



Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Technique de Fès
Département de biologie
LST : Sciences Biologiques Appliquées et Santé
Année universitaire:2015-2016

PROJET DE FIN D'ETUDES:
LES ANALYSES HEMATOLOGIQUES ET
MICROBIOLOGIQUES

Réalisé par :

Mlle. OUBLOUCH Fadma

Encadrant pédagogique :

Pr. TAZI Abdelali

Encadrant professionnelle :

Dr. BELLOUCH Jamal Eddine

(Pharmacien Biologiste « Laboratoire Bellouch d'analyses médicales GUELMIM »)

REMERCIEMENTS

En premier lieu et avant tout, je prie Dieu de m'avoir donné la volonté et le courage d'achever mes études.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Tout d'abord, je tiens à remercier tout le personnel de laboratoire d'analyses médicales Bellouch, plus particulièrement Monsieur le biologiste **Dr. BELLOUCH Jamal Eddine** de m'avoir accueilli durant cette période de stage au sein de son laboratoire, et de m'avoir fait confiance afin de réaliser ce stage dans les meilleures conditions possibles.

Mes profonds remerciements s'adressent également à **Pr. TAZI Abdelali**, coordonnateur de la filière « Sciences Biologiques Appliquées et Santé » qui a compris l'intérêt de ce travail m'en a consacré un peu de son temps précieux afin de mener à bien ce travail.

Je joins, ainsi, tous mes remerciements les plus chaleureux à toute l'équipe pédagogique de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès et tous les enseignants responsables de la formation de LST Sciences Biologiques Appliquées et Santé, pour avoir assuré le suivi de la formation. Sans oublier, bien sûr, ma famille, mes amies et mes collègues de la promotion.



DÉDICACE

Il est surtout très touchant de s'exprimer mais c'est un peu difficile, dire de bonnes et agréables expressions pour ceux qui habitent dans mon cœur, ils sont sans prix pour moi avec leur persévérance et leur amour, je leur adresse tout ce qui est charmant, tout ce qui fascine, tout ce qui est joli, tout ce qui nous fait vivre dans la joie, l'enchantement, le calme, le bonheur et la béatitude.

- A **mes très chers parents (ma grand-mère, mon papa et ma mère)** qui ont été constamment à côté de moi et m'encouragent sans cesse.
- A **mes frères (Aziz, Hassan et Hocaine) et ma sœur (Khadija)**, qui n'ont pas cessé de m'orienter et de me conseiller pour que je prenne le bon chemin. Vous êtes pour moi un exemple de courage et de sacrifice continu.
- A **mes meilleurs amis (Hajar, Sabrina et Rachida)**, à qui je souhaite un succès permanent, qui n'ont hésité à aucun moment à être à mes côtés pour m'apporter toute l'aide nécessaire.
- Au **Chef du Laboratoire, Dr. Bellouch Jamal Eddine**, je tiens à vous remercier pour votre accueil et les conditions de travail que vous m'aviez offert au sein de votre entité.
- A **mon encadrant pédagogique, Pr. TAZI abdelali**, je vous remercie pour le suivi de mon travail à fin de rédiger mon Projet de Fin D'Etudes dans les meilleures conditions possibles.
- A tous ceux que j'aime.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: L'organigramme de laboratoire d'analyses médicales Bellouch	3
Figure 2: Observation microscopique de PN neutrophile	10
Figure 3: Observation microscopique de PN éosinophile	10
Figure 4: Observation microscopique de PN basophile	10
Figure 5: Observation microscopique de monocyte	10
Figure 7: Observation microscopique des globules rouges	11
Figure 6: Observation microscopique de lymphocyte	11
Figure 8: L'automate de la NFS (Sysmex XS-500i)	13
Figure 9: Schéma explicatif de préparation du frottis sanguin	15
Figure 10: Schéma explicatif du mode opératoire de VS	17
Figure 11: L'automate d'hémostase (Sysmex STA SATBLLITE)	17
Figure 12: La technique de Beth-Vincent	20
Figure 13: Les différents sérums tests et les résultats de test Beth-Vincent.....	21
Figure 14: Les bandelettes urinaires.....	22
Figure 15: Examen quantitatif d'ECBU sur une cellule de Malassez	23
Figure 16: Les différentes étapes d'un examen qualitatif d'ECBU.....	23
Figure 17: l'ensemencement d'une goutte d'urine sur le milieu CLED.....	25
Figure 18: L'automate d'identification et antibiogramme (VITEK).....	25
Figure 19: Les pipettes de l'automate VITEK	26
Figure 21: Les étapes d'étalement du PV.....	27
Figure 20: Les écouvillons stériles	27
Figure 22: Les milieux de culture d'ensemencement du PV	28

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents anticoagulants et tubes utilisés	6
Tableau 2: Les différents groupes sanguins selon l'absence et /ou la présence des antigènes et/ou des anticorps.	19
Tableau 3: Les résultats de test Beth-Vincent	20

Liste des abréviations

ABO	Système ABO
ALAT	Alanine Amino Transférase
ASAT	Aspartate Amino Transférase
ASLO	Anitistreptolysines O
BK	Bacile de Koch
CCMH	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CLED	Cysteine lactose electrolyt deficient
CRP	Protéine C réactif
ECBU	Examen Cyto - Bactériologique des Urines
EDTA	Ethylène Diamine Tétraacétique Acide
GB	Globule blanc
HDL	High Density Lipoprotein
LCR	Liquide céphalo rachidien
LDL	Low Density lipoprotein
NFS	Numération Formulaire Sanguin
PN	Polynucléaire
PV	Prélèvement vaginal
RH	Système rhesus
TCA	Temps De Céphaline Activée.
TCK	Temps de Céphaline Kaolin
TCMH	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
TP	Taux De Prothrombine.
TPHA	Tréponima Palludium Hémagglutination Assay
VDRL	Veneral Disease Research Laboratory
VGM	Volume globulaire moyen
VS	Vitesse De Sédimentation.

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	i
DÉDICACE	ii
LISTE DES FIGURES	iii
Liste des tableaux	iv
Liste des abréviations	v
INTRODUCTION.....	1
I. PRESENTATION DU LIEU DE STAGE	3
1. Données générales sur Le laboratoire.....	3
2. Organigramme.....	3
II. DIFFERENTES UNITES DU LABORATOIRE.....	3
1. Hématologie	4
2. Sérologie-Immunologie.....	4
3. Biochimie	4
4. Microbiologie	4
1. La phase pré-analytique.....	5
1.1. Accueil et prélèvement	5
1.2. La préparation d'échantillon pour l'analyse.....	7
2. La phase analytique	7
3. La phase post-analytique	7
I. LES ANALYSES HEMATOLOGIQUES	9
1. La cytologie.....	9
1.1. La NFS	9
1.2. Principe et mode opératoire de l'automate Sysmex XS-500i.....	13
1.3. Le frottis sanguin	14
1.4. La vitesse de sédimentation	16
2. L'hémostase.....	17
3. Immuno-hématologie	18
3.1. Le groupage sanguin (ABO - Rhésus).....	18
1. L'examen cytot bactériologique des urines (E.C.B.U).....	21
2. Examen cyto-bactériologique des sécrétions vaginales (PV).....	26
CONCLUSION	30

