



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Les différentes techniques d'analyse au
Laboratoire d'Hématologie**

Présenté par :ADIB Lamiae

Encadré par :Pr. EL ABIDA Kaouakib

Pr. AMRANI HASSANI Moncef

Soutenue :Jeudi 08 juin 2017

Devant le jury composé de :

- Pr. EL ABIDA Kaouakib
- Pr. AMRANI HASSANI Moncef
- Pr. OUHMIDOU Bouchra

Stage effectué à : Centre Hospitalier Universitaire Hassan II

Année universitaire 2016-2017

Dédicace



Je dédie ce mémoire à:

Mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments ,
pour leur patience illimitée, leur encouragement continu et leur aide .

Mes chers frères pour leur grand amour et leurs soutien qu'ils trouvent ici
l'expression de ma haute gratitude .

Tous mes chers amis

A ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'édition de ce rapport .



Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements, ma profonde gratitude et mon grand respect à:

Pr. Moncef ELAMRANI, Professeur, responsable au service Hématologie de CHU-Fès pour son soutien durant cette période de stage.

Je tiens à remercier particulièrement mon encadrante, **Pr. EL ABIDA Kaouakib**, pour sa patience, sa disponibilité, son aide durant toute la période de stage et surtout ses judicieux conseils.

Aumembre de jury,

Je vous exprime professeurs mes vifs remerciement et je vous témoigne ma reconnaissance et mon respect

Merci infiniment

Listes des abréviations:

- CHU : Centre Hospitalier Hassan II .
- TCA : Temps céphaline active .
- TP : Taux de prothrombine .
- INR : Internationalnormalized ratio .
- NFS : Numération Formule Sanguine .
- CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine .
- TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine .
- VGM : VolumeGlobulaire Moyen .
- VS : Vitesse de Sédimentation .
- CD : Coombs Directe .
- RAI : Recherche Agglutinines Irrégulières(Coombs Indirecte) .
- Rh : Rhésus .

Sommaires:

Glossaire

Abréviation

Présentation générale du CHU.....1

Introduction.....2

Données bibliographiques:

I Hématologie.....4

II Cellules sanguines.....4

III Hémogramme.....8

IV Frottis sanguin.....9

V Hémostase.....10

VI Technique de groupage:12

VII La vitesse de sédimentation.....13

VIII Test de Coombs.....13

Matériel et méthodes

I unité d'hémolyse.....16

1) Numération formule sanguine.....16

2) Frottis sanguin.....19

II Les différentes techniques en hémostase.....21

III Technique de groupage.....25

IV vitesse de sédimentation.....27

V Test de coombs.....29

Conclusion.....32

Présentation générale de la structure d'accueil



Date de création : 30 Août 2001

Date de mise en service : 05 Août 2002

Statut : Etablissement public doté de personnalité morale et d'autonomie financière.

Lieu d'implantation : la wilaya de Fès

Missions : dispenser des soins médicaux conduire des travaux de recherche médicale dans le strict respect de l'intégrité physique et morale et de la dignité des malades participer à l'enseignement clinique universitaire et postuniversitaire

Médicale et pharmaceutique ainsi qu'à la formation du personnel paramédical

Organisation : le Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès est constitué d'une direction et des formations hospitalières

Composition :

Hôpital des spécialités

Mère enfants

Hôpital Omar Drissi

Hôpital Ibn Al Hassan

Hôpital d'oncologie

Adresse : Centre Hospitalier Universitaire Hassan II : B.P 1835 Atlas Fès

Téléphone :

Télé Direction 035 61 90 52

Télé/ Fax Secrétariat Général 035 61 90 53

Email : chufes@menara.ma direction/ chufes2@menara.ma secrétariat générale

Introduction:

Les analyses hématologiques sont pratiquées sur le sang pour permettre le diagnostic ou le suivi de certaines maladies. Le sang est composé d'un liquide, le plasma, dans lequel flottent des cellules (globules rouges, globules blancs et plaquettes) et un grand nombre de substances (protéines, hormones, vitamines, etc.). Ainsi, l'hématologie regroupe l'analyse des cellules du sang mais aussi d'éléments dissous dans le plasma comme les facteurs de coagulation ou les anticorps.

- Les tests les plus utilisés pour le diagnostic et l'étude des problèmes hématologiques sont :

- ✓ l'hémogramme (ou numération formule sanguine, NFS) généralement automatisé ;
- ✓ le test du groupage sanguin
- ✓ la vitesse de sédimentation
- ✓ Coombs directe (CD)
- ✓ Coombs indirecte (RAI)

- Les explorations de coagulation :

- ✓ Le temps céphaline activé (TCA)
- ✓ International normalized ratio (INR)
- ✓ Les facteurs de coagulation
- ✓ Le taux de prothrombine (TP, PR Prothrombine Ratio)
- ✓ Les D-Dimères

A travers ce rapport je vais essayer de présenter les différentes tâches techniques des analyses hématologiques effectuées au sein du laboratoire.

Donc quelles sont les différents tests réalisés au niveau de ce service ?

Données bibliographiques

I. L'hématologie:

L'hématologie est la branche de la médecine qui étudie la physiologie et la pathologie de sang, et plus particulièrement les cellules sanguines dont l'origine est hématopoïétique et qui ont un rôle dans l'oxygénation, l'immunité et la coagulation. Elle étudie également certaines molécules plasmatiques que sont les facteurs de coagulation. Globalement, on peut distinguer la cytologie sanguine qui s'intéresse aux cellules et à leur physiologie, et à l'hémostase qui explore le phénomène de la coagulation, c'est-à-dire la formation de caillot et leur destruction ultérieure.

II. Les cellules sanguines:

Le sang est composé de cellules sanguines en suspension dans le plasma. L'ensemble est contenu dans les vaisseaux sanguins.

Les éléments figurés du sang ont des durées de vie limitées ; il existe un équilibre dynamique entre leur production (l'hématopoïèse et la lymphopoïèse) et leur destruction.

1) Les globules rouges :

Sont des cellules dépourvues de noyau, dont le cytoplasme est riche en hémoglobine et dépourvu d'organites. Ces cellules assurent le transport des gaz respiratoires O_2 et CO_2 . (Figure 1).

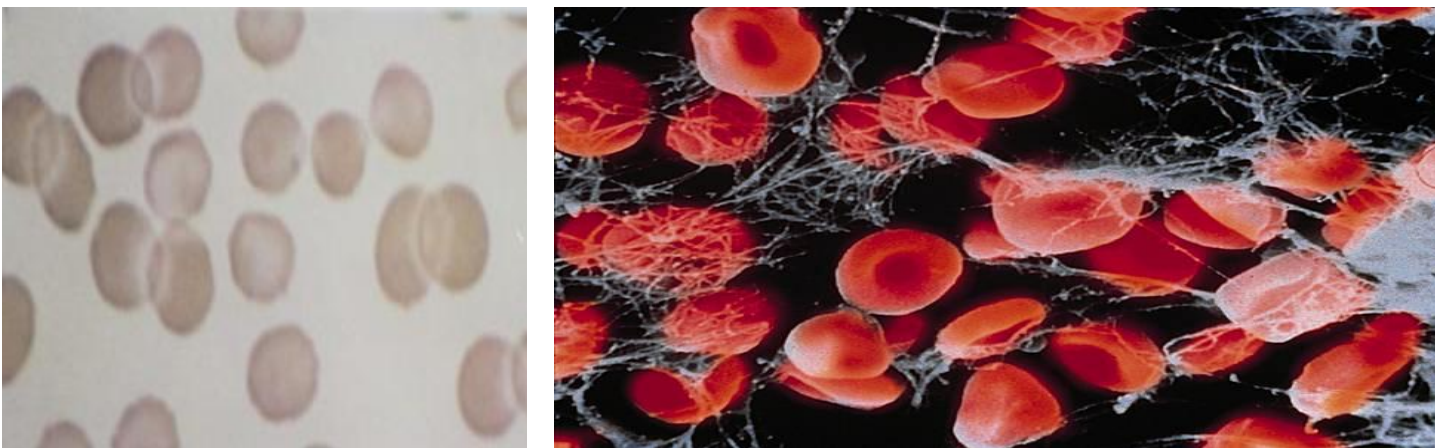


Figure 1 : aspect morphologique des globules rouges

2) Les polynucléaires neutrophiles:

Responsables de la défense contre les infections bactériennes et autres processus inflammatoires. Le noyau est polylobé et le cytoplasme légèrement acidophile, renferme des granulations très fines. Ils présentent entre 40% et 70% du pourcentage des leucocytes totaux. (Figure 2).



