

# Profil Microscopique Des Lames Colorées Au Giemsa Contenant Le Méthanol Et Le Giemsa Contenant L'éthanol

<sup>1</sup> NOKEWA SAMA Benjamin, <sup>2</sup> MUNTOKOLE NGOIE Laurent, <sup>3</sup> SAMBA  
KABAYO Fabrice, <sup>4</sup> LUKUMWENA KALALA Zet

<sup>1</sup> Département de Laboratoire, Institut Supérieur de Technique Médicales de Kolwezi en RD Congo

<sup>2</sup> Département de Laboratoire, Institut Supérieur de Technique Médicales de Kolwezi en RD Congo

<sup>3</sup> Département de Laboratoire, Institut Supérieur de Technique Médicales de Kolwezi en RD Congo

<sup>4</sup> Faculté de Science Pharmaceutique, Université de Lubumbashi en RD Congo

---

## Résumé

**Introduction :** La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) fait partie des colorations polychromes dites « de Romanowsky » avec celles de Leishman, de Giemsa et de Wright. C'est une méthode de référence en l'hématologie

**Matériels et Méthodes:** Nous avons réalisé étude comparative descriptive des frottis sanguins colorés au Giemsa contenant le méthanol et le Giemsa contenant l'éthanol artisanal pendant le mois de décembre 2021, cette étude a été menée à Kisenge manganèse, ville de Kasaji, la province du Lualaba en République Démocratique du Congo. Cette étude concernée 40 sujets qui ont été reçu en consultation et envoyé au laboratoire pour un examen de frottis épais.

**Résultats :** A la microscopie, le compartiment cytoplasmique des cellules ont conservées leurs affinités à chaque colorant respectif.

**Conclusion :** La microscopie observée n'a pas révélé de différences significatives entre les lames colorées Colorées au Giemsa contenant le méthanol et le Giemsa contenant l'éthanol

Mots clés :

**Microscopie, Giemsa, Méthanol, Ethanol**

---

Date of Submission: 22-11-2022

Date of Acceptance: 06-12-2022

---

## I. INTRODUCTION

La coloration de Giemsa, également appelée coloration de Pappenheim est une méthode de coloration utilisée en hématologie (cytologie) pour la différenciation des cellules sanguines. Cette méthode a été mise au point par GUSTAV GIEMSA bactériologiste et chimiste allemand pour l'application de la combinaison des colorants en vue de démontrer la présence des espèces de plasmodium sanguin(1)(El Bekkali, 2016).

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) fait partie des colorations polychromes dites « de Romanowsky » avec celles de Leishman, de Giemsa et de Wright. C'est une méthode de référence en l'hématologie. Elle est utilisée quotidiennement en cytopathologie pour l'étude des appositions ganglionnaires, des étalements et des spots de centrifugation des liquides biologiques (3).

Un étalement correctement coloré est indispensable si l'on veut pouvoir poser un diagnostic du paludisme, en particulier si l'on veut identifier avec précision différentes espèces parasitaires. Il est recommandé d'utiliser le colorant de Giemsa pour la coloration de frottis minces et de gouttes épaisses. C'est également la procédure jugée comme étant la plus fiable. La solution de Giemsa est un mélange d'éosine et de bleu de méthylène (azur). L'éosine colore la chromatine du parasite en rouge, tandis que le bleu de méthylène colore le cytoplasme parasitaire en bleu. On utilise du méthanol pour fixer le frottis mince. L'hémolyse et la coloration de la goutte épaisse ont lieu simultanément. Le pH idéal pour faire ressortir les granulations liées aux parasites et identifier différentes espèces est de 7,2(Organisation mondiale de la Santé, 2016)

Le mélange effectué avec le bleu de méthylène polychrome et de l'éosine est instable parce que les ions de colorant de charge opposées s'associent et forment des composés sous forme de sels appelés éosinate d'Azur insoluble dans l'eau.(5)

Les éosinates d'Azur sont par contre solubles dans les alcools. Pour ce faire le mélange de méthanol et le glycérol est souvent le plus utilisé..(6),

