

Examens d'hématologie cellulaire



*Vous avez quitté la plateforme de France Université Numérique.
Aucune donnée personnelle ne sera récupérée.*

Pour démarrer cette séquence, veuillez cliquer sur "Ecran suivant"



Certaines diapositives facultatives sont signalées par une croix orange :
leur contenu est un peu plus complexe et ne sera pas au programme des évaluations.



U-PC
Université Sorbonne
Paris Cité

université
**PARIS
DIDEROT**
PARIS 7

 UNIVERSITÉ
**PARIS
DESCARTES**

UNIVERSITÉ **PARIS 13**
NORD


UPEC
Connaissance - Action

UNIVERSITÉ
PARIS-EST CRÉTEIL
VAL DE MARNE



ASSISTANCE
PUBLIQUE  **HÔPITAUX
DE PARIS**

Hôpitaux Universitaires
**SAINT-LOUIS
LARIBOISIÈRE
FERNAND-WIDAL**

Hôpitaux
Universitaires

Paris-Seine
Saint-Denis

 **HÔPITAUX UNIVERSITAIRES
PARIS CENTRE**
Cochin - Pitié-Salpêtrière - Saint-Joseph - Bichat
La Pitié-Salpêtrière - La Pitié-Salpêtrière - Bichat

 **HÔPITAUX UNIVERSITAIRES
PARIS NORD VAL DE SEINE**
Louis-Moore

 **Necker**
CHU de Paris

 **hm
HENRI MONDOR**
ALBERT CHARRIER - GUY DE CLERMONT
PARIS-VAL-DE-SEINE - HÔPITAL CLERMONT

 **Hôpital Universitaire
Robert Debré**

 **HÔPITAUX UNIVERSITAIRES
PARIS OUEST**
Cochin - Pitié-Salpêtrière - Saint-Joseph - Bichat

Examens d'hématologie cellulaire



Bienvenue !



Les examens d'hématologie cellulaire

Docteur Raphaël Itzykson
Hématologue
Hôpital Saint Louis
Université Paris Diderot

A partir d'un support du Docteur Stéphanie Mathis
Hémato-biologiste
Hôpital Saint Louis
Université Paris Diderot

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Examens d'hématologie cellulaire



Objectif du module

1

A l'issue de ce module, vous serez capable de connaître les principaux examens permettant d'explorer l'hématopoïèse



La durée de votre formation est estimée à 20 minutes

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



= Ensemble des mécanismes qui assurent la production des différentes cellules sanguines

◆ **Lieu de production** : moelle osseuse

◆ **Production régulée**

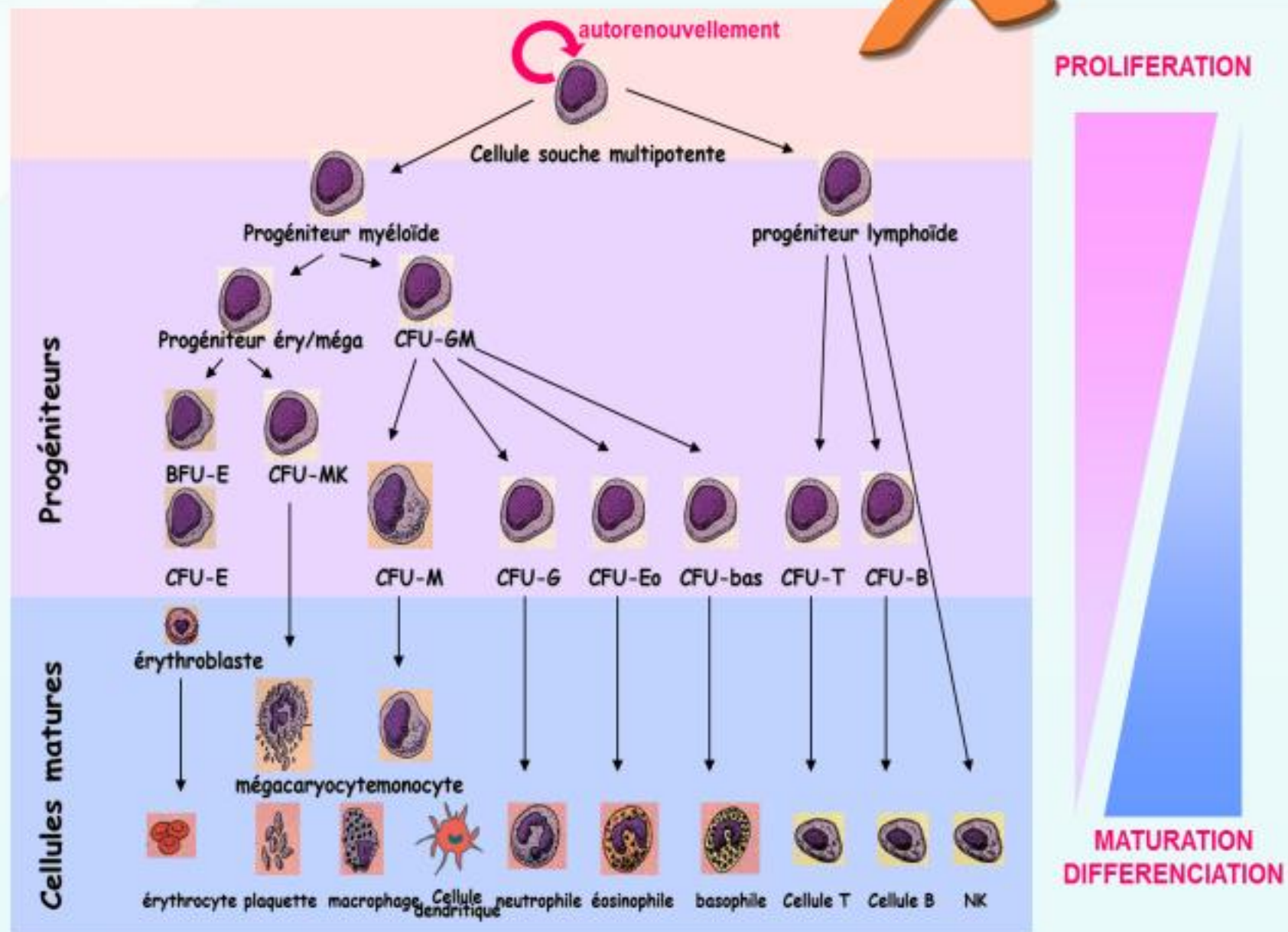
- ◆ Microenvironnement médullaire
- ◆ Facteurs de croissance

◆ **Production constante**

	Nombre	Durée de vie	Production
Globules rouges	$20 \cdot 10^{12}$	120 j	$200 \cdot 10^9$
PN neutrophiles	$0,5 \cdot 10^{12}$	24 h	$50 \cdot 10^9$
Plaquettes	$1,0 \cdot 10^{12}$	7 j	$100 \cdot 10^9$

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Prolifération - Maturation - Différenciation



Les termes "cellules souches", "différenciation", "auto-renouvellement" sont définis dans le glossaire

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Comment explorer l' hématopoïèse ?



