

UNIVERSITE DE YAOUNDE I



FACULTE DE MEDECINE ET DES SCIENCES BIOMEDICALES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE PARASITOLOGIE HEMATOLOGIE
ET PATHOLOGIES INFECTIEUSES

UNITE D'HEMATOLOGIE

TRAVAUX PRATIQUES D'HEMATOLOGIE

A l'attention des étudiants du premier cycle

POLYCOPIE

Rédigé par :

Dr Claude Tayou Tagny

Dr Bernard Chetcha

Pr Dora Mbanya

Edition 2013

SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
LE SANG	4
PREPARATION DES ECHANTILLONS	6
ANALYSE DES ECHANTILLONS	8
• Frottis sanguin	8
• Formule leucocytaire	13
• Numération des Globules rouges	16
• Numération des Globules blancs	18
• Numération des plaquettes	20
• Numération des réticulocytes	22
• Calcul des constances érythrocytaires	24
• Vitesse de sédimentation	26
• Hématocrite	28
• Test d'Emmel	29
• La détermination du Groupe sanguin	31

INTRODUCTION

Ce polycopié est destiné aux étudiants du premier cycle, niveau L1, L2 et L3. Il présente de façon simple les principales analyses hématologiques que doit connaître un étudiant de 2^{ème} année de formation médicale ou biomédicales.

Pour chacune des analyses, sont rapportés :

- le principe
- le matériel nécessaire
- le mode opératoire
- l'interprétation des résultats

Des images accompagnent la présentation de l'analyse.

Le polycopié est précédé d'une présentation sommaire du sang et de ses composants et de la préparation des échantillons en vue des analyses.

LE SANG

Le sang est une suspension fluide pigmenté en rouge, composé d'une partie liquide appelé le plasma, dans lequel sont suspendus les éléments cellulaires.

Les éléments cellulaires sont : Globules rouges, Globules blancs et Plaquettes. Les cellules sont fabriquées au sein de la moelle osseuse au cours d'un processus appelé Hématopoïèse.

Le plasma est essentiellement composé d'eau, de molécules simples (acides aminés, protéines, glucides, lipides, ions, minéraux, gaz etc..), de molécules complexes (hormones, immunoglobulines etc....)

Le sang circule dans les veines et les artères, des veines vers les poumons et des poumons vers les artères et les autres tissus.

Il a de nombreux rôles dont les plus importants sont :

- ✓ le transport d'oxygène et de CO₂ grâce à l'hémoglobine
- ✓ le transport des nutriments et des médiateurs chimiques, des déchets de l'organisme et autres substances chimiques
- ✓ l'équilibre oncotique, osmotique, acido-basique et hydro cellulaire
- ✓ la défense cellulaire et immunitaire
- ✓ l'hémostase

Le volume du sang est d'environ 4 à 6 l chez l'homme, 3 à 5 litres chez la femme et 1-3 l chez l'enfant (60-70ml/kg). Il représente 7 à 8 % de la masse corporelle.

Pour étudier les éléments constitutifs de base du sang, on le prélève au laboratoire dans un tube sec ou dans un tube contenant de l'anticoagulant. En hématologie, l'anticoagulant le plus indiqué est l'éthylène diamine tétra-acétate de potassium ou de sodium (EDTA).

Le sang prélevé dans un tube sec laissé au repos pendant 30 minutes ou centrifugé forme deux parties : un caillot fait de cellules sanguines enrobées dans une maille de fibrine et un surnageant de couleur jaune citrin appelé sérum.

Le sang prélevé dans un tube avec anticoagulant et centrifugé forme un culot fait de globules rouges, un surnageant jaune citrin appelé plasma et une couche intermédiaire faite de globules blancs et de plaquettes souvent appelé « Buffy coat ».

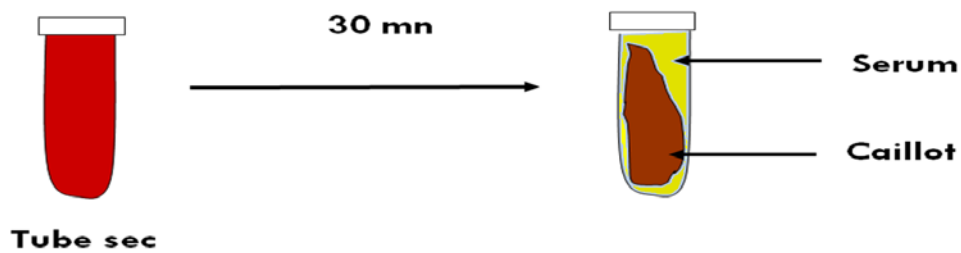


Figure 1 : Processus d'obtention du sérum et du caillot

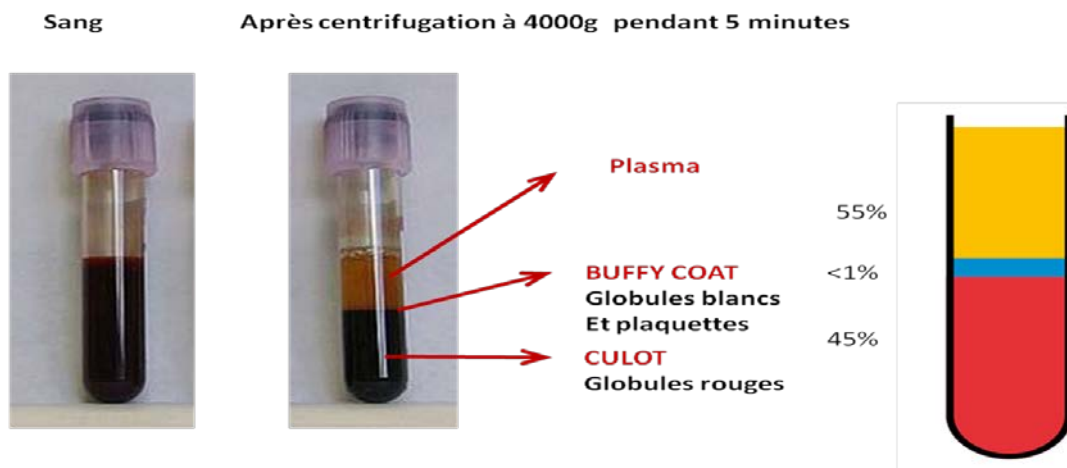




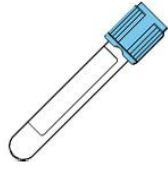

Figure 2 : Processus d'obtention du plasma et du culot globulaire

PREPARATION DES ECHANTILLONS

En vue d'étudier le sang, les prélèvements sont faits dans des tubes adaptés au type d'analyse hématologique à réaliser comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau I : Type de tube en fonction des analyses hématologiques

