

FACULTE DE PHARMACIE DE LYON

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES DE LYON

TRAVAUX PRATIQUES D'HEMATOLOGIE

Pr S. GUIBAUD avec B. DURAND et Ch. BON

2ème ANNEE

1992 - 1993

LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE PHARMACEUTIQUE

L'hémogramme constitue l'examen de base de toute exploration hémato-
logique. Il comprend :

- les numérations cellulaires : érythrocytes, leukocytes et thrombocytes ;
- le dosage de l'hémoglobine ;
- la détermination de l'hématocrite ;
- le calcul des indices érythrocytaires ;
- l'étude du frottis sanguin : étude morphologique des érythrocytes et des thrombocytes, établissement de la formule leukocytaire et étude morphologique des leukocytes.

A ces paramètres, s'ajoute souvent la numération des réticulocytes.

Depuis quelques années, l'hémogramme complet est devenu un examen automatisé, précis, rapide et reproductible grâce à l'utilisation d'appareils automatiques et électroniques de plus en plus perfectionnés. Avant la mise en circulation des compteurs électroniques, les méthodes manuelles ont été pendant de nombreuses années les seules techniques utilisables, à portée de tout laboratoire, pouvant donner des résultats convenables dans les mains de techniciens entraînés.

Ces techniques manuelles seront successivement décrites.

NUMERATIONS CELLULAIRES

Elles comprennent :

- la numération des érythrocytes
- la numération des leukocytes
- la numération des thrombocytes

I - NUMERATION DES ERYTHROCYTES (Ercs)

1) Principe

Le sang est dilué avec un liquide qui prévient la lyse des érythrocytes. Cette dilution est introduite dans une cellule compte-globules ou hématimètre de volume connu et les érythrocytes sont comptés au microscope. Les liquides de dilution utilisés pour la numération des érythrocytes ne détruisent pas les leukocytes. Cependant, ces derniers sont normalement si peu nombreux, qu'ils n'interfèrent pas dans les résultats.

2) Prélèvement

- Sang capillaire : prélèvement par piqûre franche avec une micro-lance stérile au niveau de la pulpe d'un doigt chez l'adulte, au niveau du talon chez le nourisson. Eliminer la première goutte de sang.
- Sang veineux recueilli sur anticoagulant EDTA (permettant une bonne conservation de la morphologie des cellules sanguines).

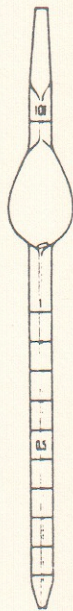
3) Réactifs

- Liquides de dilution (neutres, isotoniques)
 - . liquide de HAYEM ($HgCl_2$ - $Na_2 SO_4$ - NaCl - eau distillée), le plus fréquemment utilisé.
 - . liquide de MARCANO ($Na_2 SO_4$ - formol - eau distillée)
 - . soluté physiologique à 9 g/l.

4) Matériel

4-1 Pipette de dilution ou pipette de POTAIN (fig. 1) :

- Tube capillaire comportant à la partie supérieure un renflement en ampoule contenant une petite bille de verre (destinée à assurer l'homogénéisation du mélange) et portant plusieurs graduations :
 - . graduation 101 au dessus de l'ampoule ;
 - . graduations 0,5 et 1 au dessous de l'ampoule permettant d'obtenir des dilutions respectives de 1/200 et 1/100.



- Un tube de caoutchouc terminé par un embout buccal est adapté à cette pipette pour l'aspiration.

← Fig. 1 : pipette de Potain pour érythrocytes.

4-2 Cellules compte-globules ou hématimètres (fig.2) :

Il s'agit d'épaisses lames de verre au centre desquelles se trouve une plate-forme gravée d'un quadrillage. Deux rigoles encadrent cette plate-forme et la séparent de 2 surfaces légèrement plus élevées sur lesquelles on fait adhérer une lamelle de verre plane.