Examens du sang périphérique

Numération Formule Sanguine (NFS) ou
hémogramme +/- dosage des réticulocytes

Examens de la moelle osseuse

Myélogramme
Biopsie ostéomédullaire

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Examens du sang périphérique



◆ Numération Formule Sanguine (NFS) ou hémogramme

- ◆ Réalisé à partir de sang total
- ◆ Sang prélevé sur anticoagulant (**EDTA**) par voie veineuse au pli du coude



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Numération Formule Sanguine



- ◆ Analyse **quantitative** des éléments figurés du sang
 - ◆ « la numération globulaire » est le nombre de leucocytes (= globules blancs), d'érythrocytes (= globules rouges), de plaquettes par litre de sang (+/- réticulocytes)
 - ◆ « la formule leucocytaire » est le nombre d'éléments nucléés (polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, lymphocytes et monocytes) par litre de sang
- ◆ Analyse **qualitative** des éléments figurés du sang = « frottis sanguin »
 - ◆ Analyse morphologique des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Numération Formule Sanguine : Analyse quantitative



- ◆ **Mesure automatisée** sur un automate de numération cellulaire
 - ◆ Nombre des éléments pour un volume de sang donné

Numération globulaire

Paramètres mesurés

- ✦ Globules rouges (T/L)
- ✦ Hémoglobine (g/dL)
- ✦ VGM ou volume globulaire moyen (fL)
- ✦ Réticulocytes (G/L)
- ✦ Globules blancs (G/L)
- ✦ Plaquettes (G/L)

Paramètres calculés

- ✦ Hématocrite (%) = $GR \times VGM \times 10^{-1}$
- ✦ TCMH ou Teneur corpusculaire moyenne en Hb (pg) = $(Hb \times 10) / nb \text{ GR}$
- ✦ CCMH = Concentration corpusculaire moyenne en Hb (g/dL) = $(Hb \times 1000) / Ht$



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Numération Formule Sanguine : Analyse quantitative



Formule leucocytaire

- ◆ Mesure **automatisée**
- ◆ Analyse des cinq sous populations de globules blancs
 - ◆ Répartition en %
 - ◆ Valeurs absolues (G/L)

- ✧ Polynucléaires neutrophiles
- ✧ Polynucléaires éosinophiles
- ✧ Polynucléaires basophiles
- ✧ Lymphocytes
- ✧ Monocytes



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

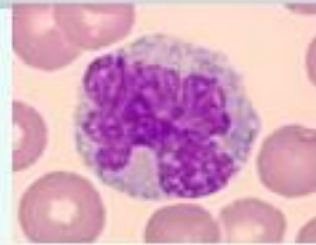
Numération globulaire : valeurs usuelles



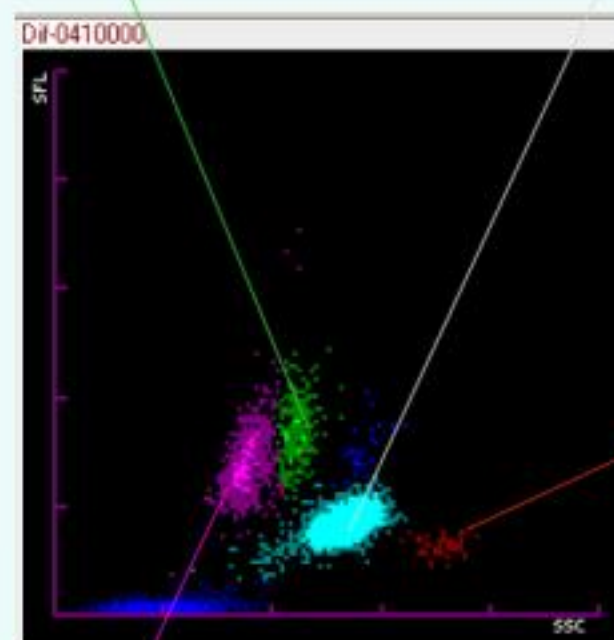
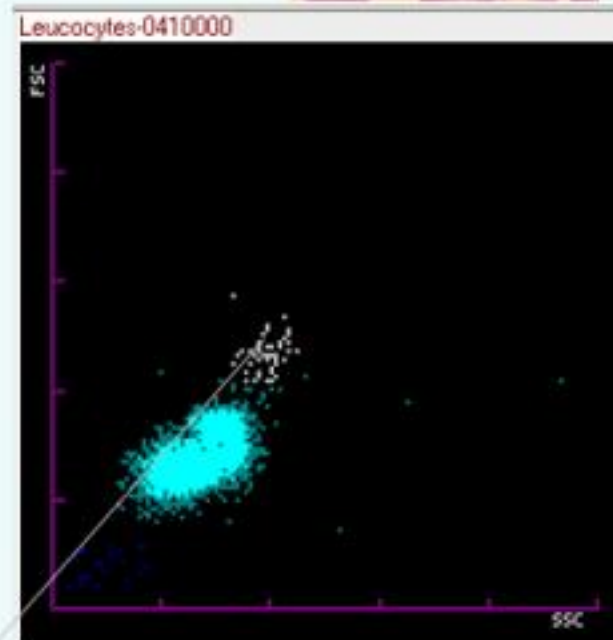
	Adulte homme	Adulte femme	Enfant	Nouveau né	Modifications physiologiques
GR $10^{12}/l$	4.5 à 6.2	4.0 à 5.4	3.6 à 5.0	5.0 à 6.0	
Hb g/dl	13 à 18	12 à 16	12 à 16	14 à 20	grossesse 2eme trimestre <10.5
Ht %	40 à 54	35 à 47	36 à 47	44 à 62	
VGM femtolitres	80 à 100	80 à 100	75 à 85		Alcool VGM 100-102 fL
CCMH g/dL	31 à 36	31 à 36	31 à 36	31 à 36	
TCMH pg	27 à 32	27 à 32	27 à 32	27 à 32	
GB $10^9/l$	4.0 à 10.0	4.0 à 10.0	4.0 à 12.0	10.0 à 25.0	Fumeurs GB >12.0
Plaquettes $10^9/l$	150 à 450	150 à 450	150 à 450	150 à 450	

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

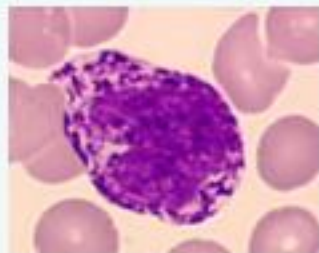
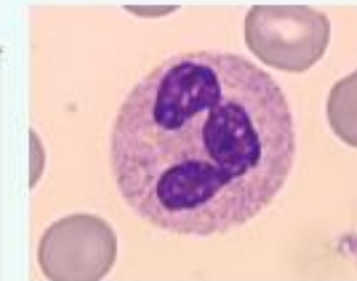
Formule leucocytaire automatisée



