



جامعة سيدي محمد بن عبد الله - فاس
ⵜⴰⵎⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⴰⵏ ⴰⵎⴰⵏⴰⵏⴰⵏ ⴰⵏ ⴰⵎⴰⵏⴰⵏⴰⵏ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah - Fès



Projet de Fin d'Etudes
Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST-SBAS)

**Description des différents tests réalisés au
Laboratoire d'Hématologie**

Présenté par : EL YAHYAOUI Fatima Zahra

Encadré par : Pr ELABIDA Kaouakib

Dr EL Founini Ahmed

Soutenu le : 04/07/2022

Devant le jury composé de : Pr ELABIDA Kaouakib

Pr SEFRIQUI Samira

Stage effectué au : Laboratoire d'Analyses Médicales EL FOUNINI

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Avant de commencer la présentation de ce rapport, je profite de l'occasion pour remercier chaleureusement toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame ELABIDA Kaouakib, Professeur à la FST de Fès, pour la qualité des renseignements qu'elle m'a offert. Son encouragement permanent et son dynamisme organisateur m'ont énormément facilité la tâche.

Mes remerciements au Docteur EL FOUNINI Ahmed, Directeur du Laboratoire d'Analyses Médicales pour son soutien et son aide.

Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien permanent des membres de ma famille, surtout mes parents qui m'ont toujours encouragée moralement et matériellement.

J'exprime aussi mes sincères remerciements à toute l'équipe du Laboratoire d'Analyses Médicales EL FOUNINI : les Infirmiers, les Techniciens, les Agents de service, pour m'avoir aidée et bien accueillie durant cette période de stage.

Enfin, merci à tous ceux qui ont rendu possible ce travail.

Liste des figures

Figure 1 : Composition du sang	2
Figure 2 : Schéma des globules rouges.....	2
Figure 3 : Aspect d'un monocyte	4
Figure 4 : Aspect d'un lymphocyte.....	4
Figure 5 : Schéma des plaquettes.....	4
Figure 6 : l'appareil SYSMEX XN-1000.....	6
Figure 7 : Interprétation des valeurs de CCMH.....	10
Figure 8 : Aspect des réticulocytes.....	10
Figure 9 : Les différentes cellules d'un frottis sanguin normal.....	11
Figure 10 : Les différentes étapes de réalisation d'un frottis sanguin.....	12
Figure 11 : Schéma explicatif du mode opératoire de VS.....	15
Figure 12 : Mécanismes du maintien du sang dans le système vasculaire.....	17
Figure 13 : Les étapes d'activation de la coagulation.....	18
Figure 14 : L'appareil Star Max.....	18
Figure 15 : Conditions de transfusion sanguine.....	25
Figure 16 : Les réactifs du groupage ABO-Rhésus.....	26
Figure 17 : Réalisation pratique du groupage sur plaque d'opaline.....	26
Figure 18 : Carte Scan-Gel Monoclonal ABO/RH.....	27

Liste des tableaux

Tableau 1 : Le personnel du laboratoire	
Tableau 2 : Aspect et caractéristiques des granulocytes.....	3
Tableau 3 : Réactifs utilisés par l'appareil SYSMEX XN-1000.....	7
Tableau 4 : Variations physiopathologiques de la vitesse de sédimentation.....	16
Tableau 5 : Variations physiopathologiques du taux de prothrombine.....	20
Tableau 6 : Les types d'antigènes et anticorps du système ABO.....	23
Tableau 7 : Epreuve de Beth-Vincent et de Simonin.....	24
Tableau 8 : Détermination du rhésus par la technique de Beth-Vincent.....	25

Liste des abréviations

GR : Globule Rouge.

GB : Globule Blanc.

PL : Plaquette.

NFS : Numération Formule Sanguine.

Hte : Hématocrite.

Hb : Hémoglobine.

HBG : Taux d'Hémoglobine.

VGM : Volume Globulaire Moyen.

HCT : Taux d'Hématocrite.

TCMH: Teneur Globulaire Moyenne en Hémoglobine.

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique.

fl: femto litre.

pg: picto gramme.

MGG: May-Grünwald Giemsa.

VS: Vitesse de Sédimentation.

TP: Temps de Prothrombine.

TQ: Temps de Quick.

AVK : Anti Vitamine K.

TCA : Temps de Céphaline Active.

TCK : Temps de Céphaline Kaolin.

INR : International Normalized Ratio.

ISI : Index de Sensibilité International.

Système ABO : Système de base des groupes sanguins.

Rh : Rhésus.

CQI : Contrôle de Qualité Interne.

CQE : Contrôle de Qualité Externe.

Sommaire

Présentation du laboratoire.

Introduction.....

A : Cellules circulantes.....

I. Composition du sang.....

1. Les globules rouges : Erythrocytes..... **1**
2. Les globules blancs : leucocytes..... **2**
 - a. Les granulocytes..... **2**
 - b. Monocyte..... **2**
 - c. Lymphocyte..... **3**
3. Plaquettes : Thrombocytes..... **3**

B : Examen hématologique..... **4**

I. Hémogramme..... **4**

1. Définitions..... **4**
2. Intérêt de la NFS..... **5**
3. Prélèvement sanguin..... **5**
4. Comptage : Appareil SYSMEX XN-1000..... **5**
 - a. Réactifs utilisés..... **5**
5. Etude des différents paramètres de l'hémogramme..... **6**
 - a. Numération globulaire..... **6**
 - b. Le taux d'hémoglobine..... **7**
 - c. L'hématocrite..... **7**
 - d. Les constantes érythrocytaires..... **7**
 - i. Volume globulaire moyen : VGM..... **8**
 - ii. Teneur corpusculaire (ou globulaire) moyenne en hémoglobine: TCMH (ou TGMH)..... **8**
 - iii. Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine : CCMH.... **9**
 - e. La numération des réticulocytes..... **9**
6. Frottis sanguin..... **9**
 - a. Principe..... **9**
 - b. Intérêts..... **10**

c. Prélèvement sanguin.....	11
d. Critères d'un bon frottis.....	11
e. Techniques.....	12
7. Coloration de May Grunewald Giemsa.....	12
a. Principe.....	12
b. Composition des colorants.....	12
c. Technique.....	13
d. Résultats.....	13
II. Vitesse de sédimentation.....	13
1. Principe.....	13
2. Prélèvement sanguin.....	14
3. Réalisation de la VS.....	14
a. Méthode.....	14
b. Interprétation.....	14
c. Variations physiopathologiques.....	15
C : Hémostase.....	15
I. Définitions.....	15
II. Prélèvement sanguin.....	16
III. Appareillage.....	17
IV. Les différents tests d'hémostase.....	17
1. Taux de prothrombine(TP) ou temps de Quick(TQ).....	18
a. Réactifs utilisés.....	18
b. Mode opératoire.....	19
c. Valeurs usuelles.....	19
d. Valeurs physiopathologiques.....	19
2. Le temps de céphaline activée : TCA.....	19
a. Réactifs utilisés.....	20
b. Mode opératoire.....	20
c. Valeurs usuelles.....	20
d. Valeurs physiopathologiques.....	20
3. Fibrinogènes.....	21
a. Réactifs utilisés.....	21
b. Mode opératoire.....	21

c. Valeurs usuelles.....	21
d. Valeurs physiopathologiques.....	21
D : Immuno-hématologie.....	21
I. Les systèmes du groupe sanguin.....	22
1. Le système ABO.....	22
a. Détermination du groupe ABO.....	23
i. Principe.....	23
ii. Epreuve globulaire : Epreuve de Beth Vincent.....	23
iii. Epreuve plasmatique : Epreuve de Simonin.....	24
2. Le système Rhésus.....	24
II. Transfusion sanguine.....	24
III. Réalisation pratique du groupage.....	24
1. Sur plaque.....	25
2. Sur cassette.....	25
a. Mode opératoire.....	26
b. Résultats et interprétations.....	26
Conclusion.....	27
Références Bibliographiques et Webographiques.....	27
	27
	28

Présentation du laboratoire

Le laboratoire d'Analyses Médicales EL FOUNINI est construit en 1982 à Meknès par Ahmed EL FOUNINI, Biologiste Médical.