Figure 2 : aspect morphologique d'un polynucléaire neutrophile

3) Les polynucléaires éosinophiles :

Les éosinophiles traitent en premier lieu les infections parasitaires, peuvent augmenter au moment des réactions allergiques et leur augmentation peut être une indication pour l'établissement d'un diagnostic. Ils ont un noyau bilobé avec des granulations plus grosses et de teinte orangée. Son pourcentage est entre 1% et 4%. (Figure 3).

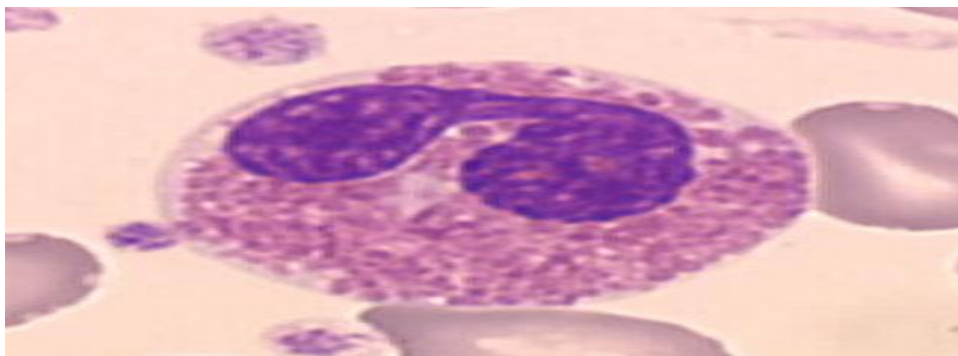


Figure 3 : aspect morphologique d'un polynucléaire éosinophile

4) Les polynucléaires basophiles :

Responsables des réponses allergiques et inflammatoires en libérant de l'histamine, ils sont caractérisés par de grosses granulations basophiles violettes. Son pourcentage est entre 0% et 1%. (Figure 4).

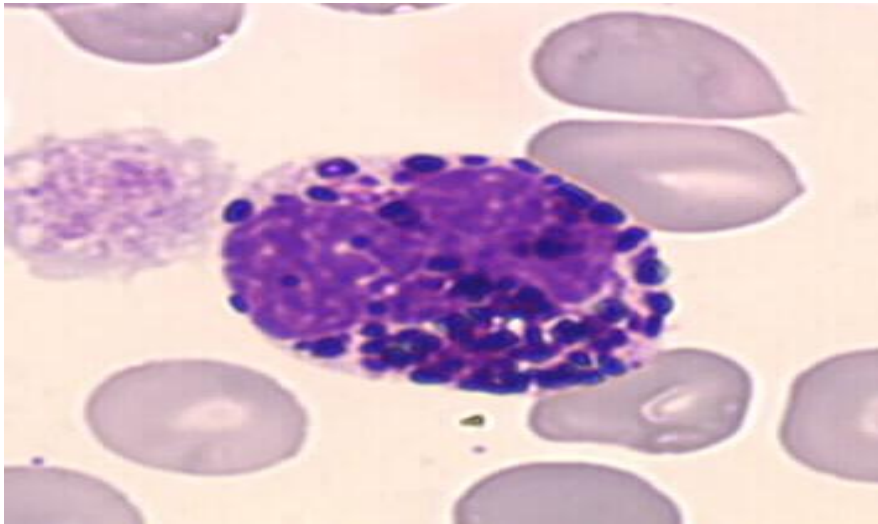


Figure 4 : aspect morphologique d'un polynucléaire basophile

5) Les lymphocytes :

Deuxième cellule la plus importante après le neutrophile, son augmentation est le plus souvent signe d'une infection en particulier une infection virale. Sa valeur normale est entre 20% et 45%. (Figure 5).

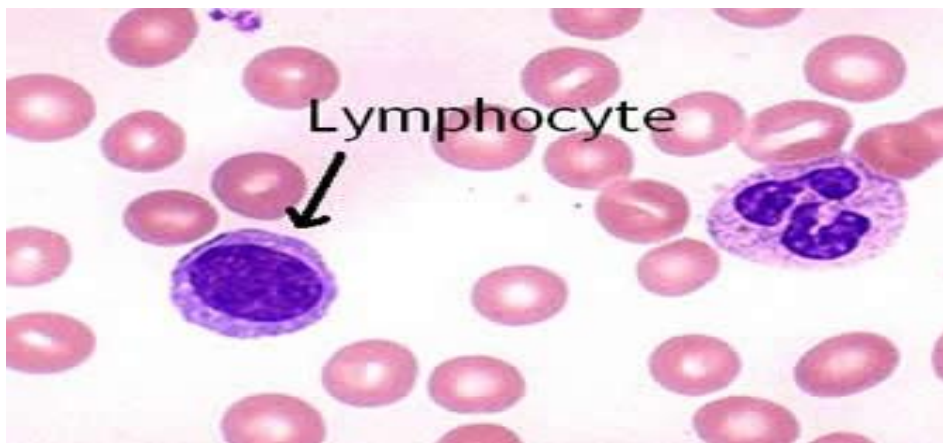


Figure 5 : aspect morphologique d'un lymphocyte

6) Les monocytes :

Ce sont les plus grandes cellules circulantes dans le sang, possèdent un noyau encoché, un cytoplasme gris-bleu et contient des granulations. Sa fonction principale est la phagocytose (les monocytes se transforment en macrophages dans les tissus). (Figure 6).

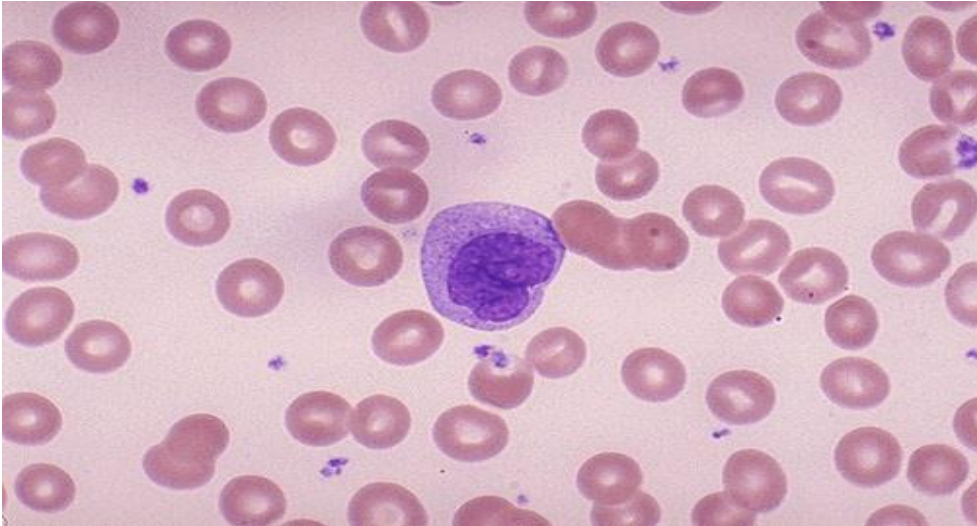


Figure 6 : aspect morphologique d'un monocyte

7) Les plaquettes :

Les plaquettes sont des cellules de 2 à 4 micromètres de diamètre, anucléées et résultent de la fragmentation du cytoplasme de cellules géantes dans la moelle osseuse. (Figure 7).