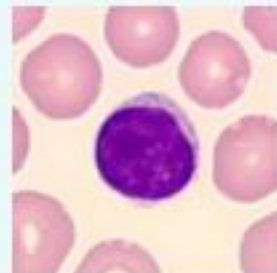
Monocytes



Polynucléaires
neutrophiles

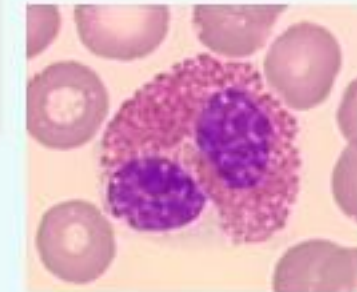


Polynucléaires
basophiles



Lymphocytes

Polynucléaires
éosinophiles



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Numération formule sanguine : analyse qualitative



◆ Examen du frottis sanguin

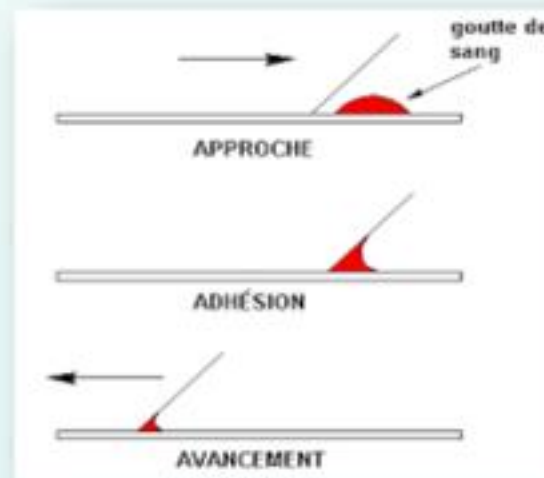
- ◆ analyse morphologique des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes
- ◆ décompte des éléments nucléés = **formule leucocytaire manuelle**

Comment le réaliser ?

1- dépôt d'une fine goutte de sang



2- étalement sur lame



3- frottis sanguin non coloré

frange



4- frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa (MGG)



5- lecture au microscope

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

NFS pathologique



Anémie	Hb < 13 g/dL (homme) Hb < 12 g/dL (femme) Hb < 14 g/dL (nouveau né) Hb < 12 g/dL (enfant)
Microcytose	VGM < 80 fL
Macrocytose	VGM > 100 fL
Hypochromie	CCMH < 31 g/dL
Régénératif	Réticulocytes > 150 G/L
Arégénératif	Réticulocytes < 100 G/L
Polyglobulie	Hématocrite > 54% (homme) Hématocrite > 47% (femme)
Thrombopénie	Plaquettes < 150 G/L
Thrombocytose	Plaquettes > 450 G/L
Leucopénie	GB < 4 G/L
Leucocytose	GB > 10 G/L

Neutropénie	PNN < 1,70 G/L
Neutrophile	PNN > 7 G/L
Lymphopénie	Ly < 1 G/L
Lymphocytose	Ly > 4 G/L
Monocytopénie	Mono < 0,2 G/L
Monocytose	Mono > 1 G/L
Eosinophilie	PNE > 0,5 G/L
Basophile	PNB > 0,2 G/L

+ anomalies morphologiques des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

NFS pathologique



- ◆ Toute anomalie de la NFS doit être explorée.

anémie normo/macrocytaire arégénérative et/ou neutropénie et/ou thrombopénie
--

= pancytopenie

- ◆ Examens sanguins complémentaires nécessaires
 - ◆ Cause réactionnelle ? (infectieuse, virale, immune ...)
 - ◆ Cause centrale ? (exploration de la moelle osseuse)

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Comment explorer l'hématopoïèse ?



Examens du sang périphérique

Numération Formule Sanguine (NFS) ou
hémogramme +/- dosage des réticulocytes

Examens de la moelle osseuse

Myélogramme
Biopsie ostéomédullaire

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Exploration de la moelle osseuse



◆ Myélogramme : analyse cytologique

◆ Examen **quantitatif**

- ✦ pourcentages relatifs des éléments des différentes lignées médullaires

◆ Examen **qualitatif**

- ✦ évaluation de la morphologie cellulaire et mise en évidence de dysplasies

◆ Biopsie ostéo-médullaire : analyse histologique

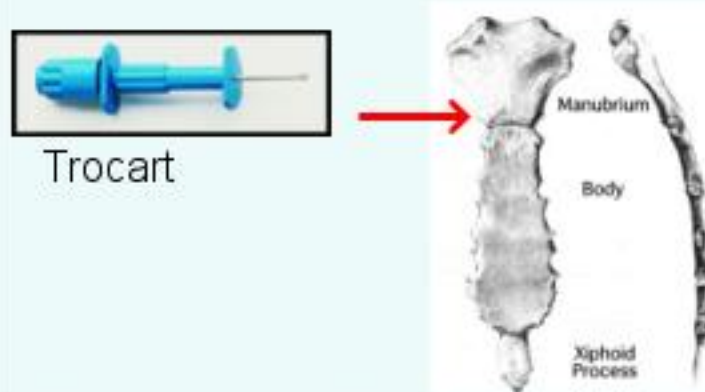
Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Myélogramme



Ponction sternale

- ◆ Adulte
- ◆ Siège : sternum (manubrium)



Ponction iliaque

- ◆ Enfants ou Adulte si contre-indication à la ponction sternale
- ◆ Siège : crête iliaque postérieure



Anesthésie locale +++



Patch lidocaïne
(superficielle)

Injection locale de xylocaïne
(profonde : peau + tissus sous
cutanés + périoste)



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

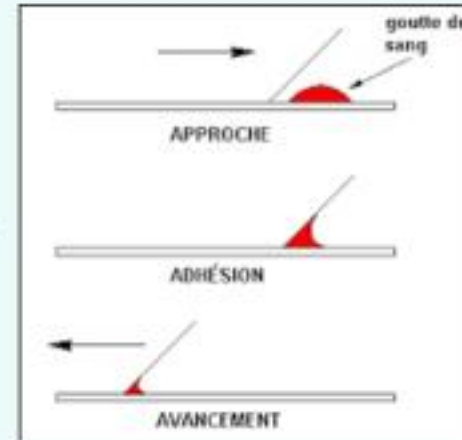
Myélogramme



Aspirations de
moelle osseuse

1- Etalement fin = frottis médullaire

1ère aspiration
(gouttes)



2- Examens complémentaires

2ème aspiration
(1-2 mL)

