

LE SANG : GENERALITES

1- PROPRIETES DU SANG

Le sang est un organe fluide maintenu à l'intérieur des vaisseaux (artères, veines et capillaires). Il pèse environ 5 kg chez l'adulte. Il est constitué de cellules sanguines (communément appelées "éléments figurés du sang") et de plasma. La centrifugation d'un prélèvement sanguin additionné d'un anticoagulant sépare une phase solide qui sédimente au fond du tube, constituant les cellules sanguines et un surnageant qui représente la phase liquide, appelée : plasma. Un prélèvement sanguin dans un tube sec (sans anticoagulant) forme après coagulation le sérum.

Les cellules sanguines sont constituées de globules rouges (hématies ou érythrocytes), les plus nombreux (99%), ils assurent le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus, leur durée de vie est de 120 jours. Les globules blancs ou leucocytes assurent la défense de l'organisme, leur durée de vie est variable (quelques jours à années). Les plaquettes ou thrombocytes (fragments de cellules) jouent un rôle dans l'hémostase et leur durée de vie est de 5-7 jours.

Le plasma est constitué d'eau (90%), de protéines (dont les plus importants sont l'albumine, les globulines, le fibrinogène et les facteurs de la coagulation), de sels minéraux, de glucides, de lipides, d'hormones, d'enzymes et de pigments.

2 - LA MASSE SANGUINE

La masse sanguine ou volume sanguin total est représentée par le volume plasmatique et le volume globulaire, elle est mesurée à l'aide de produits radioactifs. Le volume plasmatique est mesuré par l'albumine marquée à l'iode radioactif (^{131}I) et le volume globulaire par le chrome 51 (^{51}Cr).

Le volume sanguin total = volume globulaire + volume plasmatique (tableau)

	Volume globulaire	volume plasmatique	Volume sanguin total
Homme (ml/kg)	36	39	75
Femme (ml/kg)	32	34	66

Il est important de connaître les différentes variations de ces volumes et c'est la diminution du VG qui définit l'anémie:

- Le volume sanguin total est augmenté à la naissance (VG) et chez la femme enceinte (VP).
- Dans les hémorragies aiguës, il y a une diminution proportionnelle du VG et du VP.
- Dans les hémorragies chroniques, il y a une diminution du VG traduisant une vraie anémie.
- Dans les hyperhydratations, il y a une augmentation du VP, il s'agit d'une fausse anémie.
- Dans les déshydratations, il y a une diminution du VP mais le VG est normal.
- Dans les polyglobulies, il y a une augmentation du VG, du VST traduisant une polyglobulie.

LES ORGANES HEMATOPOIETIQUES

Les organes hématopoïétiques sont représentés par la moelle osseuse, le thymus, les ganglions, la rate et le foie. Ces organes sont le siège de l'hématopoïèse qui commence dès la troisième semaine de gestation dans le mésenchyme. Au deuxième mois, l'hématopoïèse passe du sac vitellin au foie, vers le troisième mois, elle débute au niveau de la rate et vers le quatrième mois, la moelle osseuse est l'organe hématopoïétique le plus important. Le tissu lymphoïde apparaît dans le thymus et les ganglions à partir du quatrième mois fœtal. Le sang fœtal et du nouveau-né est très riche en cellules souches hématopoïétiques.

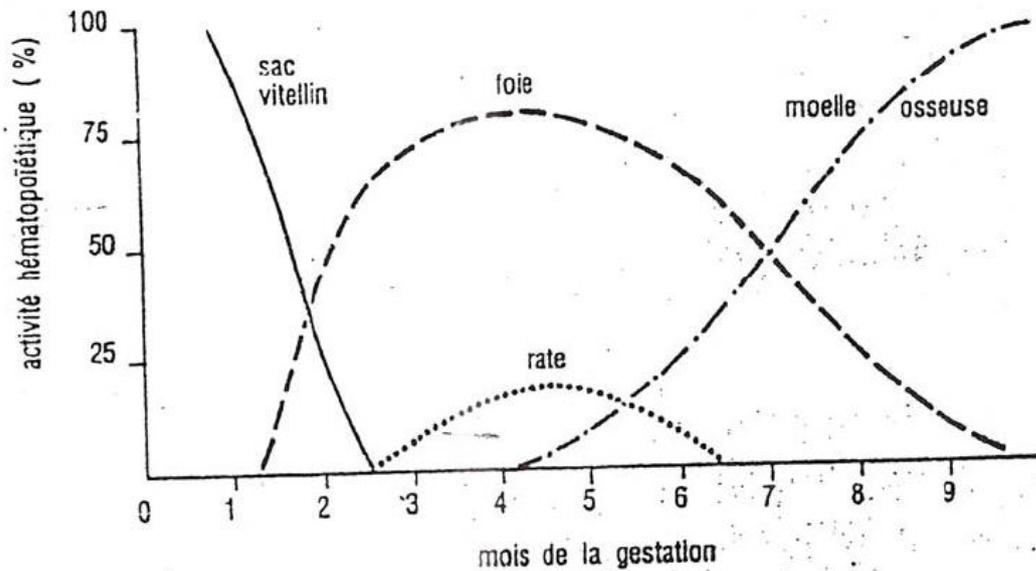


Figure 1 : Les sites de l'hématopoïèse pendant la gestation

1- LA MOELLE OSSEUSE

La moelle osseuse est une matière semi-fluide localisée dans différents os de l'organisme (sternum, bassin, crêtes iliaques, épiphyses proximales des fémurs et des humérus, le crâne, les côtes et les vertèbres). Elle est constituée d'un tissu hématopoïétique ou moelle rouge contenant les cellules des lignées érythrocytaires, myéloïdes, mégacaryocytaires et lymphoïdes, et, de cellules adipeuses. Ce système est maintenu par un réseau constituant le microenvironnement qui permet des conditions anatomiques et intercellulaires satisfaisantes pour assurer une hématopoïèse normale. Il est composé de Cellules Stromales (Fibroblastes, cellules endothéliales et épithéliales, Lymphocytes, ostéoblastes, macrophages et adipocytes) et d'une matrice extracellulaire (collagène I, III, VI), (protéines adhésives : fibronectine, protéoglycannes, thrombospondyne) et des facteurs de croissance. Les vaisseaux sanguins et les sinus irriguent le tissu osseux et la moelle osseuse. Leur paroi est constituée de cellules endothéliales recouvertes de cellules réticulaires. Celles-ci émettent des prolongements cytoplasmiques dans le tissu hématopoïétique, forment des fibres de réticuline et ont une action de phagocytose. Les cellules sanguines adultes traversent les sinusoides et passent dans le courant circulatoire.