Eosine est un acide ayant une affinité sélective pour le cytoplasme cellulaire basique. Elle se fixe aux molécules basiques, et pour cette raison l'éosine est très utilisée comme colorant de laboratoire pour colorer le

cytoplasme de certaines cellules. Ce mélange de Giemsa contient également dans sa préparation le méthanol jouant le rôle de fixateur comme alcool et solvant des colorants. Outre le fixateur (alcool) le Giemsa contient aussi le glycérol qui joue le rôle de conservateur des colorants. Le glycérol est un composé chimique, fluide, incolore, visqueux et inodore au goût sucré. (7), (8), (9)

Tableau I. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ETHANOL

Ethanol
<ul style="list-style-type: none"><li>• Alcool avec un groupe éthyle dans le squelette carbone ;</li><li>• Acidité : légèrement supérieur à celle de l'eau ;</li><li>• Formule brute : <math>\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}</math> ;</li><li>• Alcool primaire ;</li><li>• Masse volumique : <math>789\text{kg/m}^3</math></li><li>• Température d'ébullition : <math>78^\circ\text{C}</math></li></ul>

(You et Arteel, 2019; Ma *et al*, 2021)

## II. MATERIELS ET METHODES

### Type d'étude

Il s'agit d'une étude comparative descriptive des frottis sanguins colorés au Giemsa contenant le méthanol et le Giemsa contenant l'éthanol artisanal.

### Période d'étude

Cette étude s'est déroulée pendant 6 jours soit du 22 décembre 2021 au 26 du même mois et de la même année.

### Cadre d'étude

Notre étude a été menée à Kisenge manganèse, commune dans la ville de Kasaji, la province du Lualaba au sud-est de la République Démocratique du Congo. Cette cité est rurale, est située à 106 km de Dilolo, coté frontière de la RDC avec l'Angola. Il est à l'intersection entre la route vers la Zambie et l'Angola.

### Population d'étude

#### Critères d'inclusion

Avoir été reçu en consultation à la clinique AFIA par un médecin ou par un infirmier le malade est envoyé au laboratoire pour un examen de frottis épais ou mince durant la période allant du 23 décembre au 26 décembre 2021. Etre âgé d'au moins un an ou plus, avoir accepté de participer à l'étude. Pour les enfants un accord des parents au préalable était envisageable.

#### Critère d'exclusion

Sont exclus de l'étude, les malades hospitalisés ou venus en consultation à la Clinique AFIA ayant d'autres examens paracliniques rien que la goutte épaisse.

### Echantillonnage

Nous avons procédé à un échantillonnage par convenance. Au total 40 étalements étaient colorés.

### Technique de collecte des données

Les patients en consultation, en ambulatoire et ceux hospitalisés ont été prélevés dans le service de laboratoire.

Après avoir pris connaissance de la demande des examens par un consultant de la clinique AFIA sur base du bon de laboratoire le technicien était chargé d'effectuer le prélèvement et d'expliquer à chaque patient ou accompagnateur ou encore le garde malade l'importance de cette étude.

Après l'accord des patients qui remplissaient les critères d'inclusion, un numéro d'identification avait été attribué à chacun et le cas échéant, le protocole était rempli suivi de la ponction veineuse au niveau du pli du coude 2 ml de sang était suffisant sur EDTA suivant le protocole de laboratoire.

Le strict respect de règles dans le prélèvement était de rigueur. Les échantillons prélevés ont été au même moment acheminés au laboratoire de la clinique AFIA avec les prélèvements effectués dans les différentes salles où étaient hospitalisés certains malades qui avaient acceptés de participer dans cette étude. Les échantillons ont été étalés en raison de deux lames portes objet par échantillon, séchés à l'air libre, 40 échantillons ont été colorés au Giemsa contenant le méthanol comme fixateur et les 40 autres ont été colorés au Giemsa contenant l'éthanol à  $90^\circ$  comme fixateur. La qualité de la fixation de l'éthanol était évaluée par rapport au méthanol.

### Considération éthique

Pour arriver à la réalisation de cette étude nous avons sollicité et obtenu au préalable auprès de monsieur le Directeur General des établissements FLORY l'autorisation de réaliser nos travaux au laboratoire de la clinique

AFIA ainsi que le recrutement des patients et la réalisation de nos analyses. Nous avons aussi obtenu, par signature, le consentement de Monsieur le Gestionnaire et du Médecin Directeur de ladite clinique.