Fig. 2 : Hématimètre

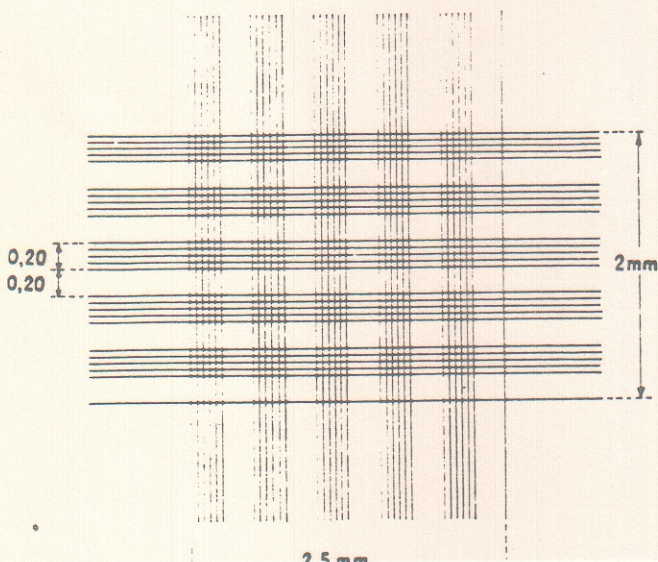
Deux modèles d'hématimètre sont surtout utilisés :

- l'hématimètre de MALASSEZ (fig. 3)

quadrillage : 100 rectangles de 0,25 mm x 0,20 mm

profondeur de la chambre : 0,20 mm

Volume total : 1 mm³



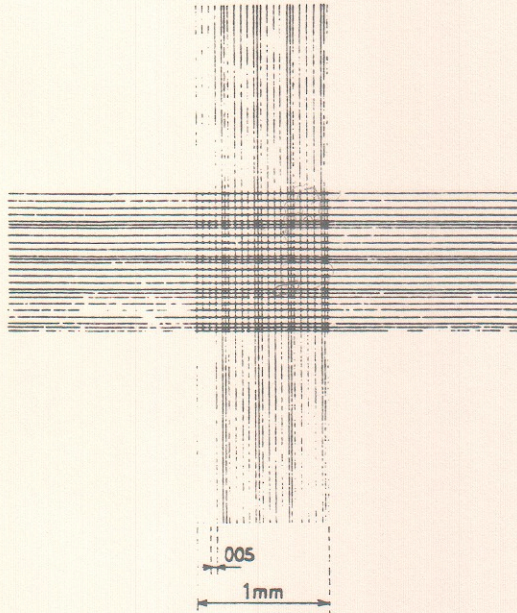
← Fig. 3 Quadrillage de l'hématimètre de Malassez.

- l'hématimètre de THOMA (fig. 4)

quadrillage : 400 petits carrés de 0,05 mm de côté

profondeur de la chambre : 0,1 mm

volume total : 0,1 mm³



← Fig. 4 : Quadrillage de l'hématimètre de Thoma.

4-3 Lamelle spéciale, planée optiquement.

5) Technique

5-1 Dilution du sang

- La pipette étant reliée à la bouche par son tube de caoutchouc, aspirer le sang jusqu'au trait 0,5 sans faire de bulle.

- Essuyer l'extérieur de l'extrémité de la pipette.

- Aspirer le liquide de dilution jusqu'au repère 101 (dilution au 1/200).

- Agiter pour homogénéiser le contenu de l'ampoule.

5-2 Remplissage de la cellule

- Rejeter les premières gouttes (qui ne représentent que du liquide de dilution)

- Laisser la cellule se remplir par capillarité après avoir appliqué le bout de la pipette contre la lamelle montée sur la cellule

- Laisser reposer 5 mn pour permettre aux érythrocytes de sédimenter.

5-3 Lecture au microscope

objectif x 40

- Sur cellule de MALASSEZ :

Compter les érythrocytes situés à l'intérieur de 4 rectangles (choisis suivant une diagonale). Les érythrocytes "à cheval" sur les lignes limitrophes ne sont comptés qu'une fois sur deux.

$$\begin{aligned} \text{Erythrocytes/mm}^3 &= \frac{\text{Erythrocytes comptés} \times 100 \times 200}{4} \\ &= \underline{\text{Nombre d'érythrocytes comptés} \times 5000} \end{aligned}$$

$$\text{Nombre d'érythrocytes/l} = \text{Nombre d'érythrocytes/mm}^3 \times 10^6$$

$$\text{Unités S.I.} = \text{Téra/l} = 10^{12}/\text{l}$$

- Sur cellule de THOMACompter les érythrocytes contenus dans 5 grands carrés

$$\begin{aligned} \text{Erythrocytes/mm}^3 &= \text{Erythrocytes comptés} \times \frac{1}{0,004 \times 5} \times 200 \\ &= \underline{\text{Erythrocytes comptés} \times 10\ 000} \end{aligned}$$

Ex : Erythrocytes comptés : 500

$$\text{Nb d'érythrocytes/mm}^3 = 500 \times 10\ 000 = 5.000.000$$

soit en unités S.I. : $5 \times 10^{12}/\text{l}$ (5 Téra/l)6) Valeurs usuellesVariations physiologiques importantes suivant l'âge et le sexe :- Adulte : Homme : $4,5$ à $5,7 \times 10^{12}/\text{l}$ (Téra/l ou T/l)Femme : $4,2$ à $5,2 \times 10^{12}/\text{l}$

