

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 32307 B1** (51) Cl. internationale : **G01N 33/72; G01N 33/569**

(43) Date de publication :
02.05.2011

(21) N° Dépôt :
33352

(22) Date de Dépôt :
12.11.2010

(30) Données de Priorité :
20.05.2008 FR 08/02729

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/FR2009/000593 20.05.2009

(71) Demandeur(s) :
BH HOLDINGS, ZI Le Chêne Vert F-35650 Le Rheu (FR)

(72) Inventeur(s) :
BOUCHER, Patricia ; HERMAN, Jean-Pierre

(74) Mandataire :
SABA & CO

(54) Titre : **PROCEDE DE DETERMINATION DU TAUX D'HEMOGLOBINE , DE NUMERATION ET DE DIFFERENCIATION DES GLOBULES BLANCS ET MILIEU ADAPTE**

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de détermination, dans un échantillon sanguin, du taux d'hémoglobine, de numération et de différenciation des globules blancs, comprenant les étapes suivantes : On dispose de l'échantillon sanguin dans un milieu isotonique ou hyperosmolaire, à un pH n'excédant pas 10, en l'absence d'ions cyanure et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et un agentconservateur, On détecte le complexe formé entre l'hémoglobine et les groupes d'ammonium quaternaire, par spectrophotométrie, et On dénombre les globules blancs et on les différencie en au moins trois sous-populations, ledit procédé étant réalisé en l'absence de tout autre ligand. L'invention concerne aussi un milieu pour mettre en Suvre le procédé.

Abrégé:

L'invention concerne un procédé de détermination, dans un échantillon sanguin, du taux d'hémoglobine, de numération et de différenciation des globules blancs, comprenant les étapes suivantes : On dispose de l'échantillon sanguin dans un milieu isotonique ou hyperosmolaire, à un pH n'excédant pas 10, en l'absence d'ions cyanure et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et un agentconservateur, On détecte le complexe formé entre l'hémoglobine et les groupes d'ammonium quaternaire, par spectrophotométrie, et On dénombre les globules blancs et on les différencie en au moins trois sous-populations, ledit procédé étant réalisé en l'absence de tout autre ligand. L'invention concerne aussi un milieu pour mettre en œuvre le procédé.

(TREIZE PAGES)**BH HOLDINGS
SABA & CO., Casablanca**

02 MAI 2011

**PROCEDE DE DETERMINATION DU TAUX D'HEMOGLOBINE, DE
NUMERATION ET DE DIFFERENCIATION DES GLOBULES BLANCS ET
MILIEU ADAPTE**

L'invention concerne un procédé et un milieu de réaction pour, à la
5 fois, déterminer, sans produit toxique tel que le cyanure, le taux d'hémoglobine,
dénombrer et différencier les globules blancs (GB) sur une même dilution d'un
échantillon sanguin.

Les méthodes traditionnelles de mesure de l'hémoglobine
reposaient sur la détection en spectrophotométrie à 540 nm, d'un complexe
10 chromogène formé entre des ions cyanures et l'hémoglobine sous une forme
oxydée, la méthémoglobine. L'échantillon sanguin à analyser était exposé à un
milieu de réaction aqueux contenant des sels de cyanure (cyanure de
potassium) et des sels de ferricyanure (ferricyanure de potassium ou de
sodium). En milieu aqueux, les globules rouges (GR) sont lysés, l'hémoglobine
15 est oxydée en méthémoglobine (aussi appelée hémoglobine) par les ions
ferricyanure et cyanures, lesquels possèdent une forte affinité vis-à-vis de
l'hème ; ils sont des ligands de l'hème de la méthémoglobine en formant un
complexe cyanméthémoglobine, dont le maximum d'absorbance est à 540nm.
La mesure de l'hémoglobine est faite par spectrophotométrie.

20 Par la suite, pour accélérer la lyse des GR, un sel d'ammonium
quaternaire a été ajouté en faible concentration au milieu réactionnel. On s'est
cependant heurté à un problème d'agglutination des complexes formés entre
les ions ferrocyanures et les groupes ammonium quaternaire ; ces agglutinats
présentent une turbidimétrie qui gêne la mesure photométrique de
25 l'hémoglobine. Pour cette raison, les sels de ferricyanure ont été abandonnés,
alors que le sel de cyanure est conservé.