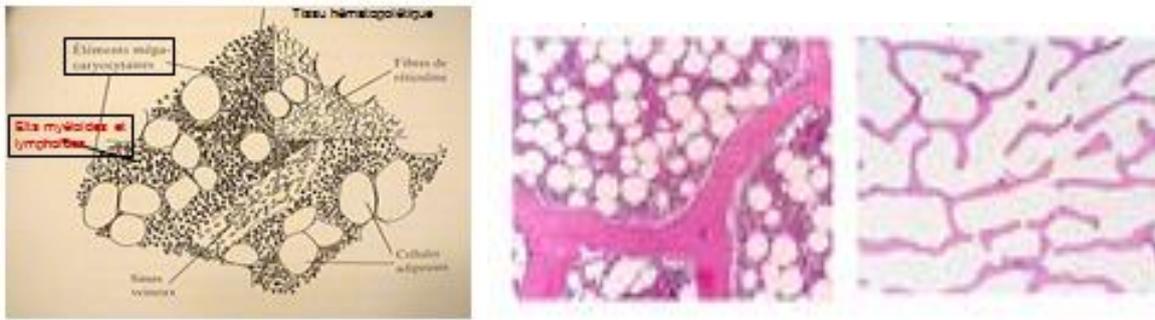


Figure 2 : moelle osseuse

2- LE THYMUS

Le thymus est un organe lymphoïde central responsable de la différenciation et de la maturation des lymphocytes T. Il apparaît dès la vie embryonnaire, il est indépendant des sollicitations antigéniques, il involue après la puberté. Il est situé à la partie inférieure du cou, dans le médiastin antéro-moyen, il comprend deux lobes formés de lobules délimités par les travées de la capsule conjonctive. Le cortex est riche en précurseurs médullaires qui migrent lentement vers la médullaire avant de passer dans la circulation puis dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans la médullaire, les cellules endothéliales se regroupent en structures arrondies, appelées corpuscules de Hassel.

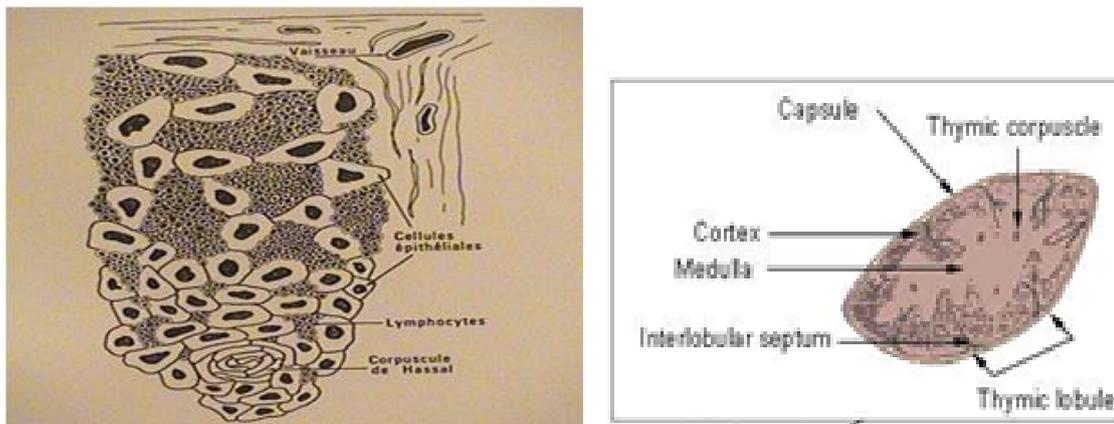


Figure 3 : Le thymus

3- LES GANGLIONS

Les ganglions sont de petits nodules ronds ou en forme de haricot, leur taille est de 1-2 cm. Ce sont des organes lymphoïdes périphériques, ils parsèment le trajet des vaisseaux lymphatiques, Chaque ganglion comprend :

- La capsule avec le système des voies lymphatiques efférentes et le sinus marginal.
- La zone corticale contenant les follicules lymphoïdes constitués d'un centre germinatif et d'une corticale. Ils sont riches en lymphocytes B.
- La zone médullaire est constituée de cordons (associant des LT, LB, plasmocytes et macrophages) et de volumineux sinus du système lymphatique efférent et sanguins.
- La zone interfolliculaire et paracortex contient les cellules interdigitées, les veinules post-capillaires et les lymphocytes T soumis à une recirculation. Ces lymphocytes quittent les ganglions par le système lymphatique, regagnent le canal thoracique qui les déverse dans le courant

circulatoire, puis retournent dans les zones thymodépendantes par les parois des veines post-capillaires.

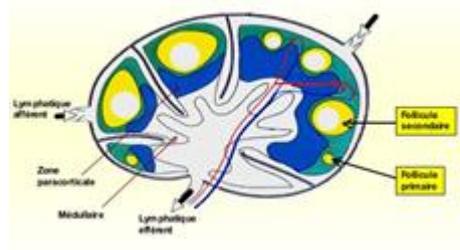


Figure 4 : Le ganglion

4- LE TISSU LYMPHOÏDE ASSOCIÉ AUX MUQUEUSES (MALT)

Le MALT est retrouvé dans le tube digestif (plaque de Peyer, appendice iléo-caecale), le poumon, les amygdales, le derme ou autres organes. Ces organes hébergent les macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T. Leur développement est tributaire des stimulations antigéniques extérieures.

5- LA RATE

La rate pèse chez l'adulte 150-200g. Elle est enveloppée d'une capsule conjonctive, le parenchyme splénique comprend la pulpe blanche et la pulpe rouge séparées par la zone marginale.

