

### **TP5 : ETUDE D'UN FROTTIS SANGUIN**

Le sang humain contient différents éléments. On retrouve :

- **Les globules rouges (ou hématies) :** Ces cellules contiennent une protéine importante, l'hémoglobine, qui a pour fonction principale de transporter l'oxygène. On en retrouve en moyenne,  $\approx 4 \text{ à } 6 \text{ millions / } \mu\text{L (mm}^3\text{) de sang}$ . A titre indicatif, chez l'Homme il y'a :  $4,5 - 6,0 \text{ millions / } \mu\text{L}$  et chez la Femme il y'a :  $4,0 - 5,2 \text{ millions / } \mu\text{L}$ .
- **Les globules blanc (ou leucocytes) :** Ces cellules interviennent dans la défense de l'organisme (immunité). Les leucocytes constituent un vaste groupe composé de différentes cellules ayant des aspects caractéristiques. On en retrouve en moyenne,  $\approx 4\,000 \text{ à } 10\,000 / \mu\text{L de sang}$ .
- **Les plaquettes (ou thrombocytes) :** Ce sont des éléments de petite taille jouant un rôle important dans les mécanismes de coagulation. On en retrouve en moyenne,  $\approx 150\,000 \text{ à } 400\,000 / \mu\text{L de sang}$ . Le sang est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme, ainsi une quelconque modification des paramètres sanguins quantitatifs et qualitatifs traduit un dysfonctionnement dans l'organisme. La réalisation d'analyses sanguines de contrôle est donc extrêmement importante : c'est pourquoi c'est une des premières étapes d'un diagnostic médical. Le sang ne peut pas être étudié directement. En effet,
  - ✓ le sang laissé à l'air libre coagule.
  - ✓ les hématies sont trop nombreuses pour être comptées directement.
  - ✓ les différents leucocytes sont difficiles à distinguer.
- **Les études sanguines passent donc par des techniques adaptées :**
  - ✓ prélèvement du sang avec un anticoagulant.
  - ✓ numération des cellules après dilution, sur des lames spéciales de comptage. « Thoma » ou « Malassez ».
  - ✓ coloration des cellules pour distinguer les différents leucocytes.

→ **Coloration de May Grünwald et Giemsa (MGG)**

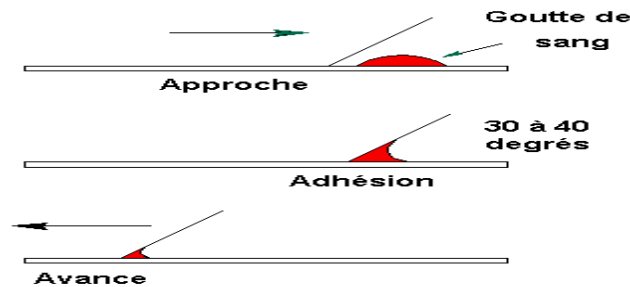
#### **1. Préparation du Frottis Sanguin**

##### **a) Matériel**

- ✓ Lancettes ou aiguilles stérilisées
- ✓ lames à microscope
- ✓ Alcool éthylique ou méthylique à 70 %
- ✓ Eau distillée
- ✓ Colorant Giemsa
- ✓ Récipients peu profonds ou boîtes de Pétri
- ✓ Microscope avec une capacité grossissante d'au moins 100 fois.

**b) Exécution du frottis :** Déposez une gouttelette de sang près de l'extrémité d'une lame. figure 1, mettez l'extrémité d'une seconde lame en contact avec la gouttelette et laissez cette dernière s'incliner. L'angle entre les deux lames doit être de  $30 \text{ à } 40^\circ$ . Poussez maintenant vers la gauche. Le frottis devrait couvrir près de la moitié de la lame. Il est important que le sang ne soit pas en quantité excessive, sinon **les globules rouges** pourraient cacher les **leucocytes**. Ainsi, si

vous parvenez à faire dans votre frottis une transition graduelle de l'épais vers le mince, vous devriez arriver à une zone où les cellules sont réparties de manière satisfaisante. **Un bon étalement de la goutte de sang** donne une meilleure observation.



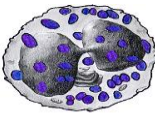
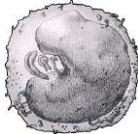
**Figure 1 : Comment préparer un frottis sanguin**

**c) Fixation et Coloration :** Il faut fixer le frottis avant la coloration. Cette opération entrave le gonflement des cellules, qui demeurent intactes une fois colorées. Une technique de fixation simple et efficace est de tremper le frottis pendant de trois à cinq minutes dans un récipient contenant de l'alcool éthylique ou méthylique à 70 %. On utilise généralement le **colorant Giemsa**. Il s'agit d'un mélange de colorants constitué à partir du bleu de méthylène et de l'éosine. Pour une coloration, utilisez une lame comportant un frottis fixé et séché. Couvrez entièrement la lame avec de gouttes de colorant (à peu près 16 mn), en renouvelant le colorant environ quatre fois. Rincez ensuite la lame avec l'eau distillée. Laissez l'eau s'écouler et la lame sécher. Votre frottis est maintenant prêt pour l'observation, Un grossissement de 100 fois suffit pour vous permettre d'observer et identifier les différents types de cellules. Vous pouvez les examiner avec un objectif à sec ou en appliquant la technique à l'huile d'immersion.

#### **Objectif du TP :**

Observer un frottis sanguin coloré au grossissement x 100, et repérer sur ce frottis les différentes cellules sanguines. Pour cela s'aider de la figure ci-dessous consignant les aspects des différentes cellules colorées.

**Dessiner les différents éléments sanguins. Respecter la taille et la forme (noyau) des différentes cellules.**

|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |  |  |
| Hématie<br>Erythrocyte                                                              | Neutrophiles                                                                        | Eosinophiles                                                                        | Basophiles                                                                          | Lymphocytes                                                                           | Monocytes                                                                             |
| Diamètre=7,5 µm                                                                     | Dia=15 µm                                                                           | Dia=15 µm                                                                           | Dia= 13 à 15 µm                                                                     | Dia= 10 à 15 µm                                                                       | Dia= 20 à 30 µm                                                                       |