

TP contrôle de BCM n°1

BTS Bio Analyses et contrôles 2ème année

1. Numération en hématimètre des hématies dans du sang humain

Vous disposez :

- de 500 μ L de sang humain d'un homme (Norme 4,50 à 5,50.10¹² hématies par litre de sang),
 - d'un hématimètre de Malassez (volume total : 1 μ L, 100 rectangles élémentaires),
 - de liquide de Marcano (50g.L⁻¹ sulfate de sodium, 0,37% formaldéhyde).
- 1) Réaliser une dilution appropriée de l'échantillon sanguin de façon à compter 50-250 cellules dans un rectangle élémentaire de la cellule. Justifier par le calcul la dilution choisie. Expliciter la réalisation de la dilution par un schéma simple.
 - 2) Vérifier l'homogénéité de la cellule de Malassez et compter sur 4 à 5 rectangles. Calculer alors la concentration en hématies de l'échantillon et comparer la aux normes en vigueur.

2. Test de viabilité d'une suspension de levure Saccharomyces boulardii

1) Théorie

A partir de la fiche distribuée (Trypan Blue de Mediatech Technical Information), expliquer :

- principe d'un test de viabilité,
- le rôle du Bleu Trypan,
- la différence observée entre une cellule morte et une cellule vivante, en justifiant la réponse.
- donner une formule plus explicite que celle fournie au point 6 de la fiche.

2) Réalisation pratique :

On cherche à vérifier la viabilité d'une suspension de Saccharomyces boulardii dans une préparation médicamenteuse d'Ultra Levures. Pour cela, on a mis en suspension le contenu d'une gélule d'Ultra Levures (50 mg) dans 10mL d'eau physiologique.

Vous disposez :

- de 500 μ L de suspension de levure,
 - d'un flacon d'eau physiologique stérile,
 - d'une solution de Bleu Trypan à ?????????? %.
- Réaliser une dilution au 1/200 de la suspension de levures et bien homogénéiser. Puis réaliser une dilution au 9/10 en Bleu Trypan. Expliquer, sur le compte rendu, par des schémas simples, la réalisation de ces deux dilutions.
 - Vérifier l'homogénéité de la cellule de Malassez et compter les levures sur une demi cellule. Calculer alors :
 - la viabilité de la suspension,
 - la quantité initiale de levures vivantes.
 - Comparer et commenter les résultats obtenus avec les données de la notice de l'Ultra levures : une gélule contient 5,00.10⁹ levures vivantes.

3. Réalisation de la coloration des réticulocytes par le Bleu de Crésyl Brillant

- Réaliser une coloration des réticulocytes à partir de l'échantillon de sang.(cf. Protocole joint)
- Présenter à l'examineur un réticulocyte et réaliser un schéma annoté de l'observation (NB : attention de ne pas confondre les réticulocytes avec des leucocytes très riches en AN)

Observation des réticulocytes

Le réticulocyte est une hématie jeune; il représente la fin de la maturation de la lignée érythrocytaire. Élaboré dans la moelle osseuse, il est libéré dans le sang. La recherche et la numération des réticulocytes n'est réalisée qu'en cas d'anémie. Elle permet d'apprécier l'efficacité de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse et constitue un élément de diagnostic intéressant.

1. Principe de la mise en évidence des réticulocytes

Le réticulocyte se différencie d'une hématie adulte

- par un diamètre légèrement plus grand
- par la présence dans son cytoplasme d'un reste d'ARN.

Il n'est pas saturé en hémoglobine et peut apparaître polychromatophile sur frottis coloré de MGG.

Pour le distinguer parfaitement d'une hématie mature, on utilise une coloration spéciale avec un colorant basique: le bleu de Crésyl brillant. Ce colorant précipite et colore l'ARN résiduel en un réseau de petites granulations ou filaments constituant la substance granulofilamenteuse.

C'est une coloration supra-vitale, sans fixation préalable.

La densité des granulations diminue au fur et à mesure que le réticulocyte mûrit. Moins de deux jours après sa libération dans la circulation, le réticulocyte perd sa substance basophile et se transforme en hématie.

2. Technique

2.1. échantillon sanguin

Sang veineux prélevé sur EDTA ou oxalate.

2.2. préparation du Bleu de crésyl brillant

Il est soluble dans de l'eau physiologique additionnée d'un anticoagulant. Composition

- | | |
|---|--------|
| - bleu de Crésyl brillant | 10 g |
| - citrate de sodium | 4 g |
| - solution de NaCl à 8,5g.L ⁻¹ | qsp 1L |

2.3. coloration

- Dans un tube à hémolyse, introduire 100µL de solution colorante.
- Ajouter le même volume de sang.
- Mélanger, boucher et laisser en contact 15 min à 37°C (bain-marie).
- Homogénéiser la suspension et réaliser quelques frottis réguliers et minces.
- Observation du frottis coloré à l'immersion.

Les hématies sont colorées plus ou moins intensément en bleu verdâtre.

Les réticulocytes, légèrement plus gros, se distinguent des hématies matures par leur substance granulofilamenteuse colorée en bleu foncé, violet.

Trypan Blue

Trypan blue is the most common stain used to distinguish viable cells from nonviable cells; only nonviable cells absorb the dye and appear blue and may also appear asymmetrical. Conversely, live, healthy cells appear round and refractile without absorbing the blue-colored dye. The use of this stain, however, is time- sensitive. Viable cells absorb Trypan blue over time, and can affect counting and viability results. Make dilutions just prior to counting to prevent viable cells from absorbing the stain, and thus appear non-viable.

In addition, trypan blue has a greater affinity for serum proteins than for cellular proteins. For cells cultured in high serum conditions, the background in the hemacytometer may be too dark. In this case, cells must be isolated from the serum. Simply centrifuge the cells and resuspend the cell pellet in a balanced salt solution or serum-free media prior to counting.

Procedure

1. Prepare a uniform cell suspension of the culture. Determine the number of cells per millileter and to be counted.

total number of cells using the following calculations:

2. Dilute a small sample of the cell suspension in 0.4% (w/v) Trypan blue. Other dilutions may be performed based on cell density of the suspension.

$$1:5 \text{ cells/ml} = \# \text{ of cells counted} \times 10^4 \times \text{dilution factor}$$

$$\# \text{ squares counted}$$

$$\text{total cells} = \text{cells/ml} \times \text{vol. of original cell suspension}$$

3. Center a cover glass over the hemacytometer. The percentage of viable cells can also be chambers. Fill one chamber with the cell dilution calculated using the following formula:

using a Pasteur pipette. The solution will pass under the cover glass by capillary action. Do not overfill. If the solution spreads into the two lateral grooves adjoining the grid table, clean the hemacytometer and repeat the application. If there are any bubbles in the solution covering the grid table, clean the hemacytometer and repeat the application.

$$\% \text{ Viability} = \frac{\# \text{ Viable Cells Counted}}{\text{Total \# Cells Counted}} \times 100$$

4. Place the hemacytometer on the stage of an inverted microscope and adjust focus using 100X magnification.

5. Use a hand-held counter to record cell counts in each of the four corner and central squares. Five squares (four corner and one center) are counted for a total of five squares. See Figure 1.

Important: Count squares touching the middle line of the triple line on the top and left of the squares. Do not count cells touching the middle line of the triple lines on the bottom or right side of the square.