- La pulpe blanche est constituée de manchons lymphoïdes périartériolaires hébergeant les LT matures. Par endroits, ce manchon s'épaissit pour former les corpuscules de Malpighi qui renferme des follicules lymphoïdes B constitués d'un centre germinatif, d'un manteau et d'une zone marginale.
- La pulpe rouge comprend les sinus veineux et les cordons spléniques (cordons de Billroth) contenant des LB, LT et des phagocytes mononuclés.
- La rate est le siège de nombreuses activités fonctionnelles : dans les follicules lymphoïdes a lieu la lymphocytopoïèse ; la rate joue le rôle de réservoir des globules rouges et des plaquettes ; elle est l'organe de filtration grâce aux cellules du système de phagocytes mononuclés. Elle participe à la défense spécifique de l'organisme. Elle joue un rôle dans l'hématopoïèse dans la phase hépatosplénique pendant la vie embryonnaire et dans certains états pathologiques.



Figure 5 : La rate

6- LE FOIE

Chez l'adulte, le foie pèse 1200-1400g, il est divisé en lobules et chaque lobule est constitué de cellules hépatiques ou hépatocytes, de fibres conjonctives, de voies biliaires intra et extra hépatiques et de nombreux vaisseaux sanguins. La paroi des sinusoides est tapissée de cellules

endothéliales et par endroits sont attachées des cellules volumineuses appelées cellules de Kupffer qui font partie du système de phagocytes mononuclés. Elles conservent un pouvoir hématopoïétique chez l'embryon et à l'occasion de certains états pathologiques.

Les fonctions du foie sont multiples, celles qui touchent l'hématologie sont principalement:

- L'érythrophagocytose des globules rouges âgés ou pathologiques, cependant l'activité est inférieure à celle de la moelle osseuse et de la rate. Les produits de dégradation de l'Hb sont transformés en pigments biliaires.
- La réserve de fer sous forme de ferritine.
- La synthèse de plusieurs protéines plasmatiques de la coagulation : le fibrinogène (I), la proaccéléline (V), la proconvertine (VII), les FAH (VIII-IX) et le facteur de Stuart (X).
- La défense contre certaines bactéries pathogènes par les cellules macrophagiques.

L'HEMATOPOÏÈSE

1-DEFINITION

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui assurent la production, le développement et la maturation des cellules sanguines. On distingue deux types de cellules sanguines : les cellules myéloïdes formées dans la moelle osseuse et qui assurent la production des globules rouges, des polynucléaires, des monocytes, et des plaquettes, et, les cellules lymphoïdes formées dans la moelle osseuse et qui subiront une éducation et un stockage dans les organes lymphoïdes (thymus, ganglions, rate et tissu lymphoïde associé aux muqueuses). La permanence de l'hématopoïèse est assurée par les cellules souches et leurs dérivées.

2- LES CELLULES SOUCHES

Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée dite cellule souche pluripotente.

-Les cellules souches ont deux propriétés : la capacité d'auto renouvellement et de différenciation. La démonstration expérimentale de l'existence de cellules souches hématopoïétique résulte de l'expérience de Till et Mc Culloch en 1961 chez la souris. Des souris sont irradiées à une dose létale puis on leur injecte des cellules médullaires de souris jumelles.

Après 12 jours, on observe dans leur rate des amas de cellules en colonies contenant les différentes lignées hématopoïétiques, ces mêmes cellules réinjectées à des souris irradiées reconstituent des colonies identiques dans la rate de ces souris. Elles sont appelées CFU-S (colony forming unit spleen).

- Chez l'homme l'existence de cellules souches primitives est prouvée par les techniques de culture de moelle osseuse in vitro et par la pathologie : exemple : dans la LMC : le chromosome Philadelphie (ph1) existe dans toutes les lignées cellulaires.

- Les techniques de cultures in vitro (cultures Dexter) ont permis de mettre au point chez l'homme un test appelé LTC-IC (long term culture-initiating cell) qui identifie une cellule capable de générer des cellules hématopoïétiques.

Ces expériences montrent l'existence d'une cellule souche primitive (LTC) capable d'autorenouvellement et de différenciation. Chez un individu normal, le taux de LTC-IC est de $1-4/10^5$ cellules mononuclées médullaires.

- Il existe des CSH en phase quiescente (GO) non agressées par la chimiothérapie ou la radiothérapie et des CSH en cycle.

- Dans une moelle osseuse de sujet normal, la molécule CD34 est présente sur les CSH primitives dans environ 0,5% des cellules médullaires. Les CSH sont HLA-DR faible.
- Les cellules souches conservent leur capacité de reconstitution de l'hématopoïèse après congélation -196°.
- Les techniques de cultures ont montré chez l'homme, l'existence de cellules pluripotentes myéloïdes CFU-GEMM (G: granulocytes, E: érythroïdes, M: monocytes, M: mégacaryocytes). Ces CFU-GEMM seraient l'équivalent des CFU-S du 7^{ème} jour.

3- LES PROGÉNITEURS

Les cellules de ce compartiment sont issues des cellules souches après leur mise en cycle et font partie du compartiment de cellules déterminées (myéloïdes et lymphoïdes), à haute capacité de différenciation mais sans propriété d'autorenouvellement, intermédiaires entre les CFU-S et les précurseurs hématopoïétiques. Comme les CSH, ces cellules ne sont pas reconnaissables cytologiquement.

Depuis 1965 les progrès des techniques de culture in vitro en milieu semi-solide (cellules hématopoïétiques + stimulant : CSF colony stimulatig factor) ont permis d'étendre à toutes les lignées la notion de cellules déjà déterminées vers une seule lignée. En règle, plus la colonie apparaît après un long délai, plus elle dérive d'une cellule primitive et la taille de la colonie est aussi le reflet du stade de différenciation du progéniteur : ainsi les cellules provenant d'un progéniteur primitif sont formées d'un grand nombre de cellules.

On distingue :

Les progéniteurs des neutrophiles et des monocytes (CFU-GM puis CFU-G ou CFU-M), les progéniteurs des éosinophiles (CFU-Eo), des basophiles-mastocytes (CFU-Mast).

Les progéniteurs des érythroblastes : BFU-E primitives capable d'autorenouvellement entre le 16^{ème} et le 18^{ème} jour insensible à l'érythropoïétine et les BFU-E matures des 11^{ème} -12^{ème} jours sensibles à l'érythropoïétine et les CFU-E dépendants de l'érythropoïétine.

Les progéniteurs des mégacaryocytes : les BFU-MK et CFU-MK

Les progéniteurs lymphoïdes (Pré-T et les Pré-B).

Les lymphocytes T et B ont une origine hématopoïétique parallèle aux cellules myéloïdes. Les lymphocytes T font leur maturation dans le thymus et les lymphocytes B dans la moelle osseuse (bourse de Fabricius chez les oiseaux).

