

TESTS DE GROUPES SANGUINS

Réf. 025 010

1. Objectif de l'expérience :

Ce kit permet à l'élève de réaliser des tests de détermination des groupes sanguins d'échantillons de sang simulés par agglutination.

2. Composition du kit :

Ce kit est conçu pour 10 groupes d'élèves.

Composition :

- Echantillons de contrôle simulés de sang A, B et O.
- Echantillons simulés de sang de groupes inconnus (patients P1, P2, P3 et P4),
- Sérum anti A et anti B,
- Pipettes de transfert,
- Plaques à microtitration,
- Microtubes,

Remarque :

Les échantillons de type AB seront préparés par l'enseignant juste avant la séance de TP.

3. Matériel complémentaires requis :

- Optionnel : micropipette automatique (5-50 µL) et pointes.

Stocker le kit à température ambiante

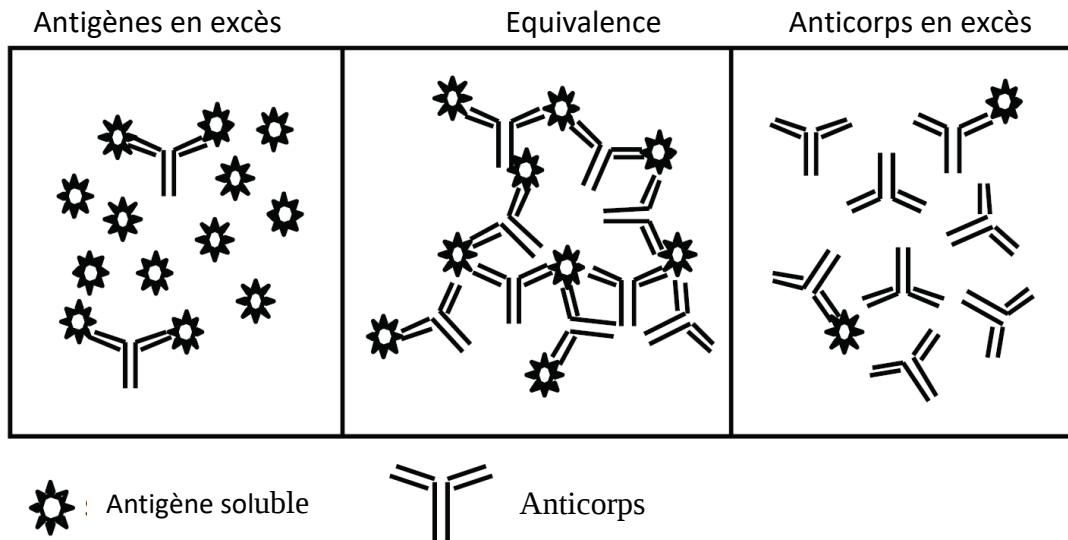
Ce kit ne contient pas de sang ou de produits sanguins

Les composants de ce kit sont conçus pour l'enseignement uniquement. Ils ne doivent en aucun cas être utilisés pour le diagnostic médical, l'usage de drogues. Ils ne doivent en aucun cas être administrés à des humains ou animaux.

4. Rappels théoriques

Des réactions de précipitation entre des antigènes solubles et des anticorps peuvent être observées à l'œil nu si ces deux composants sont présents en quantités équivalentes. Sous ces conditions, lorsque ni les antigènes ni les anticorps sont en excès, les complexes antigènes-

anticorps forment un vaste réseau et précipitent de manière visible à l'œil (diagramme ci-dessous).



La fixation d'un antigène sur un globule rouge est nommée agglutination. Le réseau visible antigène-anticorps formé est appelé agglutinat. En raison de son faible coût et de la facilité de détection de l'agglutinat, la réaction d'agglutination est utilisée de façon très fréquente en sérologie.

La caractérisation du groupe sanguin est un exemple de réaction d'agglutination très couramment utilisée. Les globules rouges présentent en leur surface des antigènes spécifiques, la réaction d'agglutination est appelée hémagglutination.

La caractérisation du groupe sanguin a de nombreuses applications médicales. La plus importante est la vérification (ou la détermination) du groupe sanguin avant toute transfusion sanguine pour éviter les accidents de transfusions.

Les groupes des donneurs et des receveurs sont testés ce qui permet avant la transfusion de s'assurer que le receveur puisse recevoir du sang compatible.