Le laboratoire se compose de :

- Salle de réception.
- 2 salles de prélèvements.
- Salle d'Hématologie.
- Salle de Bactériologie.
- Salle de Biochimie.
- Salle de Sérologie/Immunologie.

Tableau 1 : Le personnel du laboratoire

Personnel	Nombre
Biologiste Médicale	1
Techniciens	6
Infirmiers	2
Agent d'entretien	3
Total	12

1. Processus des analyses médicales :

a. Phase pré analytique :

Comprend les étapes suivantes :

- Accueil des patients.
- Enregistrement des patients avec ordonnance ou sans ordonnance.
- Prélèvement d'un échantillon biologique (sang, urines, selles...).

-Préparation, transport et conservation de l'échantillon biologique jusqu'à l'endroit où il est analysé.

b. Phase analytique :

C'est l'ensemble des processus techniques permettant l'obtention du résultat d'analyse biologique :

- Préparation des échantillons = Cette étape est déjà commencée dans la phase pré analytique après le prélèvement.
- Répartition des échantillons dans les différents départements : Biochimie, Hématologie, Bactériologie ou Sérologie.
- Réalisation des analyses médicales : C'est la partie technique, le cœur du processus analytique. C'est une étape primordiale dans la qualité du rendu de l'analyse médicale. Elle témoigne de la qualité et du sérieux du laboratoire.

Le responsable de qualité supervise : - Le contrôle de qualité interne (CQI).

- Le contrôle de qualité externe (CQE).

c. Phase post-analytique :

Comprend les étapes suivantes :

- Validation biologique.
- Rendu des résultats.
- Avec éventuellement le conseil du biologiste médical au patient.

Introduction

L'Hématologie c'est la science qui étudie les maladies du sang, et par extension, les maladies de la moelle osseuse et des organes hématopoïétiques secondaires.

Le sang est composé de cellules circulantes qui permettent l'oxygénation de l'organisme (érythrocytes), la défense de l'organisme (leucocytes), et la prévention de l'intégrité des vaisseaux (plaquettes).

Le remplacement continu et régulé des différentes cellules sanguines est assuré par un ensemble de mécanismes appelé: Hématopoïèse.

Les testes les plus utilisées pour le diagnostic et l'étude des problèmes hématologique sont :

- L'hémogramme.
- La vitesse de sédimentation.
- Le test de groupage sanguin.

Les explorations de coagulations :

- Le temps de céphaline activée (TCA).
- Le temps de Prothrombine (TP) ou temps de Quick (TQ).
- Le Fibrinogène.

Le stage au Laboratoire d'Analyses Médicales EL FOUNINI, a pour but de comprendre les différentes méthodes réalisées au laboratoire d'hématologie et des pathologies associées tels que les anémies, les cancers et les problèmes de coagulation, de savoir l'intérêt clinique des paramètres dosés, ainsi que de maîtriser les équipements nécessaires.

A : Cellules circulantes

I. Composition du sang :

Le sang est un tissu liquide comportant une substance fondamentale : le plasma, et des cellules : les éléments figurés du sang (globules rouges (GR) globules blancs (GB) et plaquettes (Pl)) [Figure1].

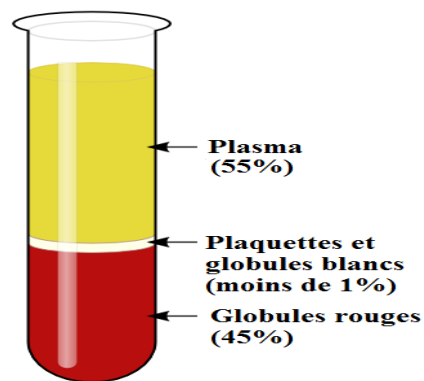


Figure1 : composition du sang [1]

1. Les globules rouges : Erythrocytes

Ce sont des cellules anucléées, biconcaves, de 7 à 8 μ m de diamètre, très déformables, avec une durée de vie de 110 à 120 jours.

Ils permettent le transport de l'oxygène, des ions H⁺ et de 10% de CO₂ par l'intermédiaire de l'hémoglobine [13] [Figure2].



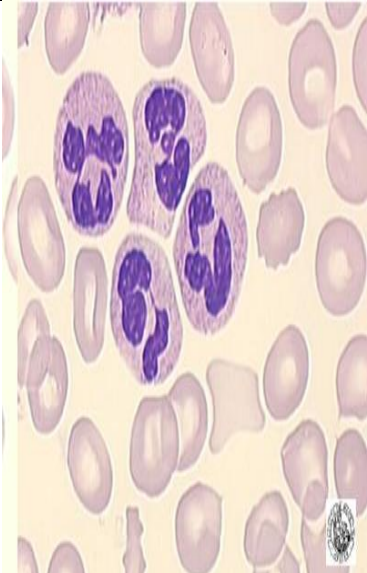
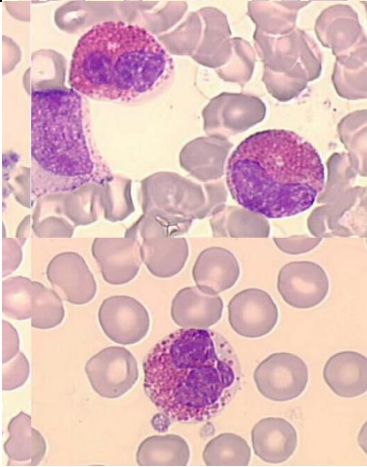
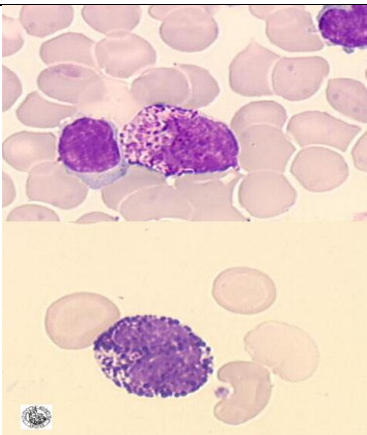
Figure2 : Globules rouges [2]

2. Les globules blancs : Leucocytes

a. Les granulocytes :

Le terme « granulocytes » fait allusion à l'aspect lobé du noyau. Il comprend les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles [13] [Tableau2].

Tableau 2: Aspect et caractéristiques des granulocytes

Cellules	Description	Rôles
Neutrophiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellule au noyau polylobé (2 à 5 lobes), de 12 à 15 µm de diamètre. • Le cytoplasme contient des nombreuses granulations, donnant la coloration neutrophile. • Durée de vie : 24h 	<ul style="list-style-type: none"> • Le rôle principal des neutrophiles est de détruire des cibles.
Eosinophiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellule à noyau bilobé, caractérisée par un cytoplasme contenant des graines orangées. • Demi-vie : 4 à 5h en circulation, 8 à 12jours dans les tissus 	<ul style="list-style-type: none"> • Détruit ses cibles par phagocytose ou libération de toxiques dans le milieu extracellulaire. • Participation active dans l'inflammation et les réactions d'hypersensibilité • Présentation des antigènes.
Basophiles 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellule au noyau peu ou pas segmenté, caractérisée par de volumineuses granulations métachromatiques. • Durée de vie : 3 à 4 jours. 	<ul style="list-style-type: none"> • Recrutement. • Activation. • Hypersensibilité.

b. Monocyte:

IL s'agit de la plus grande cellule circulante avec un diamètre de 15 μm . C'est une cellule au noyau irrégulier, avec un cytoplasme gris-bleu. Les granulations ne sont pas visibles [13] [Figure3].