Ces progéniteurs présentent l'antigène HLA - DR, le récepteur de la transferrine et sont CD33+.

4-LES PRECURSEURS

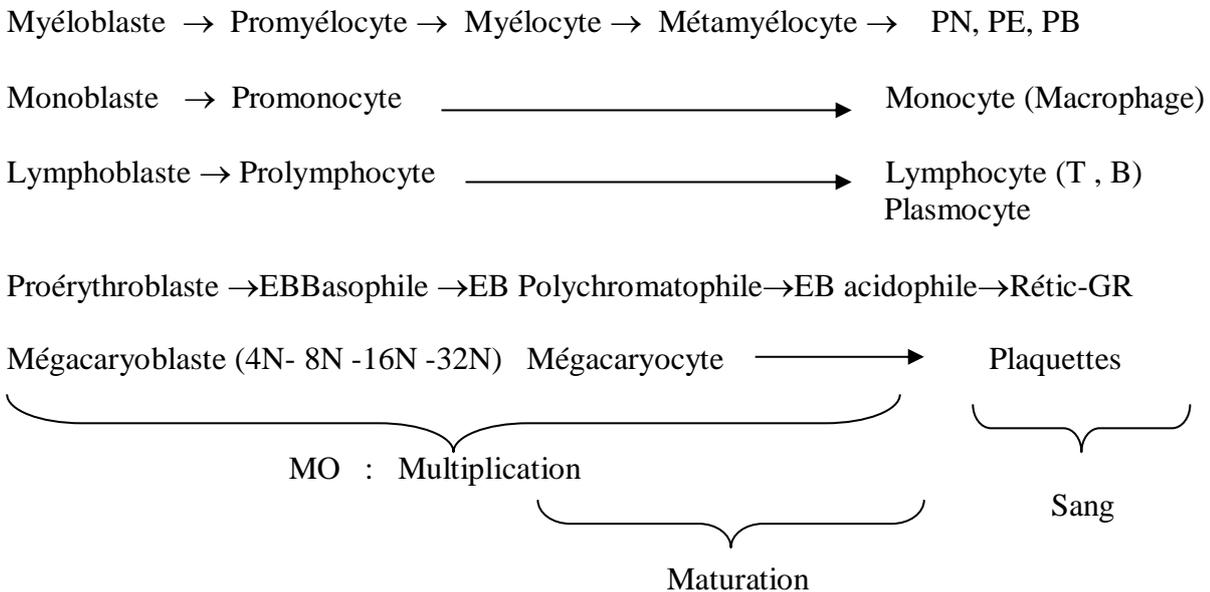
Ce sont les premières cellules morphologiquement identifiables de chaque lignée. Le compartiment des précurseurs a pour but la multiplication et la maturation cellulaire.

Les plus immatures sont les myéloblastes, les lymphoblastes, les érythroblastes, les mégacaryoblastes, les monoblastes et les plasmoblastes. Les modifications morphologiques liées à la maturation sont : la diminution de la taille de la cellule et du rapport nucléo cytoplasmique, la disparition des nucléoles et la condensation de la chromatine, l'apparition de granulations.

Parallèlement à la maturation, chaque stade cytologique correspond à une division cellulaire. Selon les lignées, il se produit 3 et 5 mitoses de sorte qu'un précurseur puisse donner naissance à 32

cellules filles. Pour la lignée mégacaryocytaire il y a une endomitose à l'intérieur du mégacaryocyte, la cellule double son ADN à chaque fois.

Multiplication et Maturation des précurseurs dans la MO.



5- REGULATION

Trois éléments jouent un rôle important pour une hématopoïèse correcte : le microenvironnement, les facteurs de croissance et certains vitamines et oligoéléments.

5-1 Le microenvironnement participe à l'organisation générale de la moelle osseuse. Il donne aux cellules souches les conditions anatomiques et intercellulaires satisfaisantes (facteurs de croissances, inhibiteurs physiologiques et substrats) pour assurer l'hématopoïèse. Il est constitué :

- De stroma médullaire (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, cellules épithéliales et adipocytes) organisé au sein des logettes hématopoïétiques dont les cellules secrètent des facteurs de croissance (CSF).

- De matrice extracellulaire composée d'un réseau fibrillaire (collagène de type I-II), de glycoprotéines et de protéoglycanes (fibronectine, laminine et la thrombospondine).

- Les cellules hématopoïétiques interagissent avec les cellules stromales et la MEC par l'intermédiaire de molécules d'adhésion de diverses familles (intégrines: VLA-4 et sélectines).

5-2 Les Vitamines, tels que la vitamine B12 et l'acide folique qui participent à la synthèse de l'ADN et donc à la division cellulaire. Leur déficit entraîne une anomalie de formation dans toutes les lignées.

5-3 D'autres éléments participent à la formation de protéines spécifiques de lignées, c'est le cas du fer, indispensable à l'érythropoïèse pour la synthèse de l'hémoglobine et les oligoéléments.

5-4 Les facteurs de croissances ou CSF. L'étude des cellules souches par culture de moelle in vitro a montré la nécessité de facteurs de croissance hématopoïétique pour la survie, la différenciation, la multiplication et la maturation des cellules hématopoïétiques. Le 1^{er} facteur connu a été l'érythropoïétine (EPO). De nombreux autres facteurs ont été découverts, clonés et synthétisés. Leur rôle exact dans l'hématopoïèse est de mieux en mieux défini. Ils permettent de

grands espoirs dans le traitement des maladies de l'hématopoïèse et certains sont déjà utilisés en thérapeutique.

Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des glycoprotéines de poids moléculaire entre 24000-90000. Ils agissent comme des hormones hématopoïétiques. Cependant, à l'exception de l'EPO, ils sont synthétisés par un grand nombre de cellules présentes dans divers organes (cellules endothéliales, fibroblastes, monocytes, macrophages et lymphocytes). Ils portent le nom de cytokines, de lymphokines et d'interleukines (IL). Ces cytokines reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques appelés « clusters de différenciation » « CD ». L'action régulatrice se fait par voie endocrine (humorale), paracrine (par contiguité) et autocrine (par sécrétion ou directement en intracellulaire). On distingue schématiquement 3 types de facteurs de croissance selon leur lieu d'action au cours de l'hématopoïèse.