Les antigènes déterminant les groupes sanguins sont les protéines A, B et O. Elles sont appelées antigènes A B et O.

Il existe 4 combinaisons possibles liées à la présence des antigènes A et B en surface des globules rouges :

- **Groupe sanguin A :**
Seuls les antigènes A sont présents sur la surface des globules rouges.
- **Groupe sanguin B :**
Seuls les antigènes B sont présents sur la surface des globules rouges.
- **Groupe sanguin AB :**
Les antigènes A et B sont simultanément présents sur la surface des globules rouges.
- **Groupe sanguin O :**
Ni les antigènes A ni les B ne sont présents sur la surface des globules rouges.

Groupe sanguin	Antigène(s) sur les globules rouges
A	A
B	B
AB	A et B
O	ni A ni B

Les antigènes sanguins A et B sont communs à la population humaine, mais on les trouve également dans la nature comme chez les bactéries.

Lorsqu'un humain est exposé à des bactéries présentant le même groupe d'antigènes que ses globules rouges, son système immunitaire ne les reconnaît pas comme organisme étranger et aucune réponse immunitaire n'est produite contre elles.

En revanche, si les bactéries présentent des antigènes différents, le système immunitaire reconnaît les bactéries comme étrangères et produit des anticorps contre elles.

Ces sérums anticorps peuvent ensuite agglutiner les globules rouges d'individus présentant des groupes sanguins non compatibles.

Par exemple, des anticorps anti-A présents dans le sérum d'un individu vont agglutiner les globules rouges d'un autre individu présentant des antigènes A. De même des anticorps anti-B vont agglutiner des globules rouges portant des antigènes B.

Groupe sanguin	Antigène(s) sur les globules rouges	Anticorps dans le sérum
A	A	anti-B
B	B	Anti-A
AB	A et B	ni anti-A ni anti-B
O	ni A ni B	Anti-A et Anti-B

Le groupe sanguin O est communément appelé donneur universel, et le groupe AB receveur universel. En réalité aucune de ces appellations n'est correcte, il n'existe pas de donneur ni de receveur universel dans le cas de transfusion intégrale de sang. En effet, si l'on transfuse du sang de groupe O à un individu possédant un autre groupe sanguin, les anticorps anti-A et anti-B présents dans le sérum du sang de groupe O vont agglutiner les globules rouges du receveur portant les antigènes A et/ou B.

En réalité, du sang de groupe O est donneur universel seulement si uniquement les globules et non le sérum est transfusé. Pour cette raison seulement du sang du même groupe peut être transfusé à un receveur, bien qu'en raison de l'existence de sous types cette simplification ne soit pas non plus toujours valable.

A propos du sang et des groupes sanguins :

Le sang est un tissu conjonctif qui représente 8% de la masse d'un individu adulte. Il est constitué de cellules et de liquide. La partie liquide appelée plasma constituée d'eau à 90% représente 55 % du volume total du sang. Les constituants biologiques du plasma représentant 10 % en masse de ce dernier, contient des protéines, des sels dissous et des nutriments. Certaines de protéine présentes dans le plasma sont impliquées dans le processus de coagulation. Lorsque les protéines sont extraites du plasma, le liquide résultant est nommée sérum.

En résumé, le plasma est la partie liquide du sang, et le sérum est la partie liquide du sang coagulé.

Les 45% du sang restants sont constitués de cellules sanguines. On distingue 3 principaux types de cellules sanguines :

- les érythrocytes, appelées aussi globules rouges,
- les thrombocytes, appelées aussi plaquettes,
- les leucocytes, appelés globules blancs,

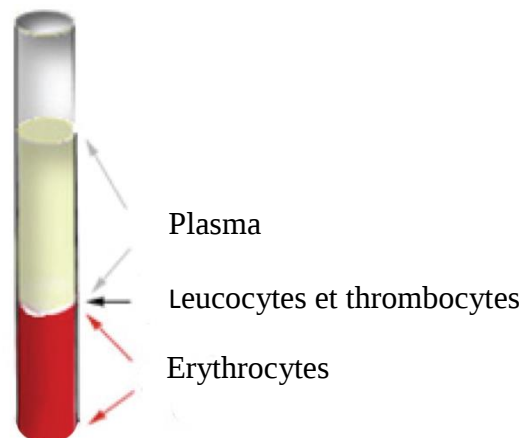
Ces trois types de cellules sont produits dans la moelle osseuse rouge à partir de cellules souches pluripotentes appelées hématocytoblastes. Des cellules pluripotentes sont capables de se différencier en plusieurs types de cellules. Les hématocytoblastes sont capables de se différencier en tous types de cellules sanguines. Environ un milliard de cellules sanguine sont produites chaque jour par un processus nommé hématopoïèse

Lorsque le sang est centrifugé, il se sépare en trois fractions (diagramme ci-dessous). LA fraction supérieure est le plasma, un liquide jaunâtre. Les deux couches inférieures sont constituées de cellules sanguines.