Figure 7 : aspect morphologique des plaquettes

III. Hémogramme:

1) Définition :

L'hémogramme est un examen qui donne des informations sur les éléments contenus dans le sang tels que les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Il permet de révéler un grand nombre de pathologies : anémie, problème de coagulation, infections virales, consommation des plaquettes...

D'autres paramètres sont mesurés tels que le taux d'hémoglobine, le volume globulaire moyen (VGM) et l'hématocrite (HCT) et d'autres sont calculés (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

2) Les différents paramètres d'un NFS :

2.1 L'hématocrite :

Est le volume occupé par les globules rouges circulants dans le sang exprimé en pourcentage par rapport au volume total du sang.

Cette mesure est indispensable pour calculer le VGM et la CCMH.

2.2 L'hémoglobine :

Est une métalloprotéine contenant du fer. Elle a pour fonction de transporter l'oxygène O₂. Chez l'humain, l'hémoglobine est une protéine hétérotétramérique formée de chaînes peptidiques identiques deux à deux.

2.3 Le volume globulaire moyen :

Le volume globulaire moyen, est un paramètre sanguin rendant compte de la taille des globules rouges, exprimée en μm^3 . Il se calcule après la réalisation d'un hémogramme à partir de l'hématocrite et du nombre d'hématies, selon la formule :

$$\text{VGM (fl)} = \frac{\text{Hématocrite (\%)}}{\text{Nombre d'hématies (million/mm}^3)}$$

2.4 La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine :

La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, aussi parfois appelée teneur globulaire moyenne en hémoglobine, est un paramètre sanguin donnant la masse moyenne

d'hémoglobine contenue dans un globule rouge. Elle est calculée par le rapport entre le taux d'hémoglobine et le nombre d'hématie.

$$\text{TCMH (pg)} = \text{Hémoglobine (g/dl)} / \text{Nombre d'hématies (million/mm}^3\text{)}$$

2.5 La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine :

La CCMH est un paramètre sanguin donnant la concentration massique moyenne d'hémoglobine contenue dans un certain volume de globules rouges.

$$\text{CCMH (\%)} = \text{Hémoglobine (g/dl)} / \text{Hématocrite (\%)}$$

3) Pourquoi prescrire un hémogramme ?

L'hémogramme est un des examens biologiques les plus courants, prescrit dans le cadre d'un bilan sanguin. Il permet d'évaluer l'état de santé général du patient. Il est prescrit lors d'une grossesse, d'un bilan préopératoire et dans le suivi de certains traitements.

Il est également prescrit en cas de suspicion d'anémie ou d'infection, ou pour vérifier l'état nutritionnel et l'exposition à des substances toxiques.

Enfin, un hémogramme peut être demandé si le patient souffre de symptômes liés à une maladie du sang (hématomes, fatigue, douleurs osseuses, pâleur...)

IV. Frottis sanguin:

Un **frottis sanguin** est du **sang** étalé sur une lame de microscope, dans le but d'observer ses cellules et aussi les dénombrer. Le **frottis** doit subir une coloration par le May Grunwald Giemsa (MGG) pour révéler certaines cellules qui sans cela seraient transparentes, donc non visibles. L'étude du frottis est extrêmement utile au diagnostic cytologique de nombreuses maladies hématologiques et parasitaires (anémie microcytaire hypochrome, thrombopénie, leucopénie...).

V. L'hémostase:

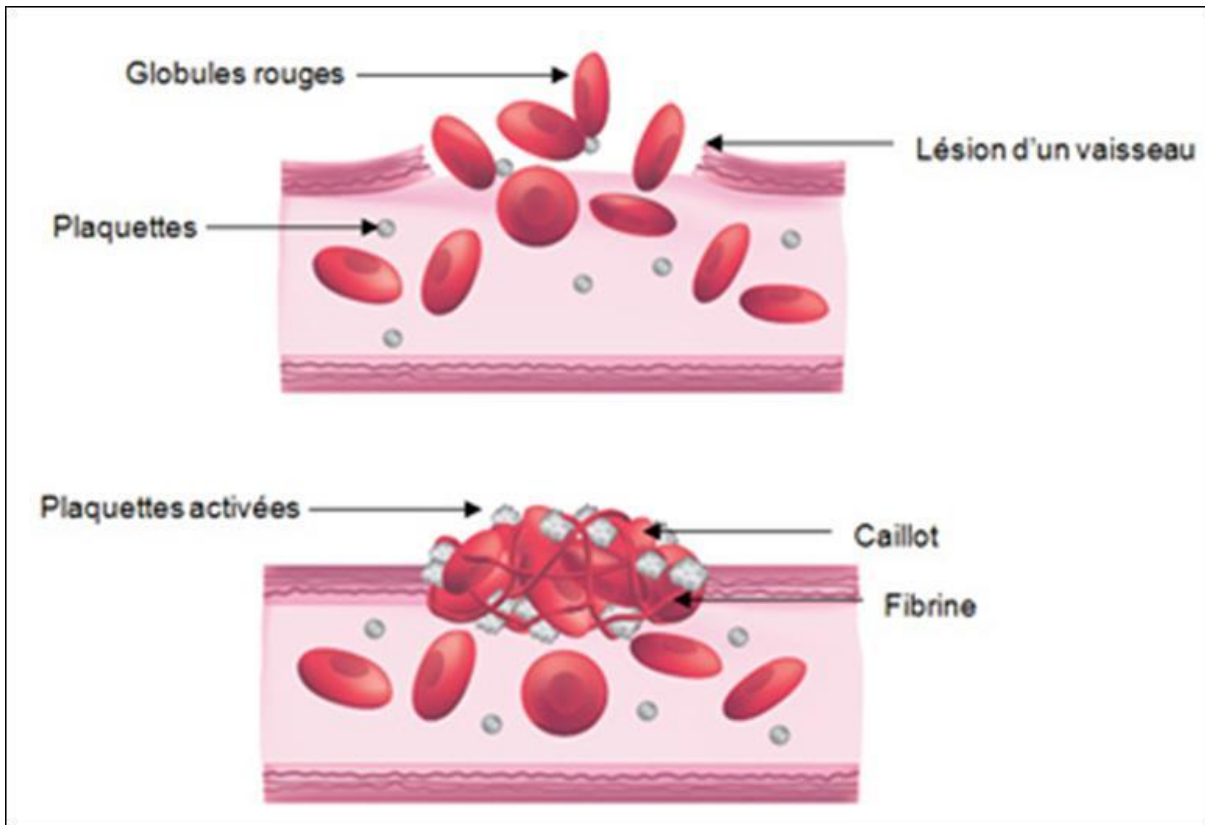


Figure 8 : Mécanismes du maintien du sang dans le système vasculaire

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux. Le processus d'hémostase sert donc à arrêter les hémorragies, empêcher les thromboses et maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins. (Figure 8).