6

Type	Sec	EDTA	Citrate Coag	Citrate VS
Capacité (ml)	5 - 7 - 10	5	5	2-3
Couleur tube	Transparent	Transparent	Transparent	Transparent
Couleur bouchon	Rouge orangée	Violet	Bleu	Noir
Présentation				
Quantité minimale	1ml/examen	1ml/examen	90% du volume prévu du tube (ou à la <u>limite indiquée sur le tube</u>)	90% du volume prévu du tube (ou à la <u>limite indiquée sur le tube</u>)
Examens réalisés sur prélèvement	Tests serologiques	NFS Réticulocytes Groupage sanguin Frottis sanguin VS (Si tube spécial non disponible)	TP TCK Groupage sanguin NFS (Situation particulière, voir le biologiste)	VS

La conservation des échantillons doit être courte pour éviter la détérioration des éléments du sang et optimiser la qualité des résultats. Ci-dessous, le type de tube et les conditions de conservation.

Tableau II : Type de tube en fonction des analyses hématologiques

Tubes	Sec	EDTA	Citrate Coag	Citrate VS
Capacité (ml)	5 – 7 - 10	5	5	2-3
Examens	Tesst serologiques	Hemogramme Réticulocytes Groupage sanguin Frottis sanguin VS (Si tube spécial non disponible)	TP TCK Groupage sanguin	VS
Conservation	Les tubes doivent être bien étiquetés, bien rebouchés. Eviter de les agiter brutalement au risque de provoquer une hémolyse mécanique. Respecter les conditions de températures.			
	+4 à +18°C Pendant un maximum de 24H	+4 à +18°C Pendant un maximum de 4H Le frottis sanguin doit être réalisé le plus vite possible	+4 à +18°C Pendant un maximum de 4H	+4 à +18°C Pendant un maximum de 4H
Delai de transmission	2-3 heures	2-3 heures	Moins de 2 heures	2-3 heures

CYTOLOGIE

La cytologie consiste en la numération des cellules, l'étude de leur structure et de leur morphologie.

FROTTIS SANGUIN

8

Principe :

Le frottis sanguin est une technique d'étalement et de coloration du sang dont l'objectif est de mettre en évidence les aspects morphologiques normaux ou anormaux des principaux éléments figurés du sang. L'étude la morphologie se fait par l'examen au microscope ordinaire d'un frottis sanguin coloré.

A l'aide de colorants spécifiques, il s'agit d'imprégner les cellules étalées et leurs composants préalablement fixés à l'alcool méthylique pour les rendre visibles par l'œil de l'examineur.

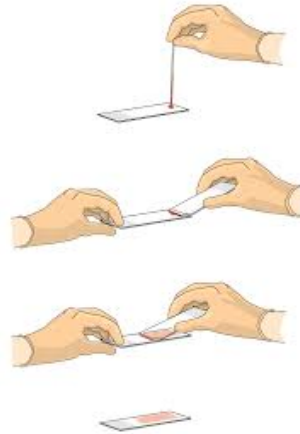
L'hémogramme et le frottis sanguin permettent de diagnostiquer :

- les anémies / les polyglobulies
- les thrombopénies / thrombocytoses
- les neutropénies / polynucléoses
- les lymphopénies / lymphocytoses
- les monocytoses
- les hyperéosinophilies
- les basophilies
- les anomalies qualitatives des cellules du sang
- la présence de cellules étrangères

Matériel

- Sang périphérique prélevé sur anticoagulant (EDTA, citrate)
- Lames propres dégraissées
- Colorants May Grunwald et Giemsa
- Microscope ordinaire avec objectif x10 (faible grossissement), x40, x100 (fort grossissement)

Mode opératoire



9

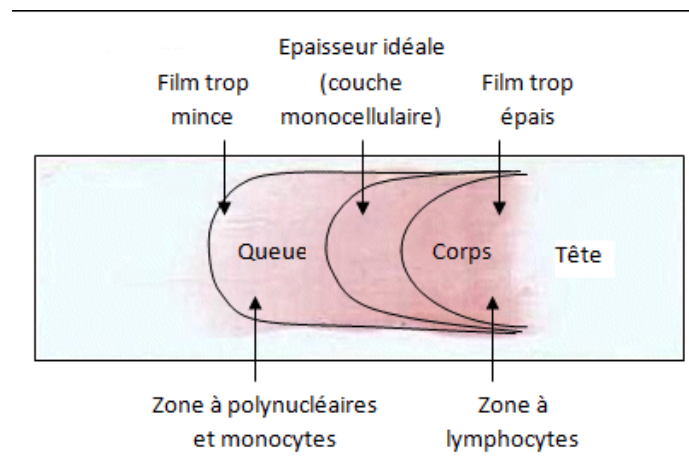
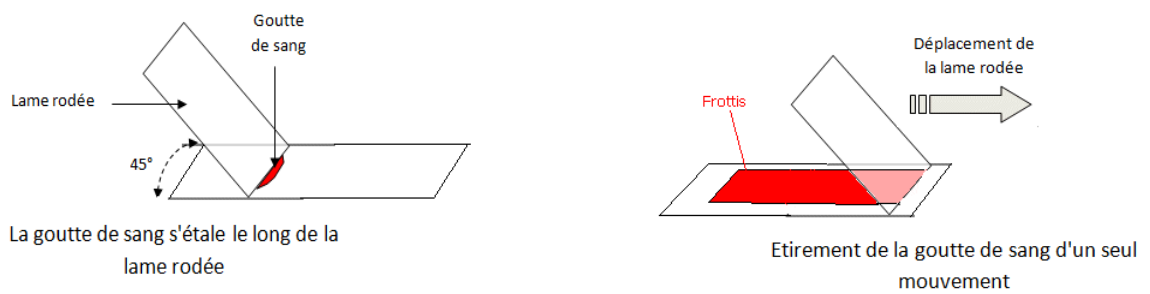


Figure 6 : Réalisation d'un frottis sanguin

Étalement du sang

Il permet d'obtenir une seule couche de cellule.

