



Importance du comptage des Réticulocytes

Production des réticulocytes

Toutes les cellules sanguines émanent d'une cellule souche. Sous une prolifération prononcée, ils se différencient en cellules des trois lignées sanguines (Érythroïèse, granulopoïèse et thrombopoïèse). En mettant l'accent sur la ligne des globules rouges (RBC), nous voyons que la durée de vie des érythrocytes circulants est d'env. 120 jours. Près de 1% de ce total est perdu chaque jour et est renouvelé par de nouvelles cellules. Chaque seconde, environ deux millions de globules rouges sont produits. Dans la moelle osseuse, les jeunes érythroblastes éjectent leur noyau, devenant des réticulocytes qui entrent alors dans le flux sanguin périphérique.

En règle générale, le réticulocyte reste dans la moelle osseuse pour trois jours supplémentaires et pendant un jour dans le flux sanguin périphérique. Le nom «réticulocyte» provient de la structure en forme de bande («réticulum» en latin), qui devient visible après coloration avec un colorant supravital, telle que le bleu de caryil brillant ou le nouveau bleu de méthylène (précipitation des fragments d'acide ribonucléique ; Figure. 1).

Histoire

- **1865** Première description des réticulocytes par Erb, qui a découvert un réticulum intracellulaire utilisant de l'acide picrique.
- **1881** en utilisant la coloration supravital, Ehrlich a démontré un réseau intracellulaire qui a été décrit comme *substantia reticulo-filamentosa*.
- **1891** Smith a identifié les réticulocytes comme globules rouges immatures rouges
- **1932** Classification des étapes de maturation par Heilmeyer (voir tableau 1).
- **1953** Seip quantifie les étapes de maturation avec valeurs de références (voir tableau 1).
- **1960** Comptage de réticulocytes avec des méthodes basées sur la fluorescence (orange d'acridine), développé par Kosenov et Mai.
- **1983** Tanke automatise la mesure des réticulocytes en utilisant la méthode de fluorescence et cytométrie en flux.

Tableau 1 : Etapes de maturation selon Heimeyer et quantification selon Seip

Stades de Maturation selon Heimeyer	Description Morphologique	Quantification selon Seip (% Normal)
Stade 0	Noyau	
Stade I	Réticulum constitué de caillots denses	< 0,1
Stade II	Réticulum lâchement arrangé	7
Stade III	Réticulum diffusé différemment	32
Stade IV	Quelques granules dispersées	61,0

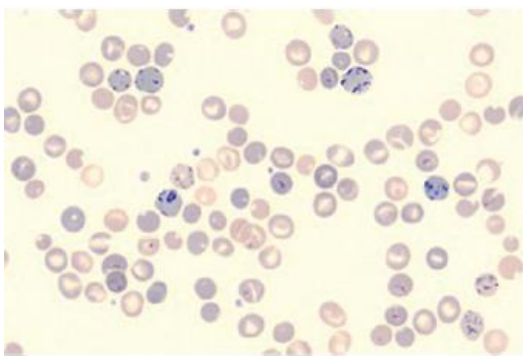


Figure 1 : Coloration supravitale d'un frottis sanguin avec différents stades de réticulocytes

Les stades de maturation I et IV sont souvent interprétés de manière incorrecte : le stade I est parfois décrit comme un érythroblaste et le stade IV en tant que RBC mature car sa faible teneur en ARN n'est pas détectée. L'interprétation correcte du stade IV est particulièrement importante, car cette étape de maturation est dominante dans la circulation sanguine périphérique.

En 1986, le Comité national du laboratoire clinique standards (NCCLS) a classé comme un réticulocyte tout globule rouge 'non nucléé' contenant deux ou plusieurs particules coloré en bleu correspondant à l'ARN ribosomique [1].

Le Conseil International de normalisation en hématologie (ICSH) a également accepté cette définition [2].

Les réticulocytes reflètent la régénération de l'érythropoïèse. Dans un système équilibré, plus de 90% des stades très avancés des réticulocytes (stades III et IV) sont présents dans le sang périphérique. Si l'érythropoïèse est stimulée, les réticulocytes plus immatures migrent dans le sang périphérique (semblable à une déviation gauche" en granulopoïèse).