Les étalements, séchage des lames, la coloration et la microscopie et comparaison des résultats ont été exécutés selon les règles de bonnes pratiques de laboratoire. Les échantillons positifs ont été pris en charge conformément au Protocole du PNL (Programme National de Lutte Contre le Paludisme).

Lieu d'étude

La clinique AFIA fait partie de la zone de santé de kasaji, direction Kolwezi.

Situation géographique

- A l'ouest air de santé Tshilemu
- A l'est air de santé de Kisenge
- Au sud air de santé de Divuma gare
- Au nord air de santé Kisenge A

Confection des frottis sanguins

Le principe de confection d'un frottis épais consiste donc à étaler une goutte de sang uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche de cellules, qui après coloration et fixation, pourra permettre d'effectuer l'étude morphologique des éléments figurés du sang, et de déterminer s'il y a anomalies de présence, d'aspect ou de nombre de cellules. (Amou, 2013) (12)

Pour le frottis mince la confection consiste à étaler une goutte de sang sur une lame de verre, peut être effectuée manuellement en faisant l'angle de 45° puis d'un coup sec glisser la lame de verre rodé et l'extrémité de l'étalement doit être en dents de scie. Mécaniquement à l'aide d'appareils automatiques et semi-automatiques. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre à l'abri des poussières et des mouches (13)(14)

La préparation de Giemsa concentré, la solution mère :

- Peser deux fois 0.75 g de Giemsa en poudre
- Prélever 65 ml de méthanol
- Prélever 65 ml de l'éthanol à 90%
- Prélever deux fois 35 ml de glycérol ou glycérine pure.

Préparation de la solution mère de Giemsa

Commencer par verser le méthanol ou l'éthanol dans l'éprouvette propre puis ajouter la poudre et laisser doucement se déposer au fond de l'éprouvette. Ensuite ajouter pendant 3 minutes de manière circulaire le glycérol, mélanger et de la même manière. Remuer ensuite toujours de cette manière 3 fois par jour, pendant 4 jours consécutifs. Filtrer, noter la date de préparation et bien étiqueter le flacon en plastique.

Préparation de la solution de travail

Dans une éprouvette en plastique de 100 ml, y mettre 5 ml de Giemsa pour 45 ml d'eau tamponnée à un pH 7, c'est une quantité suffisante pour colorer plus ou moins 25 étalements. Agiter le mélange très doucement. Cette quantité de 50 ml de Giemsa dilué permet de colorer un nombre important des étalements.

Coloration des lames

Recouvrir chaque étalement séché d'avance au Giemsa fraîchement préparer et laisser agir pendant 30 minutes, chronométrer pour mieux surveiller la coloration, rincer délicatement à l'eau de robinet et placer les lames sur le séchoir pour sécher à l'abri des poussières.

Microscopie de frottis mince

La lecture a été effectuée au laboratoire de la clinique AFIA à l'aide d'un microscope optique binoculaire marque PRIMO STAR ZEINSS.

A l'objectif 100× à huile à immersion selon les normes universelles, par le technicien de laboratoire. Pour une meilleure reproductibilité des résultats au hasard 4 lames deux pour l'étalement épais et l'étalement mince sont choisies pour la validation des résultats.

### III. RESULTATS

**TABLEAU II. RESULTATS DE LA MICROSCOPIE DES LAMES COLOREES AU GIEMSA  
CONTENANT LE METHANOL**

éléments	Caractéristiques morphologiques et cytologiques
hématies	Les cellules hématies sont plus nombreuses, elles ont la forme de disque biconcave et sont colorées en beige-rose
Leucocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrophiles : noyau est polylobé, le cytoplasme est rose, les granulations fines sont colorées en violets,</li> <li>• Basophiles : le noyau est bilobé réniforme et coloré en violet rouge, le cytoplasme est rose pâle et les grosses granulations colorées en bleu noir,</li> <li>• Eosinophiles : le noyau est bilobé coloré en violet, les grosses granulations sont colorées en orange,</li> <li>• Monocytes : le noyau est en coché profond et coloré en violet, le cytoplasme est gris clair,</li> <li>• Lymphocytes : le noyau occupe la quasi-totalité du cytoplasme coloré en bleu.</li> </ul>

Thrombocytes ou plaquette sanguine	Elles sont peu nombreuses groupées et colorées en violet clair.
------------------------------------	---

les résultats microscopiques des frottis colorés au Giemsa contenant le méthanol comme fixateur.