En contact avec le plasma se trouve une couche fine de couleur blanche nommée couche leuco-plaquettaire qui représente moins de 1% du sang total contient les leucocytes et les thrombocytes.

La couche inférieure est constituée de globules rouges et représente près de 45 % du sang total en masse.

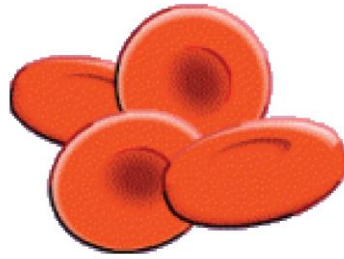
Sang centrifugé	
Plasma	= ~ 55%
Couche leuco-plaquettaire	= < 1%
Erythrocytes	= ~ 45%



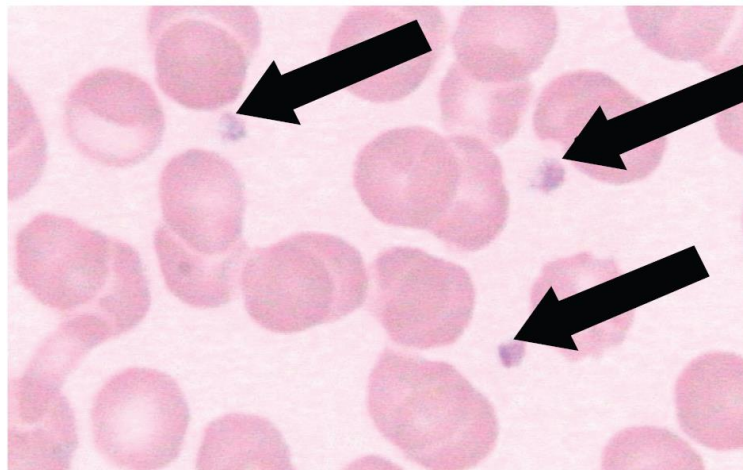
En comparant la couche centrale et la couche du fond, il est aisé de conclure que les érythrocytes (globules rouges) sont les cellules sanguines les plus nombreuses.

Le rôle de ces cellules est de transporter l'oxygène et dans une moindre mesure le dioxyde de carbone.

Un humain adulte de sexe féminin, possède entre 4,3 et 5,2 millions de globules rouges par microlitre de sang ; et un humain adulte de sexe masculin entre 5,1 et 5,8/. Les érythrocytes mûrs ne possèdent pas de noyau et ne sont pour cette raison plus capables de se diviser. Les érythrocytes sont des cellules de petite taille (7,5 µm de diamètre en moyenne). Le centre d'un érythrocyte est plus fin que sa périphérie et paraît plus clair en son centre pour cette raison au microscope (schéma ci-dessous).



Les thrombocytes (photo ci-dessous) sont en réalité des fragments cytoplasmiques de cellules plus grandes situées dans la moelle osseuse. Comme les érythrocytes les thrombocytes ne possèdent pas de noyau et ne peuvent se diviser. Un adulte humain possède entre 150 000 et 400 000 thrombocytes par microlitre de sang. Leur rôle est essentiellement l'hémostase (l'arrêt des hémorragies).