- Nouveau-né : jusqu'à 6 T/l

- 3 ans : $3,2$ à $4,3$ T/l

Autres variations physiologiques :

- séjour en altitude : \uparrow (polyglobulie)II - NUMERATION DES LEUKOCYTES (Lkcs)1) Principe

Le sang est amené à une dilution convenable à l'aide d'un liquide de dilution qui lyse les érythrocytes tout en préservant la structure des leukocytes (éléments nucléés). Cette dilution est introduite dans un hématimètre et les leukocytes sont comptés au microscope.

2) Prélèvement

- Sang capillaire (sans anticoagulant)
- Sang veineux (recueilli sur EDTA)

3) Réactifs

- Liquide de dilution :

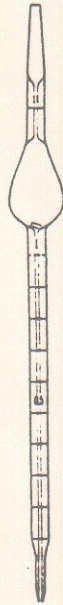
. solution de bleu acétique correspondant à la formule suivante :

bleu de méthylène.....	0,05 g
acide acétique	1 ml
eau distillée	q.s.p 200 ml

4) Matériel4-1 Pipette de dilution ou mélangeur de POTAIN

Pipette ayant le même aspect que celle utilisée pour la numération des érythrocytes ; elle comporte à la partie supérieure un renflement en ampoule contenant une petite bille de verre (destinée à assurer l'homogénéisation du mélange) et porte plusieurs graduations (fig. 5) :

- . en dessous de l'ampoule : 0,5 et 1 (correspondant respectivement à des dilutions au 1/20 et 1/10)
- . au dessus de l'ampoule : 11



← Fig. 5 : mélangeur de POTAIN

4-2 Hématimètres

Deux modèles utilisés (cf numération des érythrocytes) :

- Cellule de MALASSEZ :

la plus utilisée, permet une lecture sur un volume total de 1 mm^3 ;

- Cellule de THOMA, de capacité plus réduite (volume total = $0,10 \text{ mm}^3$)

4-3 Lamelle spéciale, planée optiquement

5) Technique

5-1 Dilution du sang

- Aspirer le sang jusqu'au trait 0,5 sans faire de bulle.
- Essuyer l'extérieur de la pipette.
- Aspirer le liquide diluant jusqu'au trait 11 pour obtenir une dilution au 1/20è.
- Agiter la pipette pour homogénéiser le mélange.

5-2 Remplissage de la cellule

- Rejeter les premières gouttes (liquide de dilution)
- Remplir la cellule par capillarité après avoir appliqué le bout de la pipette contre la lamelle montée sur la cellule
- Laisser sédimenter 5 à 10 min. pour permettre aux leukocytes de sédimenter.

5-3 Lecture au microscope

Les leukocytes sont identifiables du fait de leur taille, de leur réfringence et de leur noyau toujours nettement visible.

Vérifier au faible grossissement, l'homogénéité de leur répartition.

Comptage à l'objectif x 40

- Sur cellule de MALASSEZ :

Dénombrer les leukocytes situés à l'intérieur des traits limitant la partie quadrillée de la cellule, c'est-à-dire contenus dans l'ensemble des 100 rectangles (soit dans 1 mm^3).

$$\text{Leukocytes}/\text{mm}^3 = \frac{\text{Nombre de leukocytes comptés} \times 20}{\text{Nombre de leukocytes}/1 = \text{Nombre de leukocytes}/\text{mm}^3 \times 10^6}$$

$$\text{Unités S.I.} = 10^9/1 \text{ (Giga/l ou G/l)}$$

- Sur cellule de THOMA :

Dénombrer tous les leukocytes situés à l'intérieur des traits limitant le quadrillage de la cellule (soit dans $0,1 \text{ mm}^3$)

$$\text{Leukocytes}/\text{mm}^3 = \frac{\text{Nombre de leukocytes comptés} \times 200}{\text{Ex : Leukocytes comptés} = 30}$$

$$\text{Nb de leukocytes}/\text{mm}^3 = 30 \times 200 = 6\ 000$$

$$\text{soit en unités S.I. : } 6 \times 10^9/1 \text{ (6 G/l)}$$

6) Valeurs usuelles

4 à $10 \times 10^9/l$ (Giga/l ou G/l)

- si < 4 leucopénie
- si > 10 hyperleukocytose

Variations physiologiques :

- pas de variation en fonction du sexe
- variation en fonction de l'âge
 - . nouveau-né : 12 à 25 G/l
 - . enfant : ≈ 10 G/l
- au cour de la grossesse : légère hyperleukocytose.