- A l'extrémité d'une lame porte objet, propre et dégraissée, déposer une petite goutte de sang frais.
- Amener le rebord d'une deuxième lame rodée contre la goutte du sang, de manière à former un angle de 45°. Le sang diffuse par capillarité le long du rebord de la lame rodée en formant un fin filet.
- Étirer la goutte de sang d'un seul mouvement vers l'autre extrémité de la lame porte objet en exerçant une légère pression. Sécher rapidement par agitation.
- Un frottis bien fait doit être continu, avec une queue d'étalement régulière.
- Il faut identifier le frottis après étalement en remplissant le coin de la lame avec au moins les informations suivantes : Noms, prénoms, date de l'étalement

10

Fixation

La fixation à l'alcool méthylique fige les cellules dans leur état naturel et permet leur conservation.

Dans la méthode de coloration par May Grunwald et Giemsa (MGG), la fixation s'opère dans le premier temps de la coloration grâce à la solution alcoolique de May-Grunwald (éosine bleu de méthylène).

Coloration par le May-Grunwald et Giemsa

L'éosinate de bleu de méthylène colore surtout des cytoplasmes et des granulations azuro-eosinino-basophiles.

L'azur colore surtout les noyaux et les grosses granulations azurophiles des lymphocytes.

Coloration proprement dite

May-Grunwald :

- Recouvrir la lame avec 1 ml ou 15 gouttes
- Reboucher le flacon. Laisser 3 minutes

- Ajouter sur le frottis la même quantité d'eau tamponnée, en chassant le May-Grunwald, puis laisser 1 minute.

Giemsa

- Verser le liquide et recouvrir la lame par la solution de Giemsa diluée (3 gouttes dans 2 ml d'eau tamponnée) préparée extemporanément.
- Laisser en place pendant 15-20 minutes
- Laver à l'eau de robinet. Sécher à l'air.

Examen d'une lame de sang colorée

1- Examiner la lame avec un faible grossissement ($\times 10$) pour juger de la qualité de la coloration et de la répartition des globules blancs ; leur distribution est en effet rarement homogène.

2- Au fort grossissement ($\times 40$ et $\times 100$)

a. Apprécier la morphologie de différents éléments cellulaires

b. Rechercher :

- Anomalie des globules rouges (formes, tailles et les inclusions)
- Anomalie des globules blancs (contenu, forme)
- Anomalie des plaquettes (nombre, contenu, répartition)
- Parasites
- Formule leucocytaire : elle consiste à identifier chaque leucocyte rencontré et de comptant 100 cellules pour établir la proportion de chaque type de globule blanc par rapport au nombre total de globules blancs.

Interprétation /Lecture

✓ **Les globules rouges :**

Leur taille normale = 7 microns

- Si inférieur à 6 microns = microcytose
- Si supérieur à 9 microns = macrocytose
- Si variation de taille = anisocytose
- Si anormale de forme = poikilocytose (microsphérocytose, Hématie en cible, Drépanocytes)

On peut aussi noter:

Leur coloration = teinte uniforme ou polychromatophilie

Les inclusions (nucléaires, parasites, corps de Jolly – Anneau de Cabot, parasites etc.)

Les cellules jeunes : érythroblastes

- ✓ On note l'aspect des Globules blancs, leur taille, leur nombre, leur contenu, leur répartition (formule leucocytaire)
- ✓ On note l'aspect des plaquettes (taille, nombre, forme, répartition)
- ✓ On note enfin les corps étrangers (parasites)

Limites du frottis sanguin

- Ce n'est pas une technique de concentration
- Numération fiable impossible
- Risque de faux comptage selon l'endroit de comptage

LA FORMULE LEUCOCYTAIRE

Principe :

Les principaux globules blancs en circulation dans le sang sont : le Polynucléaire neutrophile (PN), le Polynucléaire basophile (PB), le polynucléaire éosinophile (PE), le monocyte (MONO) et le lymphocyte(LYM). Chez un sujet normal, ces différentes cellules sont retrouvées dans des proportions bien déterminées. Après coloration d'un frottis sanguin, la formule leucocytaire permet de déterminer cette proportion. Des proportions anormales aident à identifier certaines maladies.

13

Matériel

1. Microscope,
2. Lame colorée MGG,
3. Compteur cellulaire

Mode opératoire :

- Mise au point du microscope,
- Identification des cellules (voir schémas et photos)
- Comptage de 300 à 500 cellules
- Calcul de la proportion de chaque cellule par rapport au total
- Détermination de la formule leucocytaire

Interprétation :

Formule leucocytaire normale :

PN : 40-70%

PE : 3-7%

PB : 0-1%

Mono : 5-10%

Lym : 20-35%

Morphologie des cellules (vue microscopique) :

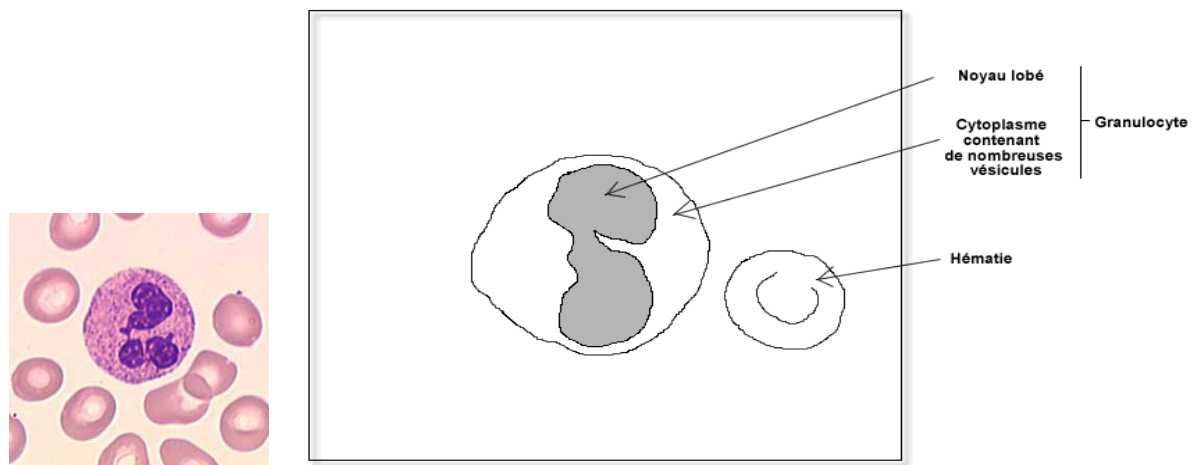


Figure 7 : POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE : Taille 10 – 14 μm ; noyau dense polylobé avec 3-5 lobes, cytoplasme rose-orange avec des fines granulations