Exemple : cytogénétique
=> tubes adaptés



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



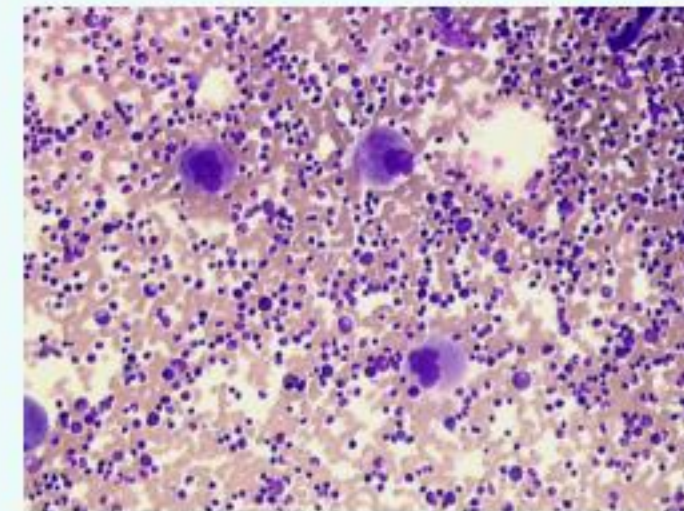
1- Coloration au May
Grunwald Giemsa (MGG)



Frottis médullaire non
coloré

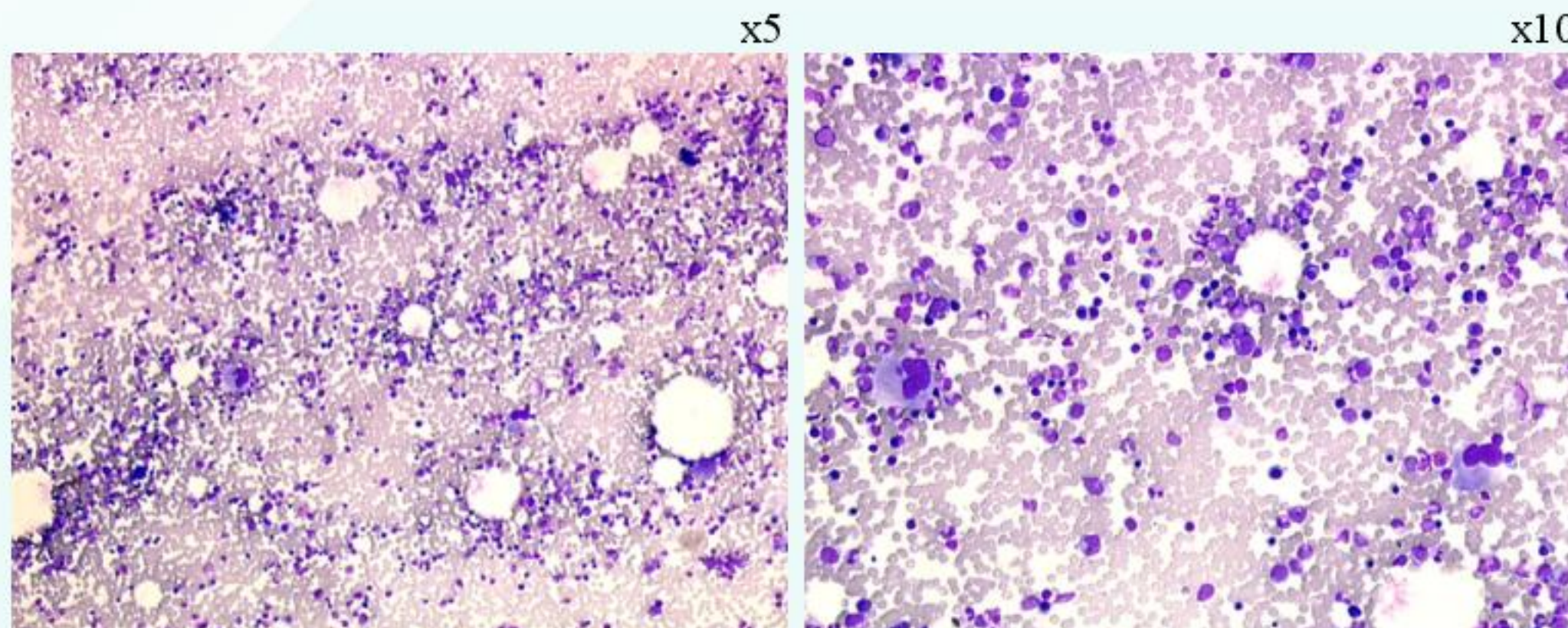


2- Lecture au microscope



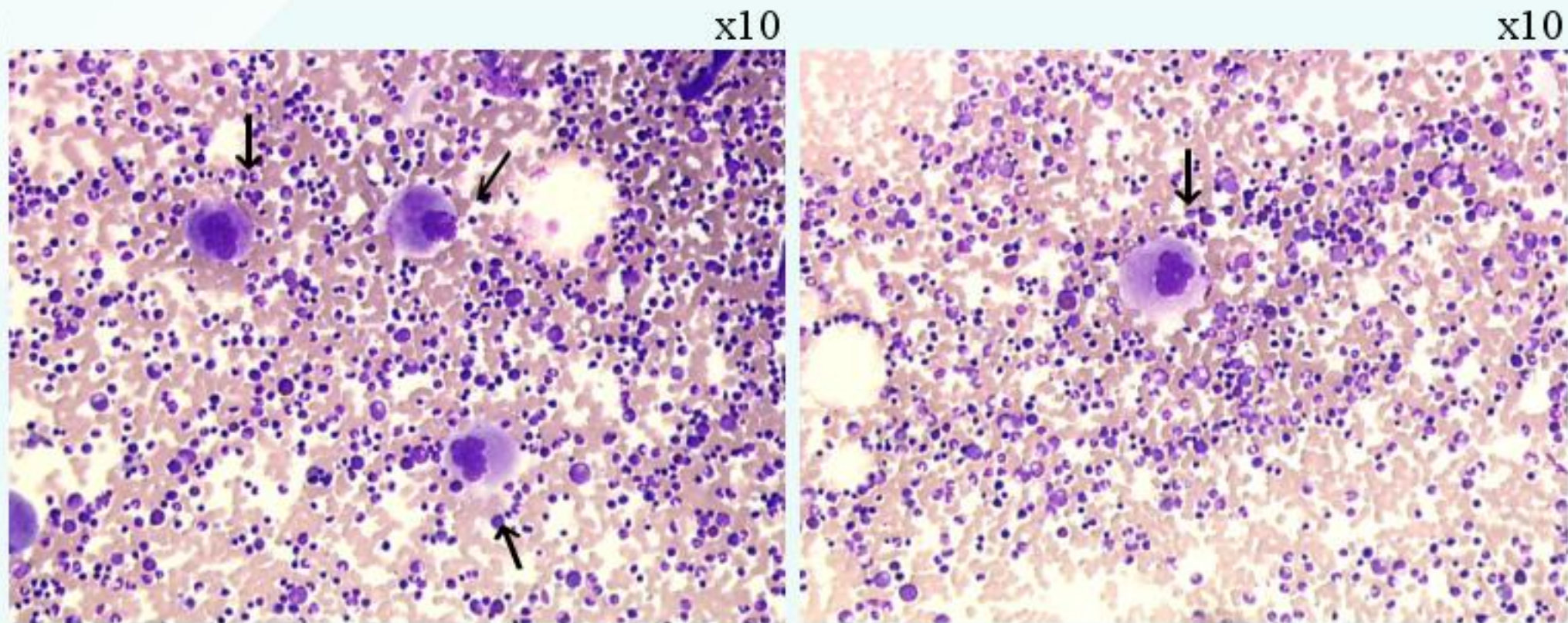
- ◆ Evaluation de la richesse médullaire
- ✧ Etude des mégacaryocytes
- ✧ Décompte en pourcentage des différentes lignées myéloïdes et non myéloïdes
- ✧ Analyse morphologique des différentes lignées