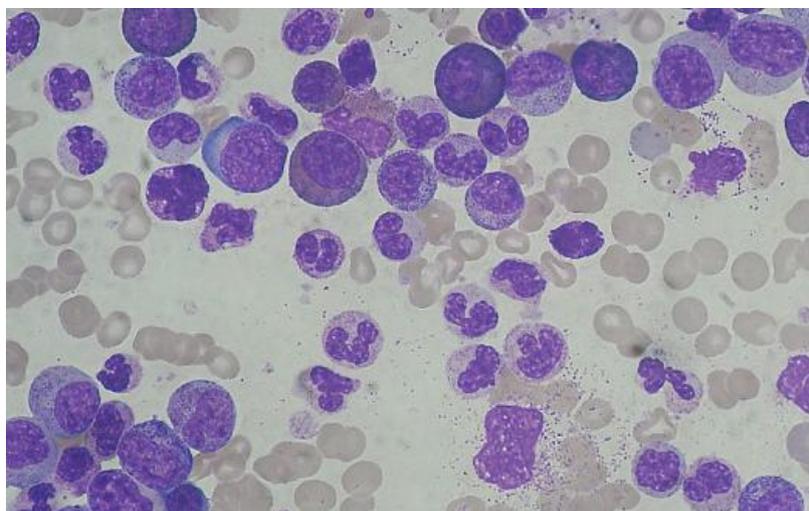


Figure I. observation microscopique à l’immersion du frottis sanguin coloré au Giemsa contenant le méthanol au GtX100. Il s’agit respectivement des globules rouges, les globules blancs et les plaquettes sanguines selon la coloration des différents constituants des éléments figurés du sang.

**Tableau III. RESULTATS DE LA MICROSCOPIE DES LAMES COLOREES AU GIEMSA CONTENANT L’ETHANOL ARTISANAL**

Eléments	Caractéristiques morphologiques et cytologiques
Hématies	L’hémoglobine protéine basique fixe le colorant acide, coloré en beige-rose.
Leucocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrophiles : le noyau est polylobé, le cytoplasme est rose, les granulations fines sont colorées en violets,</li> <li>• Basophiles : le noyau en croissant est coloré en violet rouge, le cytoplasme est rose pâle et les grosses granulations colorées en bleu à violet-noire,</li> <li>• Eosinophiles : le noyau est bilobé et coloré en violet, les grosses granulations sont orangées,</li> <li>• Monocytes : le noyau est en croissant coloré en violet, le cytoplasme est gris clair,</li> <li>• Lymphocytes: lecompartiment cytoplasmique fixe le colorant basique coloré en bleu, noyau occupe la quasi-totalité du cytoplasme coloré en bleu.</li> </ul>
Thrombocytes	Il y a les plaquettes sanguines sont peu nombreuses des thrombocytes groupées et colorées en violet clair.

Les résultats microscopiques de frottis sanguin coloré au Giemsa contenant l’éthanol comme fixateur.