Des automates ont été développés pour analyser rapidement
l'hémoglobine, le nombre de GR et de GB dans les échantillons sanguins. Les
milieux de réaction ont dû aussi évoluer parallèlement ; pour compter les GR et
30 les GB, on est passé d'un diluant aqueux à un diluant isotonique ou faiblement
hyperosmolaire. Dans ces conditions, il a été nécessaire d'augmenter la
concentration en ammonium quaternaire pour lyser les GR.

Ces techniques présentent l'inconvénient majeur d'impliquer des
ions cyanure, toxiques.

35 Des méthodes ne nécessitant plus d'ions cyanure ont été mises au
point.

I. Oshiro et al. Clin. Biochem. 15(1) 83-88 (1982), proposent un procédé de détermination du taux d'hémoglobine dans un échantillon sanguin, mettant en jeu du lauryl sulfate de sodium (SLS), en l'absence de tout ion cyanure. Le SLS mis au contact de l'échantillon provoque l'hémolyse des GR, entraîne la conversion de l'hémoglobine en méthémoglobine par oxydation de l'atome de fer. Le complexe stable formé est détecté en spectrophotométrie d'absorption. Le SLS, même aux concentrations les plus faibles indiquées, provoque une lyse de l'ensemble des cellules, y compris des GB qui sont réduits à l'état de noyaux. Cette méthode utilise une forte dilution qui ne permet pas le comptage des GB avec une imprécision acceptable pour un temps de comptage limité. En outre le dénombrement différentiel n'est pas accessible.

Le document US5468640A décrit un procédé rapide de détermination du taux d'hémoglobine, dans un échantillon sanguin, selon lequel on met ledit échantillon au contact d'un milieu de réaction, à un pH de 11,3-13,7, comprenant un tensioactif ionique, également exempt de tout ion cyanure. Soit le tensioactif est aussi une base forte, comme l'hydroxyde de stéaryltrialkylammonium, et il confère le pH requis au milieu, soit il n'est pas une base forte, par exemple le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), et une base forte doit être ajoutée, par exemple un hydroxyde de métal alcalin. Après hémolyse des GR par le tensioactif, l'action de ce dernier et de celle de la base forte entraînent la dénaturation de l'hémoglobine, l'exposition des hèmes de l'hémoglobine à l'oxygène de l'air provoquant l'oxydation de l'atome de fer. Le complexe formé entre les hèmes ferriques et les ions hydroxyde est détecté en spectrophotométrie d'absorption. Comme le procédé précédemment décrit, cette méthode ne permet pas de déterminer la différenciation des GB, car les conditions drastiques provoquent inévitablement leur lyse à l'état de noyaux.

Le document US6740527A divulgue un procédé de détermination du taux d'hémoglobine d'un échantillon sanguin, toujours dépourvu d'ion cyanure, qui permet en outre de donner une numération des GB. L'échantillon est d'abord dilué, puis mis en contact avec un milieu de réaction qui comprend un agent de lyse consistant en 0,1-20% en poids d'au moins un sel d'ammonium quaternaire et 0,1-15% en poids d'un sel d'hydroxylamine. Cette méthode permet de mesurer le taux d'hémoglobine et de dénombrer les GB, mais il ne permet pas de différencier ces derniers.

Déterminer le taux d'hémoglobine, le nombre de GB et la différenciation des GB avec un seul agent de lyse sur un analyseur automatique d'hématologie permettrait de réduire le nombre de réactifs utilisés et de simplifier l'organisation fluide de l'analyseur. Ce sont des facteurs de robustesse du système et de réduction des coûts de fabrication et de fonctionnement.

Les auteurs de la présente invention ont découvert, contre toute attente, que la seule présence d'un ou de plusieurs sels d'ammonium quaternaire était suffisante pour lyser les GB et stabiliser la mesure de l'hémoglobine par fixation des groupes d'ammonium quaternaire sur l'hème. Il(s) suffi(s)ent donc pour déterminer le taux d'hémoglobine, dénombrer les globules blancs et différencier ces derniers, dans un échantillon sanguin, en l'absence de tout autre agent de lyse et autre ligand de l'hème de l'hémoglobine.

Ainsi, l'invention apporte un procédé simple, exempt de produit toxique, permettant, dans le même échantillon sanguin, à la fois de déterminer le taux d'hémoglobine, et de dénombrer et différencier les GB. Ce procédé met en jeu les techniques de lecture et de mesure classiquement employées dans le domaine de la formulation sanguine et n'implique aucune entité chimique toxique, comme les ions cyanures et les sels d'hydroxylamine, par exemple.