Figure 3 : Aspect d'un monocyte [3]

c. Lymphocyte:

C'est une cellule au noyau régulier, occupant la majorité du volume cellulaire, avec un cytoplasme mince. Elle joue un rôle dans l'immunité humorale [13] [Figure4].

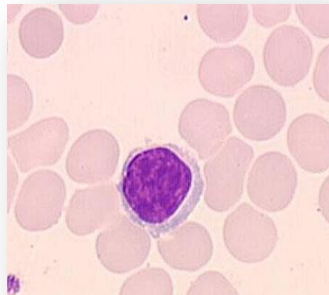


Figure 4 : Aspect d'un lymphocyte [3]

3. Plaquettes : Thrombocytes

Les plaquettes sont les plus petits éléments circulants du sang, elles se présentent comme un disque aplati. Elles maintiennent l'intégrité des vaisseaux et permettent la libération des produits vasoconstricteurs [13] [Figure5].



Figure 5 : Schéma des plaquettes [4]

B : Examen Hématologique

I. Hémogramme :

1. Définitions :

La Numération Formule Sanguine (NFS) ou hémogramme est un examen essentiel qui apporte des renseignements sur les cellules sanguines, sur les processus de défense immunitaire, sur l'hémostase et qui révèle des modifications évocatrices d'un grand nombre de maladies.

La NFS comprend :

- La numération des différents éléments figurés du sang: les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes (calcul le nombre absolu de différentes cellules dans un volume de sang).
- Le dosage des différents paramètres utiles au diagnostic de pathologies liés au sang tel que: le taux d'hémoglobine (HBG), le volume globulaire moyen (VGM), le taux d'hématocrite (HCT), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TCMH).
- La formule leucocytaire détermine le pourcentage relatif et le nombre absolu des différentes sous-populations de globules blancs: polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, polynucléaires basophiles, lymphocytes, et monocytes.

2. Intérêt de la NFS :

Cet examen permet de déceler la présence de différentes pathologies ou troubles, comme :

- une anémie ;
- une infection ;
- une inflammation ;
- un mauvais fonctionnement de la moelle osseuse, qui assure la production des cellules sanguines... [13]

3. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement de sang veineux est recueilli sur un anticoagulant ; EDTA ; adapté permettant la meilleure conservation des cellules.

Le prélèvement peut être conservé quelques heures (<2h) à température ambiante pour la technique de numération. Par contre, les étalements sur lame doivent être faits le plus rapidement possible après le prélèvement.

Pour les nourrissons ou les petits enfants le prélèvement de sang capillaire se fait en général au bout du doigt, ou au talon.

4. Comptage : Appareil SYSMEX-XN 1000:

La numération consiste à compter les cellules du sang grâce à un automate (SYSMEX XN 1000) [Figure6].



Figure 6: L'appareil SYSMEX XN-1000

Cet automate est constitué de 2 électrodes de platine entre lesquelles on fait passer un courant électrique: c'est la méthode Coulter A chaque passage de cellule, une différence de potentiel se crée. Chaque variation est comptée et le nombre de variations correspond au nombre de cellules. De plus, l'intensité de la variation est proportionnelle à la taille de la cellule, c'est-à-dire plus la variation est importante plus la cellule est grosse. La formule est établie grâce à une différenciation chimique qui entre autre séparera les constituants basophile et acidophile.

a. Réactifs utilisés :

Les réactifs utilisés par l'appareil SYSMEX XN-1000 sont [Tableau 3] :

Tableau 3 : Réactifs utilisés par l'appareil SYSMEX XN-1000

Réactif	Rôle
CELLPACK DCL	Diluant qui sert à nettoyer l'aiguille après l'aspiration d'un échantillon.
CELLCLEAN cl 50	Détergeant alcalin puissant destiné à supprimer les réactifs lytiques des résidus cellulaires, et des protéines sanguines restées dans les systèmes de conduits des analyseurs d'hématologie SYSMEX
LYSERCELL WDF	Réactif lysogène.
FLUROCELL WDF	Colore les leucocytes des échantillons lysés, et permet la détermination de la formule leucocytaire.
SLS SULFYSER	Réactif sans cyanure destiné à la détermination de l'hémoglobine, il lyse les érythrocytes et agit sur la globine pour former un complexe coloré stable.

5. Etude des différents paramètres de l'hémogramme :

L'hémogramme est un examen complet du sang qui permet à la fois d'estimer l'état de santé général et de diagnostiquer divers troubles comme l'anémie par l'étude de la formule globulaire, le taux d'hémoglobine, l'hématocrite et les constantes érythrocytaires.

a. Numération globulaire :

- **GR :** Homme : $4,5 \text{ à } 5.7.10^6/\text{mm}^3$.

Femme : 4 à $5,5 \cdot 10^6/\text{mm}^3$.

Nouveau né : 4 à $5,7 \cdot 10^6/\text{mm}^3$.

- Valeur variable en fonction de l'âge et du sexe.
- **GB** :
 - Neutrophiles : 1700 à 7000/mm³.
 - Eosinophiles : 50 à 500/mm³.
 - Basophiles : 10 à 100/mm³.
 - Lymphocytes : 1400 à 4000/mm³.
 - Monocytes : 100 à 1000/mm³.
- **PL** : 150000 à 400000/mm³.

b. Le taux d'hémoglobine :

C'est la quantité d'hémoglobine contenue dans un volume de sang circulant.

- Exprimé en g/l ou plus souvent en g/dl.
- Variable en fonction de l'âge et du sexe.
 - Homme : 13 à 17 g/dl.
 - Femme : 12 à 16 g/dl.
 - Nouveau né : 14 à 20 g/dl.

c. L'Hématocrite :

C'est le volume du sang circulant occupé par les GR, exprimé en %. Il s'obtient facilement par centrifugation, et correspond au rapport du précipitât sur le volume total. Il est variable en fonction de l'âge et du sexe.

Homme : 40 et 55 %.

Femme : 35 et 50 %.

c. Les constantes érythrocytaires :

Elles sont indispensables pour diagnostiquer les pathologies de la lignée érythrocytaire, entre autre les anémies.

Constantes érythrocytaires en fonction des unités le plus souvent exprimées :

- ▶ Hte = Hématocrite en %.

- ▶ Hb = Hémoglobine en g/100ml.
- ▶ Nombre d'hématies = Globules rouges ou Hématies en Téra/Litre.

i. Volume globulaire moyen : VGM

C'est le volume moyen occupé par une hématie exprimé en femto litre (fl) ou en μm^3 .

Il est variable en fonction de l'âge.

$$\text{VGM (fl)} = \frac{\text{Hématocrite (\%)}}{\text{Nombre d'hématies (10}^{12}\text{/l)}}$$

Chez l'adulte le VGM normale varie entre 80 à 98 μm^3 .