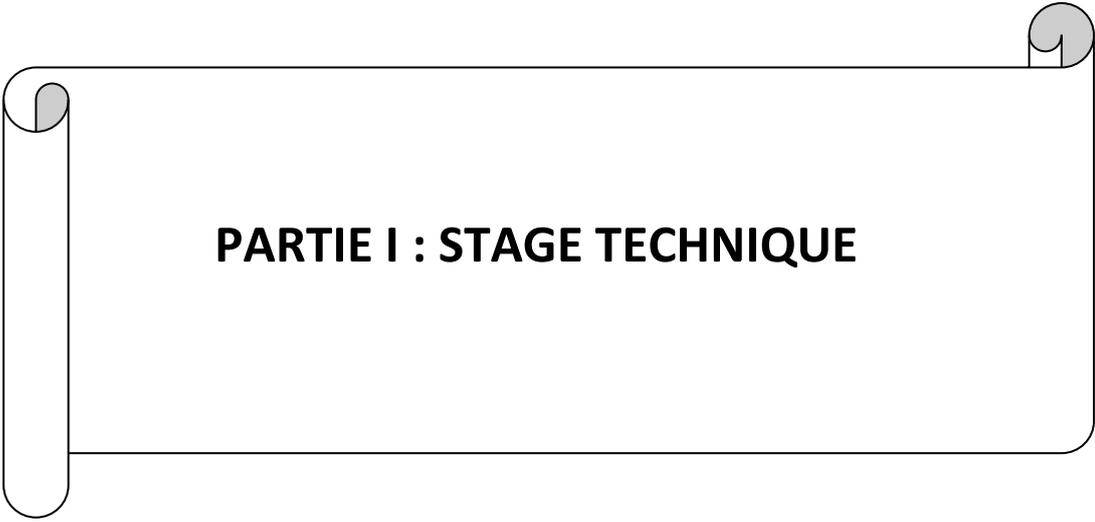
INTRODUCTION

En vue d'obtenir la licence en Sciences et Techniques en Sciences biologiques appliquées et santé, j'ai effectué un stage au sein du laboratoire d'analyses médicales Bellouch de Guelmim dont le principal objectif est d'appliquer le côté théorique, fortifier le côté pratique de la formation et d'améliorer mes compétences dans le domaine des analyses médicales.

Le sujet de mon Projet consiste l'étude descriptive des analyses hématologiques et microbiologiques que l'on distingue classiquement comme des examens médicaux systématiques qui permettent une détection précoce, diagnostic et le suivi les effets d'un traitement et l'évolution d'une maladie .

A travers ce rapport je vais essayer de présenter un aperçu sur le laboratoire, puis d'introduire les différentes tâches techniques des analyses hématologiques et microbiologiques effectuées au sein du laboratoire.

Donc quelles sont les différents tests réalisés au niveau ces deux services ?



PARTIE I : STAGE TECHNIQUE

I. PRESENTATION DU LIEU DE STAGE

1. Données générales sur Le laboratoire

- Nom : Laboratoire Bellouch d'analyses médicales.
- Pharmacien biologiste : BELLOUCH Jamal Eddine
- Adresse : Hay Alfida N 17 Rue N 2, Guelmim.

2. Organigramme

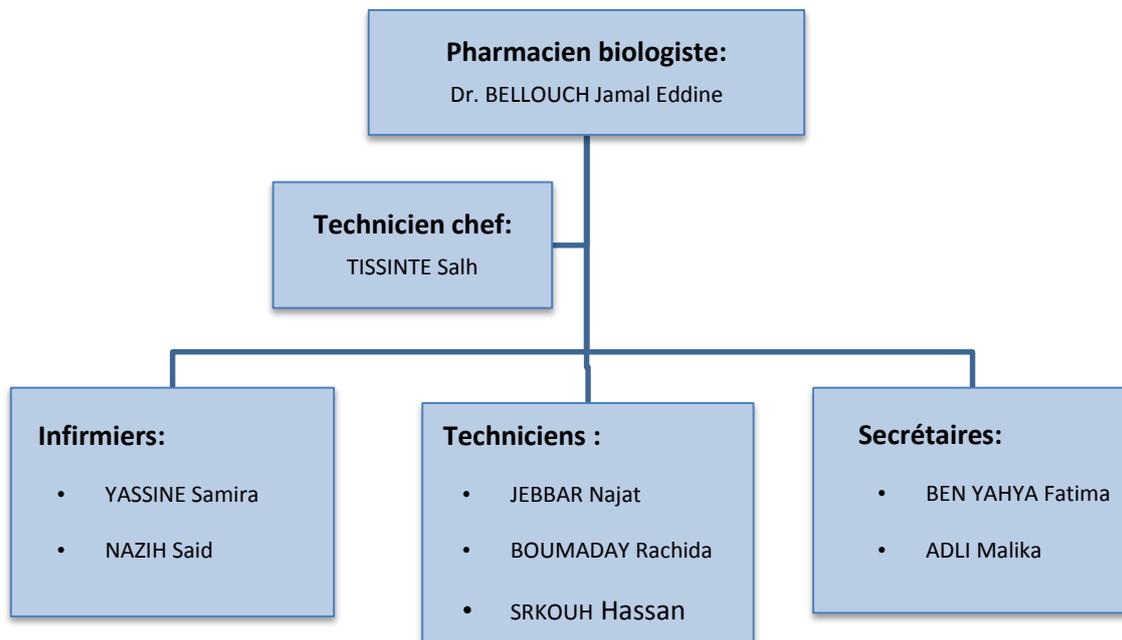
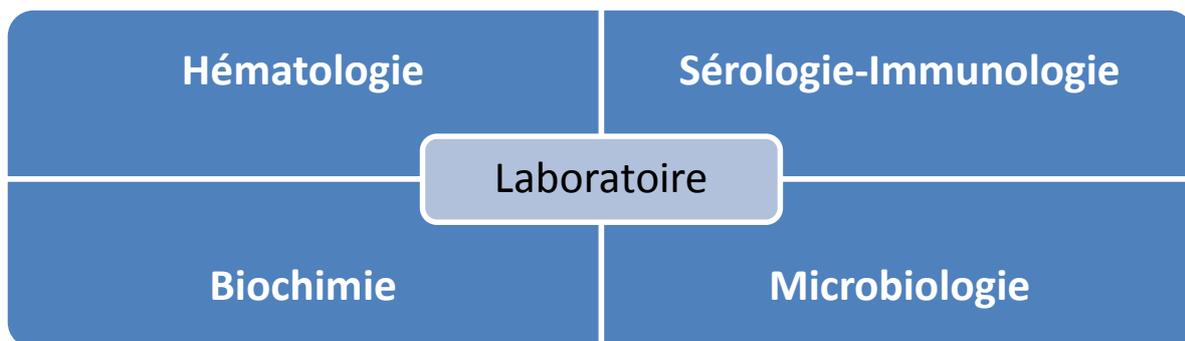


Figure 1: L'organigramme de laboratoire d'analyses médicales Bellouch

II. DIFFERENTES UNITES DU LABORATOIRE

Le laboratoire est constitué de quatre postes techniques différents :



1. Hématologie

Les examens de base, habituellement sollicités, dans cette unité sont :

- NFS (Numération Formule Sanguine) qui est un hémogramme complet ou formule sanguine.
- VS (Vitesse de Sédimentation).
- Hémostase (Temps de Céphaline Active « TCA » ou taux de Prothrombine « TP »).
- Groupage sanguin (AB0-Rh).

2. Sérologie-Immunologie

Une paillasse est dédiée pour des tests, tels que :

- Sérologie d'hépatite B «ACHBC» et C «ACHVC».
- Bilan de thyroïde : TSH, T4, T3.
- Bilan de fertilité : FSH, LH, Prolactine, Testostérone.
- Autres : Réaction à antigène non tréponémique « VDRL », réaction à antigène tréponémique « TPHA » et Protéine C- Réactif « CRP »...