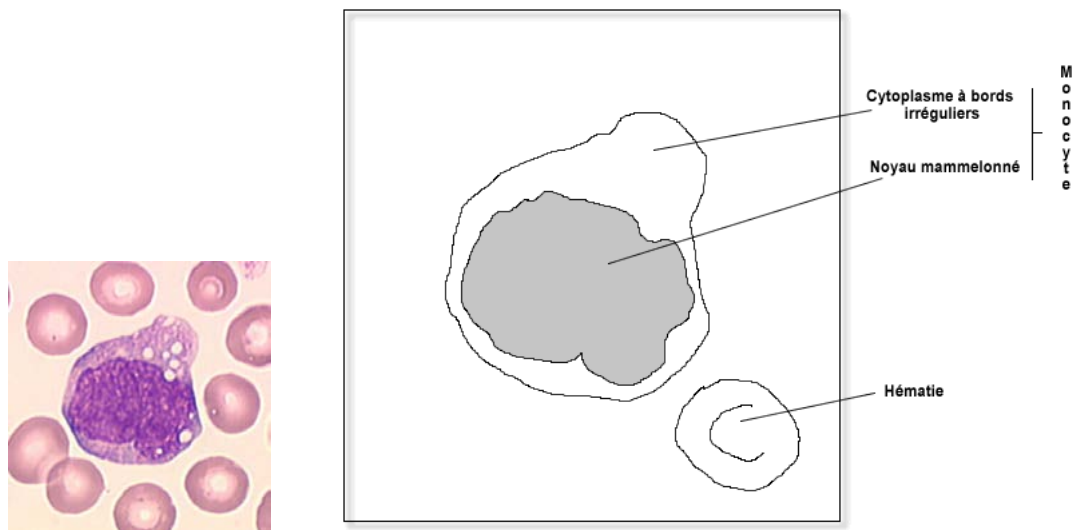


Figure 8 : MONOCYTE : Taille 15-20 μm ; noyau finement réticulé à contours irréguliers (mamelonné), cytoplasme gris-bleu, avec des vacuoles

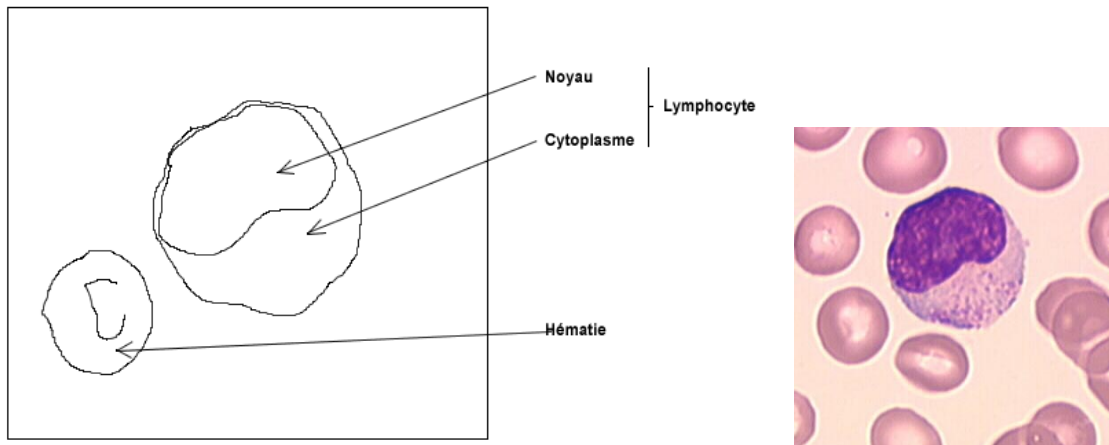


Figure 9 : LYMPHOCYTE : Taille : 10-12 μm ; noyau dense, cytoplasme bleuté, parfois quelques granulations rouges (azurophiles)

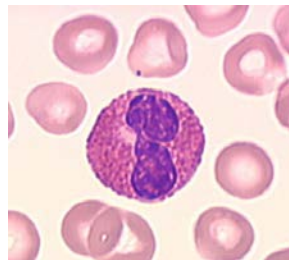


Figure 10 : POLYNUCLEAIRE EOSINOPHILE : Taille 10 – 14 μm ; noyau dense polylobé avec 2-3 lobes, souvent bilobé, cytoplasme avec des grosses granulations rouge-orange

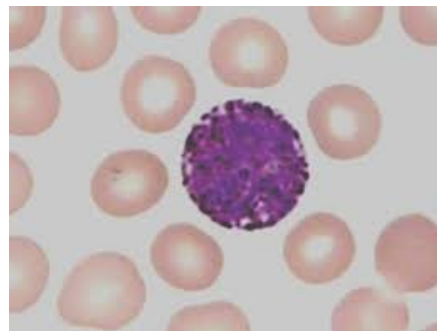


Figure 11 : POLYNUCLEAIRE BASOPHILE : Taille 10 – 14 μm ; noyau dense polylobé en trèfle, cytoplasme avec des grosses granulations noirâtres, recouvrant le noyau

NUMERATION DES GLOBULES ROUGES

Principe

Le principe de la numération sanguine des globules rouges (GR) est basé sur la dilution des cellules et leur comptage sur une cellule quadrillée de volume connu. 1 μ l de sang total est dilué 100 fois avec la solution de Hayem ou de Macarno. La solution diluée remplit une cellule de Malassez et le comptage se fait au microscope. Puis, la concentration réelle est obtenue après multiplication du nombre de cellules comptées par l'inverse de la dilution.