Les facteurs multipotents : principalement l'IL3 ou SCF et le GM-CSF. Ils agissent sur les cellules souches les plus immatures, les progéniteurs les plus différenciés voire sur les cellules les plus matures.

Les facteurs de promotion comme l'IL1, l'IL4, l'IL6 et LIF (leukemia inhibitory factor) potentialisent l'effet des CSF. Ils augmentent le nombre de cellules souches en cycle cellulaire (facteur de prolifération et de différenciation) et sensibilisent les cellules souches totipotentes à l'action des autres facteurs de croissance.

Les facteurs restreints : Ils agissent sur les cellules souches engagées, favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont principalement : le G-CSF, le M-CSF, IL5 Eo, IL4 stimulent les LT et les macrophages, IL6 méga, EPO, TPO thrombopoïétine . L'IL2 active les lymphocytes T après s'être fixée sur son récepteur spécifique le CD25. Elle stimule les lymphocytes NK et les LB.

5-5 Les facteurs de croissance non spécifiquement hématopoïétiques : Ils ont une action potentialisatrice et nécessitent la présence de l'érythropoïétine surtout pour l'obtention de colonies des CFU-E, BFU-E: l'IGF1-2 (insuline growth factor 1 et 2), le PDGF (platelet derived growth factor), la STH (hormone de croissance), les hormones thyroïdiennes, les androgènes, la cortisone et la dexaméthasone.

5-6 La régulation négative de l'hématopoïèse (les inhibiteurs) est assurée par: l'interféron γ (CFU-GEMM), le TNF- α (CFU-GEMM) et leTGF- β (CFU-S –MK-E-GM –BFU-E). Les prostaglandinesE (inhibent les CFU-GM mais stimulent les BFU-E), la lactoferrine, les isoferritines acides et certains peptides isolés des PN.

6- EXPLORATION DE L'HEMATOPOIESE

- **L'hémogramme** renseigne sur une hématopoïèse physiologique normale ou non. Les paramètres de l'hémogramme sont les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes.

- **Le myélogramme** : à l'aide d'un trocart, un prélèvement par aspiration au niveau de l'épine iliaque ou du sternum est étalé sur une lame, coloré au MGG et observé au microscope optique. La richesse de la moelle osseuse et des précurseurs sont analysés et appréciés.

- **La biopsie de moelle osseuse** : un fragment médullaire permet l'analyse de l'architecture de la moelle osseuse. Elle est indiquée en cas d'aplasie médullaire, de myélosclérose, de lymphomes, de carcinome, de splénomégalie ou de fièvre indéterminée.

- **Méthodes isotopiques** :