3. Biochimie

Au niveau de cette paillasse plusieurs paramètres sont dosés selon les bilans demandés :

- Le bilan glucidique (glycémie à jeun, hémoglobine glyquée).
- Le bilan rénal (urémie, créatinémie).
- Le bilan lipidique (cholestérolémie total, HDL, LDL, triglycéridémie).
- Le bilan hépatique (transaminase « ALAT et ASAT », gamma-glutamyltransférase « gamma-GT », Phosphatase Alcaline, Bilirubine « Total, Indirect, conjuguée »).
- Bilan hydro-électrolytique (sodium, potassium, chlore).
- Autres (Acide urique, Amylase, lipase, protéine total, albuminémie, calcium, Protéine urinaire, ASLO, CRP)

4. Microbiologie

Parmi les tests microbiologiques appliqués dans le laboratoire Bellouch :

- Examen cytobactériologique des urines (ECBU)

- Examen cyto bactériologique des sécrétions vaginales (PV)
- Examen parasitologique et coproculture des selles
- Spermogramme et spermoculture
- Bacile de Koch (Bk)

III. DIFFERENTES PHASES ANALYTIQUES

Les examens de biologie médicale se déroulent en trois phases :

1. La phase pré-analytique

Ce terme englobe toute la partie qui précède l'analyse. La grande partie de cette phase se déroule dans le laboratoire Bellouch de GUELMIM au niveau de la salle de prélèvement et d'accueil. Elle concerne : le prélèvement, l'étiquetage et le transport d'échantillon, la dernière étape dans cette phase (la préparation d'échantillon pour l'analyse) se fait au niveau des salles techniques.

1.1. Accueil et prélèvement

- La secrétaire accueille le patient, lui crée un dossier complet contenant toutes les informations personnelles. Après quoi, elle inscrit les examens en fonction de l'ordonnance du médecin. Enfin, elle complète le dossier par une étiquette contenant la référence.
- L'infirmière prend les dossiers des patients et appelle à tour de rôle pour effectuer les prélèvements. Il (Elle) valide les informations de chaque personne et choisit le type de tube qui convient.

➤ Tubes de prélèvement

Le choix des tubes de prélèvement s'effectue selon l'examen demandé. Il existe deux types : soit avec ou sans anticoagulant.

- Tube avec anticoagulant :

Pour garder le sang à l'état fluide lors d'un prélèvement on utilise un « anticoagulant », son rôle est de bloquer une ou toutes les réactions qui transforment le fibrinogène en fibrine.

Donc, il existe différents types d'anticoagulants dans différents tubes pour différentes analyses (Héparine de lithium, Citrate de sodium, EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique, fluorure de sodium). (Voir Tableau 1).

- Tube sans anticoagulant :

Pour obtenir le sérum on utilise des tubes secs (sans anticoagulant) pour coagulation naturelle (pendant 30min). (Voir Tableau1).

Remarque:

- Le volume à prélever du sang est indiqué sur les flacons.
- Il faut respecter le rapport sang/anticoagulant : surtout en cas d'hémostase et test de vitesse de sédimentation.

Tableau 1: Les différents anticoagulants et tubes utilisés

	Les tubes	Les anticoagulants	Les analyses effectuées
Avec anticagulant	Le bleu 	Citrate de sodium	Coagulation (T.P /TCK)
	Le violet 	EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique	Hématologie :(NFS)
	Le noir 	Citrate de sodium	Vitesse de sédimentation
	Le gris 	Fluorure de sodium	Dosage de Glucose
Sans anticoagulant	Le rouge 	Sec : sans anticoagulant	Analyse sur sérum : (biochimie, sérologie)

➤ **Ordre de prélèvements des tubes**

Si l'on prélève plus d'un échantillon lors de la ponction veineuse, il est recommandé d'effectuer les prélèvements dans l'ordre qui suit pour éviter la possibilité d'un résultat erroné.

1. Tube pour analyse de sérum (tube : bouchon rouge).
2. Tube pour la coagulation (tube de bouchon bleu).
3. Tube pour la vitesse de sédimentation (tube : bouchon noir)
4. Tube pour l'hématologie (tube: bouchon violet).
5. Tube pour analyse de plasma (tube : bouchon vert).
 - Les infirmières assurent l'acheminement des tubes aux salles des analyses pour la phase analytique.

1.2. La préparation d'échantillon pour l'analyse

Se sont les techniciens qui se chargent de la préparation des échantillons par :

- La vérification et l'identification des numéros uniques des tubes de chaque patient.
- Le contrôle des automates et la mise en marche des appareils et vérification des réactifs.
- La répartition des tubes dans les différentes paillasse selon les analyses demandées.
- La Centrifugation des tubes pour travailler sur sérum ou plasma en respectant le temps, la vitesse et la température de centrifugation pour préserver au mieux l'échantillon dans les conditions souhaitées.
 - o Les tubes de chimie doivent être centrifugés pendant 10 minutes, car l'analyse se fait sur du sérum.
 - o Les tubes de plasma pour les analyses d'hémostase sont centrifugés 15 minutes à 4000 tours/min. Ce sont les conditions qui permettent d'éliminer le maximum de plaquettes et donc d'éviter leur interférence lors de l'analyse.

2. La phase analytique

Cette phase est le processus technique permettant l'obtention d'un résultat d'analyse biologique. Donc c'est le moment où les techniciens analysent les paramètres biologiques d'un échantillon biologique selon les unités cités auparavant.

3. La phase post-analytique

Cette phase concerne tous les événements qui peuvent se produire après l'analyse, elle est réalisée par le biologiste et les secrétaires, puisque:

- Le biologiste contrôle et interprète les résultats.
- La délivrance des résultats aux patients est assurée par les secrétaires et dans certains cas particuliers par le biologiste.



PARTIE II : PARTIE PRATIQUE

I. LES ANALYSES HEMATOLOGIQUES

Les examens hématologiques de base habituellement demandés au laboratoire hématologique se regroupent en trois parties distinctes :

- La cytologie et hémogramme : c'est la numération des cellules sanguines et l'étude de la morphologie, de la structure et de la pathologie.
- L'hémostase : c'est l'étude de la coagulation (étude des facteurs de coagulation de la phase extrinsèque et la phase intrinsèque et les cofacteurs de la coagulation).
- L'immuno-hématologie qui s'intéresse aux propriétés immunologiques des constituants du sang.

1. La cytologie

Le laboratoire Bellouch au niveau d'unité hématologique élabore ces analyses cytologiques :

1.1. La NFS

La numération formule sanguine ou hémogramme est un examen essentiel qui apporte des renseignements sur les cellules sanguines et sur les processus de défense immunitaire. Cet examen comprend le comptage de toutes les cellules ou éléments figurés du sang (les globules rouges ou hématies, les globules blancs ou leucocytes et les plaquettes) et certains paramètres liés à ces éléments sont mesurés (le taux d'hémoglobine, le volume globulaire moyen « VGM », l'hématocrite, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine « CCMH » et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine « TGMH »).

Les différents éléments étudiés en NFS.

Les Leucocytes (GB)

Les leucocytes sont la base de l'immunité à médiation cellulaire et humorale puisque, ils assurent la défense de l'organisme. Leur origine est la moelle osseuse un tissu situé au cœur de nos os et sont présentés dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes et de nombreux tissus conjonctifs de l'organisme. Le nombre des leucocytes dans le sang est normalement de 5000 à 10000 cellules par mm^3 .

Les globules blancs sont des cellules nucléées du sang dont on distingue trois catégories:

- **Les polynucléaires(PN)**

Les polynucléaires, apparaissent au microscope optique comme s'ils contiennent plusieurs noyaux. Mais en réalité ils n'en possèdent qu'un seul noyau, formé de plusieurs lobes reliés par de fins ponts de chromatine. Ils sont dits granulocytes car ils sont caractérisés par la présence de granules dans leur cytoplasme.

Il existe 3 catégories de polynucléaires : Les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.

- a. PN Neutrophiles**

Cellules arrondies, de 12 à 15 μm de diamètre possédant un noyau segmenté en plusieurs lobes (multilobes) et des granules, elles ont une affinité pour les colorants neutres.