16

Matériel

1. une pipette de Potain pour globules rouges

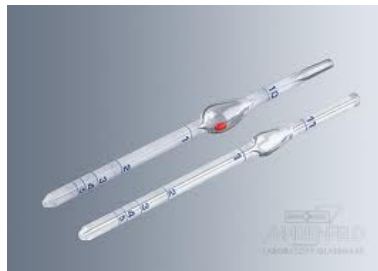


Figure 3 : Image des pipettes de Potain

2. une cellule de Malassez

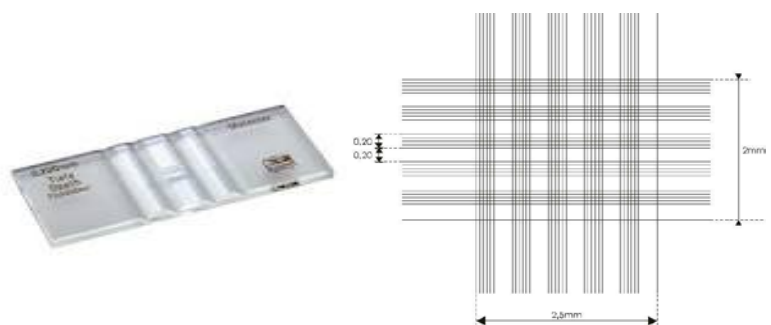


Figure 4 : La cellule de Malassez

La Cellule de Malassez a un Volume total de 1 μ l. Son quadrillage est formé de 10 bandes horizontales ;

1 bande contient 10 rectangles ; 1 Rectangle sur 2 est quadrillé ; 1 rectangle contient 20 petits carrés ;

1 Bande= 1/10 de mm² ; 1 rectangle = 1/100 de mm²

Au total, la cellule est composée de 100 rectangles et 2000 petits carrés. Chaque carrée a les caractéristiques suivantes :

Longueur=0,25mm; Largeur=0,20 mm; Profondeur=0,20mm

3. *une lamelle*
4. *la solution de Hayem ou de Marcano*
Le marcano est constitué de :
 - Sulfate de soude : 50g
 - Formol : 10cc
 - Bleu de méthylène : 0,01g
 - Eau distillée QSP 1 litre
5. *du sang frais prélevé sur EDTA*
6. *Microscope*

Mode opératoire

- Avec une pipette de Potain, aspirer le sang jusqu'au trait 0,5,
Si le sang est prélevé à la pointe du doigt, la première goutte doit être essuyée avec du coton sec.
- Aspirer le liquide de Marcano jusqu'au trait 101 (dilution au 1/200)
Rejeter les premières gouttes avant de remplir la cellule avec le mélange
- Attende 2 à 3 minutes avant de lire.
- Compter de façon aléatoire 10 carrés sur les 2000 de la cellule

Interprétation/calcul

X = Nombre de GR/ μ l

N = Nombre moyen de GR comptés par petit carré= $\frac{C_1+C_2+C_3+C_4+.....C_{10}}{10}$

$X = N \times 2000 \times 200 = N \times 400.000$

200 = Dilution

Globules rouges :	Homme	:	4,5 à 5,5 millions/ μ l
	Femme	:	4,2 à 5,4 millions/ μ l
	Nouveau né	:	5,5 à 6,2 millions/ μ l

NUMERATION DES GLOBULES BLANCS

Principe

Le principe de la numération sanguine des globules blancs (GR) est basé sur la dilution des cellules et leur comptage sur une cellule quadrillée de volume connu. 1µl de sang total est dilué 20 fois avec la solution de Lazarus. La solution diluée remplit une cellule de Malassez et le comptage se fait au microscope. Puis, la concentration réelle est obtenue après multiplication du nombre de cellules comptées par l'inverse de la dilution.

18

Matériel

1. *Pipette de Potain pour globule blanc*
2. *une cellule de Malassez*
3. *une lamelle*
4. *la solution de Lazarus*

Le Lazarus est constitué de :

- Sol bleu de toluidine à 0,25° = 10cc liquide
 - Acide acétique = 10 cc de
 - Eau distillée GS = 100cc
5. *du sang frais prélevé sur EDTA*
 6. *Microscope*

Mode opératoire

- Avec une pipette de Potain, aspirer le sang jusqu'au trait 0,5
- Si le sang est prélevé à la pointe du doigt, la première goutte doit être essuyée avec du coton sec.
- Aspirer le liquide de Lazarus jusqu'au trait 11. (dilution au 1/20)
- Rejeter les premières gouttes avant de remplir la cellule avec le mélange
- Attende 2 à 3 minutes avant de lire.
 - Compter de façon aléatoire 10 rectangles sur les 100 de la cellule

N.B : Attention, ce compte englobe les éventuels érythroblastes qui ne peuvent être séparées des globules blancs. Celles-ci seront soustraites après le pourcentage cellulaire effectué sur le frottis de sang coloré au May Grunwald Giemsa.

Interprétation/calcul

X = Nombre de GB/ μ l

N = Nombre moyen de GB comptés par rectangle = $\frac{C_1+C_2+C_3+C_4+.....C_{10}}{10}$

X = N x 100 x 20 = N x 2.000

20 = Dilution

Globules blancs :	Adulte	:	4000-10000
	Enfant	:	4000-12000
	Nouveau né	:	jusqu'à 25.000

NUMERATION DES PLAQUETTES

Principe

C'est le même principe que celui du comptage des globules blancs. La solution de dilution est le chlorhydrate de procaine. La technique la plus courante utilise un liquide de dilution qui lyse les hématies et les leucocytes, et qui évite l'agglutination des plaquettes. Les plaquettes souvent difficiles à distinguer d'impuretés, de poussière apparaissent comme des grains noirs réfringents.

20

Matériel

1. *Pipette de Potain pour globule blanc*
2. *une cellule de Malassez*
3. *une lamelle*
4. *Sang frais prélevé sur EDTA*
5. *Microscope*
6. *la solution de Chlorhydrate de procaine composée de :*
 - Chlorhydrate de procaine : 2,43g
 - Chlorure de sodium : 0,20g
 - Eau distillée : 100cc.

Mode opératoire

- Avec une pipette de Potain, aspirer le sang jusqu'au trait 0,5
- Si le sang est prélevé à la pointe du doigt, la première goutte doit être essuyée avec du coton sec.
- Aspirer le liquide de dilution jusqu'au trait 11. (dilution au 1/20)
 - Rejeter les premières gouttes avant de remplir la cellule avec le mélange
 - On agite longtemps la pipette pour obtenir la lyse des hématies.
 - Attende 2 à 3 minutes avant de lire.
 - on compte deux bandes complètes de la cellule, soit 20 rectangles sur les 100 de la cellule.
 - Le comptage doit être fait de préférence en contraste de phase où les plaquettes apparaissent en noir sur fond clair. Mais on peut également faire ce compte et microscopie ordinaire.