III - NUMERATION DES THROMBOCYTES1) Principe

Le sang est dilué dans un liquide qui :

- conserve la structure des thrombocytes en s'opposant à leur agrégation spontanée ;
- permet la lyse des érythrocytes.

La numération proprement dite est effectuée ensuite en cellule au microscope.

2) Prélèvement

- Sang capillaire (prélèvement au bout du doigt)
- sang veineux recueilli sur EDTA (qui inhibe l'agrégation plaquettaire)

3) Réactifs

- Liquides de dilution :

- . liquide de PIETTE préparé selon la formule :

Solution A :

Chlorhydrate de procaine	24,3 g
Eau distillée	q.s.p 100 ml

Solution B :

Chlorure de sodium	1 ml
Eau distillée	q.s.p 100 ml

Solution de dilution à préparer extemporanément :

Solution A 1 ml

Solution B 9 ml

- . PLAXAN, liquide commercial à base d'oxalate d'ammonium à 1 %.

4) Matériel4-1 Mélangeur de POTAIN (dilution au 1/20^e)

4-2 Hématimètre de MALASSEZ ou de THOMA

5) Technique5-1 Dilution du sang (cf Numération des leukocytes)5-2 Remplissage de l'hématimètre (cf Numération des leukocytes)5-3 Lecture au microscope

Réduire l'éclairage en diaphragmant : les thrombocytes apparaissent comme des corpuscules réfringents, bien séparés, de taille inégale (1/3 à 1/5 d'un érythrocyte).

Vérifier au faible grossissement l'homogénéité de leur répartition.

Lecture à l'objectif x 40 :- Sur cellule de MALASSEZ :Compter les thrombocytes contenus dans 10 rectangles quadrillés (soit dans $0,1 \text{ mm}^3$)

$$\text{thrombocytes/mm}^3 = \text{thrombocytes comptés} \times 10 \times 20$$

$$= \underline{\text{thrombocytes comptés} \times 200}$$

$$\text{thrombocytes/l} = \text{Nombre de thrombocytes/mm}^3 \times 10^6$$

- Sur cellule de THOMA :Compter les thrombocytes contenus dans 5 grands carreaux (soit $5 \times 0,004 \text{ mm}^3$)

$$\text{thrombocytes/mm}^3 = \text{thrombocytes comptés} \times \frac{1}{5 \times 0,004} \times 20$$

dilution

$$= \underline{\text{thrombocytes comptés} \times 1000}$$

$$\text{Ex : thrombocytes comptés} = 300$$

$$\text{Nb de thrombocytes/mm}^3 = 300 \text{ 000}$$

$$\text{soit } 300 \times 10^9/\text{l (Giga/l)}$$

6) Valeurs usuelles

$$150 \text{ à } 400 \times 10^9/\text{l}$$

Pas de variation sensible en fonction du sexe.

7) Valeurs pathologiques

. si	↘	:	thrombopénie
. si	↗	- > 500	thrombocytose
		- > 1000	thrombocytémie

DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

Il existe plusieurs méthodes manuelles de dosage de l'hémoglobine. Cependant, la méthode à la cyanméthémoglobine est la technique recommandée par le C.I.S.H (Comité International pour la Standardisation en Hématologie). Un des avantages de cette méthode de mesure du taux d'hémoglobine est qu'une solution étalon de cyanméthémoglobine est en vente dans le commerce, facilitant la calibration spectrophotométrique.

I - PRINCIPE

Le sang est dilué dans la solution de Drabkin. Sous l'action du ferricyanure de potassium, le fer ferreux de l'hémoglobine est transformé en fer ferrique (méthémoglobine). Celle-ci se combine au cyanure de potassium pour former la cyanméthémoglobine, pigment stable (alors que l'hémoglobine est instable) mesurée à une longueur d'onde de 540 nm au spectrophotomètre.

II - PRELEVEMENT

- Sang capillaire ou sang veineux recueilli sur EDTA.

III - REACTIFS

. Solution de DRABKIN

ferricyanure de potassium 0,2 g

($K_3 Fe (CN)_6$)

cyanure de potassium (KCN) 0,05 g

bicarbonate de sodium ($Na HCO_3$) 1 g

eau distillée 1000 ml

Conservation à l'abri de la lumière.

Cette solution a été modifiée par addition de détergent, afin d'accélérer la vitesse de transformation en cyanméthémoglobine.