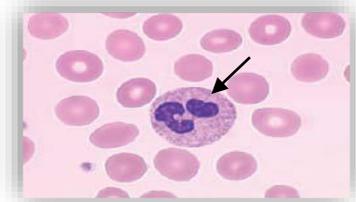


Figure 2: Observation microscopique de PN neutrophile

- b. PN Eosinophiles**

Cellules arrondies, légèrement plus grandes que les polynucléaires neutrophiles caractérisées par des granulations cytoplasmiques de couleur orangée. Le noyau est souvent bilobé.

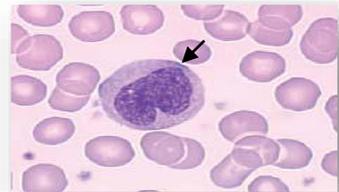


Figure 3: Observation microscopique de PN éosinophile

- c. PN Basophiles**

Les basophiles sont des cellules circulantes arrondies avec un noyau qui est souvent difficile à distinguer à cause des nombreuses granulations et comme leur nom indique, leurs granules ont une affinité pour les colorants basiques.

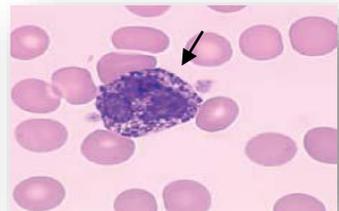


Figure 4: Observation microscopique de PN basophile

- **Monocytes**

Ce sont les plus grands des globules blancs et forment 4 à 10% environ de la totalité des leucocytes. Ils sont caractérisés par un noyau **en fer à cheval**, un cytoplasme qui contient de fines granulations. La norme se situe autour de 350 à 800 cellules / mm^3 .

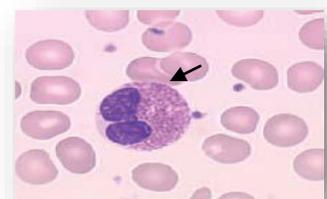


Figure 5: Observation microscopique de monocyte

○ **Lymphocytes**

Les lymphocytes ont un rôle majeur dans le système immunitaire. Ce sont de petites cellules dont le noyau est de grande taille occupant tout le corps cellulaire et se caractérisent par un cytoplasme très réduit. La norme est comprise entre 1500 à 4000 cellules/mm³ chez l'adulte.

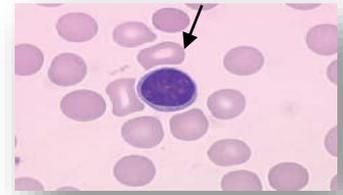


Figure 6: Observation microscopique de lymphocyte

Les érythrocytes(GR)

Les globules rouges, ou hématies, ou érythrocytes sont les cellules les plus nombreuses du sang (chaque litre de sang humain contient de 4 à 6 billions de globules rouges), sans noyau, biconcaves et présentes dans le sang circulant auquel elles confèrent sa couleur rouge. Leur diamètre varie entre 7 à 8 µm.

Le globule rouge est le terme de la lignée rouge qui comprend le proérythroblaste, l'érythroblaste basophile, l'érythroblaste polychromatophile, l'érythroblaste acidophile, le réticulocyte et l'érythrocyte avant d'être envoyés dans la circulation générale ou ils vivent environ 120 jours. Cette évolution cellulaire se déroule dans la moelle osseuse.

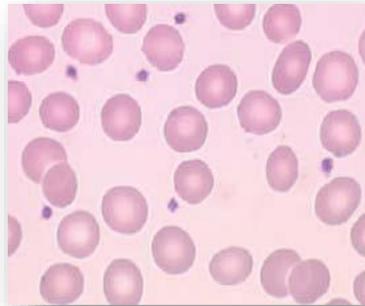


Figure 7: Observation microscopique des globules rouges

Hémoglobine

L'hémoglobine est une protéine synthétisée par les érythroblastes, riche en fer et permet de fixer rapidement de grandes quantités d'oxygène. Elle se trouve à l'intérieur des globules rouges du sang (13.5 à 17.5 g/100 ml chez l'homme et 12 à 16 g/100 ml chez la femme) ce qui leur confère leur couleur rouge.

Hématocrite

L'hématocrite correspond au volume occupé par les hématies entassées par centrifugation dans une quantité de sang total connue. Il s'exprime en pourcentage.

Des constantes érythrocytaires

Les constantes érythrocytaires sont calculées pour chaque échantillon de sang à partir des résultats de la numération des globules rouges, du dosage de l'hémoglobine et de la mesure de l'hématocrite. Elles sont extrêmement utiles dans le diagnostic des anémies.

a. Le volume globulaire moyen(VGM)

Il correspond au volume moyen qu'occupe une hématie dans le sang. Il est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{VGM } (\mu\text{m}^3) = \frac{\text{Hématocrite}(\%)}{\text{Nombre d'hématies (millions /mm}^3)} \times 10$$

Chez l'adulte la valeur normale varie entre 85 à 95 μm^3 par contre il existe un macrocyte (VGM >100 μm^3) chez le nouveau né.

b. La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine(TCMH)

C'est le poids moyen de l'hémoglobine contenue dans les hématies de l'échantillon analysé. Elle est calculée par la formule suivante :

$$\text{TCMH (pg)} = \frac{\text{Hémoglobine (g /100ml)}}{\text{Nombre d'hématies (millions /mm}^3)} \times 10$$

Le TCMH de l'adulte normal varie entre 27 à 28 pg. Ce paramètre est considéré comme l'un des meilleurs indices d'un déficit de synthèse de l'hémoglobine.

c. La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine(CCMH)

Elle représente le pourcentage d'hémoglobine contenue dans la masse globulaire de l'échantillon analysé. C'est aussi le poids en gramme d'hémoglobine contenue dans 100 ml d'hématies. Elle est mesurée de la manière suivante :

$$\text{CCMH \%} = \frac{\text{Hémoglobine (g /100ml)}}{\text{Hématocrite(\%)}} \times 100$$

La valeur normale du CCMH varie entre 32% et 36%.

La numération des plaquettes

Un thrombocyte ou plaquette est un élément figuré du sang sans noyau à contenu granuleux dont la taille varie entre 2 à 4 µm, formé dans la moelle osseuse. Ces cellules sont de petites tailles mais elles jouent un rôle essentiel dans la coagulation, Les valeurs normales sont 150000-400000 /mm³.

1.2. Principe et mode opératoire de l'automate Sysmex XS-500i

Les différents paramètres de la NFS calculés sont calculés dans le laboratoire Bellouch par l'automate de la NFS (Sysmex XS-500i) :

➤ **Principe**

Le principe de mesure repose sur la variation d'impédance engendrée par le passage de la cellule au travers d'un orifice calibré.

L'échantillon est dilué dans un diluant électrolytique (conducteur de courant). La conductivité est très différente de celle des cellules. Quand la cellule traverse l'orifice et passe entre deux électrodes, la résistance électrique augmente de façon proportionnelle au volume de la cellule.

➤ **Mode opératoire**

Le protocole de travail se déroule comme suit :

- Homogénéiser le tube de sang.
- Appuyer sur la touche « *No Echantillon Manuel* » présenté sur l'écran d'ordinateur et composer le numéro de série du patient (03160401 ; 03160402 ...)
- Présenter le tube débouché à l'aiguille, appuyer sur la gâchette de départ située en arrière de l'aiguille.



Figure 8: L'automate de la NFS (Sysmex XS-500i)

- A la fin de cycle d'analyse qui dure environ 60 secondes, les résultats sont affichés sur l'écran d'ordinateur.
- A la sortie du résultat sur l'imprimante, l'appareil est prêt pour effectuer une autre analyse.