Le compte des réticulocytes

La fraction normale des réticulocytes dans le sang dépend de la situation clinique mais est généralement de 0,5% à 1,5% chez les adultes [3] et 2% à 6% chez les nouveau-nés [4]. Le nombre de réticulocytes est un bon indicateur de l'activité de la moelle osseuse car il représente la production récente et montre le statut érythropoïétique du patient et si la production est normale ou non. Par conséquent, un compte fiable des réticulocytes est nécessaire. Une comparaison des différentes valeurs de référence telles que rapportées par différents auteurs peuvent être trouvés dans un article revue publié par Piva et al. [5].

Indications pour le comptage des réticulocytes

- Diagnostic et traitement de base dans tous les types d'anémie
- Surveillance dans les traitements au Fer, Vit B12, Folates
- Surveillance thérapeutique dans le traitement à l'érythropoïétine
- Surveillance durant les greffe de moelle
- Patients nouveaux nés et pédiatrie

Le comptage des réticulocytes sur tubes EDTA reste fiable jusqu'à 72 heures après prélèvement du sang. La température de stockage de +4 ° C ou 20 ° C, respectivement, n'a aucun effet significatif sur le résultat mesuré [6].

Comptage Manuel

(Matériaux : colorant supravital, telle que le bleu cresyl brillant ou le nouveau bleu de méthylène, une lame préparée, et un microscope).

1. Le sang total est mélangé avec des volumes équivalents de colorant supravital.
2. Après l'incubation, l'échantillon est étalé sur lame et séché à l'air.
3. Les réticulocytes sont comptés au microscope à l'huile d'immersion (grossissement 1000 fois)
4. 1000 globules rouges sont comptés. A un grossissement de 1000 fois, cela correspond à approx. Cinq champs visuels, chacun consiste à environ 200 cellules
5. Le compte des réticulocytes est donné par mille [‰] ou par [%].

Les taux d'erreur pour le comptage manuel cités dans la littérature sont de CV% 25 - 50 [7 - 8] et plus élevé encore, selon le nombre de réticulocytes. On recommande de compter 1000 globules rouges comme standard. Selon les recommandations de l'ICSH (1998) [9] sur le taux de comptage dans la gamme de référence des réticulocytes, au moins 40 000 cellules devraient être comptées pour éviter de dépasser une erreur statistique de 5% (tableau 2).

Tableau 2 : Effet du nombre de globules rouges comptés sur l'erreur statistique du compte des réticulocytes. Les chiffres indiqués se réfèrent à un CV de 5%

Compte des Réticulocytes dans le sang (%)	Nombre de cellules à compter pour atteindre un CV de 5%
1	39,600
2	19,600
5	7,600
10	3,600
20	1,600
50	400

Comptage automatique

Pour mesurer avec précision le nombre de réticulocytes, les automates utilisent une combinaison d'excitation laser, de détecteurs et de marqueur fluorescent qui marque l'ARN et l'ADN (comme le thiazole Orange ou les polyméthines) [10].

Pour mesurer les réticulocytes, l'échantillon est incubé avec un marqueur de fluorescence lié à l'ARN et compté par cytométrie en flux. Les automates de réticulocytes utilisent des seuils pour la classification des cellules. Cela garantit un haut niveau de reproductibilité des résultats.

Dans les comptes automatisés, des signaux de mesure jusqu'à 30 000 globules rouges sont évalués.

Il en résulte à la fois des taux de comptage élevés et un niveau élevé de degrés de précision. Comparé au comptage manuel, les résultats de comptage automatisés (figure 2) sont disponibles beaucoup plus rapidement, actuellement en moins d'une minute.

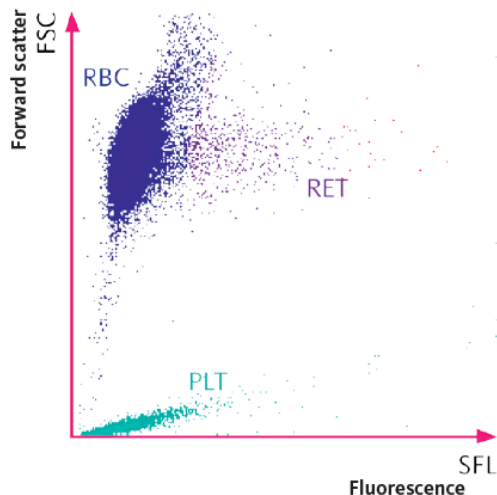


Figure 2 : Scattergramme des réticulocytes (RBC: GR matures, RET: réticulocytes , PLT: plaquettes optiques

Le nombre de réticulocytes dans le diagnostic clinique

L'interprétation du nombre de réticulocytes est problématique dans des anémies sévères. Une augmentation modérée relative des réticulocytes dans une anémie sévère n'indique pas une forte régénération suffisante de l'érythropoïèse, mais indique simplement une durée de vie raccourcie des globules rouges. Il est préférable de signaler la concentration absolue de réticulocytes, réticulocytes / μL , car cela fournit une mesure directe de performance érythropoïétique.