. Solution étalon de cyanméthémoglobine.

IV - MATERIEL

- Pipette de Sahli : jaugée à 20 ul
- Système Unopette pour dosage de l'hémoglobine
- Spectrophotomètre : filtre 540 nm.

V - TECHNIQUE

- A 5 ml de solution de Drabkin, ajouter 20 ul de sang (dilution 1/250).
- Agiter - Attendre environ 3 min.
- Photométrer à 540 nm par rapport à l'étalon commercial de titre connu.
- Résultats exprimés en g/l (unités S.I.)

VI - VALEURS USUELLES

Variations physiologiques importantes suivant l'âge et le sexe :

- Adulte : Hommes 140 à 170 g/l
- Femmes 120 à 150 g/l

- Nouveau-né : 190 ± 50 g/l
- Enfant 1 an : 120 g/l en moyenne
- " 10 ans : 130 g/l en moyenne

VII - PATHOLOGIE

IMPORTANT

Diminution du taux d'hémoglobine : ≤ 120 g/l,

ANEMIE

DETERMINATION DE L'HEMATOCRITE

L'hématocrite représente le volume occupé par les érythrocytes par rapport au volume du sang total. Il s'exprime en litre d'érythrocytes par litre de sang (l/l)

Sa détermination s'effectue :

- par méthode directe : la centrifugation (macro-hématocrite ou micro-hématocrite), technique recommandée par le Comité International pour la Standardisation en Hématologie (C.I.S.H) ;
- par méthode indirecte : calcul à partir du volume cellulaire moyen (VCM) et de la numération des érythrocytes obtenus automatiquement par des compteurs électroniques.

I - MACRO-HEMATOCRITE

1) Prélèvement

- Sang veineux prélevé sur EDTA ou héparine

2) Matériel

- Tubes de Wintrobe gradués de 0 à 100 mm et soigneusement calibrés.
- Centrifugeuse.

3) Technique

- Homogénéiser le sang
- Remplir le tube de Wintrobe jusqu'à la graduation 100
- Centrifuger 30 min. à 3000 tours/min.
- Lecture directement sur le tube, au-dessous de la couche leukocytaire.

Cette technique nécessitant un volume important de sang et un temps long de centrifugation, d'utilisation délicate et de précision relative, est abandonnée au profit du micro-hématocrite. Cependant, elle peut servir de référence pour la vérification des résultats obtenus par les autres méthodes.

II - MICRO-HEMATOCRITRE

1) Prélèvement

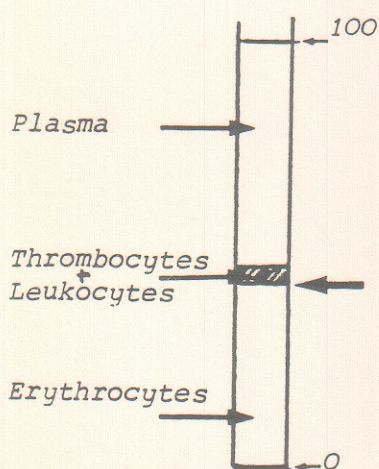
- Sang capillaire
- Sang veineux prélevé sur anticoagulant sec.

2) Matériel

- Tubes capillaires soigneusement calibrés (tubes héparinés dans le cas de prélèvement capillaire)
- Brûleur ou pâte à modeler pour fermer les tubes à une extrémité.
- Centrifugeuse spéciale (environ 12 000 tours/min. soit 12 000 g).
- Lecture à hématocrite.

3) Technique

- Remplir 1 tube capillaire au 3/4.
- Fermer une extrémité avec la pâte ou à la flamme.
- Centrifuger 5 min. à 12 000 tours/min.
- Lecture :



A l'aide d'un système de lecture incorporé à la centrifugeuse ou avec une réglette spéciale, régler le 0 et le 100, puis lire la hauteur d'érythrocytes en dessous de la couche leucocytaire (fig. 7)

Fig. 7 : lecture de l'hématocrite

- Résultats : Sur les lecteurs habituellement utilisés, l'hématocrite est exprimé en pourcentage. Les résultats doivent donc être multipliés par 0,01 pour donner le volume en l/l.

4) Valeurs usuelles

Variations physiologiques importantes suivant l'âge et le sexe :

- Adulte : Homme : 0,40 à 0,54 l/l
Femme : 0,37 à 0,47 l/l
- A la naissance : environ 0,60 l/l

EXAMEN DES CELLULES SANGUINES SUR FROTTIS

Le frottis sanguin permet :

- . d'observer et de noter la morphologie des hématies
- . d'observer les thrombocytes (étude qualitative)
- . d'établir la formule leucocytaire ou différentielle leucocytaire, c'est-à-dire d'identifier les différents types de leucocytes et d'établir le pourcentage de chacun.