➤ **Interprétation**

On peut avoir des valeurs anormales au dessous au-dessus des valeurs de référence:

- On parle d'anémie devant un taux d'hémoglobine abaissé.
- La polyglobulie est défini par une augmentation de taux des hématies.
- On parle d'hyperleucocytose devant un taux des leucocytes augmenté.
- La leucopénie est défini par une diminution de taux des leucocytes.
- On parle de thrombocytes devant un taux augmenté des plaquettes.
- La thrombopénie est défini par un taux des plaquettes diminué.

1.3. Le frottis sanguin

C'est un complément des données précédentes qui représente le dépistage éventuel d'anomalie morphologique orientant le diagnostic. Et c'est l'examen clé de plusieurs maladies :

- Pour les globules rouges : selon la morphologie on peut déterminer : une sphérocytose (hématie en sphère : hématies rond), une élliptocytose (hématie elliptique) et une drépanocytose (hématies en faucille).
- Pour les globules blancs : Leucémies ou lymphomes : par présence des blastes et selon leur nombre des blastes et leur morphologie, on peut déterminer s'il s'agit de leucémie aigue ou chronique.
- Pour les plaquettes : soit des thrombocytoses, des thrombopénies ou des thromboplastes circulants.

➤ **Principe**

Le frottis sanguin est un étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre, colorée par le May Grunwald Giemsa et lue au microscope optique. L'étude minutieuse du frottis est extrêmement utile au diagnostic de nombreuses maladies hématologiques.

➤ Manipulation

✚ Préparation du frottis sanguin

On dépose une petite goutte de sang de deux millimètres à un centimètre environ à l'une des extrémités d'une lame propre posée horizontalement sur un plan dur. Puis, on place le bord de la lame rodée ou de la lamelle sur la lame et on fait glisser celle-ci jusqu'à ce qu'elle entre au contact avec la goutte, en maintenant un angle de 45°.

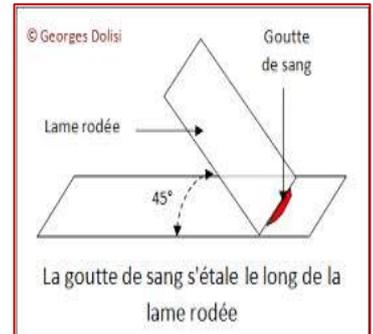


Figure 9: Schéma explicatif de préparation du frottis sanguin

La goutte s'étale le long de l'arête par capillarité. Puis, on pousse un mouvement uniforme vers l'autre extrémité de la lame sans atteindre celle-ci.

Le frottis ainsi réalisé est séché rapidement par agitation à l'air. Il ne faut pas oublier de noter l'identité du patient(N°) avec un crayon sur la tête du frottis.

Un frottis de qualité doit respecter les critères suivants :

- Il doit posséder une tête, un corps et une queue.
- Il ne doit être ni trop mince (pauvre en éléments), ni trop épais.

✚ Coloration du frottis

- Première étape : fixation de coloration par Fix- Ral 555

On plonge la lame pendant une minute dans le flacon 1, puis on égoutte l'excédent sur papier filtre.

- Deuxième étape : coloration par le Eosin-Ral 555.

On sort le frottis et on le trempe 25 secondes dans le flacon 2, puis on égoutte l'excédent sur papier filtre.

- Troisième étape : coloration par le Bleu-Ral 555.

On sort le frottis et on le trempe 40 secondes dans le flacon 3, puis on rince rapidement à l'eau distillée.

Etude du frottis sanguin

Pour déterminer la répartition des cellules, la qualité de l'étalement et de la coloration, il faut tout d'abord contrôler le frottis aux grossissements (objectif× 10). Si la préparation est jugée satisfaisante, on dépose une petite goutte d'huile à immersion sur la queue de l'étalement, puis on met en place l'objectif×100.

La répartition des cellules n'est pas parfaitement égale. Les leucocytes doivent être intacts et leur répartition relativement homogène. Tout de même, on ne peut pas éviter une certaine ségrégation. Les éléments les plus petits tels que les lymphocytes se regroupent au centre du frottis, les plus volumineux (polynucléaires et monocytes) sont dans les franges et la queue.

Les hématies observées dans la zone d'épaisseur idéale, doivent être étalées en couche monocellulaire leurs contours doivent être réguliers et leur coloration rose.

➤ **Interprétation**

Au cours de la lecture du frottis, le biologiste doit signaler la présence éventuelle de cellules jeunes appartenant à la lignée médullaire. De même, il doit informer le clinicien de tout parasite observé sur le frottis ou tous éléments orientant le diagnostic.

1.4. La vitesse de sédimentation

➤ **Principe**

La vitesse de sédimentation ou VS peut être définie comme étant la vitesse avec laquelle chutent les hématies en suspension dans un plasma à l'intérieur d'un tube de Westergreen maintenu verticalement.

La vitesse de sédimentation est longtemps restée le principal marqueur le moins coûteux de la réaction inflammatoire.

➤ **Manipulation :**

Après une homogénéisation soignée du prélèvement, on fait aspirer le sang dans le tube de Westergreen jusqu'au repère zéro, tout en évitant la formation de bulles d'air. Puis, on place le tube bien vertical sur son support.

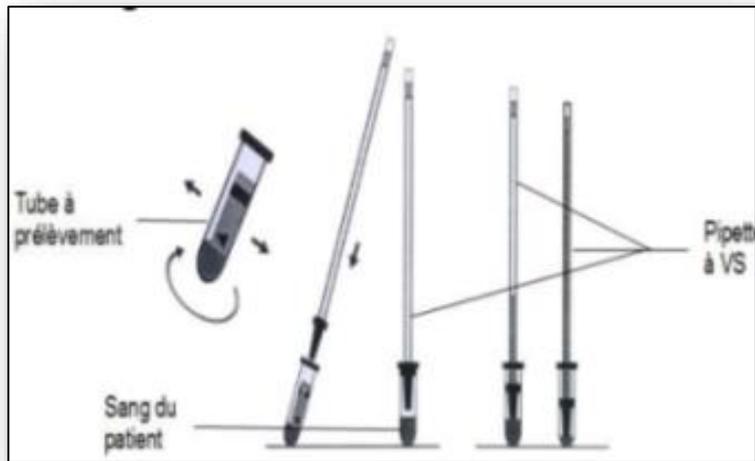


Figure 10: Schéma explicatif du mode opératoire de VS

➤ **Interprétation**

Après une heure, on lit la hauteur du plasma surnageant depuis la base du ménisque supérieure jusqu'au sommet de la colonne d'hématies.

Le résultat est exprimé en millimètre (mm), ce qui correspond à la distance parcourue par les globules rouges en une heure. Il n'est pas utile de poursuivre la lecture plus longtemps, le résultat obtenu au bout d'une heure est largement suffisant.

2. L'hémostase

Les tests explorant la coagulation appliqués dans ce laboratoire se font à l'aide de l'automate (Sysmex STA SATBLLITE) sont :

Figure 11: L'automate d'hémostase (Sysmex STA SATBLLITE)



2.1. Temps de QUICK ou taux de prothrombine (TP)

➤ *Principe*

Le temps de quick mesure le temps de recalcification d'un plasma citraté en présence d'un excès de thromboplastine tissulaire, cela permet d'explorer les facteurs de coagulation de la voie extrinsèque.

Ce test consiste donc à comparer en présence de thromboplastine, le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes par rapport à un plasma témoin normal traité dans les mêmes conditions.

➤ *La valeur normale*

Le taux de prothrombine : 70 - 100%.

2.2. Temps de céphaline activée (TCA OU TCK)

➤ *Principe*

Le temps de céphaline activée mesure le temps de recalcification d'un plasma citraté pauvre en plaquettes en présence de céphaline. C'est une méthode globale d'exploration de la voie intrinsèque de la coagulation.

➤ *La valeur normale*

Le TCA normal varie entre 30 à 40 secondes.