Par exemple, on considère une valeur de 20 % réticulocytes augmentée. Cependant, en anémie sévère avec 2 millions de globules

rouge, les réticulocytes à 20 ‰ représentent seulement 40 000 réticulocytes / μL , une valeur dans la gamme de référence.

Le nombre relatif de réticulocytes (‰ et %) donne quelques informations sur la durée de vie des globules rouges, alors que leur concentration cellulaire (réticulocytes / μL) reflète La productivité érythropoïétique de la moelle osseuse.

Avec une formule simple, le compte relatif (%) peut être convertie en concentration Réticulocytes / μl (RET/ μl) :

$$\text{RET [\%]} \times \text{GR [10}^6\text{/}\mu\text{l]} / 100 = \text{concentration RET}/\mu\text{l}$$

Les valeurs de références -en pourcentage et valeur absolue- des réticulocytes selon Cavill et al. [6] sont les suivantes :

Réticulocytes pourcentage : H / F : 0.43- 1.36%

Réticulocytes Compte : F : 17.0- 63.8 x 10⁶/L

H : 23.0 – 70.1 x 10⁹/L

Il faut se rappeler que les valeurs de référence publiées sur divers analyseurs peuvent être utilisés sur les analyseurs les plus récents, mais seulement après les avoir validés. Puisqu'il y a aussi des différences entre les intervalles de référence hématologiques de différentes populations, chaque laboratoire devra choisir lequel des valeurs de référence publiées correspondent mieux à sa propre population.

Paramètres liés aux réticulocytes

Indice Réticulocytes (RI)

La partie relative (‰ et %) des réticulocytes peut augmenter soit avec l'augmentation des réticulocytes sou avec la diminution des globules rouges.

SEED Hématologie- Importance du comptage des réticulocytes

Sysmex Educational Enhancement and Development/ Juin 2017/ N°28

Des mesures correctives peuvent être effectuées par l'intermédiaire de l'hématocrite du patient par référence à un hématocrite normal de 0,45 [L / L]. Ce type de correction est recommandé avec les anémies :

$$RI = \frac{RET [\%] \times HCT [L/L]}{0,45 [L/L] \text{ (standard HCT)}}$$

Indice Production Réticulocytes (RPI)

Le RPI est un indice qui aide à évaluer l'efficacité de l'érythropoïèse et donc la productivité de la moelle osseuse. La maturation physiologique des réticulocytes est se fait en deux temps : maturation dans la moelle osseuse (environ 8 à 10 jours depuis la première division du proérythroblaste) et celle dans le sang périphérique d'environ 1 à 2 jours jusqu'à ce qu'elles deviennent globules rouges matures.

L'idée du RPI est d'évaluer si la moelle osseuse produit une réponse appropriée à un état anémique. Après une hémorragie aigue, la production des réticulocytes devrait augmenter dans les 2 à 3 jours en réponse à la perte de GR, et atteint son maximum en 6 à 10 jours [11]. Si ce n'est pas le cas, cela sous-entend un défaut de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse.

En cas de production accentuée de globules rouges, la maturation des réticulocytes se dévie vers le sang périphérique, car les réticulocytes sont passés dans le sang périphérique à un stade antérieur (le temps de séjour altéré dans le sang périphérique est appelé « déviation»). Cela entraîne une augmentation prononcée des réticulocytes circulants, mais ne représente pas la preuve de performance de l'érythropoïèse. Le temps de maturation des réticulocytes dans la moelle osseuse est proportionnel à l'hématocrite,

c'est-à-dire diminue avec l'hématocrite et le temps de maturation dans le sang périphérique augmente. Pour donner une indication de l'efficacité de la moelle osseuse, le nombre de réticulocytes est corrigé par ce facteur dépendant de l'hématocrite.