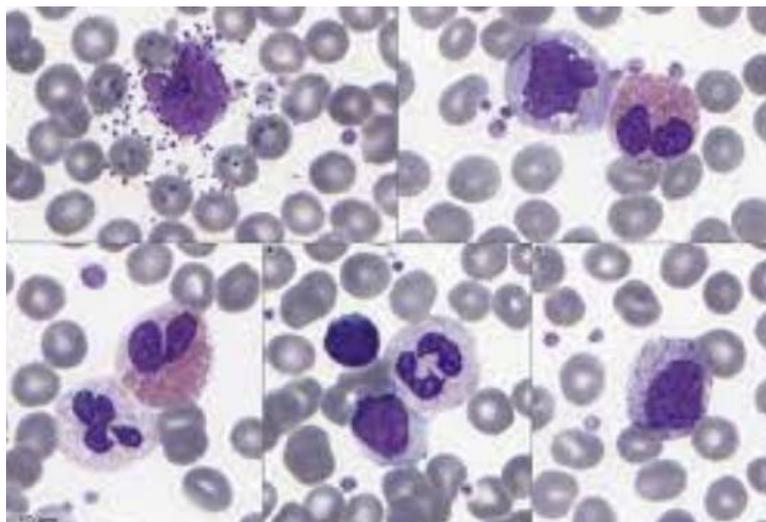


Figure II. Observation microscopique à l'immersion du frottis sanguin coloré au Giemsa contenant l'éthanol au GtX100. les résultats révèlent des globules rouges en prédominance, les globules blancs et les plaquettes sanguines selon la coloration des différents constituants des éléments figurés du sang.

#### IV. DISCUSSION

L'observation des lames a révélé que les hématies sont colorées en beige-rose. Les granulocytes neutrophiles sont colorés en rose et les granulations violettes. En rapport avec le neutrophile nos observations rejoignent celles de Tembely en 2020. Les éosinophiles, prennent la coloration violette-rose granulations bleu à violet-noire. Nos observations corroborent avec celui d'Achamou *et al*, (2018).

Par ailleurs les investigations de Bekkali en 2016 et Awele en 2020, révèlent que les basophiles sont colorés en violet et leurs granulations prennent la coloration orangées. Cette coloration paraît similaire à celle de notre étude et s'expliquerait par le fait, que le méthanol est un alcool primaire jouant le rôle de fixateur dans le mélange au Giemsa.

En effet, les observations de Zohoun, Klotoe et Zohoun en 2020, montrent que les agranulocytes monocytes, colorés au Giemsa contenant le méthanol comme fixateur, prennent la coloration violette et le cytoplasme gris clair. Amou en 2013, a révélé le cytoplasme de monocyte clair, ayant à l'apparence du verre dépoli (aspect grisâtre) avec un noyau violet, ces observations microscopiques rejoignent nos observations sur le monocyte au plan microscopique.

Par ailleurs, nos investigations ont révélé, à la microscopie, le compartiment cytoplasmique des lymphocytes bleu clair, le noyau bleu foncé remplissant la cellule. Nos investigations rejoignent celles, de (14) et de Piaton *et al* (2015). Par ailleurs, les thrombocytes ont été fixés par le Giemsa contenant l'éthanol et colorés en violet clair.

Nos observations microscopiques sont semblables à celles de plusieurs auteurs ayant utilisées le méthanol dans la préparation de Giemsa, notamment celle de Bekkali (2016) et de Tembely (2020).

Les résultats microscopiques observés n'ont pas révélé de différences significatives comme l'affirment d'autres auteurs comme Achamou *et al* (2018), Amou (2013) et de El Bekkali (2016)

#### V. CONCLUSION

Au terme de notre étude, les résultats microscopiques ont été fournis par les lames colorées au Giemsa contenant le méthanol et le Giemsa contenant l'éthanol n'ont montré de différence significative. L'observation des différentes structures cellulaires n'a pas révélé des différences significatives.

Un étalement correctement coloré et fixé est indispensable en hématologie. Il est recommandé d'utiliser le colorant de Giemsa pour colorer le frottis minces et de gouttes épaisses. L'usage du méthanol (alcool) pour la fixation.