I - CONFECTION DES FROTTIS SANGUINS

1) Principe

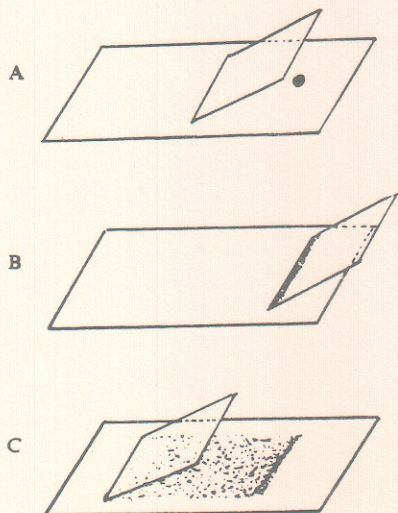
Il s'agit de préparer un étalement mince d'une goutte de sang sur une lame de verre ; après une coloration appropriée, le frottis est observé au microscope avec l'objectif à immersion.

2) Matériel

- lames de verre propres et dégraissées (ne jamais poser les doigts sur leur surface de manière à ne pas laisser d'empreintes grasses)
- lame à bords rodés ou lame plus étroite.

3) Technique (fig. 8)

- Déposer une petite goutte de sang (capillaire ou veineux) à 1 cm de l'une des extrémités de la lame.
- Placer le bord de la lame rodée sur la lame (A) et glisser celle-ci jusqu'à ce qu'elle entre en contact avec la goutte, en maintenant un angle d'environ 35 degrés. La goutte de sang s'étale le long de l'arête par capillarité (B).
- D'un mouvement souple et régulier, étaler la goutte de sang (C)
- Sécher complètement le frottis par agitation à l'air pour conserver la forme des érythrocytes et éviter la formation d'artéfacts.
- Identifier le frottis :



← Fig. 8 : confection d'un frottis de sang

A, la lamelle est glissée jusqu'à la goutte.
 B, le sang se répand dans l'angle dièdre lame-lamelle.
 C, fin du frottis.

4) Qualité du frottis

Frottis de bonne qualité (fig. 9 A) :

Frottis minces, réguliers, avec des bords parallèles à la lame mais distants de ceux-ci et avec l'extrémité arrondie ou en pinceau.

Frottis défectueux (fig. 9 B) :

Frottis trop épais → cellules mal étalées
examen difficile

Frottis trop minces → cellules trop dispersées

Frottis irréguliers → cellules mal distribuées

Frottis mal séchés → hématies altérées

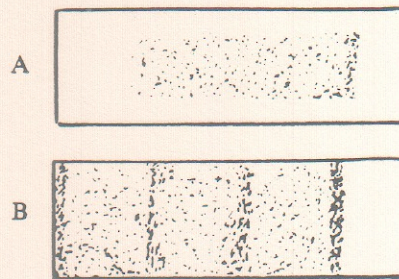


Fig. 9 : exemples de frottis

A : frottis de bonne qualité

B : frottis défectueux (irrégulier)

II - COLORATION DES FROTTIS SANGUINS

La coloration des frottis sanguins permet l'identification des leucocytes grâce à leurs caractéristiques propres mises en évidence par un colorant approprié, ainsi que l'observation des érythrocytes et des thrombocytes.

Les méthodes les plus utilisées sont la coloration de MAY-GRÜNWARD-GIEMSA et la coloration de WRIGHT.

1) Coloration de May-Grünwald-Giemsa (HMG)

1-1 Principe

Méthode panoptique basée sur l'emploi successif de 2 colorants :
le May-Grünwald et le Giemsa

- . May-Grünwald → fixation des frottis
coloration des éléments
acidophiles et des granulations spécifiques
- . Giemsa → coloration des noyaux et des parties azurophiles

1-2 Réactifs

- Solution de May-Grünwald utilisée pure ou diluée au 1/2 dans l'eau tamponnée à pH 7
- Solution de Giemsa diluée à 5 % dans l'eau tamponnée à pH 7
- Eau tamponnée à pH 7

1-3 Technique

- Coloration en bac selon la séquence suivante :
 - . May-Grünwald pur 5 min.
 - . May-Grünwald dilué au 1/2 1 min.
 - . Giemsa à 5 % 15 min.
- Lavage sous jet d'eau.
- Séchage par égouttage ou mieux, par ventilation à froid.