3. Immuno-hématologie

Parmi les tests immuno-hématologiques que le laboratoire hématologique fait :

3.1. Le groupage sanguin (ABO - Rhésus)

➤ *Principe*

La notion de groupe sanguin est très simple à définir, puisque le terme « groupe » représente un ensemble d'individus qui ont un caractère en commun et l'adjectif « sanguin » qui lui est adjoint signifie que ce caractère concerne une cellule présente dans le sang.

Le groupe sanguin donc est un ensemble de propriétés antigénique du sang qui permet de classer les individus selon des systèmes d'antigènes situés à la surface des globules rouges, les plus importants et pratiqués sont **le système ABO** et **système Rhésus**.

✚ Le système ABO

Les globules rouges portent à leur surface des antigènes spécifiques dont la présence détermine l'appartenance du sujet au groupe sanguins A, B, O ou AB.

La détermination du groupe sanguin est définit à la fois par la mise en évidence des antigènes (Agglutinogènes) anti-A et /ou anti-B à la surface des hématies humaines dans le sang total (test de Beth-Vincent) et par la présence ou l'absence d'anticorps(Agglutinines) anti- A et/ou anti- B dans le plasma (test de Simonin).

Quatre groupes peuvent ainsi être définis selon l'absence et /ou la présence des antigènes et/ou des anticorps :

Tableau 2: Les différents groupes sanguins selon l'absence et /ou la présence des antigènes et/ou des anticorps.

Groupes	A	B	AB	O
Agglutinogènes	Antigène A	Antigène B	Antigènes A et B	Pas d'antigène
Agglutinines	Anti- B	Anti- A	Pas d'anticorps	Anti- A et Anti- B

✚ Le système Rhésus

Le système Rhésus (ou RHD) est le second système attaché aux globules rouges qui dépend de l'absence ou de la présence d'un autre antigène appelé "D", donc les sujets qui possèdent l'antigène D sont dits Rhésus positif et ceux qui ne le possèdent pas sont dits Rhésus négatif.

➤ *Manipulation*

Le laboratoire Bellouch emploie le test de **Beth-Vincent** qui est une technique manuelle, sur plaque. Elle repose sur le principe de l'hémagglutination de l'antigène (sang) et le sérum test (antisérum).

Donc après avoir pris tous les moyens nécessaires d'hygiène (gants, matériels pour nettoyage....), dans une plaque d'opaline on :

- Dépose une goutte de chacun des 4 sérums en les espaçant et en faisant attention de bien les repérer.
- Puis on dépose dans chacune de ces gouttes une goutte de sang à déterminer.

- On mélange les gouttes, à l'aide du petit tube en essuyant soigneusement le tube entre les tests avec le papier absorbant.
- On fait tourner délicatement la plaque.
- La réaction apparaît une minute après l'agitation.

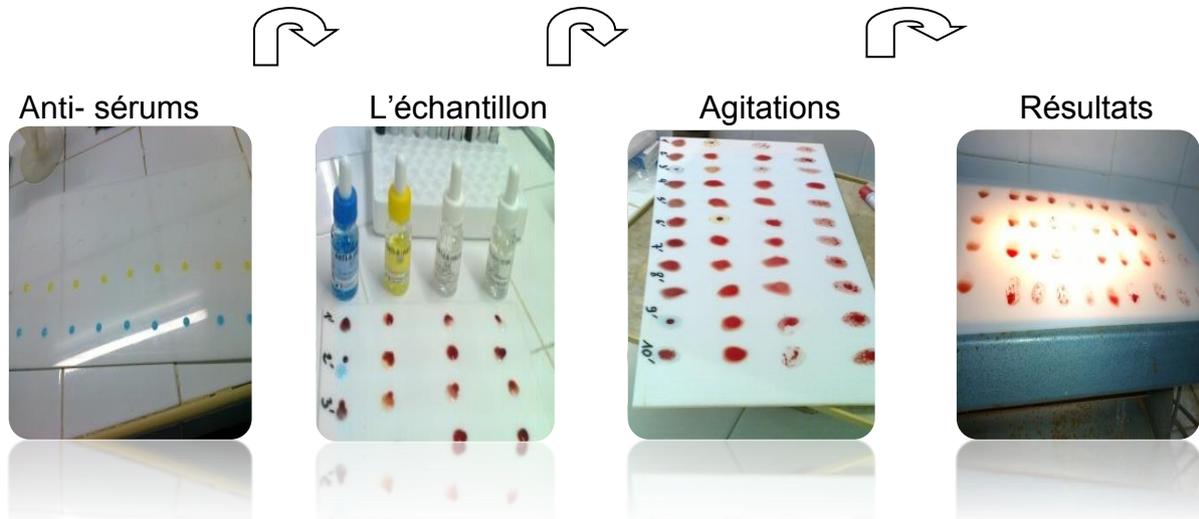


Figure 12: La technique de Beth-Vincent

➤ *Interprétation des résultats*

✚ **Système ABO**

Tableau 3: Les résultats de test Beth-Vincent

Anti A	Anti B	Anti AB	Détermination
Agglutination	Pas d'agglutination	Agglutination	Groupe A
Pas d'agglutination	Agglutination	Agglutination	Groupe B
Agglutination	Agglutination	Agglutination	Groupe AB
Pas d'agglutination	Pas d'agglutination	Pas d'agglutination	Groupe O

✚ **Système Rhésus**

- Présence d'agglutination : test est positif.
- Absence d'agglutination : test est négatif.

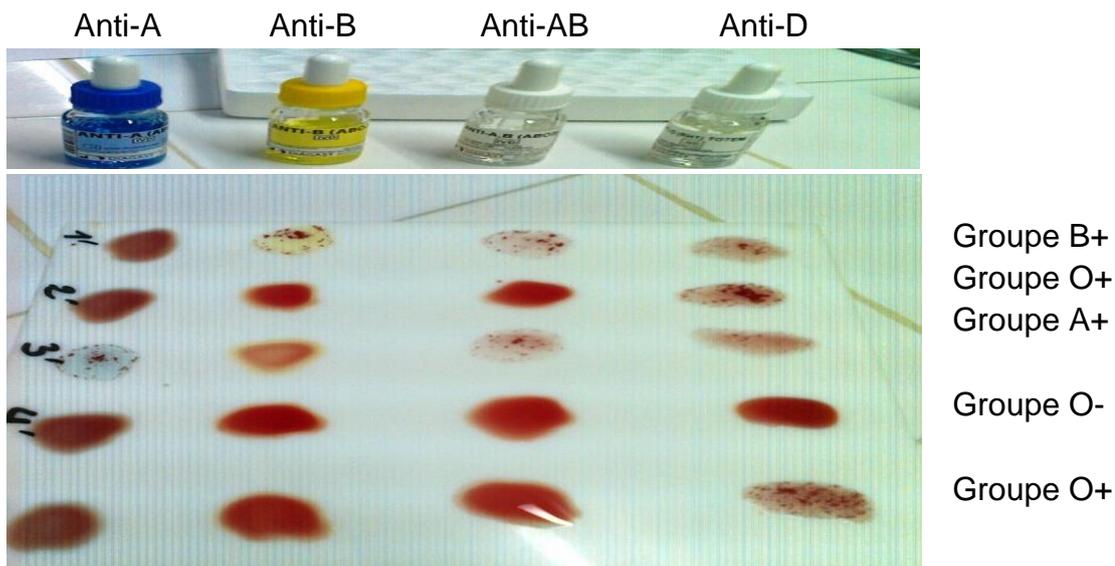


Figure 13: Les différents sérums tests et les résultats de test Beth-Vincent

II. LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

La microbiologie (du grec "mikros" = petit, "bios" = vie, "logia" = théorie, science) est la **science qui étudie les micro-organismes** (organismes microscopiques) pathogènes pour l'Homme, puisque les principaux objectifs des analyses microbiologiques sont d'isoler et d'identifier les micro-organismes pathogènes et de mesurer leur sensibilité aux antibiotiques.