L'hémostase comporte 3 temps qui sont initiés simultanément dès qu'est enclenché le processus d'hémostase. Ces temps sont :

L'hémostase primaire : qui sert à fermer la brèche vasculaire par un « thrombus blanc » : clou plaquettaire. L'agrégation plaquettaire provoque l'adhésion des plaquettes entre elles. L'hémostase primaire comporte 2 temps principaux : la phase vasculaire et la phase plaquettaire.

L'hémostase secondaire ou La coagulation proprement dite : c'est une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la formation de fibrine dont son rôle est de consolider le clou plaquettaire en formant un réseau de fibrine qui crée un caillot.

La fibrinolyse :c'est le troisième temps de l'hémostase. Elle tend à empêcher l'installation mais surtout l'extension du caillot en détruisant les polymères de fibrine. Le plasminogène se transforme en plasmine qui est une enzyme protéolytique très puissante, capable de dégrader le caillot de fibrine.

- Les différents tests d'hémostase sont :

1) Les facteurs de coagulation

Sont faits pour déterminer si un ou plusieurs de ces facteurs est/sont augmenté(s), diminué(s) ou absent(s). Ils sont demandés lorsqu'il y a des saignements inexplicables ou prolongés, une anomalie du taux de prothrombine ou du temps de céphaline active, ou un parent ayant un déficit héréditaire en facteur de la coagulation ou si un médecin veut surveiller la gravité d'un déficit en facteur et/ou l'efficacité du traitement.

2) Le temps céphaline active

C'est un test semi global d'un plasma sanguin recalcifié en présence de céphaline (substitut plaquettaire) et d'un activateur particulier (silice kaolin, acide ellagique...). Il explore la voie intrinsèque de la coagulation (facteur VIII, facteur IX, facteur XI, facteur XII), et dans une moindre mesure le fibrinogène, facteur II, facteur V et facteur X. Il fait partie, avec le taux de prothrombine et la numération des plaquettes, des trois tests principaux de détection d'une anomalie de la coagulation, faits à la demande avant une intervention chirurgicale par exemple. Il sert également pour s'assurer de la bonne efficacité d'un traitement anticoagulant par héparine.

Le résultat est exprimé en secondes ou sous forme d'un Ratio =
$$\frac{\text{TCA (patient)}}{\text{TCA (témoin)}}$$

3) Le taux de prothrombine (TP)

Est un examen de biologie médicale utilisé pour évaluer la coagulation sanguine. Il en explore la voie extrinsèque impliquant les facteurs de coagulation suivants (appelés complexe prothrombinique) : facteur I (fibrinogène), facteur II, facteur V, facteur VII et facteur X.

4) International normalized ratio (INR)

Un des indicateurs de coagulation sanguine permet d'affiner les résultats du TP. Il varie en fonction des machines. Il doit être utilisé, en particulier pour adapter les doses d'anti vitamine K. Compte tenu de la dangerosité du traitement anti vitamine K.

5) Les D-Dimères

Sont des produits de la dégradation de la fibrine (élément final de la coagulation sanguine) lors du processus de fibrinolyse. La présence de D-dimères dans le sang est normale, mais à des taux faibles, et son dosage permet en cas d'augmentation importante de son taux de détecter la présence d'un thrombus.

VI. Groupage sanguin:

Cet examen est prescrit pour déterminer le groupe sanguin d'une personne. Il est systématique dans deux cas :

- transfusion sanguine ou d'un don de sang. En effet, l'injection de produit sanguin d'un donneur non compatible avec le groupe sanguin du receveur peut entraîner des accidents transfusionnels dramatiques.
- Chez les femmes enceintes pour déterminer le risque d'avoir une incompatibilité Rhésus entre la mère et le fœtus. Cette incompatibilité peut survenir chez les femmes enceintes de leur deuxième ou troisième enfant.

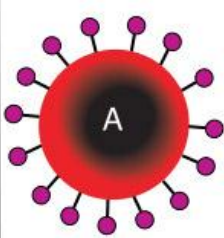
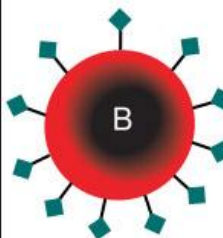
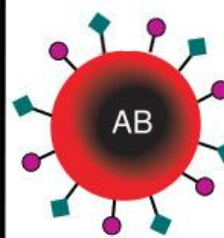
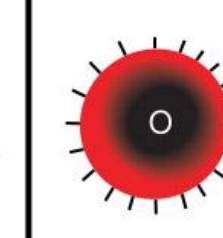
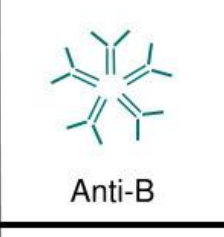
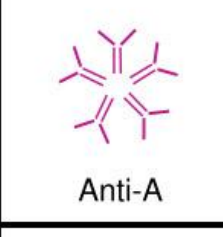
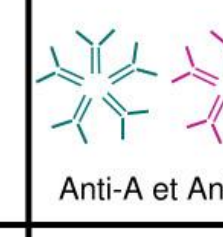



	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	 Antigène A	 Antigène B	 Antigène A et B	Pas d'antigène

Tableau 1: les différents groupes sanguins et leurs antigènes :

Le groupe sanguin d'une personne est défini en fonction de la présence ou l'absence des antigènes A, B à la surface des globules rouges et la présence ou l'absence de l'antigène Rhésus Standard (D). Les antigènes sont des marqueurs situés à la surface des globules rouges.

- ✓ Les personnes ayant des globules rouges avec l'antigène A sont du **groupe sanguin A**.
- ✓ Les personnes ayant des globules rouges avec l'antigène B sont du **groupe sanguin B**.
- ✓ Les personnes ayant des globules rouges avec les antigènes A et B sont du **groupe sanguin AB**.
- ✓ Les personnes qui n'ont aucun de ces antigènes sont du **groupe sanguin O**.

Les personnes ayant l'antigène Rhésus (D), aussi appelé Rh sont du groupe sanguin Rh+ (positif). Celles dont les globules rouges ne portent pas l'antigène Rh sont du groupe Rh – (négatif). (Tableau 1).

VII. La vitesse de sédimentation:

La vitesse de sédimentation ou VS peut être définie comme étant la vitesse avec laquelle chutent les hématies en suspension dans un plasma. Il reste le principal marqueur humoral, le moins coûteux de la réaction inflammatoire qui est exploré actuellement par le profil protéinique de l'inflammation.

Les protéines de l'inflammation qui contribuent à l'accélération de la VS sont le fibrinogène et l'haptoglobine.

VIII. Test de Coombs:

Le **test de Coombs**, maintenant appelés **tests à l'anti globuline** permettent de mettre en évidence la présence d'autres anticorps reconnus spécifiquement par cette anti globuline (IgG à l'origine, et maintenant IgA, IgM, et même fractions du complément).

Il est utilisé pour diagnostiquer et caractériser les anémies hémolytiques à médiation immune. (Figure 9).

