**, 698-708.

- 136** STROMBERG,P.C., VOGTSBERGER,L.M., MARSH,L.R., WILSON,F.D.- Pathology of the mononuclear cell leukemia of fisher rats: II. Hematology- *Vet. Pathol.*, 1983, **20**, 709-717.
- 137** SUBER,R.L., KODELL,R.L.- The effect of three phlebotomy techniques on haematological and clinical chemical evaluation in Sprague-Dawley rats- *Veterinary Clinical Pathology*, 1985, **14**, 1, 23-30.
- 138** TAVASSOLI,M., MANIATHS,A., BINDER,R.A., CROSBY,W.H.- Studies on marrow histogenesis. II; Growth characteristics of extramedullary marrow autotransplants- *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1971, **138**, 868-870.
- 139** TVEDTEN,H.W., WILKINS,R.J.-Automated blood cell counting systems: a comparison of the coulter S-Plus IV, Ortho ELT-8/DS, Ortho ELT-8/WS, Technicon H-1, and Sysmex E-5,000- *Veterinary Clinical Patholog*, 1988, **17**, 2, 47-54.
- 140** UBEDA,A., DIAZ-ENRIQUEZ,M., MARTINEZ-PASCUAL,M.A., PARRENO,A.- Hematological changes in rats exposed to weak electromagnetic fields- *Life. Sci.*, 1997, **61**, 17, 1651-1656.
- 141** ULICH,T.R., DEL CASTILLO,J.- The hematopoietic and mature blood cells of the rat: their morphology and the kinetics of circulating leukocytes in control rats- *Exp. Hematol.*, 1991, **19**, 639-648.
- 142** VALLI,V.E., VILLENEUVE,D.C., REED,B., BARSOUM,N., SMITH,G.- Evaluation of blood and bone marrow, Rat- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*- Springer Verlag - 1990, 9-26.
- 143** VAN HERCK,H., BAUMANS,V., BRANDT,C.J.W.M. - Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise- *Lab.Anim.* 1998, **32**, 377-386.
- 144** VAN HERCK,H., BAUMANS,V., VAN DER CRAATS,N.R. et al - Histological changes in the orbital region after orbital puncture- *Lab. Anim.*, 1992, **26**, 53-58.
- 145** WARD,J.M.- Classification of reactive lesions, Spleen- In: JONES, WARD, MOHR, HUNT- *Hemopoietic system*- Springer Verlag - 1990, 220-226.
- 146** WEINGAND, K.W., ODIOSO, L.W., LAYTART, M.J.- Hematology analyser comparison: Ortho ELT-8/ds vs baker 9000 for healthy dogs,mice and rats - *Veterinary Clinical Pathology*, 1992, **21**, 10-14.
- 147** WEISBROTH,S.H.- The origin of the Long-Evans rat and a review of the inheritance of coat colors in rats (*rattus norvegicus*)- *Lab. Anim.Care*, 1969, **19**, 5, 733-737.
- 148** WEISER, M.G. - Modification and evaluation of a multichannel blood cell counting system for blood analysis in veterinary hematology- *J. Am.Vet. Med. Assoc*, 1987, **190**, 4, 411-415.
- 149** WEISS,J., TAYLOR,G.R., ZIMMERMANN,F., NEBENDAHL,K.- Collection of body fluids- In: KRINKE,G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal*-Academic press- 2000, Chap 25, 485-495.
- 150** WOLFENSOHN,S., LLOYD,M.- *Handbook of laboratory animal: Management and Welfare* -2nd Edition- 1998, section 2, 179-184.
- 151** WOLFORD,S.T., SCHROER,R.A., GALLO,P.P, et al - Age-related changes in serum chemistry and hematology values in normal Sprague-Dawley rats- *Fundam. Appl. Toxicol.* , 1987, **8**, 80-88.