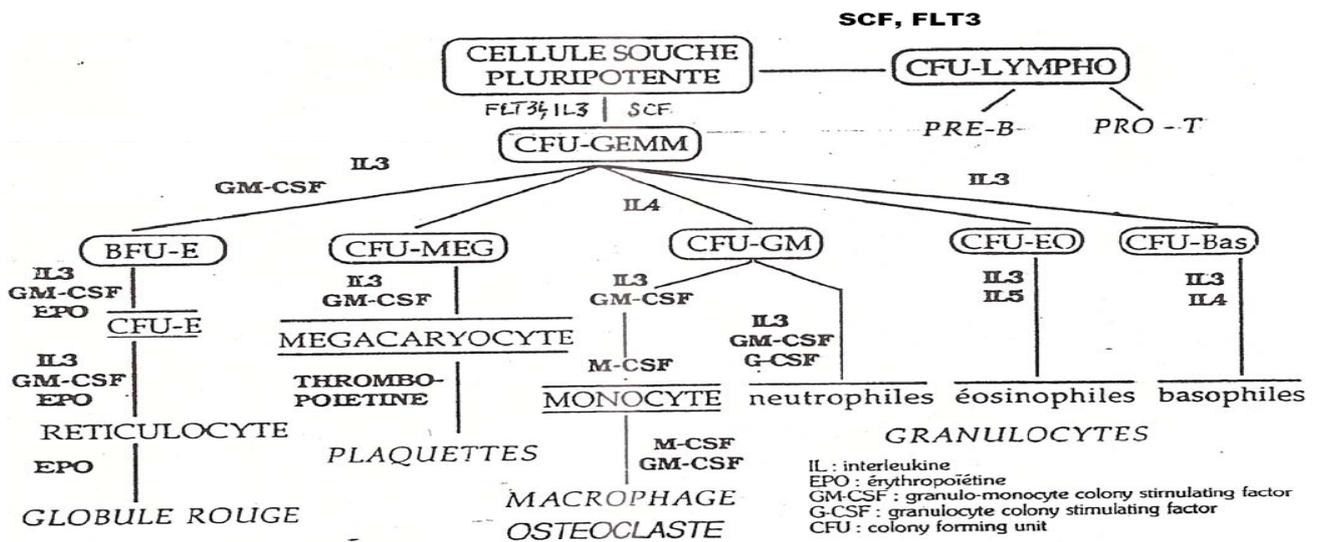


Figure 1-Progénéiteurs, facteurs de croissances et cellules sanguines

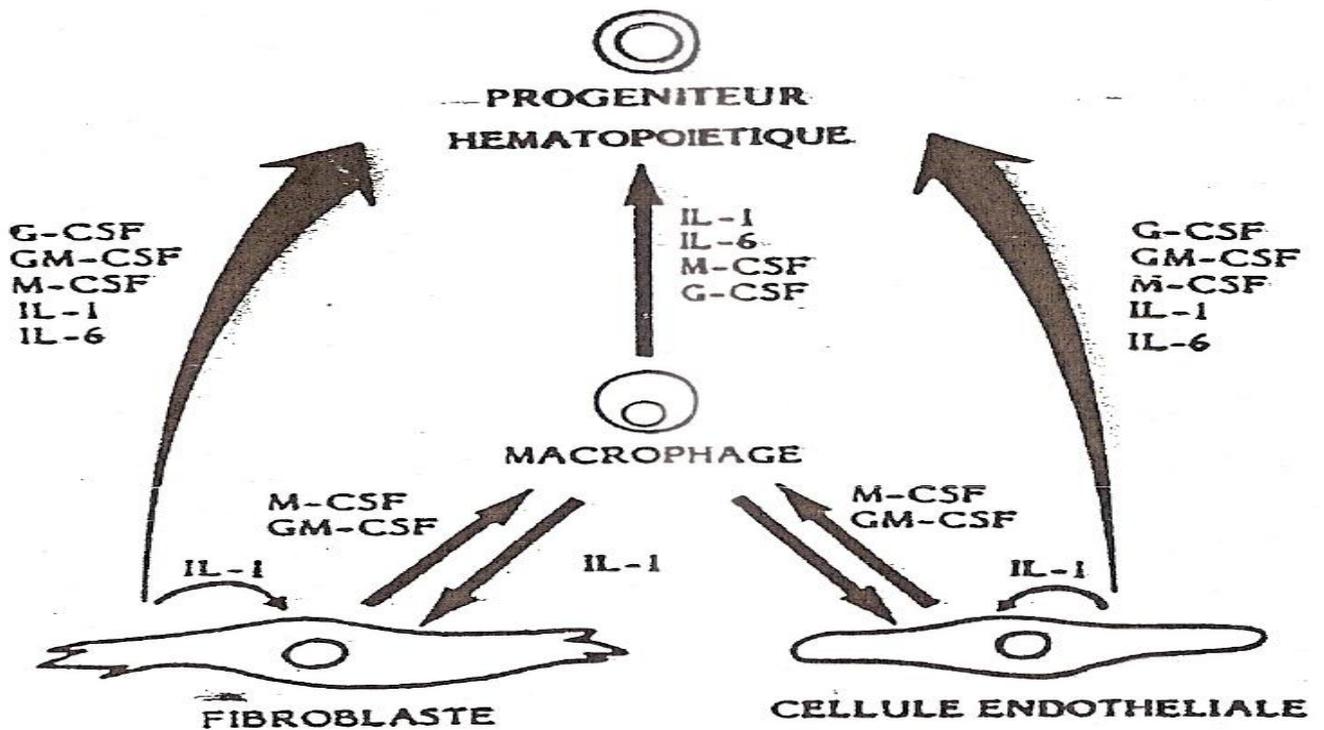


Figure 2- Interaction facteurs de croissances et microenvironnement médullaire

Etude l'érythropoïèse : on utilise les isotopes du fer émetteur γ (^{59}Fe) ou glycine ^{15}N . Une dose de ^{59}Fe liée à la transferrine est injectée et on suit l'évolution de la radioactivité dans l'organisme.

1) la radioactivité du sang diminue au fur et à mesure que le ^{59}Fe est capté par les érythroblastes renseignant sur leur richesse et leur activité. Un T/2 court est un signe d'activité érythropoïétique et un T/2 long est un signe d'érythroblastopénie.

2) Grâce aux compteurs externes la radioactivité est détectée après quelques heures au niveau du tissu hématopoïétique (les os plats) ou dans d'autres localisations (rate et le foie) dans les situations pathologiques.

3) Après quelques jours, les hématies ayant incorporées le ^{59}Fe apparaissent dans le sang. 90% de la radioactivité est retrouvée dans les hématies au 10^{ème} jour. Une érythropoïèse inefficace est décelée par un taux d'incorporation plus faible.

4) La durée de vie des globules rouges en pratique clinique est mesurée après marquage in vitro par le radiochrome (^{51}Cr) et réinjection intraveineuse. La demie vie des hématies (T1/2) est de 28+/- 4jours.

La durée de vie des leucocytes : le DF^{32}P (diisopropyl-fluorophosphate-phosphore32) et le ^{51}Cr permettent d'analyser la cinétique des leucocytes. Leur durée de vie est de quelques heures à quelques jours, certains lymphocytes persistent des années (les lymphocytes mémoires). La thymidine tritiée in vitro est utilisée dans les autoradiographies médullaires et mesure la cinétique de chaque lignée.

La durée de vie des plaquettes évaluée par le ^{51}Cr et l' ^{111}In est de 8-12 jours.

Les techniques de cultures des cellules hématopoïétiques sur des échantillons de moelle osseuse dans des milieux spéciaux enrichis en facteurs de croissance permettent de mettre en évidence les CFU

La cytométrie en flux grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux permet de mettre en évidence des antigènes membranaires ou intracellulaires permettant d'identifier la cellule.

REFERENCES

Frédéric Féger. Hématopoïèse et facteurs de croissance. EMC- Hématologie [13-000-M-85] (1997)

Brice P. Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux en hématologie. EMC Hématologie, 13-200-A-10, 2005.

Merle-Béral H, Le Garff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. EMC Hématologie, 13-000-L-10, 2008

Yves Najean. Utilisation des méthodes isotopiques en hématologie. EMC- Hématologie [13-000-M-10] (1997)

HEMOGRAMME

1- DEFINITION

L'hémogramme est un examen qui permet l'étude quantitative et qualitative des éléments figurés du sang : il comprend la détermination de l'hématocrite, le dosage de l'hémoglobine, la numération des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes, et, le calcul des indices érythrocytaires.

L'étude de l'hémogramme se fait à partir d'un prélèvement veineux dans un tube contenant un anticoagulant. Les méthodes d'évaluations manuelles des lignées sanguines ont été détrônées par l'évolution de la technologie des compteurs automatiques qui procurent un gain de temps important et une marge d'erreur plus faible. Néanmoins, l'étude quantitative par un examen de frottis de sang au microscope reste irremplaçable chaque fois qu'une anomalie sanguine est suspectée.

2- ETUDE QUANTITATIVE

2-1/ LES GLOBULES ROUGES

a- L'hématocrite est déterminé par le rapport entre le volume occupé par les globules rouges et le volume sanguin total, il est exprimé en pourcentage ou en litre de GR / litre de sang.

Les méthodes manuelles consistent à centrifuger le prélèvement contenu dans un tube capillaire et à lire directement l'hématocrite sur le tube gradué. Les causes d'erreurs sont de 2%.

Tableau I : Valeurs normales de l'hématocrite

	Hématocrite	
	(%)	L/L
Homme	40-54	0,40-0,54
Femme	35-47	0,35-0,47
1 an	36-44	0,36-0,44
Nné	44-62	0,44-0,62

b- L'hémoglobine est dosée manuellement par le spectrophotomètre. Un prélèvement sanguin est mélangé à une solution de Drabkin (formation de la cyanméthémoglobine) et lu à une longueur d'onde de 540nm au spectrophotomètre. Les causes d'erreurs sont de +/-15%.L'unité est le g/dl ou dans le système international (SI) en millimoles d'hémoglobine par litre.

