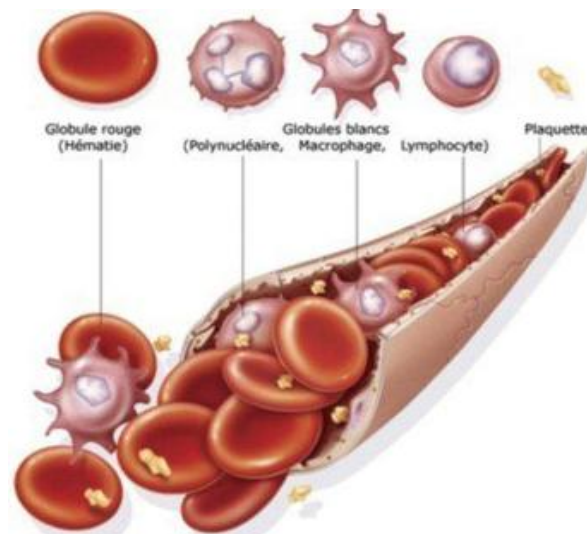


Filière Sciences de la Vie (Semestre 4)

Module : Physiologie animale

Travaux pratiques de Physiologie Animale



Pr. AGNAOU M., Pr. LEFRERE L., Pr NADIR M.

Année universitaire 2019-2020

NUMÉRATION GLOBULAIRE ET LA FORMULE SANGUINE

Introduction

Le sang est un liquide rouge biologique qui circule à travers les veines et les artères sous l'impulsion du cœur. Un individu contient de 5 à 7 litres de sang dans son corps, ce qui représente environ 8% de son poids total.

Le sang est constitué de plasma, de globules rouges (érythrocytes ou hématies), de globules blancs (leucocytes) et de plaquettes (thrombocytes). Il distribue l'oxygène, les hormones et les nutriments à toutes les cellules, les tissus et les organes du corps et par la suite, les débarrasser de leurs déchets. Le sang joue aussi un rôle dans la défense immunitaire.

L'hémogramme (ou numération de la formule sanguine) est un examen qui donne des informations sur les éléments contenus dans le sang tels que les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Il consiste à compter ces différents éléments cellulaires. Il permet de révéler un grand nombre de pathologies : anémie, problème de coagulation, infections virales...

Objectifs

- Détermination de la formule sanguine (déterminer le pourcentage de chaque type de globules blancs).
- Réalisation de la numération sanguine (déterminer le nombre des globules rouges et blancs contenus dans 1 mm³ de sang).
- Déterminer le groupe sanguin.

Principe

- Pour la détermination de la formule sanguine : le principe consiste à déterminer le pourcentage de chaque catégorie de leucocytes à savoir les mononucléaires et polynucléaires.
- Le principe de la numération globulaire consiste à mettre une goutte du sang dans l'hématimètre (cellule de Malassez) et compter dans le quadrillage ayant le volume déterminé, le nombre des globules rouges et le nombre des globules blancs.
- Le groupage sanguin se base sur la présence d'antigènes globulaires A, B, les deux A et B ou leur absence (ni A ni B), se qui caractérise les 4 groupes sanguins du système ABO. L'identification de ces antigènes globulaires en utilisant du sérum-test permet de déterminer les groupes sanguins grâce à la réaction antigène-anticorps reflétant un état d'agglutination vue à l'œil.

Protocole expérimental

I- Détermination de la formule sanguine :

Travail à réaliser : **Frottis sanguin**

- Mettre une goutte du sang dans une lame et racler à l'aide d'une lamelle
- Laisser sécher
- Mettre une goutte du colorant (Bleu de Méthylène)
- Couvrir avec une lamelle
- Observer au microscopique les différents globules blancs
- Compter les différentes catégories de leucocytes

Le comptage sera effectué dans 5 champs choisis au hasard au niveau de la lame et les résultats doivent être exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de cellule.