- VGM : 80 à 98 μm^3 : Normocytose.
- VGM < 80 μm^3 : Microcytose.
- VGM > 98 μm^3 : Macrocytose.

ii. Teneur corpusculaire (ou globulaire) moyenne en hémoglobine – TCMH (ou TGMH)

C'est la quantité moyenne d'hémoglobine par hématie, exprimée en pictogrammes (pg) :

$$\text{TCMH} = \frac{\text{Hb (g/dl)} \times 10}{\text{nombre d'hématies (10}^{12}\text{/l)}}$$

- Chez l'adulte le TCMH normale varie entre 27 et 32 pg.
 - TCMH : 27 à 32 pg : Normochromie.
 - TCMH < 27pg : Hypochromie.
 - TCMH > 32pg : Lié à la macrocytose.

iii. Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

C'est le pourcentage de saturation des hématies en hémoglobine exprimé en % :

$$\text{CCMH (\%)} = \frac{\text{Hb (g/dl)} \times 100}{\text{Hte (\%)}}$$

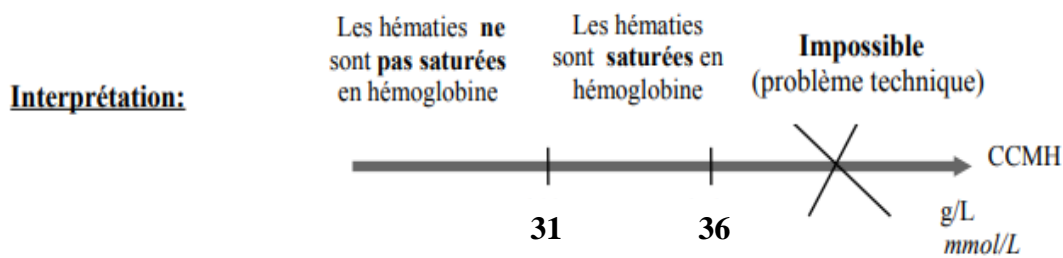


Figure 7: Interprétation des valeurs de CCMH [5]

- Chez l'adulte le CCMH normale varie entre 31 et 36 g/dl.

e. La numération des réticulocytes :

Les réticulocytes appartiennent à la lignée érythrocytaire. Ce sont les hématies jeunes, déformables et de forme plus ou moins sphérique, anucléés, mobiles, et possèdent encore des organites cellulaires (mitochondries et ribosomes, RER) et de la protoporphyrine leur permettant d'achever la synthèse d'hémoglobine [13] [Figure8].

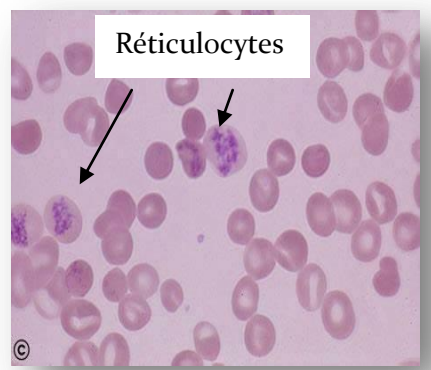


Figure 8 : Aspect des réticulocytes [6]

- Le taux de réticulocytes n'est pas compris dans la formule et doit être spécifié dans la prescription.
- Est essentiel pour interpréter une anémie.
- Est exprimé en % du nombre de GR et doit être converti en chiffre absolu.
- **Les résultats normaux sont compris entre 0,5 et 2%, ramenés au nombre absolu 20000 à 120000/mm³.**
- C'est une numération indirecte :

- Sur frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant, on dénombre réticulocytes et hématies et on calcul le pourcentage de réticulocytes par rapport aux hématies.

- Connaissant le nombre d'hématies par litre de sang, on déduit le nombre de réticulocytes par litre de sang. Ceci pour la technique manuelle. Les automates donnent le nombre de réticulocytes automatiquement et sont plus précis.

Nombre d'hématies totales= nombre d'hématies matures + nombre de réticulocytes.

- Le nombre de réticulocytes dans 1L de sang est un excellent témoin de l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse. Il permet ainsi de distinguer les anémies régénératives (origine périphérique) des anémies arégénératives (origine centrale).

Important :

Toute anomalie révélée par les calculs doit être confirmée par l'observation des hématies sur frottis colorée.

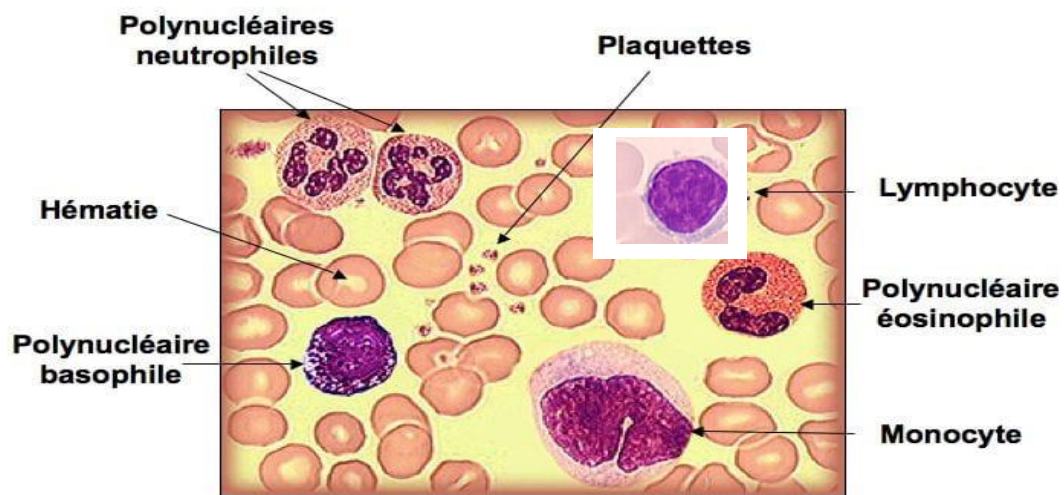


Figure 9 : Les différentes cellules d'un frottis sanguin normal [7]

6. Frottis sanguin :

a. Principe :

Le frottis sanguin consiste en la réalisation d'un étalement monocellulaire des cellules sanguines sur une lame de verre à partir d'une goutte de sang. Les cellules ainsi déposées sur

la lame sont fixées, colorées (méthode de May-Grünewald Giemsa-MGG) puis observées au microscope optique.

b. Intérêts :

L'observation d'un tel frottis au microscope photonique permet de : [13]

- Confirmer la formule automatique.
- Trouver des anomalies érythrocytaire (forme, taille, homogénéité...)
- Montrer d'éventuelles cellules médullaires circulantes.
- Détecter les cellules anormales.
- Voir d'éventuels agrégats plaquettaires.

c. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement sanguin est recueilli sur anticoagulant (EDTA) depuis moins de 3 heures.

d. Critères d'un bon frottis :

Un bon frottis est caractérisé par une bonne taille (1/2 ou 3/4 de la lame), une bonne densité et si possible se termine par une extrémité arrondie [13].

e. Techniques :

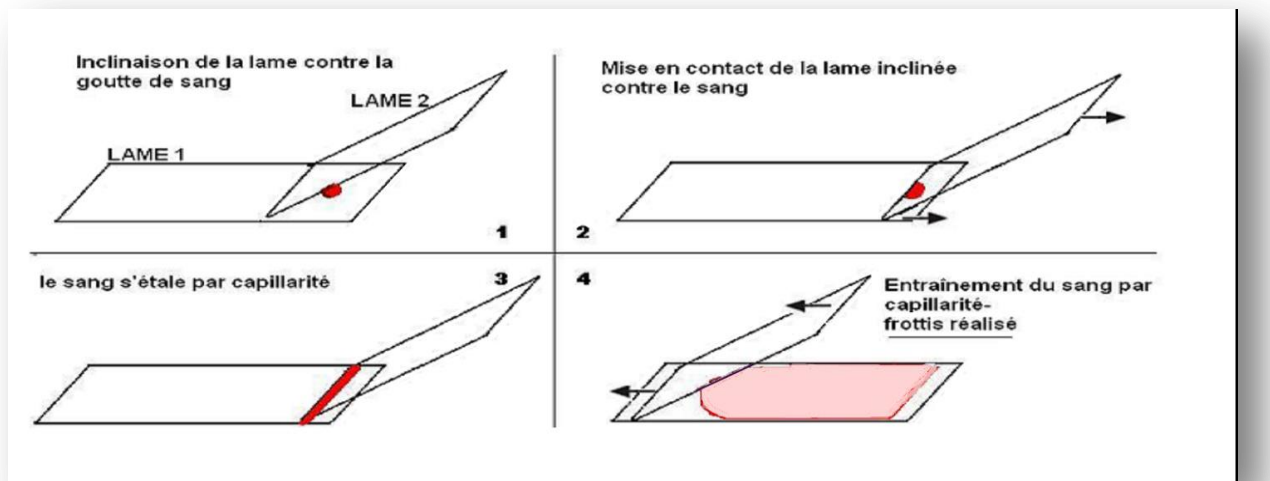


Figure 10 : Les différentes étapes de réalisation d'un frottis sanguin [8]

1. Nettoyer 2 lames à l'alcool (faces et tranches), les sécher avec du papier absorbant, les déposer sur papier absorbant.
2. Prélever, une goutte de sang à l'aide du compte-goutte.
3. Déposer la goutte de sang à l'extrémité d'une lame (figure 1).