Le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

On dispose de l'échantillon sanguin dans un milieu isotonique ou hyperosmolaire, à un pH n'excédant pas 10, dépourvu d'ions cyanure, et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et au moins un agent conservateur,

On détecte le complexe formé entre l'hémoglobine et les groupes d'ammonium quaternaire, par spectrophotométrie, et

On dénombre les GB et on les différencie en au moins trois sous populations,

ledit procédé étant réalisé en l'absence de tout autre ligand que ledit ou lesdits sels d'ammonium quaternaire.

Le milieu dans lequel est l'échantillon sanguin est classiquement préparé en une ou deux étapes ; en une étape, les ingrédients constitutifs des milieux diluant et de lyse et l'échantillon sanguin sont mélangés en une étape ; en deux étapes, l'échantillon sanguin est placé dans le milieu diluant, puis le milieu ainsi obtenu et le milieu de lyse sont mélangés.

Par milieu isotonique ou hyperosmolaire, on entend un milieu de préférence isotonique ou légèrement hyperosmolaire, pour éviter toute contraction excessive des GB qui générerait leur différenciation.

Pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, le ou les sels d'ammonium quaternaire répondent avantagement aux caractéristiques suivantes, considérées seules ou en combinaison :

Le ou les sels d'ammonium quaternaire sont choisis parmi les composés de formule (I) $NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$, dans laquelle

R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes de carbone,

R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH, CH_3SO_4 et PO_4 .

R1 peut représenter une chaîne hydrocarbonée ayant de 10 à 18 atomes de carbone et alors le ou lesdits sels sont de préférence choisis parmi les sels de dodécyltriméthylammonium, de myristyltriméthyl ammonium, de palmityltriméthyl ammonium et de stéaryltriméthylammonium.

R1 peut aussi représenter une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et le ou lesdits sels sont de préférence choisis parmi les sels de tétraéthyl ammonium.

Bien entendu, selon l'invention, ledit milieu peut comprendre plusieurs sels d'ammonium quaternaire, en particulier plusieurs sels de formule (I), et par exemple un ou des sels de formule (I) où R1 est une chaîne en C10-C18 et/ou un ou des sels de formule (I) où R1 est une chaîne en C1-C6.

Des sels particulièrement adaptés sont choisis parmi le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de dodécyltriméthyl ammonium et l'hydroxyde de tétraéthylammonium, employés seuls ou en mélange.

Par rapport au poids du milieu, la proportion du ou des sels d'ammonium quaternaire varie de 2 à 4% en poids.

Comme dit précédemment, le milieu comprend un ou des agents conservateurs. Cet ou ces agents contribuent à une optimisation de chacune des étapes dudit procédé, mais tout particulièrement à celle de la différenciation des GB. Cet ou ces agents sont notamment des agents bactériostatiques de préférence choisis parmi le diméthylurée et le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium.

Le milieu peut en outre contenir d'autres ingrédients :
un agent stabilisateur, par exemple l'acide éthylène diamine tétra
acétique (EDTA),

au moins un tensioactif non ionique, tel que le Triton®.

5 Les ingrédients ci-dessus ne sont pas indispensables à la mise en œuvre du procédé, ils vont en permettre l'optimisation.

Le taux d'hémoglobine peut être mesuré par les techniques classiques de spectrophotométrie. Le dénombrement des GB est effectué par une méthode elle aussi classique basée par exemple sur le principe
10 d'impédance qui, selon le procédé de l'invention, permet aussi de différencier les GB en au moins les trois sous-populations suivantes : les lymphocytes, les cellules monocytaires (autres que les lymphocytes) et les granulocytes.

Selon une variante du procédé de l'invention, le milieu contient au moins un sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1
15 représente une chaîne hydrocarbonée de 12 atomes de carbone et un autre sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 14 atomes de carbone. Dans ces conditions, et associées à une méthode biparamétrique d'impédance et de mesure laser aux
20 grands angles, elle aussi classique, on peut différencier au moins les quatre sous-populations suivantes : les lymphocytes, les monocytes, les granulocytes éosinophiles et les granulocytes neutrophiles.

Le milieu peut aussi comprendre jusqu'à trois sels d'ammonium quaternaire, voire plus.