II- La numération globulaire :

Dans la présente manipulation, nous sommes amenés à utiliser la cellule de Malassez comme Hématimètre (Voir figure 1) pour le comptage aussi bien pour les globules rouges que les globules blancs. Pour chaque type de globules, des dilutions du sang sont nécessaires à effectuer par des pipettes spécifiques (pipette Potain figure 2). La pipette utilisée pour les hématies contient une boule rouge (dilution 1/100) alors que celle des leucocytes contient une boule blanche (dilution de 1/10).

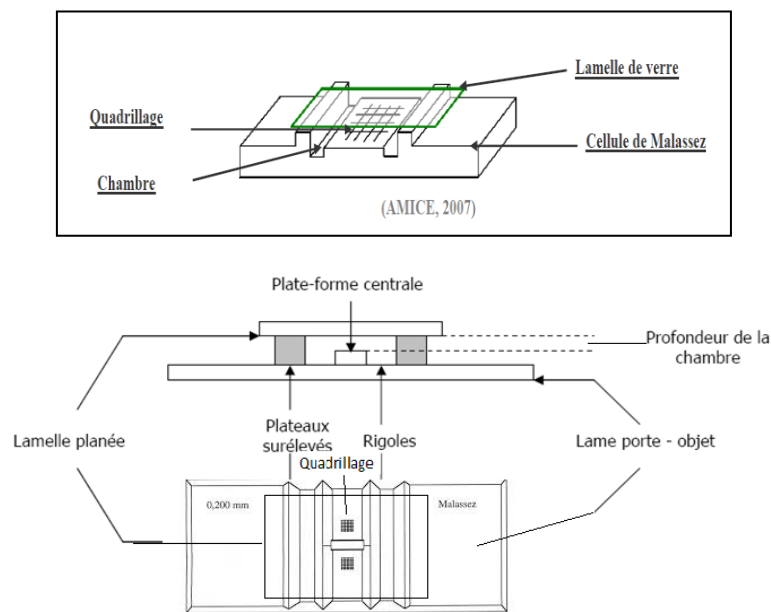


Figure 1: Cellule de Malassez

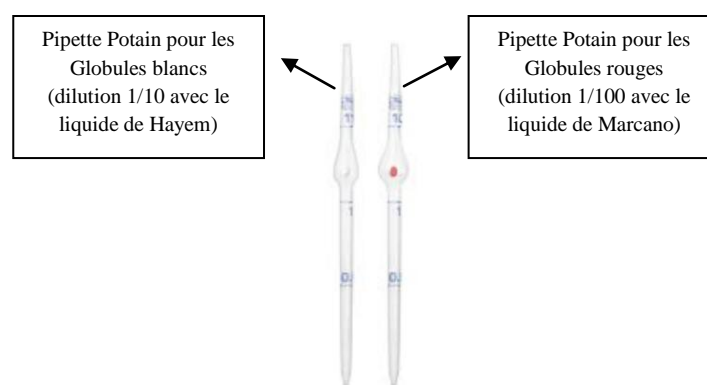


Figure 2 : Pipette Potain

Pour le comptage il faut dénombrer toutes les cellules situées à l'intérieur des carrés ou des rectangles. Quant aux cellules situées sur les lignes il faut compter comme suit (figure 3) :

- Les cellules situées sur la ligne de gauche et non pas celles situées sur la ligne de droite ou l'inverse (il faut choisir).
- Les cellules situées sur la ligne de haut et non pas celles situées sur la ligne du bas ou l'inverse (il faut choisir)

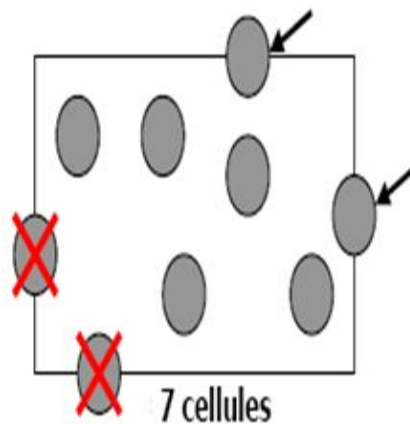


Figure 3 : Mode de comptage des globules dans la cellule de Malassez

Travail à réaliser :