4. Appliquer une autre lame inclinée à 45° en avant de la goutte de sang de façon à ce que le sang s'étale sous la lame par capillarité. (figure 2 et 3).
5. Faire glisser la lame inclinée à 45° pour étaler uniformément la goutte. (figure 4).
6. Sécher le frottis avec le sèche-cheveux.
7. Repérer au marqueur, avec une lettre F, la face où se trouve le sang.

7. Coloration de May-Grunwald Giemsa

a. Principe:

Il repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres (colorant de May-Grunwald et colorant de Giemsa) et sur l'affinité des éléments cellulaires pour les colorants acides (éléments acidophiles) et pour les colorants basiques (éléments basophiles).

b. Composition des colorants :

Colorant de May-Grunwald : éosinate de bleu de méthylène en solution dans du méthanol.

- Colorant acide : éosine.
- Colorant basique : bleu de méthylène.

Colorant de Giemsa : éosinate d'azur de méthylène en solution dans du méthanol

- Colorant acide : éosine.
- Colorant basique : azurs de méthylène.

c. Technique :

1. Placer la lame sur un support horizontal.
2. Mettre le colorant May-Grunwald de façon à couvrir la lame : Laisser 30 secondes à 1min ; c'est l'étape de Fixation.
3. Ajouter l'eau tamponnée puis laisser agir 1 min.
4. Débarrasser le colorant.
5. Préparation de la dilution Giemsa.
6. Couvrir la lame par le Giemsa préparé.
7. Laisser agir 20 min.
8. Rincer la lame avec l'eau, laisser sécher.
9. Essuyer la face inférieure (opposée au frottis) avec du papier filtre.
10. Laisser sécher la lame à l'air en position inclinée.
11. Attendre au moins 5 min avant l'observation microscopique du frottis.

d. Résultats :

Le frottis est observé à l'objectif x 100 à l'immersion.

La préparation est réussie si les cellules sont séparées, ne comporte ni dépôts de précipité et [5] :

- Les noyaux sont colorés en rouge-violet.
- Les cytoplasmes acidophiles sont rose-orangés.
- Les cytoplasmes basophiles sont bleus.
- Les cytoplasmes polychromatophiles sont gris-bleuté.
- Les granulations neutrophiles sont violet lilas.
- Les granulations éosinophiles sont orangées, les granulations basophiles sont violet foncé.
- Les granulations azurophiles sont rouges.

II. Vitesse de sédimentation : VS

1. Principe :

La vitesse de sédimentation est la vitesse à laquelle sédimentent les hématies d'un sang, recueilli sur citrate, à raison d'un volume de citrate pour 4 volumes de sang et déposé dans des tubes calibrés et verticaux, maintenus à température ambiante (20 à 27°C) : **Tube de Westergren**.

On mesure la hauteur de plasma surnageant 1 h après le dépôt, grâce aux graduations du tube. Le résultat s'exprime en mm de plasma surnageant après 1h de sédimentation.

La VS dépend du nombre des GR, la viscosité du plasma liée en particulier à l'augmentation du taux des protéines de l'inflammation tels que le fibrinogène, l'haptoglobine ou les immunoglobulines.

2. Prélèvement sanguin :

Le sang est prélevé est placé dans un tube citraté, à bouchon noir.

Le citrate est une solution anticoagulante liquide servant à diluer le sang.

Une homogénéisation par retournements est demandée afin d'éviter la formation du caillot.

3. Réalisation de la VS :

Dans ce laboratoire, on utilise la méthode manuelle pour mesurer la VS.

a. Méthode :

Le sang prélevé est aspiré dans le tube de Westergren jusqu'à repère zéro afin d'éviter toute formation de bulle d'air, juste après, on place le tube bien verticale sur son support, puis on observe la sédimentation.

La lecture se fait au bout d'une heure ou même de 2 heures [Figure11].

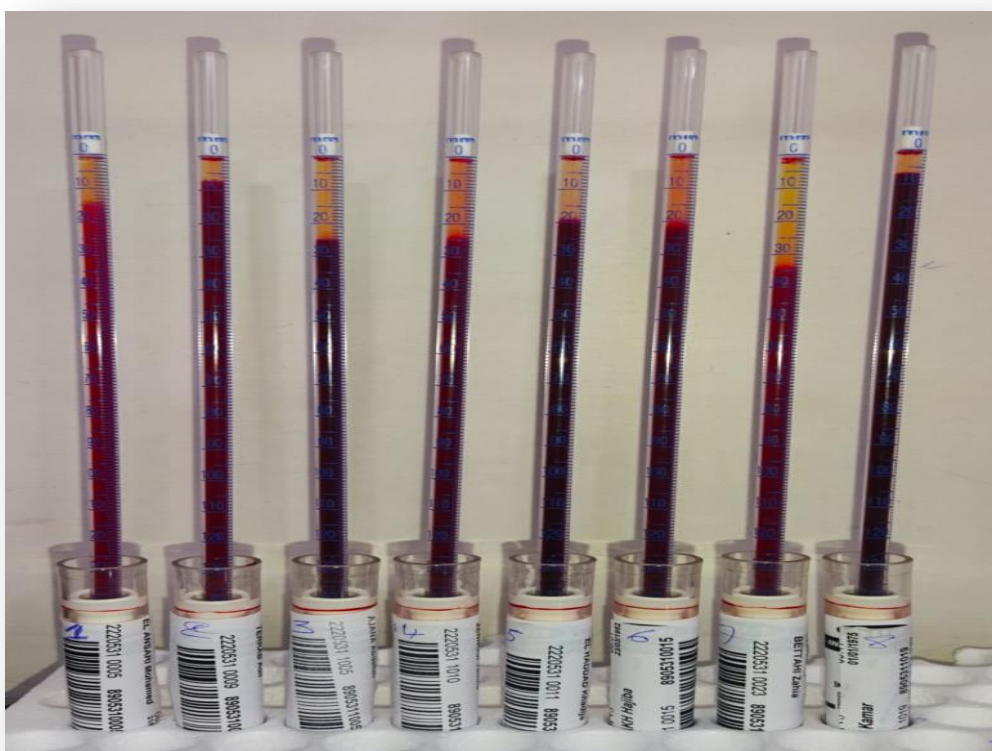


Figure 11 : Schéma explicatif du mode opératoire de VS

b. Interprétations :

A l'état normal, la VS est inférieure à 16 mm après 1h de sédimentation, et inférieure à 32mm après 2h de sédimentation.

c. Variations physiopathologiques :

Tableau 4 : Variations physiopathologiques de la vitesse de sédimentation

	Augmentation	Diminution
Vitesse de sédimentation	<ul style="list-style-type: none">○ La grossesse○ L'âge○ Maladies rhumatismales○ Tuberculose○ Infections○ Maladies dégénératives○ Cancers	<ul style="list-style-type: none">○ Polyglobulie.○ Hyperviscosités.

