

TP 4 :**PREPARATION DU FROTTIS SANGUIN****1. Présentation**

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, 5.10^{12} / litre de sang.

- **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, 7.10^9 / litre 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, 2.10^{11} / litre 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.

Contrairement à la plupart des préparations qui sont observables directement entre lame et lamelle, 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.
- coloration des cellules pour distinguer les différents leucocytes.

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

2. 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 200 fois

b) Saignée

Nettoyez votre doigt. Avec la lancette stérile, Faire une légère lésion, Entre-temps, gardez le matériel nécessaire à portée de la main et à l'abri de la poussière, en particulier les lames de microscope propres.

c) Exécution du frottis

Déposez une gouttelette de sang près de l'extrémité d'une lame. Conformément à la **figure 1**, mettez l'extrémité d'une seconde lame en contact avec la gouttelette et laissez cette dernière s'incliner également derrière adhérer derrière la lame. L'angle entre les deux lames doit être de **30 à 40** degrés. Poussez maintenant vers la gauche dans un mouvement fluide et rapide. 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.

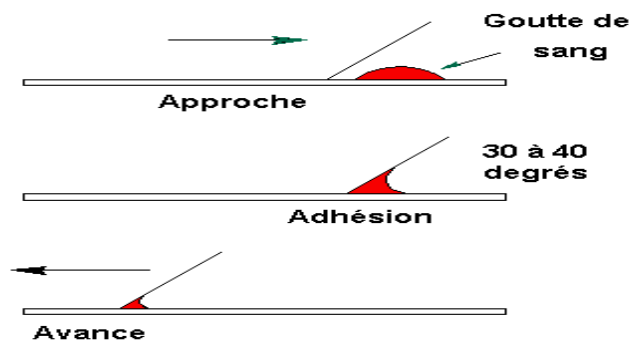


Figure 1 : Comment préparer un frottis sanguin

d) 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 %.

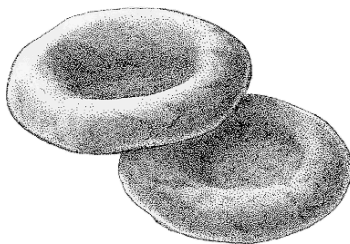
On utilise généralement le **colorant Giemsa**. Il s'agit d'un mélange de colorants constitué à partir du bleu de méthylène et de l'éosine.

Pour une coloration, utilisez une lame comportant un frottis fixé et séché. Couvrez entièrement la lame avec de gouttes de colorant. Colorez pendant à peu près 16 minutes, en renouvelant le colorant environ quatre fois. Rincez ensuite la lame avec l'eau distillée à la température ambiante. Laissez l'eau s'écouler et la lame sécher.

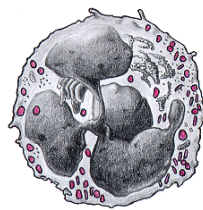
Votre frottis est maintenant prêt pour l'observation, Un **grossissement de 100 fois** suffit pour vous permettre d'observer et identifier les différents types de cellules. Si vous utilisez un grossissement plus puissant vous verrez mieux les détails des cellules. Vous pouvez les examiner avec un objectif à sec ou en appliquant la technique de l'immersion à l'huile.

e) Objectif du TP

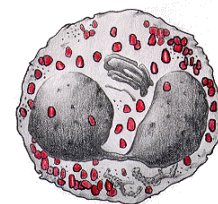
Observer un frottis sanguin coloré au **grossissement x 100**, et repérer sur ce frottis les différentes cellules sanguines. Pour cela s'aider de la figure ci-dessous consignant les aspects des différentes cellules colorées.



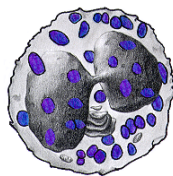
Erythrocytes



Neutrophiles



Eosinophiles



Basophiles



Lymphocytes



Monocytes

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