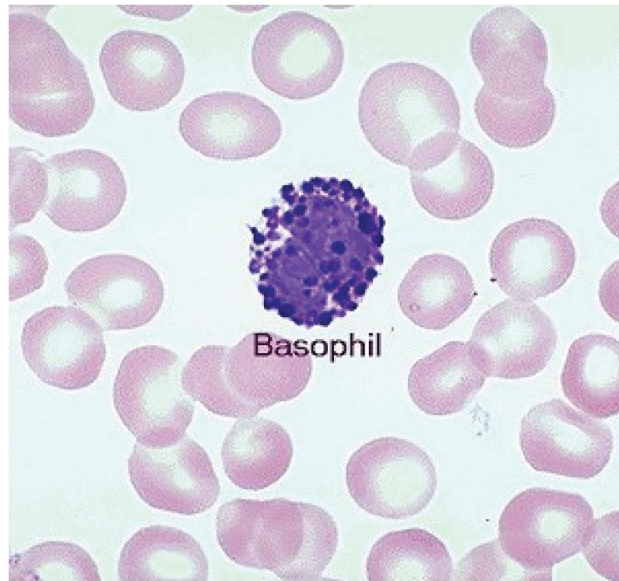
Le rôle des leucocytes est la défense de l'organisme, on en trouve entre 4 800 et 10 800 par microlitre de sang chez un humain adulte. Les neutrophiles dont le principal rôle est la phagocytose représentent environ 50 à 70% des leucocytes. Ils mesurent entre 10 et 21 μm de diamètre. Leur noyau apparaît comme une bande chez les moins matures et comme une structure à 2 à 6 lobes chez les plus matures (photo ci-dessous). En raison de la grande variation de leurs formes ils sont aussi nommés leucocytes polymorphonucléaires ou polymorphes. Comme les neutrophiles sont des phagocytes ils sont aussi appelés microphages. Le cytoplasme des neutrophiles contient des un grand nombre de granules qui renferment des enzymes hydrolytiques et autre protéines qui ont une fonction de défense. Comme les granules des neutrophiles son colorés aussi bien par des colorants acides ou basiques, ils sont considérés comme neutres d'où le nom de neutrophile. Les granules apparaissent en rose sur la préparation ci-dessous. On peut observer sur ce cliqué un neutrophile mature et un moins mature.



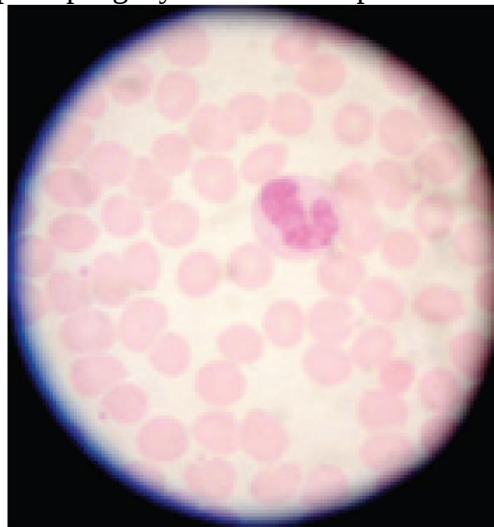
Les éosinophiles constituent entre 2 à 4 % des leucocytes et ont un diamètre de 10 à 14 μm . Leur noyau est en général bilobé. Leur cytoplasme contient des granules de relativement grande taille (comparée à la taille des granules des neutrophiles). Les granules se colorent à l'éosine d'où le nom d'éosinophiles. Par ailleurs les granules sont acidophiles et apparaissent de couleur rouge-orangée dans le cliché ci-dessous. Les granules renferment des substances chimiques dont le rôle est de détruire les parasites et de stopper les réactions inflammatoires.



Les basophiles sont les moins nombreux des leucocytes (moins de 1% des leucocytes). En général plus petits que les neutrophiles et les éosinophiles, les basophiles ont un diamètre de 8 à 10 μm . Le noyau des basophiles qui est généralement bilobé, est souvent invisible en raison du grand nombre de granules de grande taille (de couleur bleu sombre après coloration) présents dans le cytoplasme. Les granules sont dits basophiles. Les granules contiennent de nombreuses substances chimiques dont l'héparine qui est un anticoagulant et l'histamine qui cause la constriction des bronchioles et la dilatation des vaisseaux sanguins. Les basophiles peuvent être responsables des réactions allergiques.



Les monocytes sont ces cellules sanguines relativement grandes mesurant entre 14 et 24 μm de diamètre. Entre 3 et 8 % des leucocytes sont des monocytes. Le noyau d'un monocyte est grand peut paraître ovale, dentelé ou plié et a un aspect spongieux en raison de l'arrangement de sa chromatine. La fonction des monocytes est la phagocytose et son cytoplasme renferme de nombreux granules appelés lysosomes. Ces granules sont invisibles au microscope optique (photo ci-dessous) et le cytoplasme apparaît. Les monocytes qui quittent le sang et pénètrent dans les tissus sont nommés macrophages. Les monocytes et les macrophages sont les principaux phagocytes dans le corps humain.