Tableau 3 : relation entre hématocrite et temps de maturation des réticulocytes dans le sang périphérique

Hématocrite	Survie des Réticulocyte = correction maturation
36-45 %	1 jour
26-35 %	1,5 jours
16-25%	2 jours
15% et moins	2,5 jours

Le RPI devrait être entre 0,5% et 2,5% chez un individu en bonne santé [11]. En cas d'anémie, un RPI <2% indique une production insuffisante de réticulocytes, tandis qu'un RPI > 3% Indique une production de réticulocytes pour compenser la perte de globules rouges [12].

$$RPI = \frac{RET [\%]}{\frac{\text{Temps de maturation RET dans le sang en jours}}{0,45 \text{ (Standard HCT)}}} \times HCT [L/L]$$

Exemple : Valeurs Patient: HCT =0,25 L/L , réticulocytes = 25 %

$$RPI = \frac{25 \%}{2} \times \frac{0,25}{0,45} = 5,5$$

Fraction Immature des Réticulocytes (IRF)

La valeur IRF est un marqueur précoce pour évaluer la régénération de l'érythropoïèse. Alors que le pourcentage d'IRF augmente après seulement quelques heures, le nombre de réticulocytes augmente après 2 – 3 jours. Si la valeur IRF n'augmente pas pendant le traitement des anémies avec l'érythropoïétine ou des vitamines, ceci indique un manque de

réponse à la thérapie.

En outre, cela contribue à classer les anémies hypo-, normo et hyper-régénératives.

La valeur de l'IRF avec le nombre de réticulocytes se sont avérés être de très bons paramètres de surveillance de la moelle osseuse et des transplantations de cellules souches. Dans les transplantations réussies, la valeur de l'IRF atteint sa marge de 5% plus tôt que les granulocytes avec leur seuil classique de $0,5 \times 10^9$ Granulocytes / L, dans 80% des cas [13].

Un exemple de cette utilité peut être vu à la Fig. 3, où différentes pathologies sont représentées avec différents niveaux de réticulocytes immatures et matures. À titre d'exemple, dans ce cas d'aplasie, à la fois l'IRF et les réticulocytes sont bas. Ce type d'anémie affecte les précurseurs des globules rouges, mais pas celles de la lignée de globules blancs. La moelle osseuse cesse de produire des globules rouges, ce qui explique que ni les réticulocytes immatures ni les matures ne peuvent être observés.

Les valeurs de référence [14] de l'IRF est de 1,6 à 10,5% pour les hommes et les femmes.

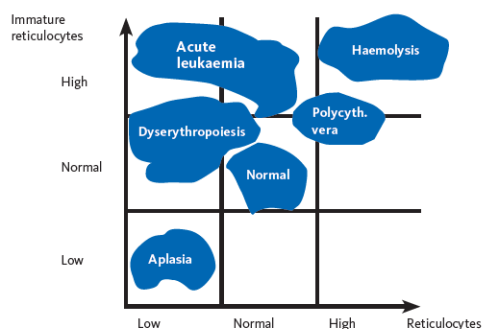


Figure 3 : Importance des réticulocytes dans le diagnostic

Maturation des Réticulocytes

En plus de la mesure conventionnelle des réticulocytes, la technologie de fluorescence de cytométrie de flux permet la classification des réticulocytes en trois étapes de maturation. Celles-ci sont définies par le contenu en ARN du réticulocyte, mesuré sur l'analyseur comme intensité de fluorescence. Plus le contenu de l'ARN est élevé, moins les réticulocytes sont matures.

Les réticulocytes sont fractionnés selon leur intensité de fluorescence en trois catégories suivantes représentant différents stades de maturité (tableau 4) :

- LFR (réticulocytes à faible fluorescence) - réticulocytes « matures »
- MFR (réticulocytes à fluorescence moyenne) - réticulocytes « semi- matures »
- HFR (réticulocytes à haute fluorescence) - réticulocytes « immatures »

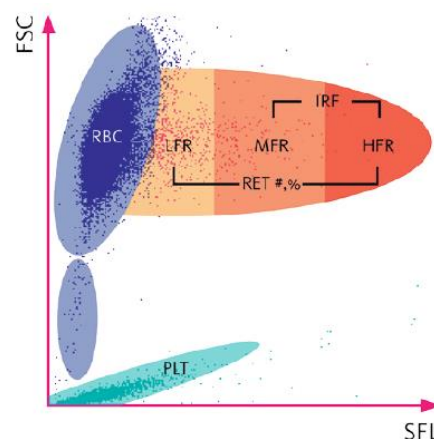


Figure 4 : Scattergramme des RET

L'RF est la somme de MFR plus HFR, c'est-à-dire l'immature réticulocytes, et est également appelé " Indice de maturation réticulocytes ".