Selon une mise en œuvre préférée du procédé, l'échantillon
25 sanguin est dilué en milieu légèrement hyperosmolaire et tamponné à pH neutre. Un pH supérieur à 10 provoque une lyse partielle des GB empêchant leur comptage différentiel.

L'invention concerne aussi un milieu pour la détermination du taux
30 d'hémoglobine et pour le dénombrement et la différenciation des globules blancs, ledit milieu étant exempt d'ions cyanure, et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et un agent conservateur, ledit milieu étant dépourvu de tout autre agent ligand que le ou lesdits sels. Ainsi, le milieu selon l'invention comprend un agent de lyse qui consiste en un ou des sels
35 d'ammonium quaternaire, ce ou ces derniers constituant le ou les seuls agents ligands se fixant à l'hème de l'hémoglobine.

Ce ou ces sels sont avantageusement choisis parmi les composés de formule I, $NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$ dans laquelle

R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes de carbone

5 R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH, CH_3SO_4 et PO_4 .

10 Ce milieu est avantageusement celui décrit précédemment et en présente les mêmes caractéristiques, considérées seules ou en combinaison.

Un milieu préféré comprend les sels d'ammonium quaternaire suivants : le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de dodécyltriméthyl ammonium, l'hydroxyde de tétraéthylammonium. Avantageusement, la proportion du bromure de myristyltriméthyl ammonium

15 varie de 20-40 g/L, celle du chlorure de dodécyltriméthyl ammonium de 1-10 g/L et celle de l'hydroxyde de tétraéthylammonium de 1-5 g/L.

Il peut en outre comprendre au moins, à titre d'agent conservateur, un agent bactériostatique de préférence choisi parmi le diméthylurée et le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium. La proportion de diméthylurée y varie de 1-

20 10 g/L et celle du le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium de 1-10 g/L.

Il peut encore comprendre un agent stabilisateur, tel que l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), dont la proportion varie de préférence de 1-10 g/L.

25 Les objets de l'invention sont exposés plus en détails et illustrés dans les exemples ci-après.

Exemple 1 : formulation d'un milieu selon l'invention

Le milieu approprié comprend un diluant et un agent de lyse et de réaction, comme suit :

30 En tant que diluant, une solution aqueuse composée de :
un tampon organique phosphate, par exemple hydrogénophosphate de sodium ou phosphate disodique anhydre
un stabilisateur des membranes, par exemple chlorure ou sulfate de sodium

35 des agents bactériostatiques, par exemple diméthylurée et 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium

un agent stabilisant par exemple EDTA disodique (EDTA.Na₂)
et en tant qu'agent de lyse, une solution aqueuse composée de :
un mélange de bromure de myristyltriméthyl ammonium, chlorure
de dodécyltriméthyl ammonium et hydroxyde de tétraéthylammonium,
5 Triton[®], en tant que tensioactif non ionique,
chlorure de sodium en tant que stabilisateur des membranes,
identique ou différent de celui du diluant, et
l'eau désionisée.

Le diluant a une osmolarité comprise entre 320-360 mOsm/Kg à pH
10 neutre et l'agent de lyse a un pH de 10,5 +/- 0.4. Le milieu réactionnel obtenu a
un pH proche de 8.

Exemple 2 : mise en œuvre du procédé sur un analyseur dit « 3
populations »

15 **Préparation de l'échantillon sanguin :**

Environ 16 µl de sang sont prélevés du tube où l'échantillon a été
recueilli. L'aiguille est rincée intérieurement et extérieurement avec du diluant,
au-dessus de la cuvette de rinçage. Ensuite, 3,5 ml du diluant décrit à
l'exemple 1 sont ajoutés pour obtenir une première dilution (1/219). Une
20 seconde dilution est faite avec 31,2µl de cette première dilution et 4ml du
diluant (1/128). Les dilutions sont transférées par vide vers les chambres de
comptage. Pendant la dilution des GR, 0,41 ml d'agent de lyse est ajouté à la
première dilution dans la chambre de comptage des GB. La dilution finale est
25 d'environ 1/244 pour les GB et de 1/28200 pour les GR/Plaquettes. Une fois les
transferts effectués, les cuvettes de dilution sont remplies de diluant pour les
rincer.