Interprétation/calcul

X = Nombre de PTL/ μ l

N = Nombre moyen de PTL comptés par bande = $\frac{B_1+B_2}{10}$

X = N x 5 x 20 = N x 100

20 = Dilution

Plaquettes : Les chiffres normaux s'établissent entre 150.000 et 400 000 par μ l.

NUMERATION DES RETICULOCYTES

Principe

Les réticulocytes ou hématies granulo-filamenteuses sont des hématies jeunes conservant dans leur cytoplasme des restes de ribosomes et de mitochondries. Ils sont dès lors capables d'un métabolisme assez intense et ils synthétisent encore activement de l'hémoglobine. Pour les mettre en évidence, on utilise une coloration dite « vitale » à base de bleu de crésyl brillant ou de bleu de méthylène nouveau. Dans ces conditions les organites cellulaires cités plus haut sont rendus visibles sous la forme d'une "substance granulo-filamenteuse" caractéristique. L'augmentation des réticulocytes traduit un accroissement de l'activité médullaire.

22

Matériel

1. Sang frais prélevé sur EDTA
2. Solution de Bleu de crésyl brillant
 - Bleu de crésyl brillant 1 g
 - Citrate de sodium à 0,3 % 20 ml
 - Solution de chlorure de sodium à 9 g/l 80 ml
3. Bain marie
4. Tube
5. pipette
6. lame
7. Microscope

Mode opératoire

- Mettre dans un tube à hémolyse 3 gouttes de solution de bleu de crésyl et 6 gouttes de sang, puis mélanger en agitant le tube doucement.
- incuber le mélange 15 à 20 minutes au bain Marie à 37°C ou 30 minutes à température ambiante.
- Homogénéiser puis prélever une goutte du mélange et la déposer sur une lame propre pour en faire un frottis mince.

- Faire sécher le frottis en agitant vivement la lame.
- Examiner le frottis à l'objectif à immersion en choisissant la queue de l'étalement, là où les hématies sont séparées les unes des autres.
- Les hématies apparaissent colorées en bleue. Les réticulocytes contiennent des filaments et des fines granulations bleu- violet foncé, disposés en filet.
- On examine 500 hématies et on compte soigneusement le nombre total des hématies et le nombre de réticulocytes.

Interprétation/calcul

Calcul :

N= nombre d'hématies examinés= 500 hématies

R= nombre de réticulocytes comptées

% de réticulocytes= R divisé par N

Nombre absolu de réticulocytes = % de réticulocytes X nombre de GR/ μ l

Exemple :

- Numération des globules rouges == 4 000 000 GR/mm³
- Sur 500 hématies examinées, 25 sont des réticulocytes
- Le pourcentage ou taux de réticulocyte est donc de : $25/500 \times 100 = 5\%$
- Le nombre de réticulocytes en valeur absolue = $5\% \times 4\,000\,000 = 200\,000$ réticulocytes/ μ l.

Valeurs usuelles : 20 000 à 80 000 réticulocytes/ μ l (0,2 - 2%) pour un taux d'hémoglobine compris entre 12 à 16 g/100 ml.

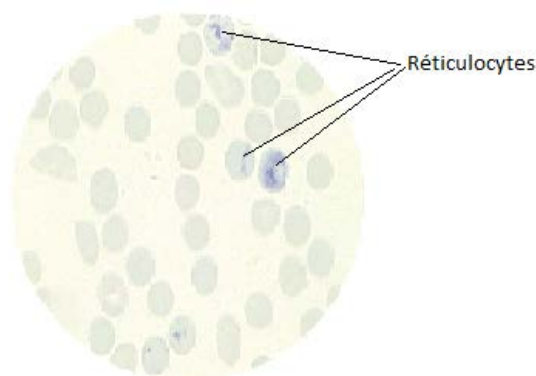


Figure 5 : Image de réticulocytes

CONSTANCES ERYTHROCYTAIRES

Principe :

Après avoir pratiquer une numération des érythrocytes, un dosage de l'hémoglobine et mesuré l'hématocrite, on peut calculer les constantes érythrocytaires. Celles-ci sont d'une grande aide pour le diagnostic des anomalies de la lignée érythrocytaire, notamment des anémies.

Matériel :

Calculatrice.

Mode opératoire :

1- le volume globulaire moyen (VGM)

C'est le volume moyen du GR exprimé en μ^3 ou en femtolitres (fl). On le calcule en divisant le volume globulaire compris dans 1 μ l de sang (donné par l'hématocrite) par le nombre de GR contenu dans 1 μ l (donné par la numération globulaire) :

$$\text{VGM (fl)} = \frac{\text{Hématocrite (\%)}}{\text{Nombre de GR (/}\mu\text{l)}}$$

Normal : de 85 à 95 μ^3 ou fl
 Microcytose < à 85 μ^3
 Macrocytose > à 95 μ^3

2- Concentration corpusculaire en hémoglobine (CCMH)

C'est la concentration de l'hémoglobine par unité de volume du globule rouge exprimé en pourcentage. C'est aussi le pourcentage de saturation des hématies en hémoglobine : les hématies étant normalement saturées en hémoglobine, la CCMH ne peut être supérieure à la normale

$$\text{CCMH (g/dl)} = \frac{\text{Taux d'hémoglobine (g/dl)}}{\text{Hématocrite (\%)}}$$

Valeurs normales entre 32 et 38 g/dl
 CCMH <32 g/dl, on parle d'hypochromie
 CCHM 32-38 g/dl, on parle de normochromie
 Il n'y a pas d'hyperchromie.
 La CCMH peut s'exprimer en % (g pour 100 ml)

3- La teneur corpusculaire moyenne en HB (TCMH)

C'est la quantité d'hémoglobine par hématie. C'est le poids moyen de l'HB dans le GR en picogramme (pg).

Calcul :

$$\text{TCMH} = \frac{\text{Taux d'hémoglobine (g/dl)}}{\text{Nombre de globules rouges (/dl)}}$$

Normalement: 27-33 pg

LA VITESSE DE SEDIMENTATION (VS)

Principe :

La VS est la vitesse avec laquelle se déposent les hématies d'un sang rendu incoagulable dans un tube de calibre précis et à une température déterminée.

On l'apprécie par la hauteur de la colonne de plasma surnageant après un temps x convenu, souvent estimé à 1 heure.