$$IRF = MFR + HFR$$

Tableau 4 : Stades de maturation des réticulocytes		
LFR	MFR	HFR
Low-Fluorescence Reticulocytes	Medium-Fluorescence Reticulocytes	High-Fluorescence Reticulocytes
Faible contenu en ARN	Contenu moyen en ARN	Contenu élevé en ARN
Réticulocytes Mature	Réticulocytes Semi- Mature	Réticulocytes Immatures
Valuers de Référence : 86.5 – 98.5 %	Valuers de Référence: 1.5 – 11.5 %	Valuers de Référence: 0 – 1.4 %

Reticulocyte Haemoglobin Equivalent (Ret-He)

En plus de la détermination quantitative des paramètres de routine (RBC, HGB, RET # /%, IRF, MCV), le RET-He offre une dimension qualitative. Les globules rouges ont une durée de vie de 120 jours. Par conséquent, les utiliser pour détecter les carences et les variations en fer de l'érythropoïèse sont seulement possible à un moment relativement tardif. Contrairement à cela, le RET-He représente la teneur en HGB des jeunes globules rouges, les réticulocytes, et offre ainsi des informations en temps réel sur l'approvisionnement en fer à l'érythropoïèse.

Mesurer la teneur en hémoglobine des réticulocytes signifie que vous pouvez mesurer l'approvisionnement en fer actuel de l'érythropoïèse et juger la « qualité » des cellules nouvellement produites. Cela vous permet de détecter les changements dans le statut du fer bien plus tôt qu'à travers la teneur en hémoglobine des globules rouges matures.

La détermination de RET-He peut être effectuée sur les analyseurs d'hématologie avec les paramètres de routine. Un avantage majeur par rapport aux paramètres ferritine ou transferrine est que RET-He n'est pas affecté par la phase de réaction aiguë. Ces marqueurs biochimiques conventionnels sont

très perturbés comme par exemple pendant l'inflammation, la grossesse ou en présence de nombreuses pathologies sévères, de sorte qu'une interprétation clinique des résultats serait alors difficile ou impossible. Mesurer la teneur en hémoglobine des réticulocytes en tant qu'évaluation directe du fer actuellement utilisé pour la biosynthèse de l'hémoglobine peut indiquer s'il existe assez de fer disponible pour l'érythropoïèse.

L'utilité clinique du paramètre RET-He a été prouvée et c'est maintenant un paramètre bien établi dans les analyses avancées en hématologie.

Indications

- Classification des anémies hypochromes et normochromes
- Surveillance thérapeutique dans les infections chroniques et tumeurs
- Surveillance thérapeutique en cas de supplémentation en fer et érythropoïétine
- Détermination de la tendance du statut actuel en fer
- Marqueur précoce des maladies. Avec le compte des RET, il permet aux cliniciens de tirer des conclusions sur à la fois la quantité et la qualité de la fraction jeune des globules rouges.
- Les valeurs de références du RET-He [14] sont pour les hommes et femmes : 1.996-2.407 fmol ou 32.1-38.8 pg.

RET-Il fournit lui-même des informations sur la biodisponibilité actuelle du fer - une faible valeur signifie qu'il y a un manque de fer ou le fer n'est pas biodisponible pour l'érythropoïèse. Il est souvent utilisé avec la ferritine - une valeur de ferritine élevée ou normale avec une faible valeur RET-He peut suggérer une carence en fer fonctionnelle tandis que les taux faibles de ferritine, avec un RET-He bas suggère une carence en fer classique. Comme la ferritine est faussement augmentée pendant les phases aiguës des maladies, la présence de l'inflammation doit être vérifiée, par ex. par la CRP.

Le RET-He est utilisé pour surveiller la thérapie à l'érythropoïétine (EPO) et / ou Fer IV. Si la valeur augmente, cela indique que la thérapie a un effet positif.

Indice Thomas -Plot

En 2006, Thomas et al. Décrit un modèle de diagramme diagnostique afin de différencier les états déficitaires en fer et de prédire les patients qui répondront à la thérapie par l'érythropoïétine [15].

L'équilibre du fer dans notre corps est régulé par le niveau de l'érythropoïèse et la taille des réserves en fer. La relation entre l'incorporation de l'hémoglobine érythropoïétique (RET-He) et les réserves en fer (ferritine) peuvent être décrits dans un schémas de diagnostic (Plot).