### Bibliographie

- [1]. O'Neil E, Horney B, Burton S, Lewis PJ, MacKenzie A, Stryhn H. Comparison of wet-mount, Wright-Giemsa and Gram-stained urine sediment for predicting bacteriuria in dogs and cats. *Can Vet J.* 2013;54(11):1061.
- [2]. EL BEKKALI A. Les techniques de coloration en hématologie [PhD Thesis]. 2016.
- [3]. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier MF, Courtade-Saïdi M, Vincent S, et al. Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa: revue de la littérature et apport de l'assurance qualité. In: *Annales de Pathologie.* Elsevier; 2015. p. 294- 305.
- [4]. mondiale de la Santé O. Coloration au Giemsa des étalements de sang à la recherche de plasmodium. Organisation mondiale de la Santé; 2016.
- [5]. Bosveli A, Montagnon T, Kalaitzakis D, Vassilikogiannakis G. Eosin: a versatile organic dye whose synthetic uses keep expanding. *Org Biomol Chem.* 2021;19(15):3303- 17.
- [6]. Tembely M. Caractéristiques de l'hémogramme des enfants hospitalisés en pédiatrie générale du CHU Gabriel TOURE [PhD Thesis]. Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2020.
- [7]. Smith MA, Zhang H, Burton IW, Liu C, Cheng AW, Sun JY. 2-Acetyl-1, 3-Diacyl-sn-Glycerols with Unusual Acyl Composition in Seed Oils of the Genus Polygala. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2018;120(8):1800069.
- [8]. Tanini D, D'Esopo V, Tatini D, Ambrosi M, Lo Nostro P, Capperucci A. Selenated and sulfurated analogues of triacyl glycerols: selective synthesis and structural characterization. *Chem Eur J.* 2020;26(12):2719- 25.
- [9]. Manchanda M, Leishman E, Sangani K, Alamri A, Bradshaw HB. Activation of TRPV1 by capsaicin or heat drives changes in 2-acyl glycerols and N-acyl ethanolamines in a time, dose, and temperature dependent manner. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9.
- [10]. You M, Arteel GE. Effect of ethanol on lipid metabolism. *J Hepatol.* 2019;70(2):237- 48.
- [11]. Ma Y, Wang XR, Li T, Zhang J, Gao J, Sun ZY. Hydrogen and ethanol: production, storage, and transportation. *Int J Hydrog Energy.* 2021;46(54):27330- 48.
- [12]. AWELE N, DENON YÉ, KOUDANDE M, KLOTUE JR, KOUDOKPON H. Comparaison de la formule leucocytaire manuelle à la formule leucocytaire automatique chez les patients au centre hospitalier universitaire de zone Suru-Léré en 2020. *EPAC/UAC;* 2020.
- [13]. ACHAMOU NA, KLOTUE JR, DOSSOU A, KEKE R, DEHOUMON F, DOHOU JC. Importance de la formule leucocytaire en cas de leucocytes normaux chez les femmes enceintes consultées à la maternité du CHUD/OP. *EPAC/UAC;* 2018.
- [14]. Barrea C, Van Damme A. Quand plaquettes et globules sang-mêlent et brouillent la formule: l'hématologie pédiatrique bénigne. *Percentile Rev Pédiatres.* 2020;25:6.
- [15]. ZOHOUN GS, KLOTUE JR, ZOHOUN AGC. Caractéristiques des anomalies quantitatives et qualitatives leucocytaires du sang périphérique rencontrées au Laboratoire d'Hématologie du Centre National Hospitalier Universitaire-Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM) de Cotonou. *EPAC/CAP/UAC;* 2020.

### ANNEXE

La préparation de l'alcool artisanal

Matériels

Un fut métallique de 100 l, un bidon de 20 litre, un tamis, un malaxeur en bois, un entonnoir. Les ions Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> provoquent la dégénérescence de la levure c'est-à-dire du ferment. Mieux vaut utiliser un récipient en PE ou en PVC.

Ingrédients : Déchets des maniocs séchés, les graines de maïs, l'eau de robinet.

Figure III. Image de dispositif de la fermentation et de la distillation de l'alcool éthylique artisanal.



Procédure :

- Première étape appelée industriellement brassage, son but est d'obtenir un moût liquide sucré prêt à être fermenté.

Mettre de l'eau dans un fut à moitié rempli puis préparer la patte avec les déchets des maniocs y ajouter de l'eau,

- Deuxième étape est celle appelée industriellement la fermentation.

Dégradation d'une substance organique à l'aide d'un ferment (diastase) couvrir le fut puis laisser reposer pendant 7 jours.

- Filtration est la méthode de séparation solide-liquide ou les particules solides sont retenues sur un Support (tamis).

Filtrer le produit de la fermentation c'est-à-dire séparé les déchets de maniocs et de maïs (solide) de la phase liquide.