Les hématies ne s'agrègent normalement pas à cause de l'existence de forces électrostatiques de répulsion (chargées positivement)

Quand un échantillon de sang recueilli sur anticoagulant est laissé au repos dans un tube vertical, les hématies sédimentent et s'entassent.

La vitesse de sédimentation (VS) dépend aussi du courant descendant des cellules et du courant ascendant du plasma.

Elle se traduit par la mesure de la hauteur du plasma surnageant (en mm) obtenue au bout d'un certain temps (1 heure).

26

Matériel

1. Sang frais prélevé sur anticoagulant (citrate ou EDTA)
2. Tube de sédimentation (il peut être le même que le tube de prélèvement- Méthode Human)
3. Portoir
4. Chronomètre

Mode opératoire

Méthode WESTERGREEN. C'est la méthode de référence.

- Le tube de sédimentation est un Tube long de 80 cm, 2,5mm de diamètre intérieur, gradué en mm de 0 à 200.
- Il est maintenu sur un support spécial obturant l'extrémité inférieure.
- Le mélange sang-anticoagulant est aspiré dans un tube de Westergreen jusqu'au trait 200.
- Le tube est placé en position verticale sur le support.
- Le chronomètre est déclenché. On mesure l'espace plasmatique libéré des hématies après une heure et après 2 heures.

Précautions

Eviter une longue stase veineuse lors du prélèvement

L'agitation excessive du sang

Température du laboratoire : il faut 20° à 30°C

Lecture et interprétation

Lire à la hauteur de séparation des globules et du plasma.

	Homme	Femme
VSH ₁ :	3	6
VSH ₂ :	8	16



Figure 12: Tube de westergreen

HEMATOCRITE

Principe:

L'hématocrite est le volume des globules rouges rapporté au volume sanguin total, on l'exprime en pourcentage. La détermination se fait en séparant les hématies du plasma par centrifugation du sang dans des conditions standardisées de durée et de vitesse.

Matériel

1. Sang recueillie sur anticoagulant sec : 5 à 10ml
2. MicroTube hématocrite de Wintrobe
3. Centrifugeuse
4. Pate à sceller

Mode opératoire:

Méthode de microhématocrite

- Retourner plusieurs fois le tube de prélèvement, Ne pas agiter (sinon hémolyse), puis rapidement :
- Plonger l'extrémité du microtube à hématocrite dans le tube de prélèvement (ou sur la goutte de sang du doigt en cas de prélèvement capillaire)
- le sang remonte par capillarité dans le microtube
- Ajuster le niveau du sang jusqu'au trait indiqué.
- Essuyer le tube et sceller avec la pate l'extrémité qui a servi à aspirer le sang
- Placer le tube dans le pot de centrifugation
- Equilibrer
- Centrifugation 6 000 à 10 000 trs/mn.
- Retirer le tube et vérifier que le trait supérieur est toujours à 100.

La graduation atteinte par le niveau supérieur de la couche de G.R, représente le chiffre d'Hématocrite indiqué sur l'abaque de la centrifugeuse.

Interprétation (Valeurs normales)

Homme : 37 - 51 %

Femme : 34 - 47 %

Enfant : 32 - 45 %.

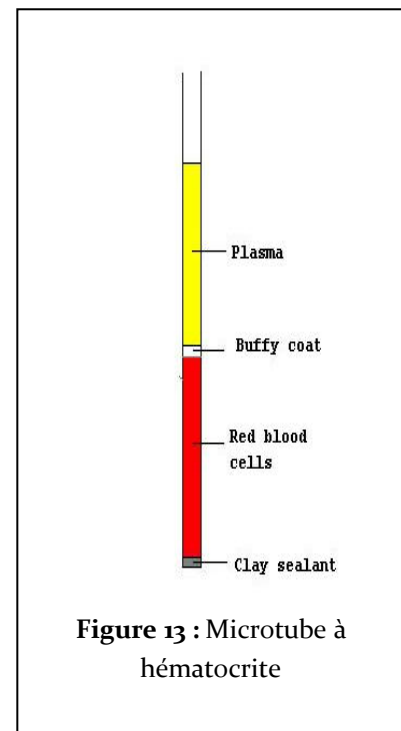


Figure 13 : Microtube à hématocrite

LE TEST D'EMMEL

Principe

C'est un test qui permet de mettre en évidence les hématies contenant de l'hémoglobine S par la provocation de leur falciformation

Lorsque la pression de l'oxygène baisse au dessus d'un certain niveau ou en présence d'un réducteur, l'hémoglobine S se polymérise puis se cristallise.

Les hématies contenant de l'hémoglobine S prennent un aspect de faucille (ou forme de banane)

Le métabisulfite accélère l'appauvrissement du milieu en oxygène.

Matériel

- 1 lame de verre propre
- 1 lamelle 24 x 36mm
- 1 tube à essai
- 1 pipette **** étirée
- 1 pipette de 5ml
- Solution métabisulfite de K ou de Na (Métabisulfate de Na ou de K ($S_2O_3M_2$) : 10g, Eau distillée)
- Vaseline, huile de paraffine, verres à ongles ou paraffine solide

Mode opératoire :

- Déposer une goutte de sang et 2 gouttes de sol réducteur au milieu de la lame.
- Mélanger avec la pointe de la pipette pasteur
- Recouvrir avec la lamelle sans former de bulle d'air
- Lutter la lamelle par pression avec le doigt ou en chauffant les bords avec le fer à paraffine.
- Laisser reposer 20' à la température du laboratoire
- Observer la préparation au microscope avec un objectif X40

Résultat : Quand les hématies contiennent de l'hémoglobine S, presque toutes les hématies (de l'ordre de 90%) vont se déformer (sauf s'il existe un taux important d'hémoglobine F associée).

Chez le sujet SS, la falciformation est très rapide. En 15 à 30mm, toutes les hématies sont falciformées.

Chez le sujet AS, le phénomène est plus lent = la falciformation est totale au bout de 30 à 60 minutes.