Ce tracé, appelé « Thomas Plot », permet la différenciation entre la carence martiale classique et l'anémie des maladies chroniques. Le tracé indique la corrélation entre le rapport sTfR / log ferritin (indice de ferritine), un marqueur de l'approvisionnement en fer de l'érythropoïèse et le RET-He (figure 5) [16]. Le tracé de Thomas peut également être utilisé pour surveiller les patients qui sont en

traitement et voir comment ils évoluent d'un quadrant à un autre.

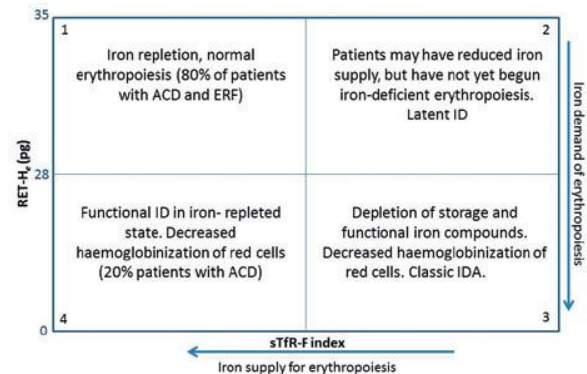


Figure 5 : Thomas Plot (ACD :anémie des maladies chroniques, ERF : phase finale insuffisance rénale , IDA : anémie ferriprive, ID : carence en fer classique)

Conclusions

Un compte de réticulocytes faible comprenant certains paramètres supplémentaires associés aux réticulocytes (IRF, RPI, etc.) sont importants pour voir si la moelle osseuse fonctionne correctement pour générer de nouveaux globules rouges, mais l'aspect quantitatif n'est pas le seul important. Nous avons vu que l'hémoglobinisation des réticulocytes, RET-He, est également d'une grande importance pour définir la qualité des réticulocytes nouvellement produits.

Des informations fiables concernant la qualité et la quantité des réticulocytes, aide à la fois au diagnostic différentiel des anémies et au suivi des patients.

Références

- [1] Koepke et al. (1986): Reticulocytes. Clin Lab Haematol 8, 169 – 179.
- [2] The Expert Panel on Cytometry of the International Council of Standardization in Haematology. (1992): ICSH Guidelines for Reticulocyte Counting by Microscopy of Supravital Stained Preparations. World Health Organization, Geneva.
- [3] Means RT et al. (2009): Anemia: Wintrobe's Clinical Hematology, 12th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. Vol. 1: Chapter 26.
- [4] Lilleyman JJ et al. (1992): Paediatric Haematology. Churchill Livingstone.
- [5] Piva E et al. (2010): Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. Clin Chem Lab Med 48(10):1369 – 1380.
- [6] Cavill et al. (1996): In vitro stability of the reticulocyte count. Clin Lab Haem 18 Suppl:9 – 11.
- [7] Peebles DA et al. (1981): Paediatric Haematology. Churchill Livingstone.
- [8] Savage RA et al. (1985): Analytical Inaccuracy and Imprecision of Reticulocyte Counting: A Preliminary Report from the College of American Pathologists Reticulocyte Project. Blood Cells 11:97.
- [9] ICSH Expert Panel on Cytometry. (1998): Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio. Clin Lab Haematol 20:77 – 79.
- [10] Davis BH, Bigelow NC. (1994): 'Reticulocyte analysis and reticulocyte maturity index'. In: Darzynkiewicz Z, Crissman HA (eds.). Flow cytometry. Methods in Cell Biology 42. San Diego: Academic Press. pp. 263 – 274.
- [11] Hoffbrand AV & Moss PAH. (2011): Essential Haematology, 6th Ed. Wiley and Blackwell; West Sussex, UK.
- [12] Adamson JW & Longo DL. Anemia and polycythemia. In: Braunwald E et al. (2001): Harrison's Principles of Internal Medicine (15th Edition). McGraw Hill (New York).
- [13] d'Onofrio G et al. (1996): Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. Clin Lab Haem 18(Suppl.1):45 – 53.
- [14] Pekelharing et al. (2010): Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. Sysmex Journal International Vol. 20, No. 1.
- [15] Thomas C et al. (2006): The diagnostic plot: A concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. Medical Oncology Volume 23, Issue 1, pp. 23 – 36.
- [16] Thomas L & Thomas C. (2004): Biochemical markers and haematologic indices in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis and monitoring of r-HuEPO therapy. Jugoslov Med Biochem 23(3):235 – 238.

*Compilé par
Dr Marion Münster*