2) Coloration de Wright2-1 Principe

Méthode très utilisée permettant une bonne différenciation des cellules grâce à un colorant composé de bleu de méthylène, d'éosine et d'azur de méthylène en solution dans le méthanol.

Coloration utilisée par les appareils automatiques de type Hématek (Miles).

2-2 Réactifs

- Colorant de Wright (éosine - bleu de méthylène) en solution prête à l'emploi
- Tampon à pH 6,8

2-3 Technique

- Coloration en bac selon la séquence suivante :
 - . Colorant de Wright 3 min.
 - . Tampon pH 6,8 6 min.
- Lavage immédiat sous jet d'eau
- Séchage par égouttage ou mieux, par ventilation à froid.

2-4 Résultats

- Résultats comparables à ceux donnés par la coloration de May-Grünwald-Giemsa
- Avantage = rapidité.

III - EXAMEN DES FROTTIS SANGUINS

- Contrôler tout d'abord à faible grossissement la qualité du frottis (étalement, distribution des cellules et coloration).

- Déposer une goutte d'huile à immersion sur l'étalement et mettre en place l'objectif à immersion (x 100).

- Tout en évitant les bords du frottis, choisir un endroit où les érythrocytes sont voisins sans cependant se toucher (fig. 10). Les leukocytes doivent être intacts et leur répartition relativement homogène, sachant que :

- . les éléments les plus petits (lymphocytes) se regroupent surtout au centre du frottis ;
- . les éléments les plus volumineux (granulocytes et monocytes) sont entraînés sur les bords et dans les franges du frottis (fig. 10)

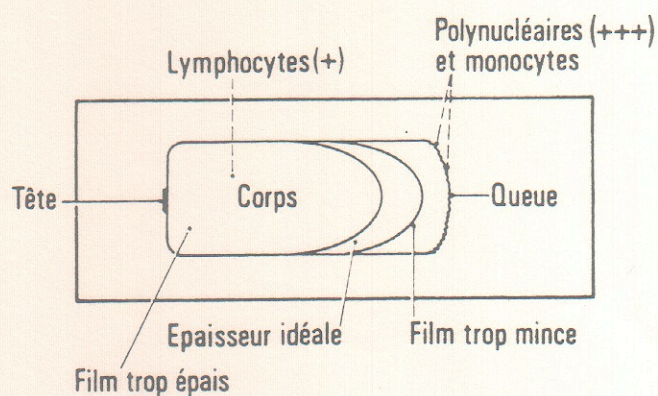


Fig. 10 - Schéma du frottis

1) Etude de la morphologie des érythrocytes

- Observation et appréciation de la taille, la forme, et la couleur des érythrocytes :

Aspect normal : cellules anucléées de 7 à 8 μm de diamètre se présentant sous forme de disques, colorés en beige par le MGG, plus pâles au centre qu'à la périphérie (normocytes normochromes)

- Recherche d'anomalies pouvant confirmer les anomalies des indices érythrocytaires :

- . anomalies de taille (= anisocytose)
microcytose, macrocytose
- . anomalies de forme (= poïkilocytose)
acanthocytes, elliptocytes, schizocytes ...
- . anomalies de coloration
hypochromie, (cellules-cible), polychromatophilie ...
- . Présence d'inclusions érythrocytaires
corps de Howell-Jolly, granulations basophiles etc...
- . Anomalies de disposition : rouleau-formation.

2) Etude de la distribution et de la morphologie des thrombocytes

- Evaluation approximative du nombre de thrombocytes (augmentation, nombre normal, diminution) qui sera confirmée par la numération

- Etude de la disposition des thrombocytes sur le frottis

- . sang capillaire (sans anticoagulant) : thrombocytes isolés avec présence de quelques agrégats plaquettaires de taille variable (Si absence d'agrégats → anormal)
- . sang recueilli sur EDTA : thrombocytes isolés et disséminés sur l'ensemble de la lame (Si agrégats → anormal)

- Etude de la morphologie des thrombocytes

Aspect normal : Eléments cellulaires anucléés en forme de disques de 2 à 3 μm de diamètre, dans lesquels on peut reconnaître deux zones distinctes :

- le chromomère ou granulomère contenant des granulations azurophiles regroupées au centre
- le hyalomère incolore, à la périphérie.

Variants : thrombocytes de taille plus grande pouvant atteindre dans certains cas 10 à 15 μm de diamètre (= thrombocytes géants ou mégathrombocytes).