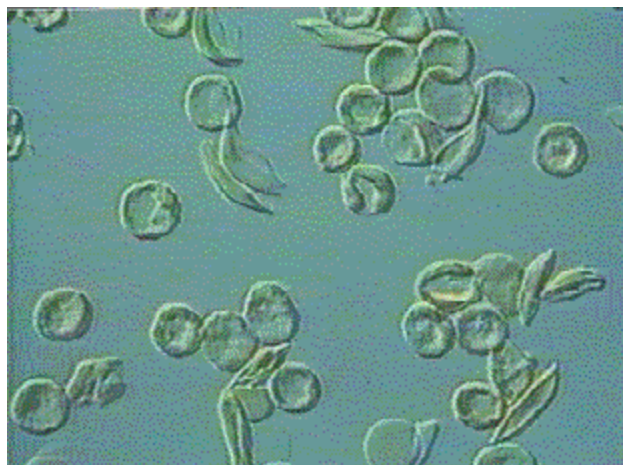


Figure 14: Hématies falciformées au cours du test d'Emmel

LA DETERMINATION DU GROUPE SANGUIN

Principe :

L'agglutination est l'expression visuelle de la réaction immunologique anticorps/antigène lors de la détermination des groupes sanguins. Elle se déroule en deux étapes essentielles :

- la fixation sur les GR des anticorps spécifiques
- l'agglutination, entre eux, des GR recouverts d'anticorps.

Une agglutination peut se faire sur une plaque, dans un tube de verre, dans un micropuits ou dans un gel.

Le groupage ABO repose sur deux épreuves qui doivent être concordantes :

Epreuve globulaire dite de Beth-Vincent : consiste à rechercher par une technique d'agglutination les antigènes présents sur les hématies ; GR à tester (antigènes à déterminer) + sérums tests connus (anticorps monoclonaux anti-A, anti-B et anti-AB)

Epreuve sérique dite de Simonin-Michon : consiste à identifier les anticorps naturels réguliers dirigés contre les antigènes absents ; Plasma à tester (anticorps naturels) + GR tests connus

NB: Le groupe ne sera définitif qu'à la suite de 2 déterminations réalisées à partir de 2 prélèvements sanguins différents.

Pour la faciliter, certains milieux diminuent la valeur absolue du potentiel zêta :

- milieu enzymatique ;
- milieu albumineux à 20%
- Le réactif LISS (Low Ionic Strength Solution)
- Le lavage des hématies à l'eau physiologique

Matériel (pour groupage ABO RhD)

- culot globulaire
- sérum ou plasma
- Serum test: anti A- Anti B- Anti A+B, Anti D
- Globules rouges tests dilués à 5-10% A, B et O
- pipette Pasteur,
- plaque de verre ou d'opaline dégraissée
- Rhésuscope

Mode opératoire

- Tracer votre plaque en 8 colonnes : Anti A, Anti B, Anti AB, Anti D, GR A, GRB, GRO, Autotest
- Disposer d'abord les réactifs (antisérums et globules tests), une goutte de chaque sur la case correspondante
- Disposer ensuite d'abord le sérum du patient, puis les culots globulaires dans les cases correspondantes (voir tableau III ci-dessous)
- Mélanger les deux gouttes de chaque case en utilisant le fond d'un tube à essai. Prendre soin d'essuyer le tube entre deux mélanges. Le mélange doit aboutir à un cercle de 3-5 cm de diamètre.
- Agiter délicatement pendant une minute par mouvement de rotation horizontale la plaque de groupage pour continuer le mélange les deux gouttes. Laisser reposer la plaque 1 minute. Des agglutinations apparaissent.

32

Interprétation

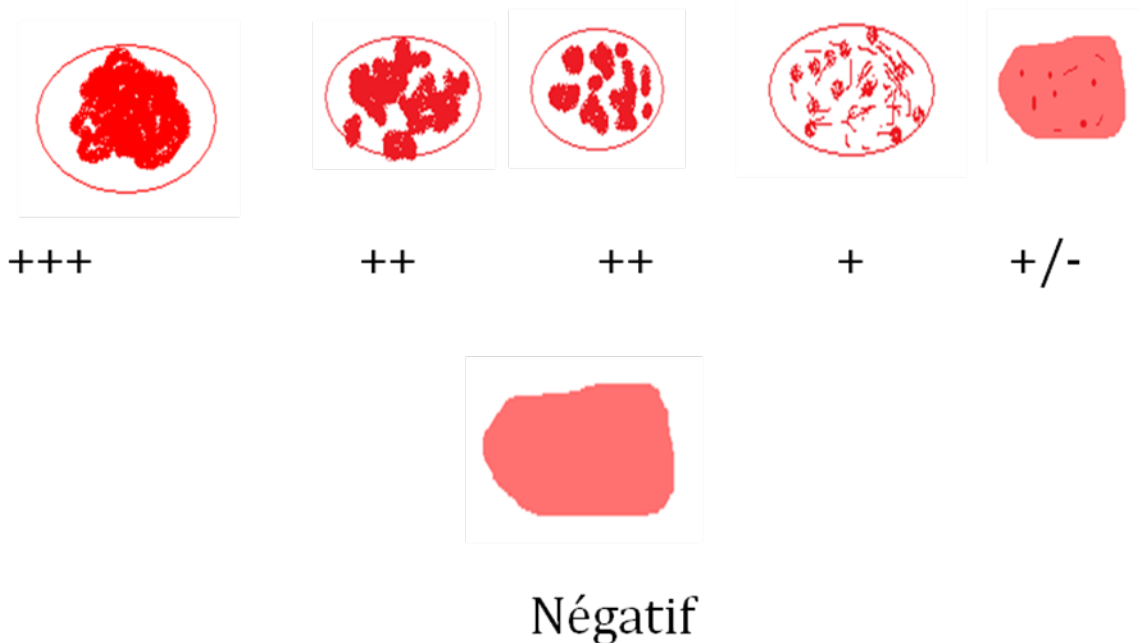


Figure 15 : Intensité des agglutinations

Ce tableau représente le résultat des agglutinations et l'interprétation des groupes

Epreuve de Beth Vincent Globules rouges du sujet				Epreuve de Simonin Sérum du sujet			Résultat
Sérum test Anti A	Sérum Test Anti B	Sérum test Anti AB	Sérum Test anti D	GR connu A	GR connu B	GR Connu O	Groupe Sanguin
+	-	+	+	-	+	-	A positif
-	+	+	+	+	-	-	B positif
-	-	-	+	+	+	-	O positif
+	+	+	+	-	-	-	AB positif
+	-	+	+	-	+	-	A négatif
-	+	+	+	+	-	-	B négatif
-	-	-	+	+	+	-	O négatif
+	+	+	+	-	-	-	AB négatif

Tableau III : Interprétation des groupes sanguins