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



Evaluation de la richesse médullaire
(= moelle de richesse normale)

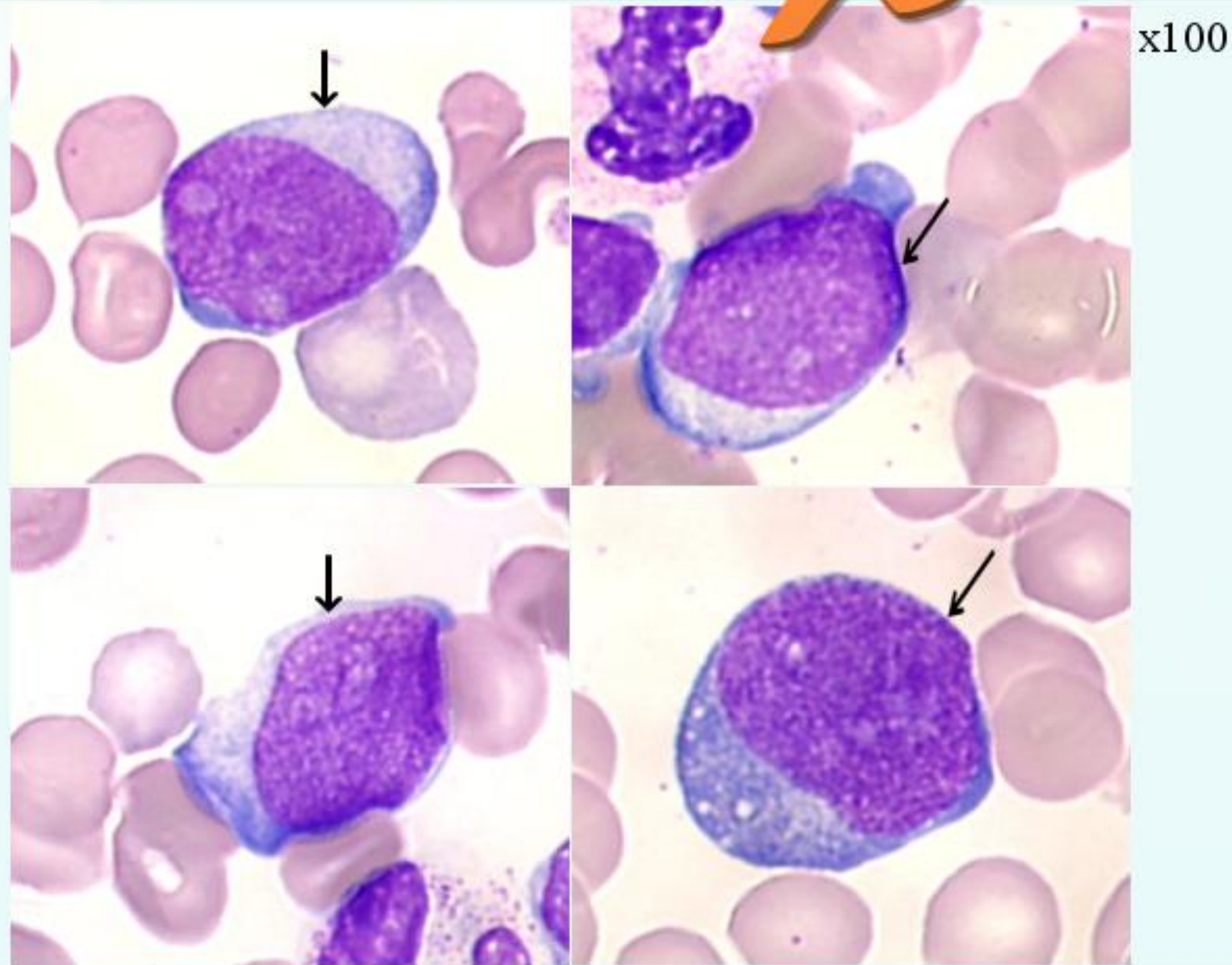
Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



Etude des mégacaryocytes ou précurseurs
myéloïdes plaquettaires (nombre et aspect)

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Cellules indifférenciées immatures : hémoblastes

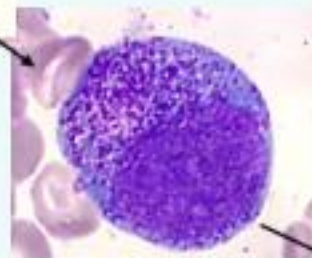


Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

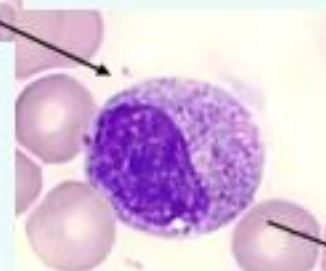
La lignée myéloïde neutrophile = granulopoïèse normale



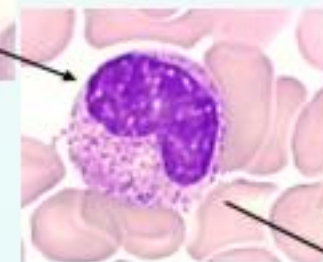
MB
Myéloblaste



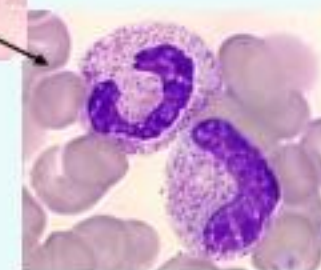
PML
Promyélocyte



MLN
Myélocyte neutrophile



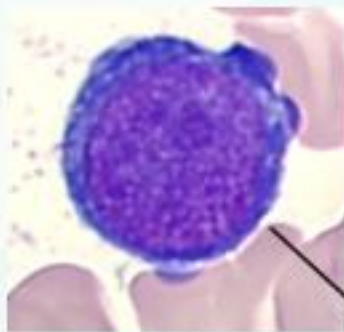
MMLN
Métamyélocyte



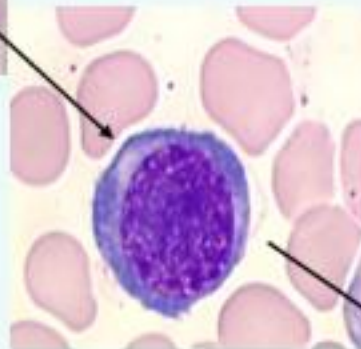
PN
Polynucléaire
neutrophile

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

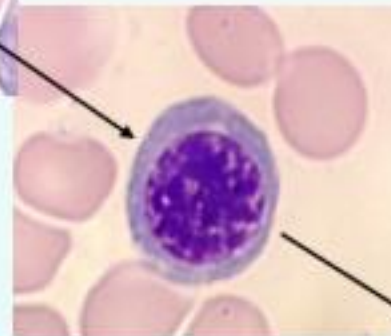
La lignée érythroblastique = Erythropoïèse normale



