Université Mohammed Khider

Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

Module : Biologie animale

TP n° 2

**Le tissu sanguin**

**Introduction**

 Le sang est une suspension de cellules baignant dans un liquide, le plasma. Toutes les cellules sanguines se forment dans la moelle osseuse rouge. On distingue 3 groupes de cellules sanguines : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Le plasma transporte ainsi des autres éléments nutritifs (glucose…), des déchets issus du métabolisme, etc.

L’observation microscopique des différentes cellules du sang nécessite une préparation préalable d’un frottis sanguin, cet examen sanguin permet d’évaluer l’aspect et le nombre des cellules sanguines.

Pour distinguer les différents types de cellules, une technique de coloration est ensuite utilisée. Celle-ci est généralement la coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG), parfois appelée coloration de Pappenheim.

La coloration de May-Grünwald-Giemsa repose sur l’action complémentaire de deux colorants neutres et sur l’affinité des éléments cellulaires pour des colorants acides (éléments acidophiles) ou basiques (éléments basophiles). Ces deux colorants sont solubilisés dans le méthanol et sont inactifs dans cette solution : c’est l’adjonction de l’**eau** qui leur donne leur **pouvoir colorant** : les sels sont alors **dissociés** en colorant **acide** (éosine) et en colorant **basique** (bleu de méthylène ou azurs de méthylène).

Une fois coloré, le frottis sanguin est alors analysé au microscope optique.

* **Les objectifsde ceTP**
* L’étudiant va réaliser un frottis sanguin.
* L’étudiant va observer un frottis sanguin coloré, et va repérer sur ce frottis les différentes cellules sanguines: globules rouges (hématies), globules blancs (leucocytes) et plaquettes (thrombocytes).
* Il va réaliser un dessin légendé du champ microscopique observé.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Cellule** | **Forme** | **Aspect au microscope optique après coloration** | **Particularités**  |
| **Globules rouges****(**7 **μm)** | ronde |  | Cellules : **- sans noyau** - en forme de disques biconcaves  |
| **Globules blancs** | **Granulocyte****Neutrophile****(10-15 μm)** | arrondie |  | Cellules : - à noyau plurilobé - à cytoplasme contenant de nombreuses granulations parfois très colorées et masquant le noyau.  |
| **Granulocyte****Eosinophile****(10-15 μm)** | arrondie |  |
| **Granulocyte****basophile****(10-12 μm)** | arrondie |  |
| **Lymphocyte****(7-15 μm)** | arrondie |  | Cellules : - à gros noyau sphérique et très colorable - sans granulations cytoplasmiques.  |
| **Monocyte****(15-30 μm)** | irrégulière |  | Cellules : - à noyau clair en forme d’ haricot - fines granulations.  |
| **Plaquettes (3-5 μm)** | Irrégulière (discoïde) |  | -Sans noyau-très nombreuses -violet |

Pour cela s’aider du tableau ci-dessous consignant les aspects et les caractéristiques des différentes cellules colorées.

* **Réalisation d’un frottis sanguin**

**1Matériel et réactifs :**

* Lames propres et dégraissées
* Pipette pasteur plastique
* Gants
* Produit biologique : Sang fraîchement recueilli sur EDTA
* Colorants : May **Grünwald** : éosinate de bleu de méthylène/ **Giemsa** : éosinate d’azur de méthylène
* Ethanol pur
* Pissette d'eau neutre
* Huile à immersion (huile de paraffine)

**2 Mode opératoire :**

1. **Exécution du frottis**
* Un échantillon de sang prélevé dans une veine du bras ou par piqûre au bout du doigt
* Homogénéiser le sang en agitant le tube(tube EDTA)
* Plonger la pipette plastique dans le sang et aspirer quelques gouttes
* Déposer une petite goutte sur l’une des extrémités de la lame 1
* Placer la lame 2, inclinée à 45°, contre la goutte de sang, jusqu’à temps que le sang s’étale par capillarité sur l’ensemble de la largeur de la lame 2.
* Faire alors glisser la lame 2, rapidement et sans à-coup sur toute la longueur de la lame 1 de façon à étaler le sang (ne pas répéter l’opération plusieurs fois sur la même lame).



* Sécher rapidement à l’air.
1. **Fixation du frottis**

Si vous colorez le frottis avant de l'avoir fixé, les cellules exploseront en raisondu choc osmotique. Pour éviter cela, il faut fixer le frottis avant la coloration.

* Placer la lame du frottis sur un support horizontal au-dessus d’un bac de coloration.
* Verser sur la lame quelques gouttes d’éthanol de façon à recouvrir complètement le frottis.
* Laisser agir 2 à 3 minutes.
1. **Coloration du frottis**

***1 - Coloration au May - Grünwald***

* Ajouter autant de gouttes d’eau neutre que de gouttes de colorantMay-Grünwaldpur (dilution ½)(Ne préparer que la quantité nécessaire pour une journée).
* Verser sur la lame quelques gouttes de May-Grünwald dilué½de façon à recouvrir complètement le frottis
* Laisser agir 2 à 5 minutes.
* Préparer la dilution du colorant de Giemsa pendant ce temps(Ne préparer que la quantité nécessaire pour une journée).
* Egoutter le colorant puis on va ajouter le Giemsa.

***2 - Coloration au Giemsa***

Préparer la dilution au 1/10ème du colorant de Giemsa(1 volume de l’eau neutre + 9 volume de colorant Giemsa pur) pendant les 5 minutes précédentes :

* Verser sur la lame quelques gouttes de Giemsadilué 1/10ème de façon à recouvrir complètement le frottis
* Laisser agir 20 minutes (coloration lente).
* Rincer sous un jet d’eau neutre.
* Ne pas incliner la lame car il resterait un dépôt de colorant sur l’étalement.
* Laisser de l’eau propre sur la lame pendant 2 à 3 minutes pour obtenir une coloration différentielle.

**Remarque : s’il n y a pas l’eau neutre au labo on la remplace par l’eau de robinet.**

1. **Séchage**

Laisser égoutter l’eau et faire sécher la lame à l’air entre 10 à 20 mn, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec du papier absorbant.

Études Cytologiques : obj.x100 à l’immersion(huile de paraffine).

**Références bibliographique :**

ABDELKARIM EL BEKKALI, thèse « les techniques de coloration en hématologie » UNIVERSITÉ MOHAMMED V-RABAT, FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE – RABAT. 2016.

Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical, OMS 1982.