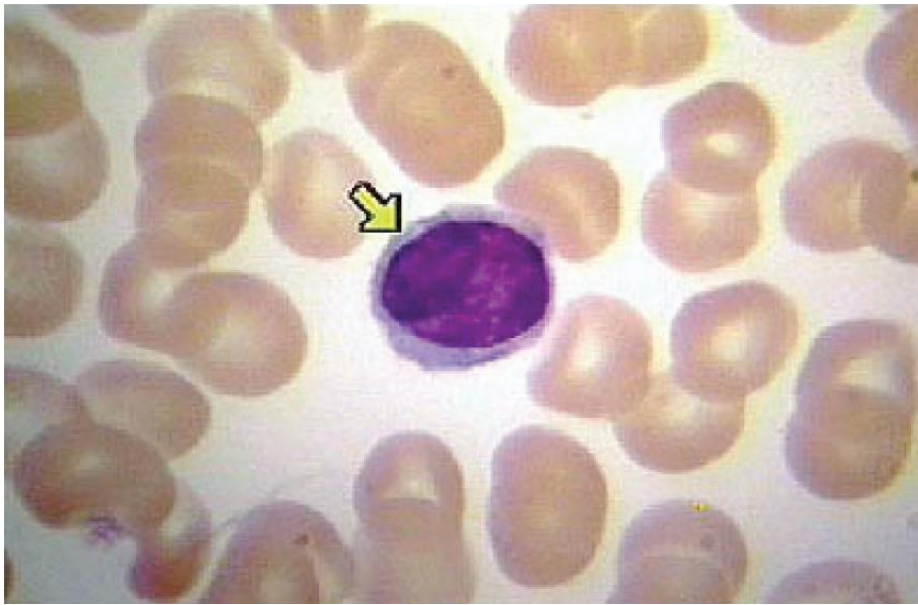
Les lymphocytes représentent 20 à 40 % des leucocytes. Ces cellules ont un diamètre de 5 à 17 μm et possèdent un grand noyau de forme sphérique. Souvent le noyau occupe presque tout le volume de la cellule, le cytoplasme étant presque pas visible. Des touffes de chromatine de forme irrégulière sont visibles après coloration (photo ci-dessous). Leur fonction est la réponse immunitaire.

Il existe deux types prédominants de lymphocytes, les lymphocytes de type B et les lymphocytes de type T. Chaque type de lymphocyte a une fonction et une localisation précise.

Les lymphocytes B produisent des anticorps alors que les lymphocytes T ont une fonction de réponse immunitaire à médiation cellulaire et dans le contrôle de la réponse immunitaire.

En raison de leurs différentes fonctions, les lymphocytes présentent des protéines membranaires de surfaces différentes et peuvent être séparés en laboratoire même s'ils semblent identiques au microscope.

Les lymphocytes B sont principalement situés dans les tissus lymphatiques (moelle osseuse, ganglions lymphatiques, rate, amygdales et appendice). On en trouve également un peu dans le sang contrairement aux lymphocytes T qui se trouvent principalement dans le sang et un peu dans les tissus lymphatiques.



5. Grandes lignes et instructions générales :

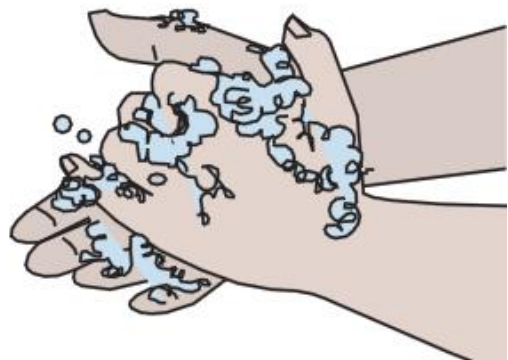
Objectifs de l'expérience :

L'objectif du TP est d'appréhender le principe de la caractérisation des groupes sanguins par agglutination.

Sécurité :

Porter de lunettes de sécurité ainsi que des gants pendant toute la durée de l'expérience.

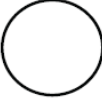
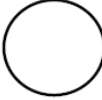
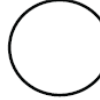
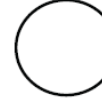
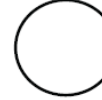
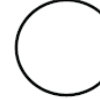
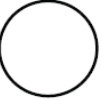
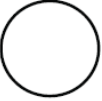
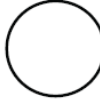
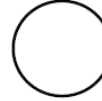
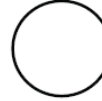
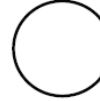
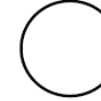
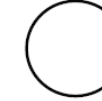
Se laver les mains au savon et à grande eau avec soin après la manipulation.