C: HEMOSTASE

I. Définitions :

Ensemble des mécanismes s'opposant aux saignements ou thromboses spontanées et permettant l'arrêt des hémorragies ainsi que la reperméabilisation des vaisseaux. Elle regroupe l'hémostase primaire, l'hémostase secondaire et la fibrinolyse [Figure12].

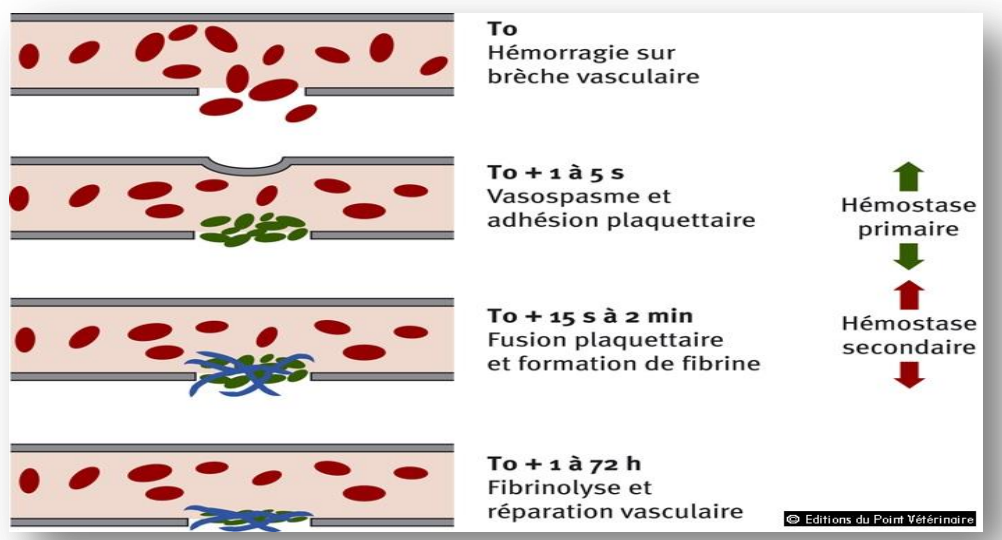


Figure 12 : Mécanismes du maintien du sang dans le système vasculaire [9]

Hémostase primaire : elle dure 3 à 5 minutes et sert à fermer la brèche vasculaire par un thrombus blanc : clou plaquettaire.

Hémostase secondaire : appelée aussi coagulation, elle dure 5 à 10 minutes permet la formation de caillot de fibrine.

On peut diviser la cascade de réactions de la coagulation en 3 étapes [Figure13] :

- **Génération de la prothrombinase** par l'aboutissement de 2 voies différentes de la coagulation appelées extrinsèque et intrinsèque.
- **La formation de thrombine** ou la transformation de la prothrombine en thrombine par le complexe prothrombinase.
- **La formation de fibrine** ou la transformation du fibrinogène en fibrine.

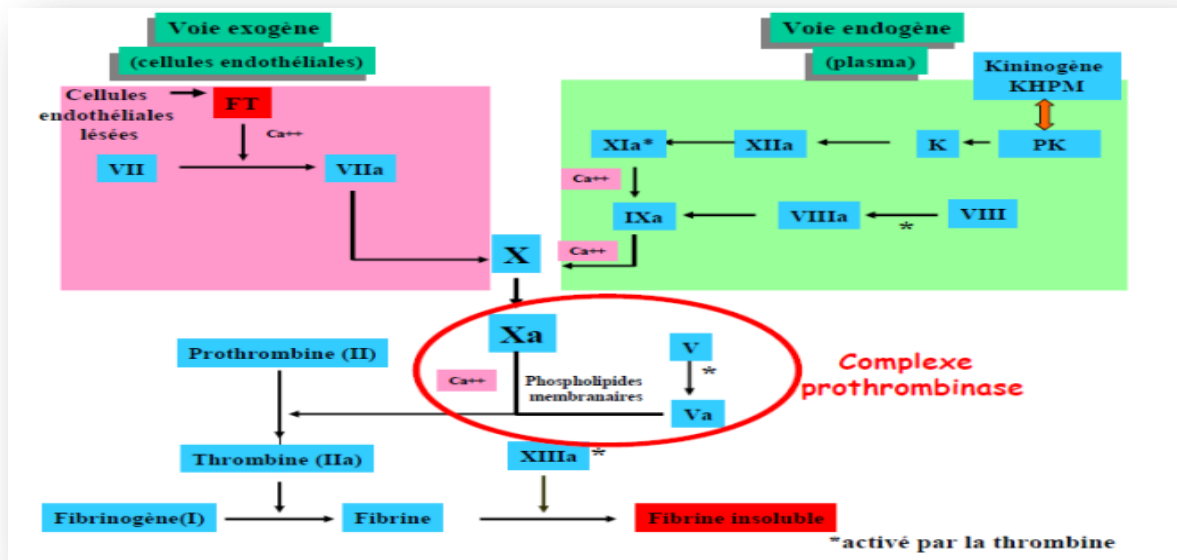


Figure 13 : Les étapes d'activation de la coagulation [10]

Fibrinolyse : dure 48 à 72 heures permet la dissolution du caillot de fibrine et retour de la circulation à la normale.

II. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement est réalisé par ponction veineuse franche. Puis le sang prélevé est recueilli dans un tube citraté, à bouchon bleu.

Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 min pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes.

III. Appareillage :

Le Star Max est un analyseur semi-automate de coagulation permettant la réalisation des tests explorant l'hémostase : TP, TCK et fibrinogène [Figure 14].



Figure 14 : L'appareil Star Max

L'appareil est composé d'une pipette connectée avec déclenchement automatique de la mesure, un écran tactile couleur, des puits d'incubation et des puits de mesure.

IV. Les différents tests d'hémostase :

1) Taux de prothrombine(TP) ou temps de Quick(TQ) :

Le temps de Quick est le temps de coagulation d'un plasma citraté mis en présence de thromboplastine calcique.

C'est un examen utilisé pour évaluer la coagulation sanguine. Il explore la voie extrinsèque (exogène) de la coagulation impliquant les facteurs de coagulation suivants : fibrinogène, facteur II, facteur V, facteur VII et facteur X.

Le TQ s'exprime en pourcentage par rapport à un témoin. Il peut aussi s'exprimer en secondes.

Le principe de mesure du Temps de Quick est de mesurer le temps de formation du caillot à partir d'un plasma de patient.

Dans le cas de patients sous AVK (surveillance des traitements par anti vitamines K), le TQ est exprimé par l'INR.

Exemple :

$$\text{TP: } 70\% \quad = \quad \text{INR: } 1,3$$

$$\text{INR} = (\text{TQ}_{\text{patient}} / \text{TQ}_{\text{Témoin}})^{\text{ISI}}$$

Avec :

ISI : l'indice de sensibilité International spécifique du réactif thromboplastine utilisée

« L'INR n'a pas d'unité »

a. Réactifs utilisés :

- Néoplastine.

b. Mode opératoire :

1. Remplir les godets par les billes.

2. Ajouter 50µl de plasma.
3. Incubation : initier l'incubation en appuyant sur le bouton déclenché (incubation pendant 50secondes).
4. Mettre 200µl de néoplastine et en déclenchant au même temps.

c. Valeurs usuelles :

Le taux de prothrombine (TP) est normalement : $\geq 70\%$.