Parmi les différents tests microbiologiques réalisés dans laboratoire Bellouch :

1. L'examen cyto bactériologique des urines (E.C.B.U)

L'urine est un liquide jaune clair, transparent sécrété par les reins et éliminé par les voies urinaires. L'urine est normalement stérile mais souillée physiologiquement lors de son émission par les germes présents dans la flore cutané - muqueuse et génito - urinaire.

➤ Principe

L'examen cyto bactériologique des urines (E.C.B.U) représente un temps capital dans le diagnostic et dans la surveillance de l'évolution et du traitement d'une infection urinaire.

Il consiste à réaliser un examen microscopique des urines qui permet l'estimation de la réaction leucocytaire, l'isolement et l'identification des bactéries infectantes et l'étude de leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques. Il permet également la recherche dans les urines des autres éléments figurés (hématies, cristaux..), des parasites et des levures.

➤ Prélèvement

Le prélèvement des urines est un temps essentiel d'ECBU. Il doit être fait avec beaucoup de soin car il conditionne la qualité de l'analyse et de son résultat.

Habituellement, il doit être réalisé avant toute antibiothérapie. Les urines sont recueillies de préférence le matin ou après avoir séjourné au moins 3 heures dans la vessie. Après une toilette intime, le premier jet de la miction est éliminé, puis le patient recueille ses urines dans un flacon stérile.

➤ Diagnostic bactériologique

○ L'examen macroscopique

- On note l'aspect des urines : clair, trouble, hématique....
- On mesure le pH urinaire et on note la présence de glucose, leucocytes, sang et les protéines par des bandelettes revêtues d'indicateurs colorés.



Figure 14: Les bandelettes urinaires

○ L'examen microscopique

✚ Etat frais

Il présente un double intérêt :

- Quantitatif : Numération des éléments cellulaires
- Qualitatif : Description des différents éléments cellulaires

a) Examen quantitatif

Cet examen permet de dénombrer les hématies et les leucocytes par ml à l'objectif $\times 40$ en utilisant une cellule de Malassez (ou lame et lamelle) qui se monte avec l'urine pure.

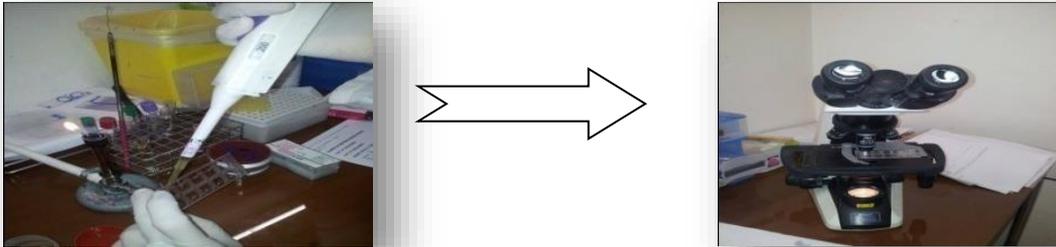


Figure 15: Examen quantitatif d'ECBU sur une cellule de Malassez

b) Examen qualitatif

- On centrifuge les urines à faible vitesse (1500 tr /mm pendant 5 mn) pour obtenir le culot.
- On jette le surnageant et on étale le culot entre lame et lamelle.
- On observe au microscope à l'objectif $\times 40$.
- On note la présence éventuelle de cellules épithéliales, de cristaux, de levures et de *Trichomonas*.

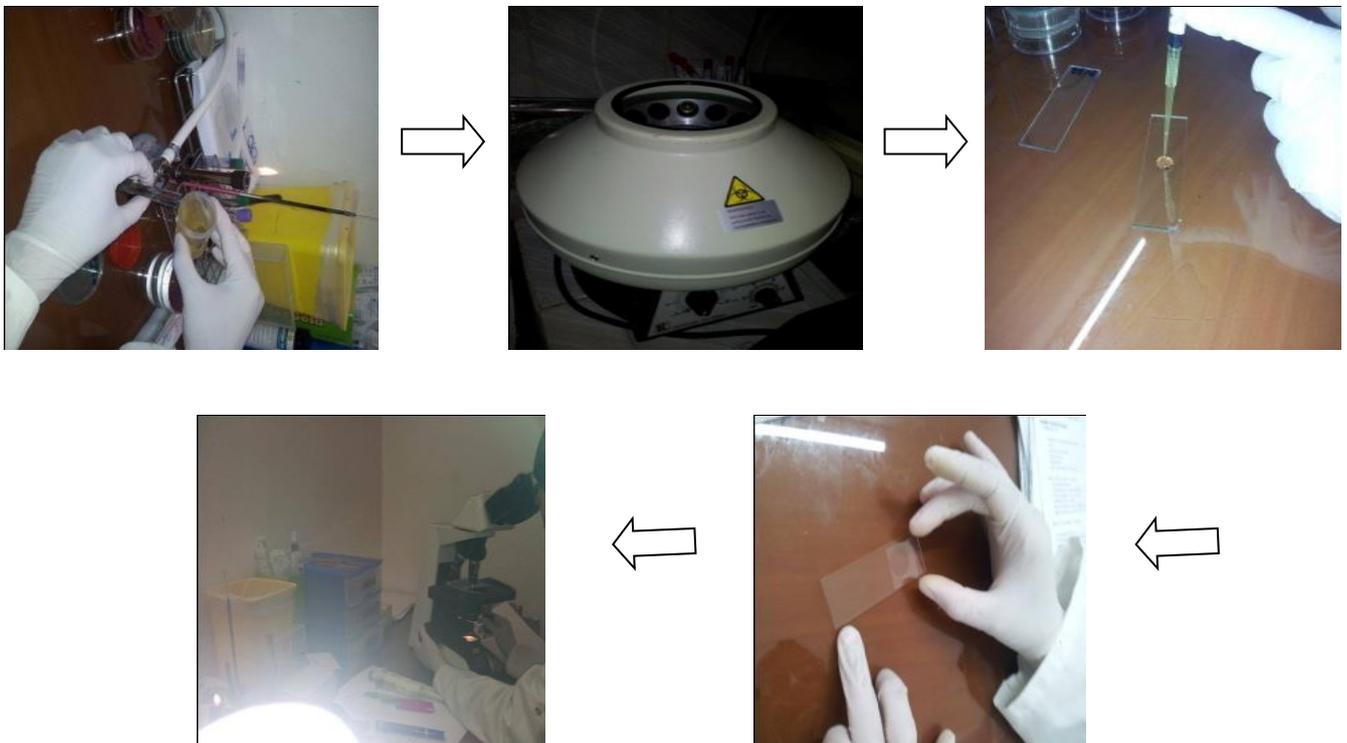


Figure 16: Les différentes étapes d'un examen qualitatif d'ECBU

Coloration de Gram

a) Principe

La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale. Elle permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram +) ou la fuschine (Gram -). L'intérêt de cette coloration est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

b) Méthode de coloration

- Sur une lame propre, étaler le culot de centrifugation et sécher à la flamme.
- Recouvrir la lame par le violet de gentiane, laisser agir 1 minute
- Rincer et recouvrir la lame avec le lugol pour enlever le colorant, laisser agir 1 minute.
- Recouvrir la lame avec l'alcool acétone, laisser agir 1 minute
- Laver à l'eau de robinet.
- Recouvrir la lame avec la fuchsine et laisser agir 30 secondes.
- Rincer et sécher la lame puis observer au microscope à l'objectif $\times 100$ en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion.
- Noter la présence, la morphologie et le gram des bactéries.