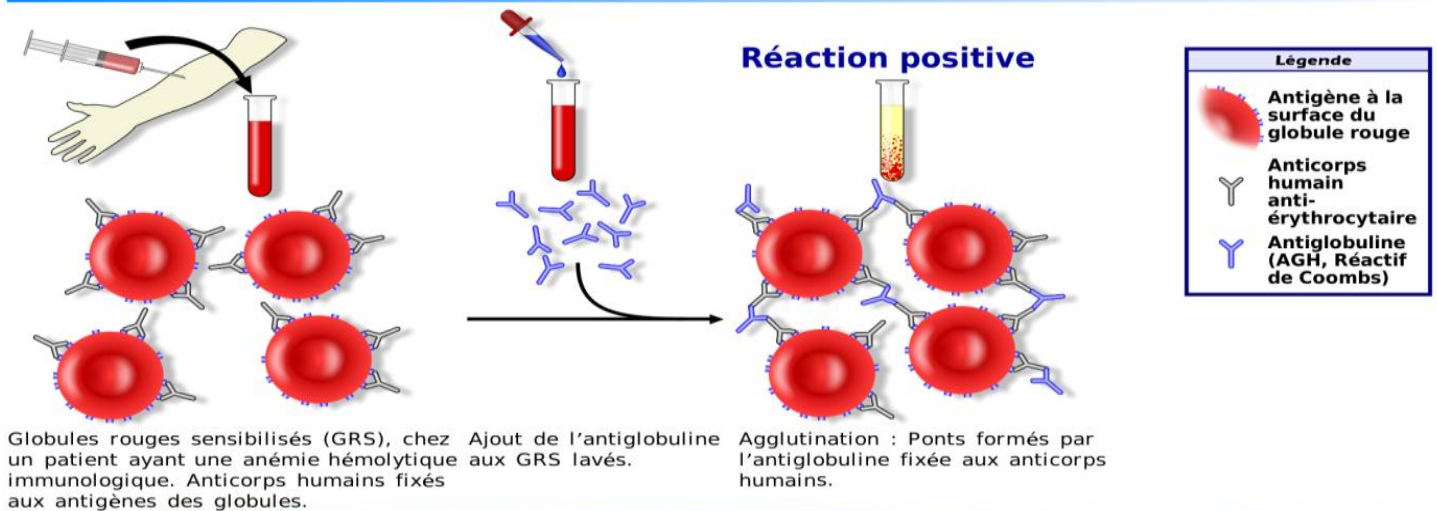
1) Coombs direct :

Le *test de Coombs direct*, ou test direct à l'anti globuline révèle par une agglutination, la présence d'anticorps incomplets liés aux érythrocytes. Il est Direct car les érythrocytes sont directement mis en contact avec l'anti globuline. Test utilisé pour le diagnostic d'une anémie hémolytique immunologique.

2) Coombs indirect :

Le *test de Coombs indirect*, ou test indirect à l'anti globuline révèle des anticorps incomplets circulants du plasma sanguin. Il est indirect, car le premier temps de la réaction consiste à fixer l'anticorps recherché sur des érythrocytes connus, ou à fixer l'anticorps connu sur les érythrocytes dont on veut déterminer un phénotype de groupe sanguin. C'est cette technique qui est utilisée et légalement obligatoire pour la recherche des anticorps irréguliers.

Test de Coombs direct / Test direct à l'antiglobuline



Test de Coombs indirect / Test indirect à l'antiglobuline

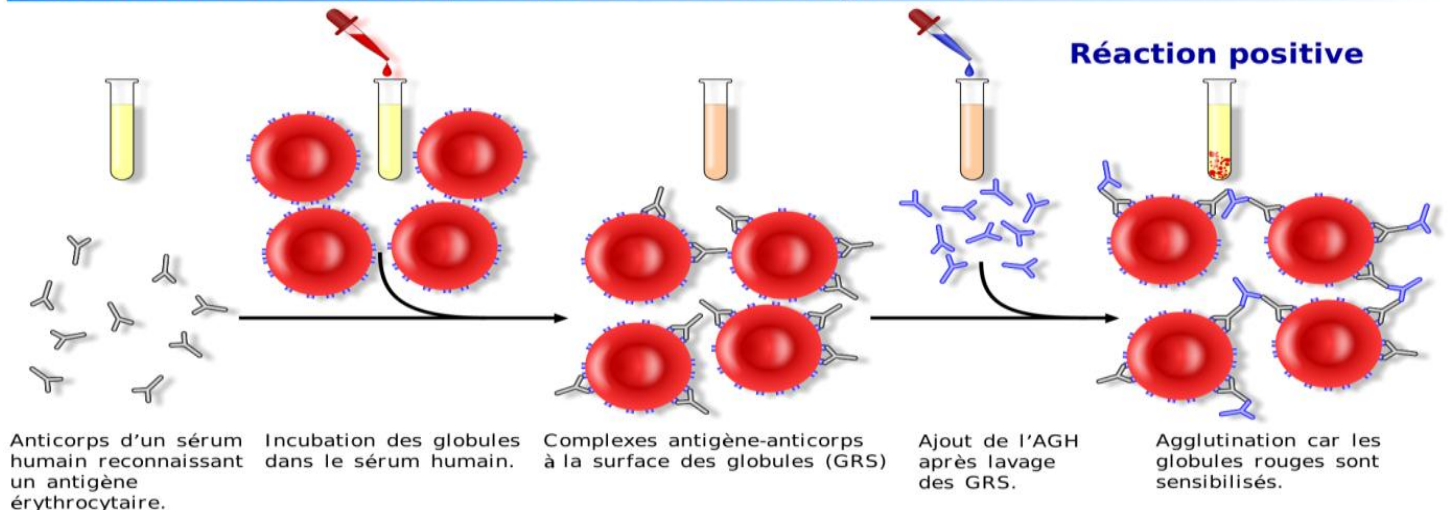


Figure9 : Schéma explicatif du test direct et indirect à l'anti globulin

Matériel et Méthodes

Le stage s'est déroulé pendant deux mois au laboratoire d'Hématologie de CHU Hassan II de Fès. Le but de ce stage est de m'initier aux différentes analyses effectuées au laboratoire.

Le laboratoire d'Hématologie se compose de 3 unités à savoir :

- Unité d'hémostase
- Unité d'hémolyse
- Unité immuno-hématologie

Il faut effectuer une maintenance et un contrôle chaque matin avant de commencer l'analyse des échantillons pour éviter les erreurs grossières.

I. Unité d'hémostase:

Dans cette unité deux analyses sont réalisées, NFS et le frottis sanguin. Les prélèvements sont mis dans des tubes contenant une substance anticoagulante EDTA (éthylène diamine tétra acétique) qui va empêcher le sang de se "gélifier" et permet une meilleure conservation des cellules. (Figure 10).



Figure 10 : Tubes de prélèvement

1) Numération formule sanguine :

Pour effectuer les analyses biologiques, les prélèvements sanguins des patients ainsi que le sang de contrôle sont analysés par deux automates utilisés en hématologie, le Sysmex XT 1800i et le Sysmex XE 5000. La validation technique et éventuellement biologique est réalisée sur frottis sanguins quand il s'agit d'une NFS anormale.

1.1. 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.

1.2. Matériel :

Le Sysmex 1800 i et le Sysmex XE 5000 sont utilisés pour les diagnostics in vitro en laboratoires. Ils réalisent la Numération Formule Sanguine en utilisant un bloc détecteur photosensible dont le fonctionnement repose sur la méthode de cytométrie de flux et l'utilisation d'un laser à semi-conducteur.

La différence entre ces deux appareils est le nombre de tube analysé ainsi que l'utilisation du réactif SNR que par le Sysmex XE-5000. (Figure 11, 12).



Figure 11 : L'appareil XT-1800i



Figure 12: L'appareil XE- 5000

1.3. Les réactifs utilisés :

Pour faire fonctionner ces appareils il faut positionner chaque réactif dans sa place qui convient ainsi qu'il faut vérifier le volume de ces réactifs. (Tableau 2).