Tableau II : Valeur normales de l'hémoglobine

	Hémoglobine (g/dl)
Homme	13-18
Femme	12-16
1 an	12-16
Nné	14-20

c-La numération des globules rouges détermine le nombre de globules rouges dans un volume donné de sang total, soit le nombre de globules rouges contenus dans un litre de sang.

La méthode manuelle consiste à mélanger l'échantillon de sang dans une solution de dilution appropriée étalée dans un hématimètre ou cellule de Malassez (plaque de verre quadriangée) et le comptage des globules rouges est fait au microscope optique. Les causes d'erreurs sont de 2-6% L'unité est le million/mm³ ou 10¹²/l.

Tableau III : Valeur normales des globules rouges

	Globules rouges (10 ¹² /l)
Homme	4,5 - 6,2
Femme	4 - 5,4
1 an	3,6 - 5
Nné	5 - 6

d- Le calcul des indices érythrocytaires se fait à partir des résultats du dosage l'hémoglobine, de la mesure l'hématocrite et de la numération des globules rouges. Les compteurs électroniques les donnent directement.

-VGM : $Hte \times 10 / \text{Nombre de GR en million} = 80-95 \text{ fl (femtolitre) ou } \mu^3$ et correspond à une normocytose. Des valeurs > à ce taux désignent une macrocytose et des valeurs < désignent une microcytose.

-CCMH : $Hb \times 100 / Hte = 32-36 \%$ et correspond à une normochromie.
Des valeurs < correspondent à une hypochromie ; il n'y a pas d'hyperchromie.

- TGMH : $Hb \times 10 / GR = 27-32 \text{ pg (picogramme)}$.
Elle désigne le poids moyen de l'Hb contenu dans un globule rouge.

- Les valeurs de ces indices servent à typer une anémie et à orienter le diagnostic.

e - La numération des réticulocytes : les réticulocytes sont des globules rouges qui viennent de perdre leur noyau dans la moelle osseuse et vont poursuivre leur maturation durant 24 heures dans le sang. Ils sont mis en évidence par des colorations spéciales (bleu de crésyl). Ils reflètent la production quotidienne d'hématies par la moelle osseuse. Le taux relatif est de 1-2% et le taux absolu est de 25000-120000/mm³.

2-2/ LES GLOBULES BLANCS

- La numération, détermine le nombre de globules blancs présents dans un volume donné de sang, soit le nombre de GB dans un litre de sang. Le comptage manuel se fait selon le même principe que pour les globules rouges. Les causes d'erreurs sont de l'ordre de +/-15% alors que les compteurs électroniques ménagent un gain de temps et une plus grande reproductibilité des résultats (causes d'erreurs +/-2,5%). Le taux chez l'adulte est de 4000-10000/mm³ (4-10 G/l).

Chez l'enfant le taux des GB est plus élevé : 20000/mm³

-Un taux de GB supérieure 10000 désigne une hyperleucocytose et un taux inférieur à 4000 désigne une leucopénie.

2-3/ LES PLAQUETTES

- La numération des plaquettes ou thrombocytes, toujours selon les mêmes principes que les globules rouges, se fait au microscope optique simple ou à contraste de phase. Les plaquettes sont difficiles à compter, vu leur petite taille qui peut être confondue avec des saletés. La marge d'erreur est de 10-15%. Le taux normal de plaquettes est de 150000-450000/mm³ (150- 450G/l).

3- ETUDE QUALITATIVE

L'étude qualitative se fait par le frottis de sang, elle permet d'observer la morphologie des globules rouges, d'identifier les différents types de globules blancs, d'établir leur pourcentage, et, observer et évaluer les plaquettes. Parallèlement les anomalies sont identifiées.

Le principe consiste à étaler une goutte de sang sur une lame de verre, de faire une coloration manuelle appropriée (MGG : May Grunwald Giemsa) ou d'introduire la lame dans l'hématek (appareil de coloration) et d'observer la lame au microscope.

3-1/ LES GLOBULES ROUGES

- Les globules rouges ont une même forme discoïde, ils ont une couleur orange- beige au MGG avec une pâleur centrale et une taille entre 7-8 µm. L'observation des globules rouges permet d'apprécier :

- la taille : normocytose, microcytose, macrocytose. Si la population des GR est hétérogène, on parlera d'anisocytose.
- la forme : sphérocytes, dacryocytes (cellules en forme de larme), codocytes (cellules cibles), schizocytes, drépanocytes. Le degré de variation de forme est dénommé poikilocytose.
- La couleur : normochromie, hypochromie ou polychromatophilie.
- Les inclusions cytoplasmiques : corps de jolly (fragments nucléaires), corps de Heinz (précipités d'hémoglobine), ponctuations basophiles, anneau de cabots.
- Des érythroblastes circulants, des rouleaux érythrocytaires .
- En cas d'anémie, si le taux des réticulocytes est > à 120000, il traduit une anémie régénérative et s'il est < à 120000, l'anémie est dite arégénérative (c'est-à-dire l'anomalie est centrale ou médullaire).
- L'augmentation du taux de globules rouges, de l'Hte et de l'Hb s'appelle polyglobulie.

3-2/ LES GLOBULES BLANCS

- La formule leucocytaire est l'établissement du pourcentage (sur 100 cellules) des différents types de globules blancs constitués de 60-80% de granuleux (PN, PE, PB et Monocytes) et de 40-20% de lymphocytes (dont 80% sont des lymphocytes T : 2/3 cd4 et 1/3 cd8 ; 10% des lymphocytes B et 10% des lymphocytes NK).

- Caractéristiques des globules blancs :

- Les polynucléaires neutrophiles (PN) ou granulocytes neutrophiles: leur taille est de 12-14 µm, le noyau présente 2-4 lobes et le cytoplasme contient des granulations neutrophiles. Le taux est de 40-75% et leur valeur absolue est de 1500-7000/mm³ (1,5- 7 Giga / l). La fonction principale des PN est la défense de l'organisme contre les infections bactériennes et ils interviennent dans le processus inflammatoire. Leur production est régie par le facteur de croissance G-CSF. Leur durée de vie dans le sang est de 6-18 heures et dans les tissus, elle est de 5 jours.