Comptages :

Une séquence de comptage est effectuée comme suit :

180µl de la première dilution sont mesurés volumétriquement pour
30 dénombrer les GB alors que 100µl environ de la seconde dilution sont mesurés
pour les GR/Plaquettes.

Le volume de la dilution des GB est contrôlé par deux barrières
optiques dans un tube volumétrique. Pendant le comptage volumétrique, les
données sont réparties dans 4 tables de 2 secondes chacune pour une
35 utilisation statistique.

Le comptage GR/Plaquettes débute avec le comptage des GB et s'arrête exactement après 8 secondes.

Différenciation en trois populations de GB :

5 Les différentes sous-populations de GB sont différenciées sur des critères de taille en contrôlant les conditions de lyse (diluant, agent de lyse, temps d'action). Quand ces conditions sont réunies, la réaction chimique qui s'effectue permet de distinguer trois populations de GB : les lymphocytes, les granulocytes et les cellules de taille moyenne (basophiles + monocytes + une partie des éosinophiles + de jeunes granulocytes).

10 Après le processus de lyse, les lymphocytes sont les plus petites cellules avec leur petit noyau et corrént avec les cellules comprises entre 25 et 90 ± 5 fL (paramétrable) sur l'histogramme de distribution des GB (en mode humain) non représenté.

15 Les cellules moyennes se trouvent dans la région située entre les lymphocytes et les granulocytes.

Après action de la lyse, elles sont corrélées avec les cellules entre 90 ± 5 et 140 ± 5 fL (modifiable) sur l'histogramme de distribution des GB, non représenté. Certains éosinophiles peuvent cependant dépasser 220 fL.

20 Les granulocytes neutrophiles, après action de la lyse, sont les plus grosses cellules avec leurs noyaux polysegmentés retenant une partie du cytoplasme. Les neutrophiles sont corrélés avec les cellules entre 140 ± 10 et 449 fL sur l'histogramme de distribution des GB, non représenté.

Hémoglobine

25 La source lumineuse, une diode électroluminescente (LED) verte (555 nm), permet de calculer l'absorbance qui est proportionnelle à la concentration en hémoglobine de l'échantillon. Le trajet optique est déterminé par deux conduits optiques dans la chambre des GB. La référence Hb est mémorisée pendant la mise en route ou quand la chambre est remplie de diluant.

30

Exemple 3 : Mise en œuvre du procédé sur un analyseur au moins 4 populations

Préparation de l'échantillon sanguin :

35 150µL de sang sont prélevés du tube où le sang a été recueilli au préalable. La colonne de sang est aspirée par l'analyseur à travers une vanne

céramique où $25 \pm 1 \mu\text{L}$ sont échantillonnés pour former une première dilution au 1/72 environ avec $1800 \mu\text{L}$ de diluant faiblement hypertonique à pH neutre.

Une seconde dilution est faite en cascade avec $25 \pm 1 \mu\text{L}$ et environ 2mL de diluant afin de mesure au 1/6000 GR et Plaquettes.

5 $475 \mu\text{L}$ de la prédilution sont repris avec $210 \mu\text{L}$ d'agent de lyse et $1440 \mu\text{L}$ du diluant environ pour obtenir une dilution finale au 1/251.

Mesures :

L'hémoglobine est mesurée à 560nm directement dans la cuve de préparation des GB au bout de 15 secondes.

10 Cette dilution GB/Hb au 1/251 est ensuite transférée dans un cytomètre où $267 \mu\text{L}$ sont injectés au travers d'un micro orifice de $75 \mu\text{m}$ et d'un faisceau laser focalisé à proximité, dans une architecture à double flux hydrodynamique. Ce double dispositif de mesure d'impédance électrique et de mesure laser aux grands angles permet de dénombrer les GB et de déterminer
15 au moins 4 sous populations leucocytaires : lymphocytes, monocytes, granulocytes érythrocytaires, granulocytes neutrophiles, mais également la mise en évidence de granulocytes neutrophiles hypogranulés, du plasmodium vivax, le signalement d'agglutinats plaquettaires ou de GR nucléés.