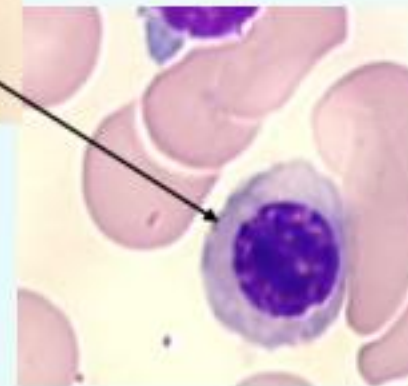
PROER
Proérythroblaste



ERB
Érythroblaste
basophile



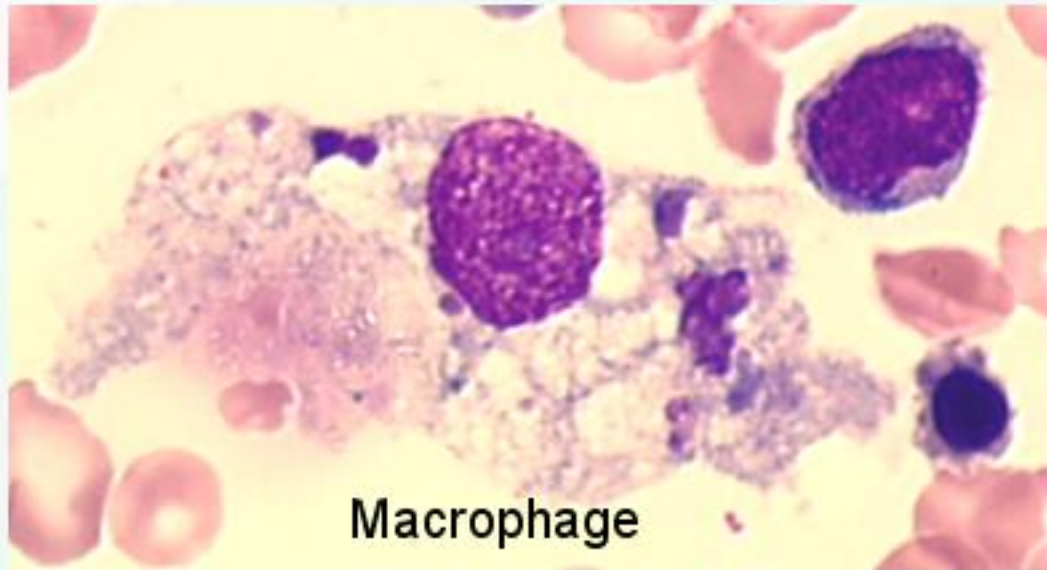
ERP
Érythroblaste
polychromatophile



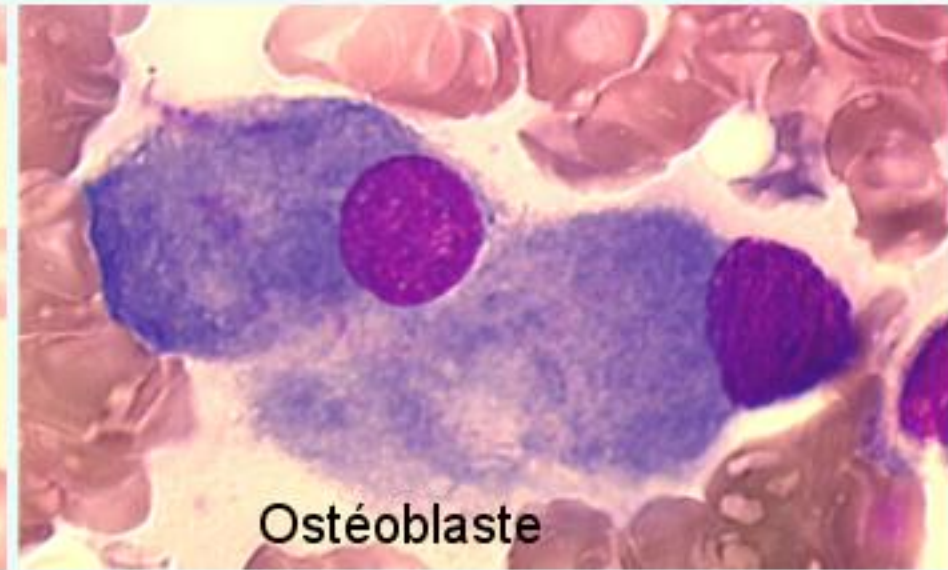
ERA
Érythroblaste
acidophile

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Autres éléments médullaires du microenvironnement



Macrophage



Ostéoblaste

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Compte rendu d'un myélogramme



Site de prélèvement
Dureté de l'os
Richesse

Lignée mégacaryocytaire présente

Cellules indifférenciées 0-3%

Lignée myéloïde 45 à 75%

Myéloblastes 1 - 3
Promyélocytes 2 - 8
Myélocytes neutrophiles 5 - 15
Métamyélocytes neutrophiles 10 -20
Polynucléaires neutrophiles 15 -30

Myélocytes éosinophiles 0 - 1
Métamyélocytes éosinophiles 0 - 1
Polynucléaires éosinophiles 0 - 1

Basophiles 0 - 2

Monocytes 0 - 3

(valeurs normales)

Lignée érythroblastique 8 à 25%

Proérythroblastes 0 - 2
Érythroblastes basophiles 2 - 8
Érythroblastes polychromatophiles 5 - 10
Érythroblastes acidophiles 7 - 15

Lignée lymphoïde 5 à 15%

Lymphoblastes 0
Lymphocytes 5 - 15
Plasmocytes 1 - 2

Autres cellules 0

Commentaires

Conclusion

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Cytométrie en flux : analyse immunophénotypique



◆ Principe

- ◆ Technique biologique d'analyse de cellules en suspension
- ◆ Détection d'antigènes à la surface ou dans le cytoplasme des cellules grâce à des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome

◆ Indications

- ◆ Préciser l'**appartenance des cellules tumorales à une lignée** (myéloïde ou lymphoïde)
- ◆ Indispensable pour le **diagnostic et la classification de certaines pathologies** = hémopathies