Puis bouillir le mélange pendant 2 à 3 heures, filtrer encore pour débarrasser de liquide complément de déchets de maniocs.

- La quatrième étape est la distillation, c'est une méthode de séparation liquide-liquide (eau- alcool) basée sur la différence de la température d'ébullition. Bouillir le liquide recueilli dans un autre fut préalablement monté avec un dispositif contenant des tuyaux pouvant conduire la chaleur (vapeur). Le bout de la partie extérieur de tuyaux est connecté à un entonnoir pour enfin recueillir goutte à goutte le liquide incolore ou le produit fini.

- La cinquième étape est la bisdistillation pour avoir seulement les fractions les plus volatiles (on distille de nouveau).

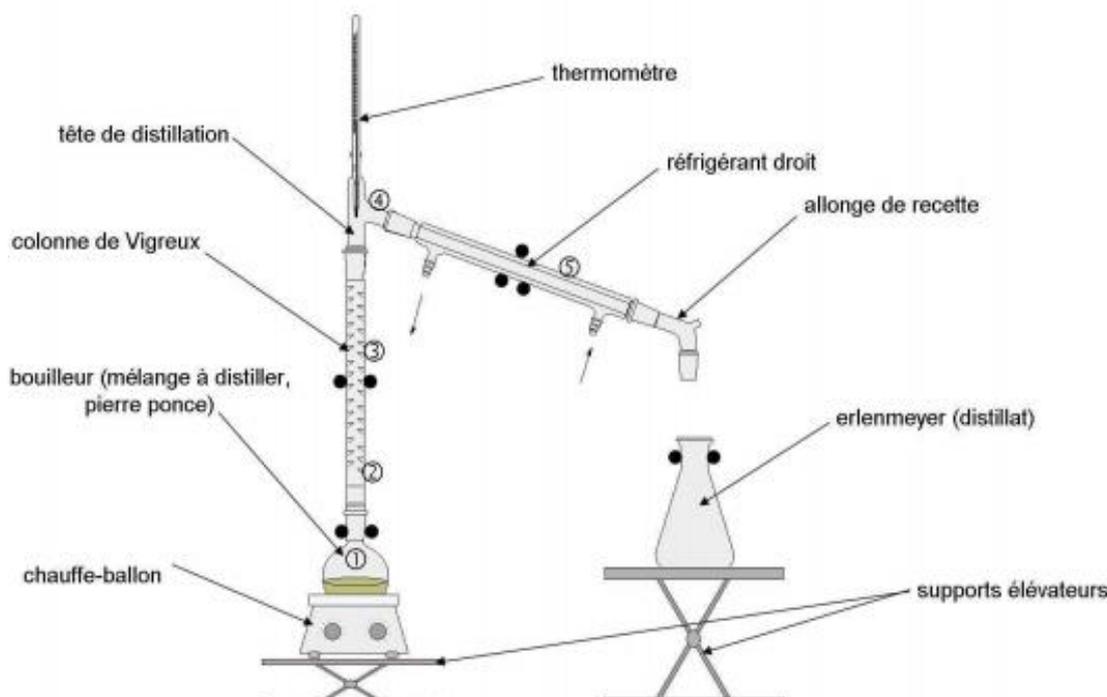
La distillation fractionnée de l'éthanol à 90° à partir de l'alcool artisanal

Matériels

Fiole à distiller, réfrigérant droit avec allonge de recette, plaque chauffante ou bain de sable, thermomètre, erlenmeyer. Le mélange à séparer est placé un ballon (bouilleur) surmonté d'une colonne de distillation (Vigreux par exemple).

Techniques : en tête de colonne, on place un réfrigérant droit en position inclinée de façon à permettre l'écoulement des liquides qui se condensent vers une allonge de recette. Un thermomètre est placé en tête de colonne de sorte que le réservoir soit placé au niveau de la jonction avec le réfrigérant (on mesure ainsi la température de l'équilibre liquide-vapeur du composé qui est récupéré dans le distillat).

Figure IV. Distillation de l'alcool artisanal



Technique de la distillation fractionnée de l'alcool artisanal pour obtenir goutte à goutte l'éthanol pur à 90° qui servira sans doute de fixateur.