NB :

- Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.
- L'alcool sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites (Gram +) la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car trop épaisse. Elles resteront alors violettes.
- La fuschine a pour but de redonner aux bactéries (Gram-) précédemment décolorées, une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à (Gram+) restées violettes seront évidemment insensibles à cette coloration.
- La coloration de gramme permet de classer les bactéries en deux groupes :
 - _ Gram+ : Ont une paroi épaisse qui se colore en violet.
 - _ Gram- : Ont une paroi plus fine qui se colore en rose.

○ La culture

La culture se fait par l'ensemencement d'une goutte d'urine sur le milieu CLED avec une incubation à 37°C pendant 24 heures.

⇒ Interprétation des résultats :

- Culture (-) (négatif) : quand les colonies sont inférieures à 10000 /ml.
- Culture (+) (positif) : quand les colonies sont supérieures à 10000/ml.



Figure 17: l'ensemencement d'une goutte d'urine sur le milieu CLED

○ L'identification et antibiogramme

Ces deux étapes sont effectuées selon une méthode semi-automatisé à l'aide d'un automate VITEK (Logiciel VITEK 2 Systems : identification (ID) et antibiogramme(AST)).

✚ Principe

Le système est très utile aux laboratoires de microbiologie, aux médecins prescripteurs et aux patients en raison de sa rapidité unique d'analyse et de production de résultats pour les tests d'identification et d'antibiogramme concernant les bactéries et les levures les plus pertinentes au niveau clinique. Le test nécessite de préparer une suspension saline contenant le germe et de l'inoculer dans les cartes déterminant les caractéristiques biochimiques et les types d'antibiotiques. Ces cartes sont jetables et à usage unique.



Figure 18: L'automate d'identification et antibiogramme (VITEK)

✚ Mode opératoire

- Préparation de la cassette :

⇒ Préparation et standardisation de l'inoculum :

- Avec un mélangeur de type PSipette, sélectionner des colonies isolées et les mettre en suspension homogène dans 3ml de solution saline.

- Standardiser cette suspension bactérienne selon les méthodologies en utilisant le DensiCHEK.

⇒ Préparation des suspensions pour l'antibiogramme :

- En utilisant la pipette manuelle fournie avec le système, transférer dans un second tube contenant 3ml de solution saline, la quantité préconisée (145 µl pour les Gram- « micropipette rouge » et 280 µl pour les Gram+ « micropipette bleu »)



Figure 19: Les pipettes de l'automate VITEK

- Création de la cassette virtuelle :

⇒ Scanner le code à barres de la cassette au niveau de l'espace « ID cassette »

- Utilisation de l'instrument :

⇒ Chargement de la cassette pour inoculation :

- Charger la cassette dans la chambre d'incubation (dans un délai maximum de 30 minutes).
- Fermer la porte et appuyer sur le bouton « lancer remplissage ».

⇒ Chargement de la cassette dans le lecteur-incubateur :

- Retirer la cassette, la placer dans le lecteur-incubateur (dans un délai maximum de 10 minutes) puis renfermer la porte.
- A la fin de l'analyse, les cartes usagées sont éjectées automatiquement dans le collecteur de déchets intégré. Vider régulièrement ce collecteur.

N B :

les résultats de l'automate sont réalisées au bout de 18 heures et fournissent le type de bactérie et sa sensibilité aux différents antibiotiques.

2. Examen cyto-bactériologique des sécrétions vaginales (PV)

Les sécrétions vaginales physiologiques proviennent principalement de la desquamation de cellules vaginales superficielles et de la glaire cervicale sécrétée par l'épithélium endocervical.

➤ Principe

L'examen cyto-bactériologique des sécrétions vaginales permet le dépistage et le diagnostic étiologique d'une infection génitale basse d'origine bactérienne ou parasitaire. Il permet éventuellement l'étude de la sensibilité des germes isolés aux antibiotiques.

➤ Prélèvement

Le prélèvement vaginal doit être fait avec beaucoup de soin car il conditionne la qualité de l'analyse. Habituellement doit être fait avant toute antibiothérapie, la patiente devra éviter toute toilette intime, ainsi que tout rapport sexuel le jour précédant l'examen.

Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un écouvillon qui est inséré dans le vagin pour la confection du frottis.



Figure 20: Les écouvillons stériles

➤ Diagnostic bactériologique

○ L'examen macroscopique

- On note l'aspect des sécrétions vaginales : blanchâtre, jaunâtre, hématiche.
- On note le pH des sécrétions vaginales.

○ L'examen microscopique

✚ Etat frais

- Faire une suspension des sécrétions vaginales dans deux gouttes d'eau physiologique sur une lame et recouvrir par une lamelle.
- Examiner au microscope à l'objectif $\times 40$
- Noter la présence de trichomonas, des levures et le nombre de leucocytes, d'hématies et de cellules épithéliales par champ microscopique.



Figure 21: Les étapes d'étalement du PV

Coloration de Gram

- On étale les sécrétions recueillies en roulant soigneusement l'écouvillon sur une lame propre et en appuyant légèrement de façon à obtenir un frottis fin et homogène.
- On sèche la lame à l'air et on effectue la coloration de Gram.
- On examine la lame colorée au microscope à l'objectif $\times 100$.
- On note la présence, la morphologie, l'abondance et le type de bactéries présentes dans la flore vaginale.

○ **La culture**

La culture des sécrétions vaginales se fait dans les milieux suivants : CLED, Sabouraud, Gélose chocolat, Gélose au sang.

- CLED : Est un milieu de croissance de toutes les bactéries.
- Sabouraud : Ce milieu est spécifique pour la croissance des levures.
- Gélose chocolat : Seules les bactéries anaérobies peuvent pousser dans ce milieu.
- Gélose au sang : Seules les bactéries anaérobies peuvent pousser dans ce milieu.



Figure 22: Les milieux de culture d'ensemencement du PV

On ensemence le prélèvement vaginal par striation dans les milieux précédents et on les incube dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

NB :

On met les milieux (Gélose chocolat et gélose au sang) dans un milieu anaérobie (pauvre en O_2) car les bactéries poussant dans ce milieu nécessitent une concentration de CO_2 .

○ **L'identification et antibiogramme**

- Après 24h d'incubation, on fait une observation sur les milieux de culture. Si on a des colonies blanches sur le sabouraud on réalise un test de filamentation pour détecter la présence de candida albicans . Le test se déroule comme suit :
 - Dans un tube on met une colonie de milieu de culture+quelques gouttes de sérum.

- Incuber à 37°C pendant 2 à 3 heures.
 - Après on réalise un étalement frais entre lame et lamelle et on observe au microscope à l'objectif ×40.
 - La présence de filaments indique que le test est positif (présence de *Candida albicans*), leur absence indique que le test est négatif.
- Pour les colonies apparues dans le milieu de chocolat et de sang et CLED, on utilise l'automate VITEK pour faciliter l'identification et réaliser l'antibiogramme.

CONCLUSION

La biologie médicale est la branche de la médecine qui vise à effectuer et interpréter des analyses sur des liquides ou prélèvements humains, dans le but de caractériser ou de suivre une maladie. Les différentes analyses médicales, hématologie, microbiologie, biochimie et sérologie permettent des analyses spécifiques et complémentaires.

La qualité de ces différentes analyses biologiques implique la maîtrise de la phase pré analytique car elle conditionne de manière importante la qualité du résultat et ainsi la précision du diagnostic et/ou l'évaluation thérapeutique. Les sources d'erreurs peuvent être multiples durant cette phase car elle met en jeu plusieurs intervenants dans différents lieux. C'est pourquoi toutes les différentes étapes de cette phase sont contrôlées par le biologiste

Ce stage m'a permis de voir et de me rapprocher beaucoup plus de la vie professionnelle, pour acquérir des informations pratiques ainsi que d'élargir mes connaissances dans le domaine de la biologie médicale depuis le début de mes études.

De façon plus générale, cette expérience très enrichissante sur tous les plans.