3) Etablissement de la formule leukocytaire ou "différentielle leukocytaire"

3-1 Principe : Détermination du pourcentage de chacun des types de leukocytes présents en comptant au moins 100 leukocytes et en distinguant les lignées granulocytaire, lymphocytaire et monocytaire. Chaque leukocyte identifié est compté à l'aide d'un compteur mécanique.

3-2 Technique

- Avec l'objectif à immersion ($\times 100$), parcourir l'ensemble du frottis "en chicane" (fig. 11) du fait de la répartition inégale des éléments, en évitant les parties trop épaisses ou trop minces.

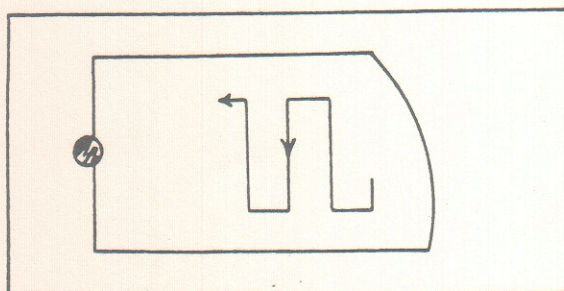


Fig. 11 : Méthode de lecture du frottis

- Compter chaque leukocyte rencontré et identifié ; établir ensuite le pourcentage de chacun des types cellulaires

3-3 Description sommaire des cellules sanguines nucléées (cf planche)

. Le polynucléaire neutrophile :

Elément arrondi de 12 à 15 μm de diamètre (\approx 2 fois la taille d'un érythrocyte) présentant :

- un noyau segmenté en 2 à 5 lobes (le plus souvent 3 lobes) avec une chromatine dense, en mottes, colorée en violet par le MGG ;
- un cytoplasme acidophile renfermant des granulations neutrophiles nombreuses, fines, apparaissant beige-rosé au MGG.

. Le polynucléaire éosinophile :

Elément arrondi d'environ 15 μm de diamètre caractérisé par :

- un noyau le plus souvent bilobé (2 lobes) ;
- un cytoplasme contenant de grosses granulations peu nombreuses, bien visibles, beige-orangé.

Elément fragile, parfois éclaté sur les frottis.

. Le polynucléaire basophile :

Cellule d'environ 10 μm de diamètre, caractérisée par de grosses granulations violet-noir foncé recouvrant le cytoplasme et souvent le noyau lui-même relativement volumineux, difficilement visible.

. Le lymphocyte

Suivant le critère taille, on distingue le petit lymphocyte et le grand lymphocyte.

Le petit lymphocyte :

Cellule arrondie dont le diamètre se situe autour de 10 μm , caractérisée par :

- un noyau à chromatine dense (violet foncé) occupant presque toute la cellule (9/10) ;
- un cytoplasme peu abondant, souvent réduit à un liséré périnucléaire, discrètement basophile, sans granulation.

Le grand lymphocyte :

Cellule d'environ 10 à 15 μm de diamètre présentant :

- un noyau moins dense que dans le petit lymphocyte,

- un cytoplasme plus abondant, bleu pâle, pouvant renfermer parfois de grosses granulations azurophiles peu nombreuses.

Forme particulière : le lymphocyte stimulé

Lymphocyte de grande taille, avec basophilie importante du cytoplasme, renforcée à la périphérie de la cellule. Forme rencontrée au cours d'infections virales (mononucléose infectieuse, oreillons, varicelle...), de la toxoplasmose etc...

. Le monocyte

Cellule quadrangulaire d'environ 15 μm de diamètre caractérisée par :

- un noyau contourné, de forme irrégulière (réniforme : forme la plus classique ou autre) ayant une chromatine moins dense que celle du polynucléaire ;
- un cytoplasme gris pâle contenant de fines granulations à peine visibles ("poussière de granulations") et parfois des vacuoles.

3-4 Valeurs usuelles

► Pas de variation sensible en fonction du sexe, mais variations en fonction de l'âge :

- Chez l'adulte :

	%	$\times 10^9 / l$
Polynucléaires neutrophiles (PN)	50 - 75	2 à 7,5
" éosinophiles	< 5	< 0,5
" basophiles	< 1	< 0,1
Lymphocytes	20 - 40	2 à 4
Monocytes	< 10	< 1

- A la naissance :

Formule leukocytaire identique à celle de l'adulte, avec évolution rapide vers une diminution des PN dès le 3^e jour de vie

- De la 1^{ère} enfance jusqu'à 10 ans environ :

Formule inversée : PN \approx 40 %

Lymphocytes \approx 50 %

► Variation avec la grossesse :

Polynucléose en fin de grossesse.