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Cytométrie en flux



◆ Principaux antigènes de lignée

◆ **Système hématopoïétique**

✦ **CD45**

◆ **Lignée lymphoïde**

✦ Marqueurs B : **CD19**, CD20, CD22, CD79b

✦ Marqueurs T : **CD3**, CD2, CD5, CD7 (+/- CD4, CD8)

✦ Marqueurs NK : CD3- CD56+ CD16+

◆ **Lignée myéloïde**

✦ **CD13, CD33**

✦ Marqueurs érythroïdes : CD235a (glycophorine)

✦ Marqueurs plaquettaires : CD41, CD42, CD61

✦ Marqueurs monocytaires : CD14, CD64

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Cytométrie en flux : mode opératoire



	Laser bleu (λ : 488 nm)				Laser rouge (λ : 633-638 nm)		Laser violet (λ : 405 nm)	
Fluoro-chromes	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	V450 ou PB	V500 ou AmCyan
λ max d'excitation	494 nm	496 nm	496 nm	496 nm	650 nm	650 nm	404 nm	415 nm



Émission de fluorescence à une λ bien précise

Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

Cytométrie en flux : principe

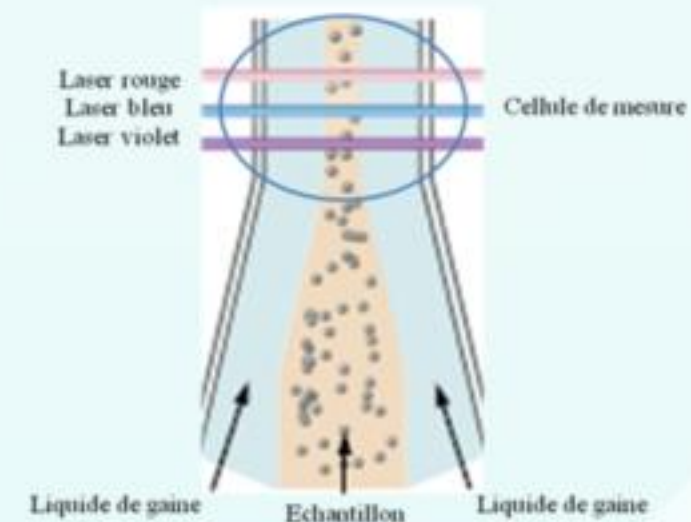


Suspension
cellulaire marquée
et lysée



1- Système fluide :

Cellules entraînées une à une par un liquide de gaine devant la source laser (λ unique)

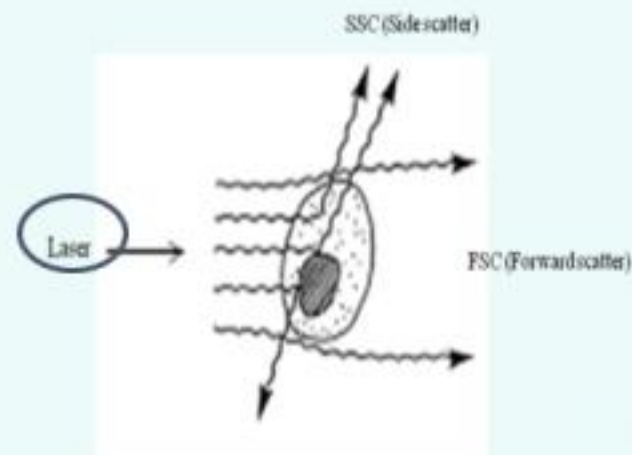


Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

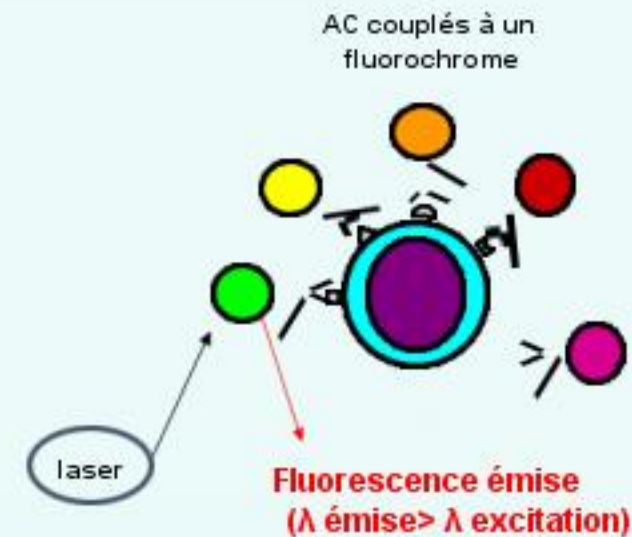
Cytométrie en flux : principe



2- Cellule de mesure
diffraction de la lumière du laser et excitation
du fluorochrome par le faisceau
laser