1- Numération des globules rouges :

- Prélever du sang qui est dans le verre à montre jusqu'au trait de la pipette Potain en faisant plonger la pointe de la pipette (aspirer doucement pour ne pas former les bulles d'air ;
- Essuyer la pointe de la pipette à l'aide du papier absorbant et aspirer le liquide de dilution (liquide de Marciano) préalablement préparé jusqu'au trait 101 ;
- Evacuer le contenu de la tige de la pipette et déposer une goutte du sang dilué que vous avez préparé dans le quadrillage de Malassez ;
- Placer la lamelle sur la cellule de Malassez ;
- Vérifier l'homogénéité de la préparation avant de commencer le comptage des globules rouges dans une vingtaine de carrés répartis dans au moins 4 rectangles ;
- Calculer le nombre des globules rouges par mm³ en tenant compte du nombre de carrés de la cellule de Malassez et de la dilution réalisée.

Cellule de Malassez

- La cellule complète mesure 1 mm³.
- Elle est constituée de 100 rectangles répartis en 10 bandes dans le sens horizontal et 10 bandes dans le sens vertical ; 25 de ces rectangles sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage.
- Vérifier avec un faible grossissement (objectif 10) que la répartition est homogène ; (sinon laver la cellule, la sécher, bien agiter le mélangeur et remplir à nouveau la chambre hématimétrique).
- Passer à l'objectif 40 et compter les hématies dans 1 rectangle (de 20 carrés chacun).

$$N \times 100 \times 200 = N \times 20\,000 = \text{nombre de globules rouges/mm}^3$$

2- Numération des globules blancs :

- Prélever le sang avec la pipette Potain au 1/10
- Aspirer le liquide de dilution préalablement préparé (liquide de hayem) jusqu'au trait 11. Ce liquide décolore les globules rouges et colore les globules blancs. Mélanger par une faible agitation ;
- Compter les globules blancs non par carré, mais par rectangle de la cellule de Malassez ;
- Calculer le nombre des globules blancs par mm^3 en tenant compte du nombre des rectangles de la cellule de Malassez et de la dilution réalisée.

Cellule de Malassez

- La cellule complète mesure 1 mm^3 .
- Elle est constituée de 100 rectangles répartis en 10 bandes dans le sens horizontal et 10 bandes dans le sens vertical ; 25 de ces rectangles sont subdivisés en 20 petits carrés pour faciliter le comptage.
- Vérifier avec un faible grossissement (objectif 10) que la répartition est homogène ; (sinon laver la cellule, la sécher, bien agiter le mélangeur et remplir à nouveau la chambre hématimétrique).
- Passer à l'objectif 40 et on compte 1 bandes : soit N le résultat du comptage
- Le résultat final est : $N \times 10 \times 20$ soit $N \times 200$ leucocytes par mm^3

III- Détermination du groupe sanguin :

Le groupe sanguin est déterminé en fonction des substances présentes à la surface des globules rouges, appelées antigènes. Les groupes sanguins sont regroupés en systèmes. Dans le système ABO, il existe quatre groupes sanguins possibles : A, B, O et AB. Dans le système Rhésus Rh, la présence ou l'absence de substance « D » à la surface du globule rouge détermine si on est Rh positif (+) ou négatif (-).

Les sérums anti-A, anti-B, anti-AB et anti-Rh responsables de l'agglutination sont utilisés pour rechercher les antigènes globulaires.

Travail à réaliser :

- Désinfecter la pulpe du doigt du donneur volontaire avec de l'alcool et piquer à l'aide d'une épingle stérile ;
- Préparer des lames propres sur lesquelles il faut déposer 4 gouttes du sang ;
- Déposer une goutte de chaque type de sérum sur les gouttes du sang et mélanger en utilisant une baguette en verre ;
- Observer s'il y a agglutination ou pas et déduire le groupe sanguin du donneur.

Remarque : préparez bien le TP, vous aurez un contrôle à la fin de la séance