Nom du réactif	Rôle
CELLPACK	Diluant sert à nettoyer l'aiguille après l'aspiration d'un échantillon.
STROMATOLYSER-FB	Réactif lytique destiné à l'analyse des leucocytes et des BASO d'un échantillon sanguin.
STROMATOLYSER-4DL	Diluant d'une partie du sang total après l'aspiration.
STROMATOLYSER- 4DS	Colorant qui colore les leucocytes des échantillons de sang lysés et détermine la formule de quatre populations (LYMPH, MONO, EO, NEUT, BASO).
SULFOLYSER	Réactif qui lyse les érythrocytes et agit sur la globine de l'HBG pour former un complexe stable.
RET SEARCH (diluant) RET SEARCH (colorant)	Diluant de l'échantillon et colore en même temps les réticulocytes, pour déterminer la concentration sanguine en réticulocytes effectuée sur l'appareil.
CELLCLEAN	Détergent alcalin puissant qui supprime les réactifs lytiques, les résidus cellulaires et les protéines sanguines restées dans l'automate.

Tableau 2 : les réactifs utilisés par l'automate

1.4. Mode d'analyse :

Après l'arriver des échantillons, il faut vérifier la quantité du sérum ainsi que s'il est non coagulé, puis on met les tubes dans les racks, en suite ces derniers sont lancer dans les automates. Si la quantité est insuffisante il faut lancer ces tubes en mode manuel. En utilisant ce mode, après que les échantillons aient été agités manuellement, les bouchons des tubes sont retirés à la main et l'échantillon est aspiré via l'aiguille d'aspiration de sang total.

1.5. Valeurs physiologiques :

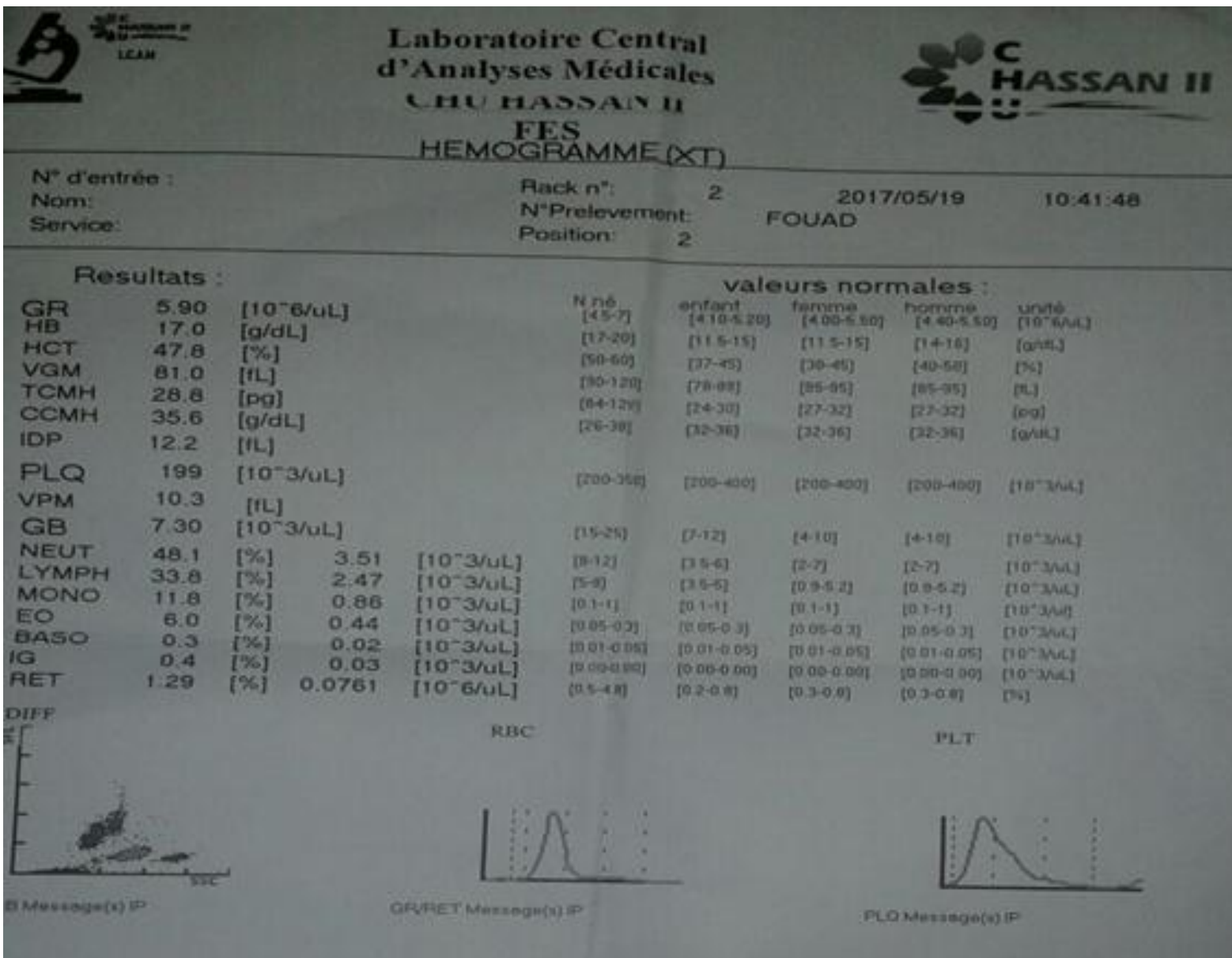


Figure 13: Exemple de résultat d'un NFS

2) Frottis sanguin :

2.1. Les réactifs :

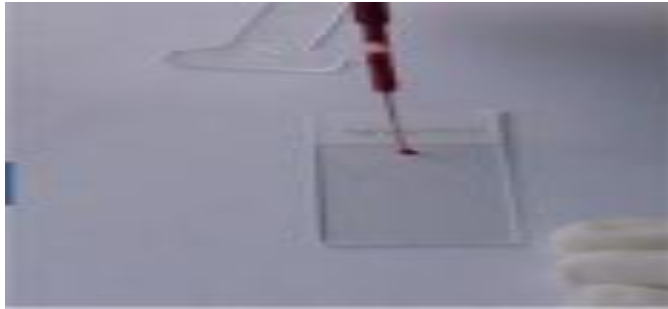
Un certain nombre de réactif doivent être disponible, Pour réaliser un frottis sanguin.

- Colorant de May-Grunwald neutre contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène)

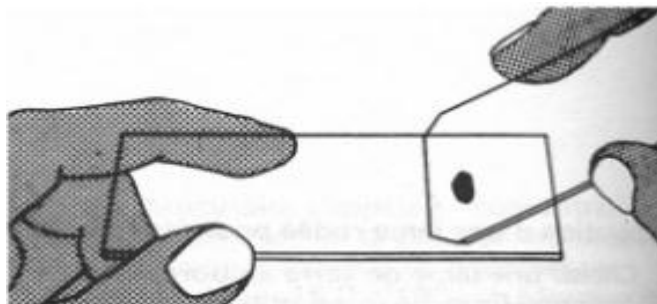
- Colorant de Giemsa neutre dilué au 1/10 (contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène).

2.2. Préparation d'un frottis sanguin :

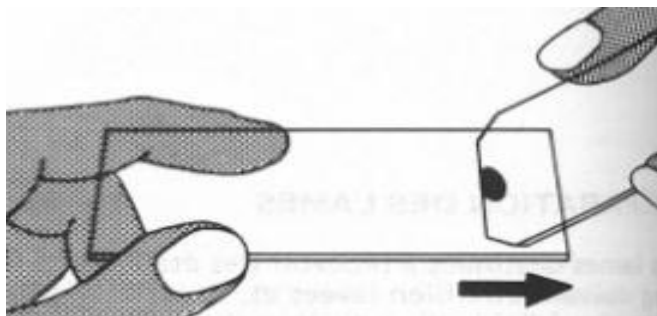
On dépose une petite goutte de sang à un centimètre à l'une des extrémités d'une lame propre posée horizontalement.