20 $67 \mu\text{L}$ de la dilution au 1/6000 sont à leur tour transférés et injectés au travers d'un micro orifice de $75 \mu\text{m}$ dans une architecture à double flux hydrodynamique pour le comptage des GR et des plaquettes.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de détermination, dans un échantillon sanguin, du taux d'hémoglobine, de numération et de différenciation des globules blancs, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 On dispose de l'échantillon sanguin dans un milieu isotonique ou hyperosmolaire, à un pH n'excédant pas 10, en l'absence d'ions cyanure et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire et un agent conservateur,

10 On détecte le complexe formé entre l'hémoglobine et les groupes d'ammonium quaternaire, par spectrophotométrie, et

On dénombre les globules blancs et on les différencie en au moins trois sous-populations,

Ledit procédé étant réalisé en l'absence de tout autre ligand.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium quaternaire sont choisis parmi les composés de formule (I)

15 $NR_1R_2R_3R_4^+ X^-$ dans laquelle

R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes de carbone,

20 R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH, CH_3SO_4 et PO_4 .

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 10 à 18 atomes de carbone.

25 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi les sels de dodécyltriméthylammonium, de myristyltriméthyl ammonium, de palmityltriméthyl ammonium et de stéaryltriméthylammonium.

30 5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi les sels de tétraéthyl ammonium.

35 7. Procédé selon la revendication 4 ou 6, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de dodécyltriméthyl ammonium et l'hydroxyde de tétraéthylammonium.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la proportion du ou des sels d'ammonium quaternaire varie de 2 à 4% en poids par rapport au poids du milieu.

5 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'agent conservateur est un agent bactériostatique, de préférence le diméthylurée.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit milieu contient en outre un agent stabilisateur.

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agent stabilisateur est l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA).

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que ledit milieu contient en outre au moins un tensioactif non ionique.

15 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le tensioactif non ionique est le Triton®.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'on dénombre les globules blancs par impédance et on différencie les trois sous-populations suivantes : les lymphocytes, les monocytes autres que les lymphocytes et les granulocytes.

20 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisé en ce que le milieu contient au moins un sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 12 atomes de carbone et un autre sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 14 atomes de carbone.

25 16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'on dénombre les globules blancs par une méthode biparamétrique d'impédance et de mesure laser aux grands angles et on différencie les quatre sous-populations suivantes : les lymphocytes, les monocytes, les éosinophiles et les neutrophiles.

30 17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le milieu comprend trois sels d'ammonium quaternaire.

35 18. Milieu pour la détermination du taux d'hémoglobine et pour le dénombrement et la différenciation des globules blancs, ledit milieu étant exempt d'ions cyanure, et comprenant au moins un sel d'ammonium quaternaire choisi parmi les composés de formule I

NR1R2R3R4⁺ X⁻ dans laquelle

R1 représente une chaîne hydrocarbonée ayant de 1 à 18 atomes de carbone

5 R2, R3 et R4 représente chacun, indépendamment, un groupe alkyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone, et

X représente un halogène ou un groupe choisi parmi OH, CH₃SO₄ et PO₄,

et un agent conservateur,

ledit agent étant dépourvu de tout autre agent ligand.

10 19. Milieu selon la revendication 18, caractérisé en ce que le ou les sels d'ammonium sont choisis parmi le bromure de myristyltriméthyl ammonium, le chlorure de dodécyltriméthyl ammonium, l'hydroxyde de tétraéthylammonium.

15 20. Milieu selon la revendication 19, caractérisé en ce que la concentration du bromure de myristyltriméthyl ammonium varie de 20-40 g/L, celle du chlorure de dodécyltriméthyl ammonium de 1-10 g/L, et celle de l'hydroxyde de tétraéthylammonium de 1-5 g/L.

20 21. Milieu selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, caractérisé en ce que l'agent conservateur est un agent bactériostatique, de préférence choisi parmi le diméthylurée et le 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium.

22. Milieu selon la revendication 21, caractérisé en ce que la concentration de diméthylurée varie de 1-10 g/L, et celle du 2-pyridinethiol-1-oxyde de sodium de 1-10 g/L.

25 23. Milieu selon l'une quelconque des revendications 18 à 22, caractérisé en ce qu'il contient en outre un agent stabilisateur.

24. Milieu selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'agent stabilisateur est l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA).

25. Milieu selon la revendication 24, caractérisé en ce que la concentration de l'EDTA varie de 1 à 10 g/L.

30 26. Milieu selon l'une quelconque des revendications 18 à 25, caractérisé en ce qu'il contient un sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 12 atomes de carbone et un autre sel d'ammonium quaternaire de formule (I) dans laquelle R1 représente une chaîne hydrocarbonée de 14 atomes de carbone.

35