L'INR normal est de : 1 à 1,30.

d. Valeurs physiopathologiques :

Tableau 5 : Variations physiopathologiques du taux de prothrombine

Inférieur à 70%	Entre 70% et 100%	Supérieur à 100%
<ul style="list-style-type: none"> • Un déficit en facteurs (II, V, VII ou X). • Une atteinte hépatique ou une avitaminose K. • La présence d'anticoagulants circulants (anti II, V, VII, X) ou antiprothrombinase. 	Normaux	Normaux

2. Le temps de céphaline activée (TCA) :

Appelé aussi TCK quand l'activateur utilisé est le kaolin. C'est un test sanguin qui permet d'évaluer le temps de coagulation d'un plasma dépaqueté, décalcifié et recalcifié en présence de céphaline et d'un activateur de la voie intrinsèque de la coagulation (facteur VIII, facteur IX, facteur XI, facteur XII) et la voie finale commune (le fibrinogène, facteur II, facteur V et facteur X).

Les résultats de TCA sont exprimés en secondes ou sous forme d'un ratio:

$$\frac{\text{TCA (patient)}}{\text{TCA (témoin)}}$$

a. Réactifs utilisés :

- Cephascreen.

- CaCl₂ (0,025M).

b. Mode opératoire :

1. Remplir les godets par les billes.
2. Ajouter 50µl de plasma et 50µl de Cephascreen.
3. Incubation : initier l'incubation en appuyant sur le bouton déclenché (incubation pendant 170secondes).
4. Mettre 100µl de CaCl₂ et en déclenchant au même temps.

c. Valeurs usuelles :

La valeur normale varie entre 26 et 36 secondes.

Le TCA ou TCK du malade doit être comparé à celui d'un plasma témoin. Le ratio malade/témoin doit être de 0,8 à 1,2.

d. Valeurs physiopathologiques :

On peut observer un allongement du TCA dans les cas suivants :

- Déficits congénitaux.
- Anomalies ou déficits acquis.
- Insuffisance hépatique sévère.

Le TCA est utile dans le diagnostic de l'Hémophilie (A, B).

3. Fibrinogène :

Le fibrinogène est une protéine plasmatique d'origine hépatique qui est transformée en fibrine insoluble sous l'action de la thrombine pour assurer, avec les agrégats plaquettaires, l'hémostase au niveau d'une brèche vasculaire.

a. Réactifs utilisés :

- OWREN-KOLLER.
- Liquid FIB.

b. Mode opératoire :

1. Remplir les godets par les billes.
2. Préparer une dilution 1/20 (250 µl d'OWNER-KOLLER+12,5 µl de plasma).

3. Ajouter 100µl de plasma diluée.
4. Incubation : initier l'incubation en appuyant sur le bouton déclenché (incubation pendant 110 secondes).
5. Mettre 100 µl de FIB et en déclenchant au même temps.

c. Valeurs usuelles :

Les résultats de fibrinogène sont exprimés en g/l.

Les valeurs normales du fibrinogène dans le sang sont comprises entre 2 et 5 g/l chez l'adulte et l'enfant.

d. Valeurs physiopathologiques :

Les valeurs peuvent varier en fonction de :

- L'ethnie, le sexe, l'âge et le poids.
- La consommation d'alcool et de tabac entraînent une augmentation du fibrinogène.
- La synthèse de fibrinogène peut augmenter à la suite d'un stress, au cours de la grossesse ou après injection de certains médicaments ou d'hormones de croissance.

D : Immuno-hématologie

L'Immuno-hématologie est la science qui permet l'étude des propriétés antigénique du sang et les réactions immunologiques correspondantes.

I. Les systèmes du groupe sanguin :











Nos globules rouges portent à leur surface un très grand nombre d'antigènes de groupes sanguins, et notre appartenance à un groupe donné dépend de la présence ou de l'absence de ces antigènes.

1. Le système ABO :

C'est le système de typage immunologique des individus en fonction de la présence ou non des agglutinogènes (antigènes) A et B sur les hématies et comprend quatre groupes principaux : **A, B, AB et O.**

Le plasma contient 2 types d'agglutinines (anticorps): agglutinine anti-A et agglutinine anti-B [Tableau6].

Tableau 6 : Les types d'antigènes et anticorps du système ABO [11]

	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

a. Détermination du groupe ABO :

i. Principe

IL existe deux épreuves différentes pour la détermination du groupe ABO :

ii. Epreuve globulaire : Epreuve de Beth Vincent

C'est une épreuve réalisée sur les GR du sujet.

Correspond à la mise en évidence des antigènes globulaires à l'aide d'anticorps connus (sérum test) [Tableau7].

iii. Epreuve plasmatique : Epreuve de Simonin

C'est une épreuve réalisée avec le plasma du sujet.

Elle 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 (GR testes) [Tableau7].

Le groupe sanguin d'un nouveau né n'est valide qu'à 6 mois après la naissance, car les anticorps apparaissent progressivement 3 à 6 mois après la naissance.

Tableau 7 : Epreuve de Beth-Vincent et de Simonin

Epreuve globulaire : GR du sujet

Epreuve sérique : plasma du sujet

Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Antigène	GR A	GR B	Anticorps naturels	GROUPE
+	-	+	A	-	+	Anti-B	A
-	+	+	B	+	-	Anti-A	B
+	+	+	AB	-	-	aucun	AB
-	-	-	O	+	+	Anti-A Anti-B	O

+ : agglutination

- : absence d'agglutination

2. Le système Rhésus :

Le système antigénique Rh comprend plusieurs antigènes, parmi lesquels cinq sont les plus importants : **D, C, c, E et e**.

Les personnes appartenant au groupe sanguin Rh⁺ possèdent un antigène supplémentaire (antigène D) sur la membrane des hématies, alors que les individus du groupe Rh⁻ ne le possèdent pas.

L'Ag D est mis en place à l'aide de sérum test Anti-D lors de détermination du groupe Rhésus [Tableau8].

Tableau 8: Détermination du rhésus par la technique de Beth Vincent

Anti-D+hématies	Résultats
Agglutination	Rh ⁺
Absence d'agglutination	Rh ⁻

II. Transfusion sanguine :

La transfusion sanguine s'effectue seulement dans le cas où le sang de receveur ne contient pas d'anticorps qui peuvent agglutiner les globules rouges.

Une personne Rh⁺ ne développe aucune réponse immunitaire vis-à-vis des hématies Rh⁻.

Les conditions de transfusion sanguine sont représentées dans les schémas suivants [Figure15].

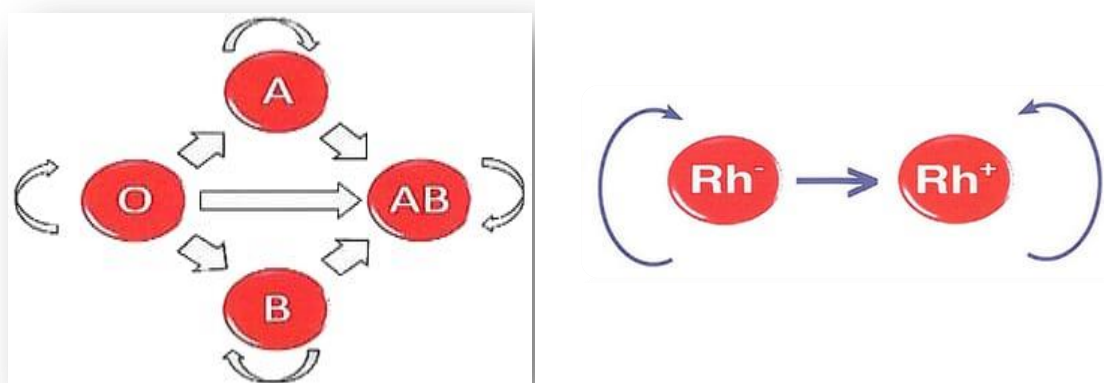


Figure 15: Conditions de transfusion sanguine [12]

III. Réalisation pratique du groupage :

Il existe deux méthodes pour la détermination du groupage sanguin :

- Sur plaque.
- Sur cassette.