6. Déroulement de l'expérience :

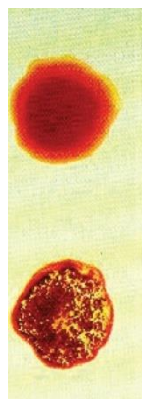
Réaction d'hémagglutination :

- 1- Se munir d'une microplaque à titration (la plaque étant dans le sens de la largeur).
 - Repérer les 8 colonnes A, B, AB, O, P1, P2, P3 et P4
 - Repérer les 2 lignes Anti-A et Anti-B

	A	B	AB	O	P1	P2	P3	P4
Anti A								
Anti B								

Enfiler une paire de gants.

- 2- **En utilisant une pipette différente (ou un cône différent) pour chaque échantillon**, pour éviter les contaminations croisées, placer 3 gouttes de chaque échantillon dans les deux puits correspondants. Par exemple l'échantillon de contrôle de groupe A sera placé dans les deux puits de la colonne A.
- 3- **Avec une pipette neuve** ajouter 2 gouttes (ou 20 μL) de sérum anti-A dans chaque puits de la ligne anti-A.
- 4- **Avec une pipette neuve** ajouter 2 gouttes (ou 20 μL) de sérum anti-B dans chaque puits de la ligne anti-B.
- 5- Laisser la reposer la microplaque à titration pendant 5 à 10 minutes.
- 6- Observer les puits et repérer la présence ou l'absence d'agglutination. Lorsque l'agglutination s'est produite, la solution apparaît granuleuse plutôt qu'homogène. Noter les résultats de la façon suivante :



- = absence d'agglutination

1- + = agglutination

7. Résultats de l'expérience :

Le diagramme ci-dessous peut être photocopié pour permettre à l'élève de noter ses résultats expérimentaux.

1- Noter les résultats de l'expérience sur le diagramme ci-dessous :

	A	B	AB	O	P1	P2	P3	P4
Anti A								
Anti B								

2- Quels sont les groupes sanguins des 4 patients :

.....

.....

.....

.....

3- Quel donneur peut donner son sang au patient 1 ?

.....

.....

.....

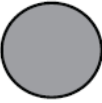
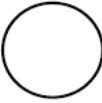
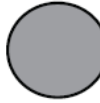
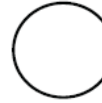
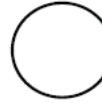
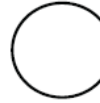
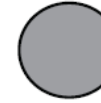
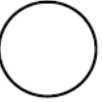
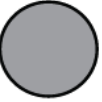
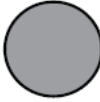
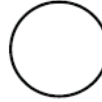
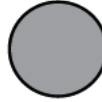
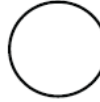
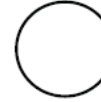
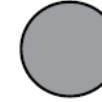
.....

8. Préparation de l'expérience :

Chaque groupe devra recevoir le matériel suivant :

- Une microplaque à titration (2 rangées de 8 puits).
- Dans un microtube ; mélanger 1 mL de sang de type A et 1 mL de sang de type B, boucher le tube et mélanger. Enfin noter sur le tube « AB ».
- Inscrire sur les microtubes « P1 », « P2 », « P3 », « P4 », « A », « B », « AB », « O ». Répartir 100 μ L de chaque échantillon dans les tubes respectifs. **Utiliser une pipette neuve ou une pointe neuve pour chaque échantillon.**
- Inscrire anti-A et anti-B sur chaque tube et répartir 200 μ L de chaque solution dans les tubes respectifs. **Utiliser une pipette neuve ou une pointe neuve pour chaque échantillon.**
- Si les élèves utilisent des micropipettes, distribuer 10 pointes par groupe d'élève.

9. Résultats attendus :

	A	B	AB	O	P1	P2	P3	P4
Anti A								
Anti B								

La couleur grisée signifie qu'il y a agglutination.

10. Nous contacter :

Ce matériel est garanti 2 ans. Pour toutes questions, veuillez contacter :

sav@sciencethic.com

www.sciencethic.com