

TP N°: 04
Etude microscopique de la cellule animale

PARTIE .II DE TP : Le frottis sanguin et coloration MGG

3. REALISATION ET COLORATION D'UN FROTTIS SANGUIN

Introduction : Le sang est un liquide biologique vital qui circule continuellement dans les vaisseaux sanguins et le cœur.

- ✓ **Érythrocytes** ou **hématies** ou **globules rouges** (à peu près 99 %). Elles ne possèdent ni noyau ni organites chez les Mammifères. Elles contiennent l'hémoglobine ($\frac{1}{3}$ des composants du cytoplasme)
- ✓ **Leucocytes** ou **globules blancs** (0,2 %), qui font partie du système immunitaire et permettent la destruction des agents infectieux.
 - Les granulocytes ou polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) ;
 - Les lymphocytes ;
 - Les monocytes.
- ✓ **Thrombocytes** ou **plaquettes** (0,6 - 1,0 %), responsables de la formation du clou plaquettaire précédant la coagulation sanguine. Ils ne contiennent pas de noyau

Ces éléments figurés constituent 45 % du sang. Les 55 % restants constituent le plasma sanguin, un liquide jaunâtre qui est la phase liquide dans laquelle sont en suspension les éléments figurés.

3.1 Prélèvement :

- Déposer une goutte de sang à 1cm de l'extrémité de la lame
- Faire glisser la seconde lame à étalement inclinée de 45° vers la goutte de sang jusqu'à la toucher
- Laisser s'étaler la goutte de sang le long de l'arête de la lame à étalement
- Glisser la lame en tirant ou en poussant (tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'autre extrémité de la lame) ; le mouvement doit être rapide, régulier, sans trop appuyer, en maintenant la même inclinaison
- Sécher le frottis par agitation dans l'air

3.2 Coloration par MGG (May-Grünwald Giemsa) :

La coloration de **May-Grünwald Giemsa**, est une méthode de coloration utilisée notamment en hématologie pour différencier les cellules du sang lors des préparations cellulaires (cytologie).

- ✓ **Principe de la coloration :** Repose sur l'action combinée de deux colorants neutres :

- **Le May-Grünwald**, contenant un colorant acide, l'**éosine**, et un colorant basique, le **bleu de méthylène**.
- **Le Giemsa**, contenant lui aussi de l'**éosine**, et un colorant basique, l'**azur de méthylène**

Ces deux colorants sont en solution dans l'**alcool méthylique** sous forme inactive. Lors de l'addition d'eau, les sels précipitent (éosinate de méthylène et azur de méthylène) et se fixent sélectivement sur les constituants cellulaires.

- Les constituants cellulaires acides, fixeront électivement les colorants basiques. Ces éléments sont qualifiés de **basophiles** (ADN, cytoplasme des lymphocytes riche en ARN).

- Les constituants cellulaires basiques, fixeront électivement les colorants acides. Ces éléments sont qualifiés d'**acidophiles** ou d'**éosinophiles** (cas de l'hémoglobine, protéine basique contenue dans les hématies et des granulations des granulocytes éosinophiles).
- Les constituants fixant les deux types de colorants sont dits **neutrophiles**.

3.3 Résultat de coloration :

- Les noyaux sont de bleu à violet-noir
- Les hématies sont beige-rosé,
- les granulations des granulocytes éosinophiles sont orangées.
- Les granulations des granulocytes neutrophiles sont violet-lilas.
- Les granulations des granulocytes basophiles sont bleu-noir
- Les granulations des grands lymphocytes sont pourpres.

3.4 Technique de coloration de MGG :

Etapes	Manipulation	Durée d'action
1. Coloration au May-Grünwald	<ul style="list-style-type: none"> • Placer la lame du frottis sur les barrettes de support horizontal d'un bac de coloration • Recouvrir le frottis de 15 gouttes de colorant 	3 minutes
	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 15 gouttes d'eau distillée 	2 minutes
2. Coloration au Giemsa	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminer le May-Grünwald sous un faible courant d'eau distillée • Déposer 2 gouttes de Giemsa, puis 20 gouttes d'eau distillée 	10 minutes
3. Séchage	<ul style="list-style-type: none"> • Rincer par un faible jet d'eau distillée • Laisser sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure avec du papier essuie-tout 	Au moins 5 minutes

3.5 Observation : Dessiner, mettre un titre et une légende et décrivez vos observations