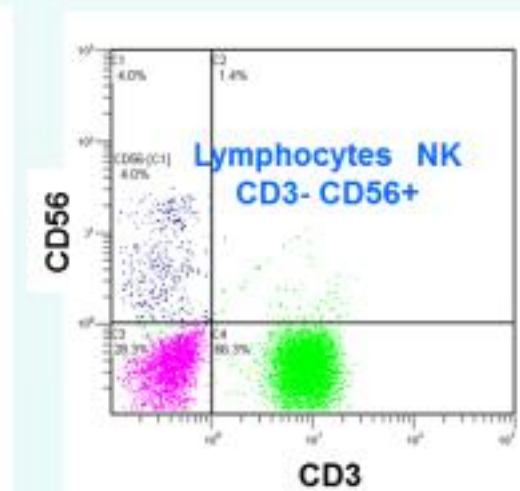
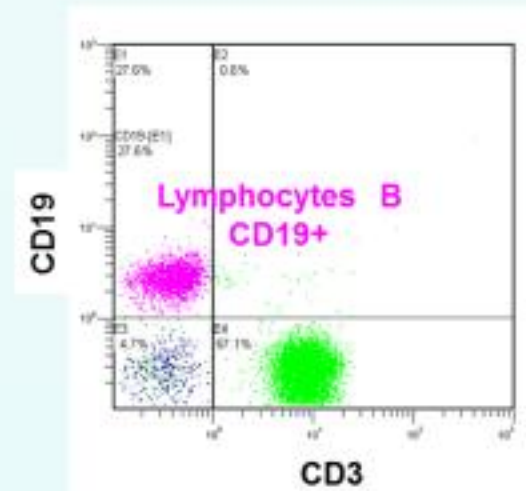
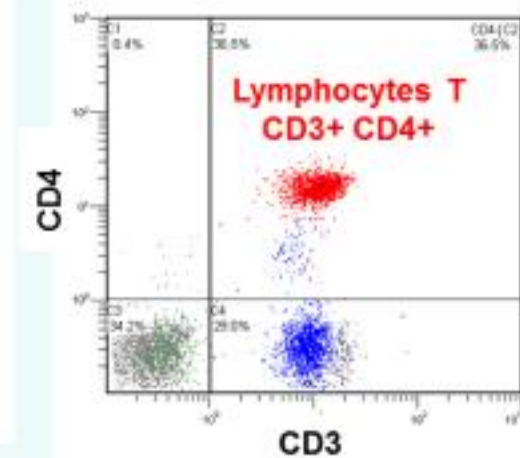
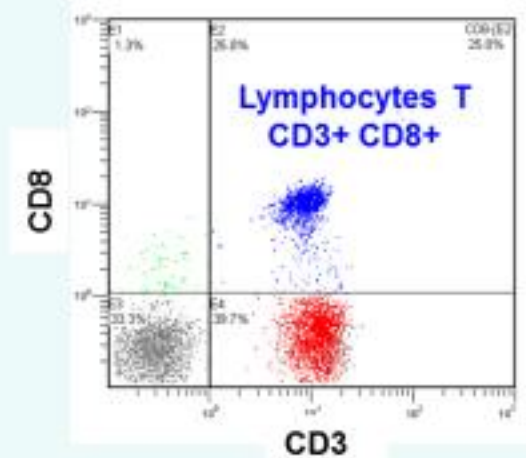
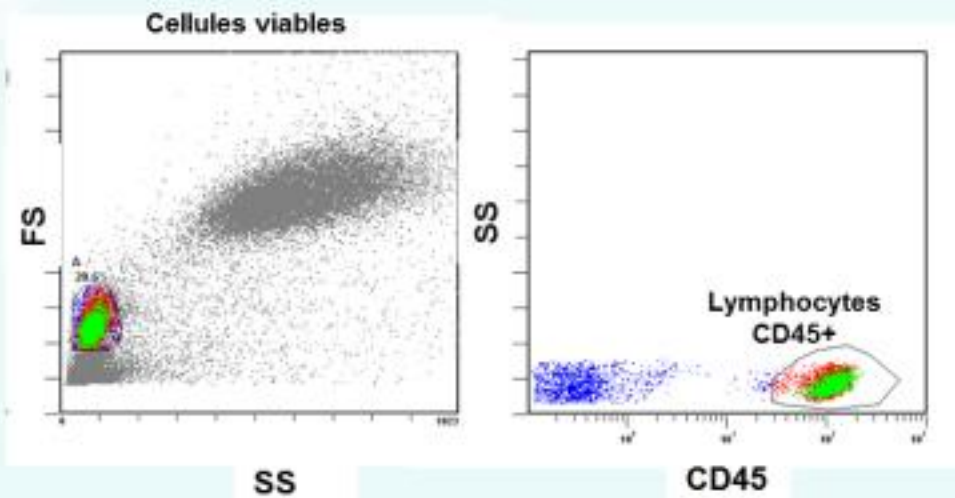
=> Taille (FSC) et structure (SSC) de la cellule



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

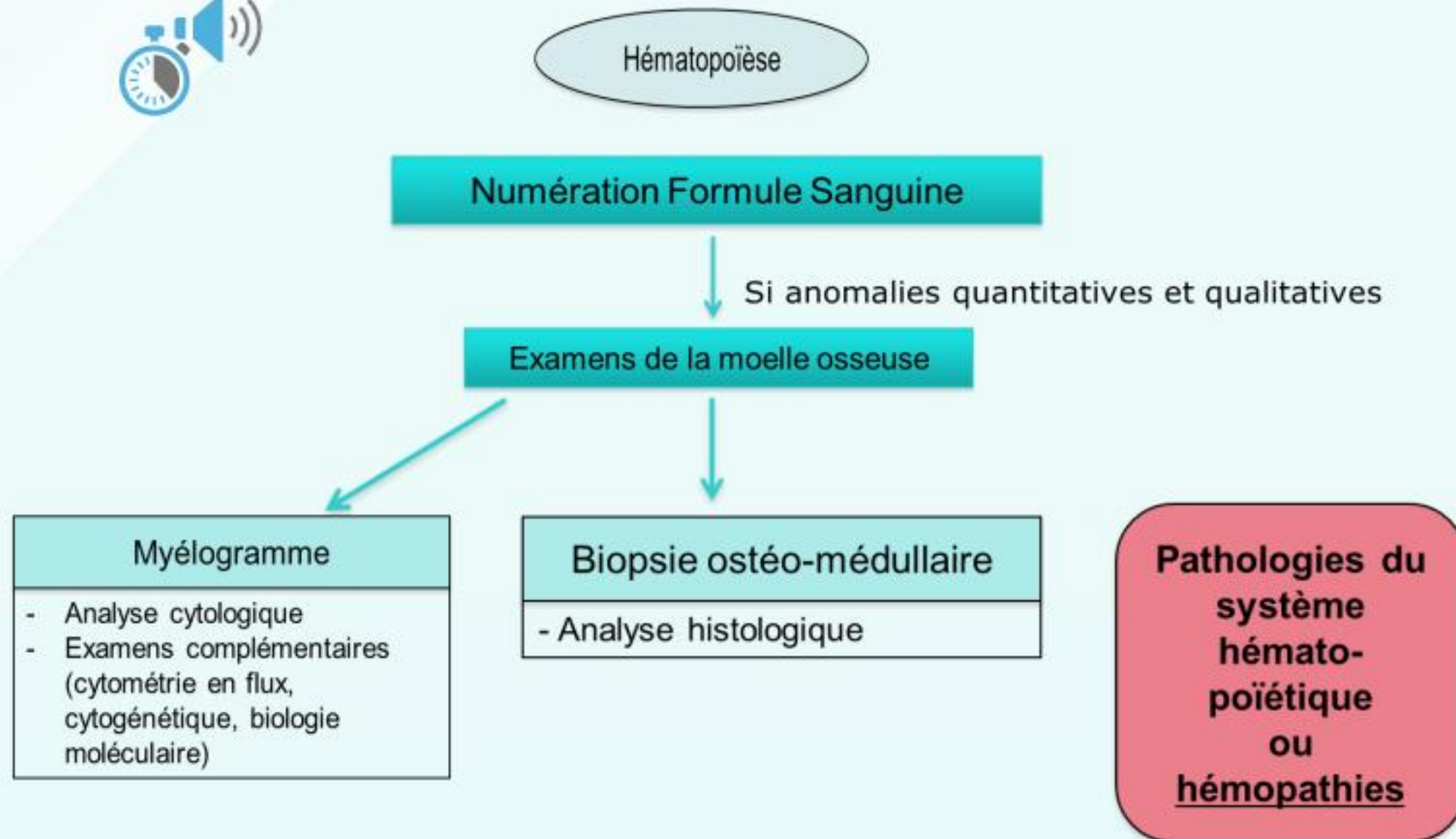
Cytométrie en flux : analyse

Exemple :
Immunophénotypage lymphocytaire sanguin normal



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation

En résumé



Cliquez sur le bouton "Ecran suivant" pour continuer votre formation



Merci d'avoir suivi ce cours.

Et rendez-vous pour la suite de votre formation,
avec un diaporama commenté sur :
"la cytogénétique en hématologie biologique"