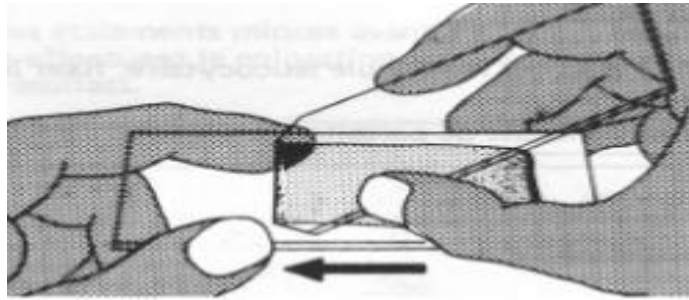
Poser la lame rodée juste en avant de la goutte de sang



Faire glisser la lame rodée jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang



Laisser le sang se répartir tout le long du bord de la lame rodée, puis pousser la lame rodée jusqu'au bout de la lame d'étalement, d'un mouvement doux et régulier (tout le sang doit être réparti avant que l'on atteigne le bout de la lame).



2.3. Contrôle du frottis:

Après la préparation du frottis sanguin, il faut vérifier que l'étalement est bien fait :

- Il ne doit pas présenter de lignes transversales ou horizontales
- Il doit être lisse aux extrémités, et non irrégulier ou strié
- Il ne doit pas être trop long ni trop épais
- Il doit être étalé uniformément

2.4. Coloration du frottis :

La coloration de May-Grunwald Giemsa, est une méthode de coloration utilisée en hématologie pour différencier les cellules du sang lors des préparations cellulaires.

Principe de la coloration :

La coloration permet de réaliser la formule sanguine et médullaire. Le principe de cette coloration repose sur l'action combinée de deux colorants neutres: le May-Grunwald et le Giemsa.

Les étapes de coloration:

On place les Frottis dans un bac, puis on le met dans le bain de May-Grunwald pendant 3 min, en suite on rince avec l'eau pendant une minute, enfin on le met dans le bain de Giemsa pendant 1 min. On laisse les lames sécher à l'aire avant l'observation au microscope.

II. Les différents Techniques en Hémostase

Au laboratoire je suis familiarisée également avec un nombre de techniques réalisées à l'unité Hémostase à savoir ces différents tests.

Le prélèvement est réalisé par ponction veineuse franche chez un sujet à jeun (cette précaution n'est pas toujours nécessaire) sur citrate tri sodique (31,3 g/l) en respectant la proportion d'un volume d'anticoagulant pour 4 volumes de sang (la couleur du bouchon est normalisée en fonction de l'anticoagulant, en l'occurrence, le bleu ciel). On centrifuge le tube à 4000 tours/minutes pendant 4 minutes pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. (Figure 15).

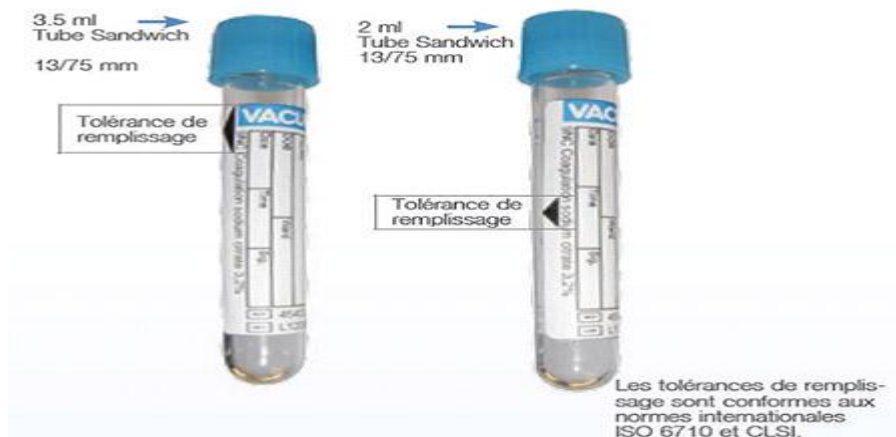


Figure 15 : tubes de prélèvement

1) Principe des tests :

Le principe de mesure est basé, pour les techniques coagulations sur la détection turbidimétrique de la formation du caillot.

2) Matériel :

L'unité d'hémostase dispose de deux automates ACL TOP qui sont des analyseurs automatique. Il réalise les tests explorant la coagulation. (Figure 16, 17).

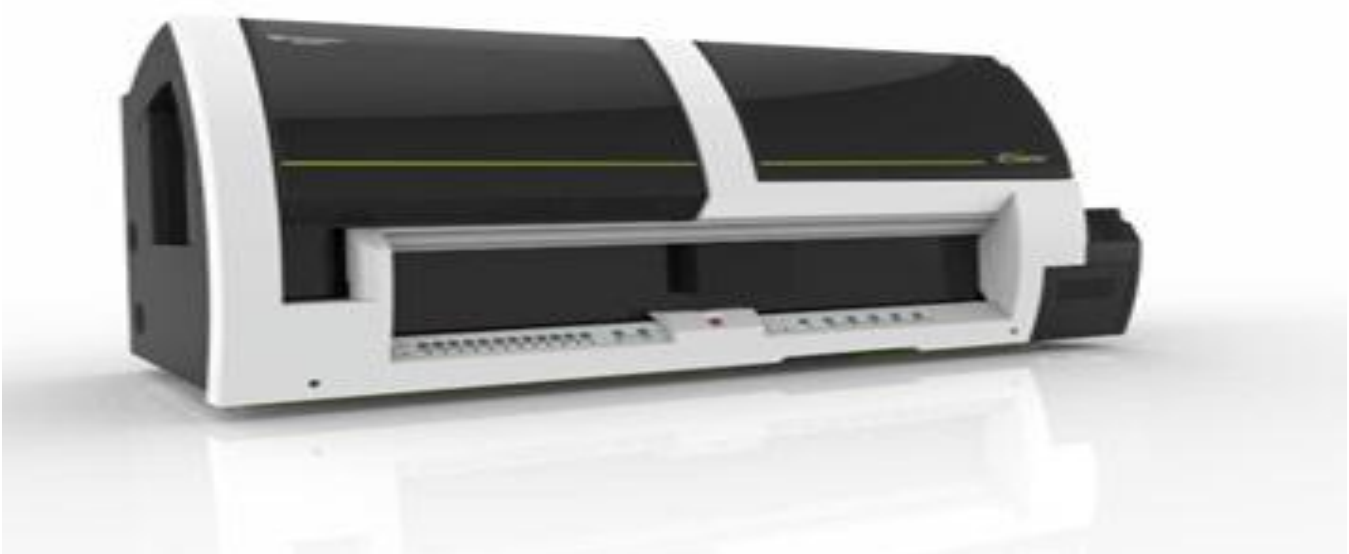


Figure 16 : Appareil ACL TOP



Figure 17 : Appareil ACL TOP 300

La différence entre ces deux appareils est la quantité des tubes analysés.

3) Réactifs :

L'automate ACL TOP utilise plusieurs réactifs spécifiques pour chaque test.

3.1. Temps céphaline active:

Réactifs

Le Réactif céphaline-kaolin, et la Solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 0,025 mol/l sont utilisés pour l'analyse du TCA.