- 152** WOLFORD,S.T., SCHROER,R.A., GOHS,F.X., et al - Reference data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals- *J. Toxicol. Environ. Health*, 1986, **18**, 161-188
- 153** WRIGHT,J.R., YATES,A.J., SHAH,N.T.,et al ..., THIBERT,P.- Hematological characteristics of the BB Wistar rat- *Veterinary Clinical Pathology*,1983, **12**, 1, 9-13..
- 154** WU,A.M., TILL, J.E., SIMINOVITCH,P.D.L., et al - Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system- *J. Exp. Med.*, 1968, **127**, 1, 455-463.
- 155** YAMATE, J., TAJIMA, M., SHIBUYA, K., et al - Heterogeneity in the origin and immunophenotypes of "histiocytic" cells in transplantable rat malignant fibrous histiocytoma- *J. Vet. Med. Sci.*, 1996, **58**, 7, 603- 609.
- 156** ZELLER,W., WEBER,H., PANOUSSIS,B., et al - Refinement of blood sampling from the rat sublingual vein of rats- *Lab. Anim.*, 1998, **32**, 369-376.
- 157** ZUCKER,R.M., ELSTEIN,K.H., SHUEY,D.L., ROGERS,J.M.- Flow cytometric detection of abnormal fetal erythropoiesis: application to 5-Fluorouracil-induced anemia- *Teratology*, 1995, **51**, 37, 37-44.

RÉFÉRENCES ÉLECTRONIQUES

- 158** CRL- Baseline haematology and clinical chemistry values for Charles River Wistar rats CRL:(WI)BR as a function of sex and age -*CRL Technical Bulletin*[online] Vol 1, Num 2 [oct 1982]; pages consultées le 13/04/01- accessible par internet:
http://www.criver.com/techdocs/82oct_tb/t82tab01.htm
http://www.criver.com/techdocs/82oct_tb/t82tab02.htm
- 159** FDA/CFSAN/OPA (US Food and drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition)- Toxicological Principles for the safety of food ingredients: IV.C.1.d. Mammalian Erythrocyte Micronucleus test - *Redbook 2000* [online] - July 2000 – pages consultées le 20/08/01- accessible par internet:
<http://vm.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1d.html>
- 160** EPA: United State Environmental Protection Agency : Prevention Pesticides and Toxic Substances - OPPTS 870.5395 In vivo mammalian cytogenetics test, erythrocytes micronucleus assay - *Health Effects Test Guideline*- [online] june 1996 - consulté le 01/07/01- accessible par internet:
<http://altweb.jhsph.edu/science/regs/EPA/5395\cytogen.htm>

Toulouse 2001

NOM : DESCAT

PRENOM : Fleur

TITRE : **Hématologie du rat : hémogramme et myélogramme.**

RESUME :

Le rat, *Rattus norvegicus*, rongeur de laboratoire consacré comme modèle expérimental dans de nombreux domaines de la recherche biomédicale, présente des caractéristiques hématologiques qualitatives et quantitatives particulières.

La détermination de valeurs chiffrées de référence est toutefois délicate parce qu'il existe de très nombreux facteurs de variations physiologiques dépendant non seulement des qualités intrinsèques du sujet étudié mais aussi des techniques de prélèvements sanguins ou médullaires. En se limitant volontairement à l'étude de l'hémogramme et du myélogramme, ce document expose donc, après une brève présentation de l'espèce, les différentes méthodes d'étude, les caractéristiques morphologiques des cellules sanguines et hématopoïétiques ainsi que les valeurs usuelles des différents paramètres chiffrés et leurs principales variations physiologiques. Dans une dernière partie, sont également présentés quelques exemples variés de perturbations, spontanées ou provoquées, des paramètres sanguins et médullaires du rat.

MOTS-CLES : HEMATOLOGIE – RAT – HEMOGRAMME – MYELOGRAMME.

ENGLISH TITLE : Hematology of the rat: hemogram and myelogram.

ABSTRACT :

The rat, *Rattus norvegicus*, is a laboratory rodent commonly used as an experimental model in many fields of biomedical research. This animal display special quantitative and qualitative haematological characteristics.

Determining detailed reference values is however difficult because of the existence of many factors of physiological variations depending not only on intrinsic properties of the studied animal but also on the technique of blood or bone marrow sampling.

After a brief presentation of the specie, this document, intentionally limited to the hemogram and myelogram, explains the different methods of study, the morphological characteristics of the blood and haematopoietic cells as well as the common values of the different parameters with indication of their main physiological variations. Various examples of spontaneous or induced disruption of blood and bone marrow parameters are also provided in the forth part.

KEY WORDS : HEMATOLOGY – RAT – HEMOGRAM – MYELOGRAM.