1. Sur plaque :

Le groupage sanguin est réalisé sur plaque d'opaline [Figure17].

On dépose 4 gouttes de sang puis on ajoute une goutte de chacun des 4 sérums anti (A-B-AB-D), on mélange avec un tube en verre et on observe l'agglutination.



Figure 16 : Les réactifs du groupage ABO-Rhésus

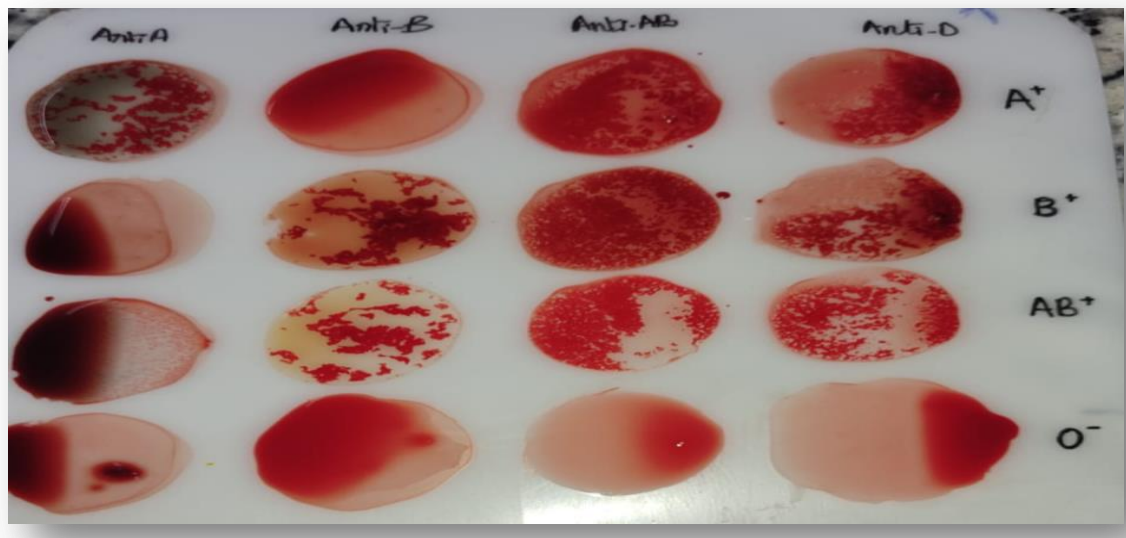


Figure 17 : Réalisation pratique du groupage sur plaque d'opaline

2. Sur cassette :

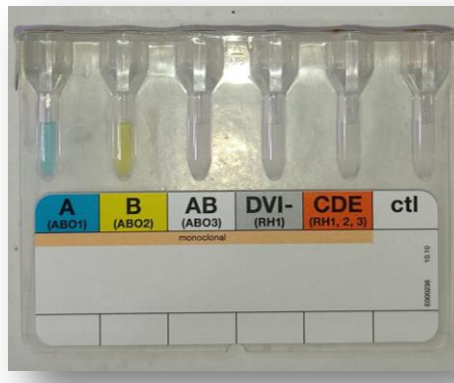


Figure 18 : Carte Scan-Gel Monoclonal ABO/RH

Les trois premiers microtubes de la carte Scan Gel Monoclonal ABO/RH contiennent chacun un gel de spécificité anti-ABO1 (A), anti-ABO2 (B) et anti-ABO3 (AB) .Le quatrième et le cinquième microtube contiennent chacun un gel de spécificité anti-RH1 (DVI-) et anti-RH1, 2, 3 (CDE). Le sixième microtube contient le gel sans anticorps et correspond au contrôle (Ctl).Ces réactifs contiennent de l'azide de sodium (< 0,1 %) comme conservateur[14] [Figure18].

a. Mode opératoire :

1. Identifier la carte par le nom ou le numéro d'échantillon correspondant.
2. Retirer la languette d'aluminium des cartes avec précaution pour éviter les contaminations inter-microtubes.
3. Préparer la suspension (10 µl du culot+200 µl du diluent).
4. Mélanger la suspension à l'aide d'un vortex.
5. Distribuer 10 µl de suspension dans la cupule de chaque microtube de la carte.
6. Centrifuger immédiatement 15 minutes dans Scan Gel Centrifuge. Lire les résultats.

b. Résultats et interprétation:

- La présence d'agglutinats en surface ou dispersés dans le gel correspond à un résultat positif indiquant la présence de l'antigène érythrocytaire correspondant.
- Un culot de globules rouges collectés au fond du micro tube correspond à un résultat négatif indiquant que l'antigène érythrocytaire correspondant n'a pas été détecté.
- Une réaction positive dans un des microtubes ne peut être validée que si le microtube Ctl est négatif.

Conclusion

Les analyses médicales en hématologie sont des examens de laboratoire destinés à faciliter le diagnostic médical, le traitement ou la prophylaxie des maladies humaines. Les progrès technologiques ont permis l'apparition des automates de mesure permettant la réalisation d'une quantité importante d'analyses en un temps limité. Ainsi que la réduction des erreurs causées par les dilutions manuelles et la lecture optique ; de plus une parfaite reproductibilité des résultats.

Au cours de mon stage de fin d'études, au Laboratoire d'Analyses Médicales EL FOUNINI, je me suis familiarisée avec un environnement technique et un ensemble de méthodes d'analyses médicales qui s'est avéré très lucratif pour ma formation. 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 et de comprendre la très grande importance de la NFS dont le diagnostic d'un certain nombre de pathologies (Leucémies, lymphomes, anémies...).

Références Webographiques

[1] : Composition du sang.

(<https://www.alloprof.qc.ca/fr/eleves/bv/sciences/les-constituants-du-sang-s1271>)

[2] : Schéma des globules rouges.

(<https://www.istockphoto.com/photo/red-blood-cells-in-vein-gm641133986-116400271>)

[3] : Aspect d'un Monocytes / Aspect d'un Lymphocytes.

(www.hematocell.fr)

[4] : Schéma des plaquettes.

(<https://www.istockphoto.com/photo/3d-illustration-of-blood-platelet-gm1059897302-283310296>)

[6] : Aspect des réticulocytes.

(<https://www.wikidoc.org/index.php/Reticulocyte>)

[7] : Les différentes cellules d'un frottis sanguin normal.

(http://campus.cerimes.fr/hematologie/enseignement/hematologie_316/site/html/1.html)

[8] : Les différentes étapes de réalisation d'un frottis sanguin.

(<https://svt.ac-versailles.fr/IMG/archives/bosvt/frottis.html>)

[9] : Mécanismes du maintien du sang dans le système vasculaire .

(<https://www.lepointveterinaire.fr/publications/pratique-veterinaire-equine/archives/n-177/rappels-sur-la-fonction-hemostatique-les-causes-et-les-mecanismes-de-ses-perturbations.html>)

[11] : Les types d'antigènes et anticorps du système ABO.

(<https://www.maxicours.com/se/cours/importance-vitale-du-sang-et-des-organes/>)

[12] : Conditions de transfusion sanguine.

(<https://www.alloschool.com/element/122532>)

[14] : (https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/fr/470185_FR.pdf)

Références Bibliographiques

[5] : MULLER.C

«Cellules normales du sang et de la moelle rouge des os». 2018

[10] : EL ABIDA.K

«Cours d'hématologie»

Faculté des Sciences et Techniques Fès, filière SBAS, 2022

[13] : CHOQUET.S

«Hématologie». Août 2007