3.2. Taux de prothrombine

Réactifs

Les réactifs utilisés pour ce test sont RecomboPlasTin 2G - 0020002950 (8 ml)Factor Diluent- 0009757600. (Figure 20).



Figure 20 : réactifs du taux de prothrombine

3.3. Facteurs de coagulation:

Réactifs

Pour doser ces facteurs, il faut un réactif pour chaque facteur de coagulation

- Fibrinogène-C - 0020301100
- Factor II déficient plasma - 0020012200
- Factor V Leiden (APC™ Resistance V) - 0020008700
- Factor VII déficient plasma - 0008466250
- Factor IX déficient plasma - 0020011900
- Factor X déficient plasma - 0008466350

3.4. Les D-Dimères

Ils sont réalisés par un seul réactif leD-Dimer HS 500 - 0020500100. (Figure 21).



Figure 21 : Exemple de réactif d D-Dimère

4) Mode d'analyse :

Avant de mettre les tubes dans l'automate, il faut maintenant vérifier si la quantité est suffisante et s'il n'est pas coagulé, en suite il faut centrifuger les tubes pour séparé le plasma du culot sanguin, puis on met les tubes dans les racks dont chaque racks peut contenir 10 tubes enfin on les mettre dans la partie solution de l'automate et on règle l'appareil sur les

III. Technique de Groupage:

1) Principe :

Le groupe sanguin 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.

La détermination de groupe ABO repose sur deux épreuves réalisées :

Epreuve globulaire (Beth-Vincent) : Cette épreuve consiste à mettre en évidence les antigènes du système ABO à la surface des globules rouges du patient à l'aide d'anticorps (antisérum) spécifiques afin de déterminer le groupe ABO du patient.

Epreuve plasmatique (Simonin-Michon) : Cette épreuve consiste à mettre en évidence les anticorps du système ABO contenus dans le plasma du patient à l'aide de globules rouges de groupe ABO connu.

2) Matériel :

Pour la détermination du groupement sanguin, on utilise deux matériel:



Figure 22 : cassette du groupage



Figure 24 : la plaque du groupage sanguin

3) Réactifs :

Les réactifs utilisés sont les anticorps (anti-A, anti- B, anti-AB) et le rhésus D. (Figure 25).



Figure 25 : les réactifs du groupage ABO - Rhésus D

4) Mode d'analyse :

4.1. Sur cassette :

On prend 10 μ l à l'aide d'une pipette, puis on distribue ce volume dans les différents puits de la cassette puis on met ces cassettes dans la centrifugeuse pendant 10 min

4.2. Sur plaque:

On met une goutte de chaque anti (-A-B-AB-D), puis on pose le sérum sur les réactifs et on observe l'agglutination.

IV. Vitesse de sédimentation :

Le prélèvement se fait dans un tube noir contenant le citrate de sodium comme anticoagulant. Permet l'obtention de sang total. (Figure 26).



Figure 26 : tubes de citrate de sodium utilisés pour mesurer vitesse de Sédimentation

1) Principe :

La vitesse de sédimentation chez une personne normale est inférieure à 10 millimètres par heure. Elle peut dépasser 100 mm/h dans certains cas. Elle est régulièrement augmentée dans un syndrome inflammatoire. Elle peut être également élevée en cas d'anémie ou de grossesse.

2) Matériel :

Le seul matériel utilisé est un tube de Westergren. (Figure 27).



Figure 27 : pipette du vitesse de sédimentation

3) Mode d'analyse :

Il faut agiter doucement 5 fois, puis on met les pipettes de VS dans les tubes et on lance le chrono pendant 1heure puis on marque la valeur ensuite on déclenche la deuxième heure.

V. Le test de coombs :

Les prélèvements se font dans des tubes secs de couleur rouge en cas de coombs indirect et dans des tubes mauve contenant EDTA en cas d'un coombs direct. (Figure 28).

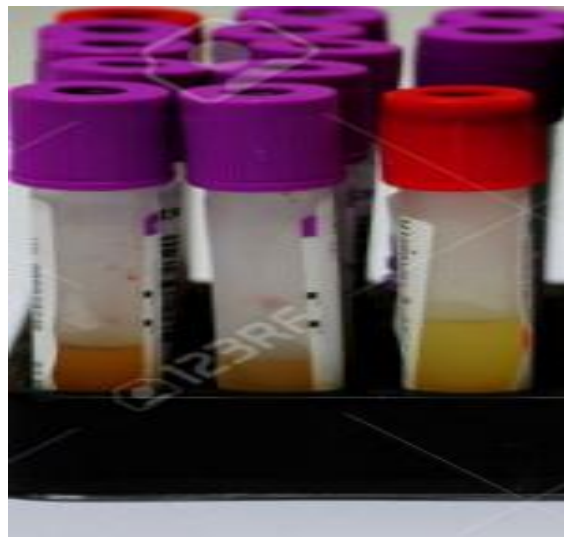


Figure 28 : tubes de prélèvements

1) Principe :

Le test direct à l'anti globuline permet la mise en présence d'un sérum ou d'un plasma inconnu et d'érythrocytes portant des antigènes connus permet la fixation des anticorps recherchés sur ces érythrocytes et de les sensibiliser. Ce test est donc utilisé pour le diagnostic de la maladie hémolytique du nouveau-né, et dans le diagnostic des anémies hémolytiques auto-immunes, ou des incompatibilités transfusionnelles.

-Le test indirect à l'anti globuline qui permet la mise en présence d'un anticorps connu, il s'agit alors d'un sérum test, avec des érythrocytes inconnus permet la mise en évidence de l'antigène correspondant sur ces érythrocytes.

2) Matériel :

Le matériel utilisé est commun pour les deux techniques :

- Les cassettes de test coombs (figure 29)



Figure 29 : les cassettes du test de coombs

3) Réactifs :

Des hématies tests sont utilisées dans le test de Coombs Indirecte. (Figure 30).



Figure 30 : Les hématies test

4) Mode d'analyse

4.1 Coombs Directe:

D'abord il faut centrifuger l'échantillon, puis on prend juste le plasma, on les distribue sur les puits de la cassette et on centrifuge.

4.2. Coombs Indirecte:

Il est constitué de deux phases une de sensibilisation et l'autre de révélation.

Phase de sensibilisation : il faut centrifuger le tube, mettre 50 μ l des hématies test dans les cassettes, puis on prélève 25 μ l du plasma et on les rajoute sur ces derniers .on laisse les cassettes dans l'étuve pendant 15 min.

Phase de révélation : c'est la phase de lecture des résultats, on centrifuge ces cassettes dans la centrifugeuse puis on lit ce qu'on a eu comme résultat.

Conclusion :

Dans le domaine de la santé, les analyses de laboratoire sont d'une extrême importance pour le diagnostic des maladies, la surveillance des patients, le traitement adapté et les pronostics. Selon les études, les résultats de laboratoire contribuent à l'établissement du diagnostic dans les deux tiers des cas. Par ailleurs, certains diagnostics ne peuvent être effectués que sur la base d'un résultat de laboratoire.

Au cours de mon stage de fin d'études, au Laboratoire d'analyses médicales de Centre Hospitalier Hassan II, je me suis familiarisée avec un environnement technique et un ensemble de méthodes d'analyses médicales qui s'est avéré très lucratif pour mon expérience professionnelle. En plus, ce stage m'a permis de voir en quoi consistait le travail d'un biologiste au sein d'un laboratoire d'analyses.

Il m'a permis aussi d'élargir mes connaissances dans le domaine de la biologie médicale depuis le début de mes études.