- Les polynucléaires éosinophiles (PE) : leur taille est de 12-16 μm , le noyau est segmenté, le cytoplasme contient des granulations azurophiles (oranges). Le taux est de 1-5% et leur valeur absolue est de 50-500/ mm^3 (0,05-0,5 G/l). Ils interviennent dans la destruction des parasites et dans la sensibilité des réactions allergiques. Leur production est sous l'influence de l'interleukine 5. Leur durée de vie dans le sang est d'environ 6 heures et dans les tissus, elle est de 10 jours, ils sont retrouvés dans la peau, les poumons, le tractus digestif, les reins et l'utérus.
 - Les polynucléaires basophiles (PB): leur taille est de 10-14 μm , le noyau est segmenté mais difficile à distinguer du fait des granulations bleu foncé. Le taux est de 0-1% et leur valeur absolue est de 10-50/ mm^3 . (0,01-0,05G/L). Ils jouent un rôle dans l'inflammation locale en libérant l'histamine lors de l'interaction IgE-allergène et dans l'hypersensibilité retardée, ils libèrent de l'héparine et un facteur activant les PE. Leur durée de vie est de 8-12 jours.
 - Les lymphocytes sont constitués de : petits lymphocytes dont la taille est de 10-12 μm , le noyau est rond et la chromatine est dense, le cytoplasme est fin et basophile sans granulation, le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé.
 - Les grands lymphocytes ont une taille de 12-15 μm , le noyau est rond parfois excentrique et le cytoplasme est étalé grisâtre, quelques cellules contiennent des granulations (LGL : CD8 ou NK).
 - Le taux des lymphocytes est de 20-40% et leur valeur absolue est de 1000-4000 / mm^3 (1-4 G/L). Les lymphocytes jouent un rôle dans la défense immunitaire. Ils participent à la destruction des substances antigéniques et en conservent la mémoire. Leur durée de vie est courte pour certains (5-20 jours) et longue pour d'autres (3-5ans ou plus).
 - Répartition des taux des sous populations lymphocytaires : lymphocytes T: 70 à 80% (900 à 2250 / mm^3) composés par les lymphocytes CD4 : 35 à 60% (600 à 1200 / mm^3) et les lymphocytes CD8 : 15 à 40% (250 à 900 / mm^3) ; lymphocytes B : 8 à 12% (75 à 350 / mm^3) et lymphocytes NK : 5 à 15% (110 à 350 / mm^3).
 - Les monocytes ont une taille de 15-20 μm , le noyau est réniforme et la chromatine est lâche ; le cytoplasme est gris-bleu abondant. Le taux est de 2-10% et leur valeur absolue est de 200-800 (0,2-0,8G/L). Leur rôle est la défense de l'organisme, l'élimination des cellules endommagées et des débris cellulaires par la phagocytose. Cette fonction est surtout assurée dans les tissus où ils sont transformés en macrophages et où leur durée de vie est de 3mois environ.
- Des anomalies des GB peuvent être révélées au frottis de sang :
- Une diminution des PN (neutropénie : $\text{PN} < 1500 \text{ elts}/\text{mm}^3$ et agranulocytose : $\text{PN} < 500 \text{ elts}/\text{mm}^3$). Les étiologies sont représentées par les infections, la fièvre typhoïde, les prises médicamenteuses (amidopyrine, alpha-méthyl-dopa, sulfamides, antithyroïdien, bactrim, les antimétabolites), l'hypersplénisme et l'insuffisance médullaire.
 - Une augmentation des PN $> 7000 \text{ éléments}/\text{mm}^3$ peut être physiologique (nouveau née, stress) ou dans les infections aiguës (appendicite, septicémies), le rhumatisme, les cancers, les corticoïdes, le tabac.
 - Une augmentation des PE $> 500 \text{ elts}/\text{mm}^3$ est retrouvée dans l'allergie, l'asthme, l'eczéma, les parasitoses.

- Une augmentation des PB > 100 elts/mm³ est rare, elle est rencontrée dans les hyperlipémies, la LMC ou les cirrhoses hépatiques.
- Myélémie : passage d'éléments +/- immatures de la moelle osseuse au sang périphérique (myélocytes, métamyélocytes, quelques promyélocytes). Exemple : dans la LMC, il y a une myélémie.
- Leucoblastes : GB jeunes (immatures) dans le sang et la moelle osseuse. Exemple : les leucémies aiguës sont définies par la présence de leucoblastes dans la moelle et le sang.
- Les lymphopénies (lymphocytes < 1000 elts/mm³) sont retrouvées dans les infections virales (SIDA), après chimiothérapie ou radiothérapie, les déficits immunitaires et après traitement immunosuppresseur.
- Les lymphocytoses (lymphocytes > 4000 elts/mm³) sont rencontrées dans la tuberculose, la MNI, la coqueluche, la maladie de Carl-Smith, la LLC...

3-3/ LES PLAQUETTES

- Les plaquettes sont de petits éléments de 2-3µm de diamètre, elles sont dispersées ou en amas sur les frottis de sang. L'existence d'amas de moins 5 plaquettes correspondrait à un taux de moins de 50000 plaquettes/ mm³ (+) avec risque de saignement. L'existence d'amas de 5-10 plaquettes correspondrait à un taux de 50000-100000 plaquettes/ mm³ (++) . L'existence d'amas supérieure à 10 plaquettes correspondrait à un taux de plaquettes normal (+++).

- Si le taux des plaquettes est inférieur à 150000/mm³ on parlera de thrombopénie (étiologies : insuffisances médullaires, purpuras thrombopéniques) et s'il est supérieur à 400000/mm³, il s'agit d'une thrombocytose (étiologies: syndromes inflammatoires, anémies ferriprives, syndromes myéloprolifératifs).

3-4/ VARIATIONS DES TROIS LIGNEES

La diminution des trois lignées (GR-GB-PL) s'appelle une pancytopenie et la diminution de deux lignées, une bicytopenie.

CONCLUSION :

L'hémogramme est un examen systématique de base qui permet non seulement d'établir un diagnostic, de suivre l'évolution spontanée ou sous thérapeutique d'une maladie donnée mais encore de sauver une vie humaine en mettant en évidence une anémie.

REFERENCES

S. Ezine. Physiologie et différenciation des cellules sanguines. EMC. Hématologie [13-013-A-10] (1993).

F. Valensi . Morphologie des cellules sanguines. EMC, Hématologie, 13-000-A-15, 2005.