

Visualisation de l'influence des matériaux dentaires sur le sang vivant en microscopie à fond noir

Odenth-Genève, 8 mai 2010

Monika Ramseyer
Centre Prévention et Santé
Colombier / NE

Marie-José Stelling-Auderset
chargée de cours UniGE
Estavayer-le-Lac

Première partie

Introduction et protocole, par Monika Ramseyer

Monsieur le Président, Mesdames et Messieurs, depuis de longues années je travaille avec Nicolas et Marie-José Stelling. Et c'est avec plaisir que j'ai accepté de vous présenter la technique du « sang vivant » et le protocole de nos études.

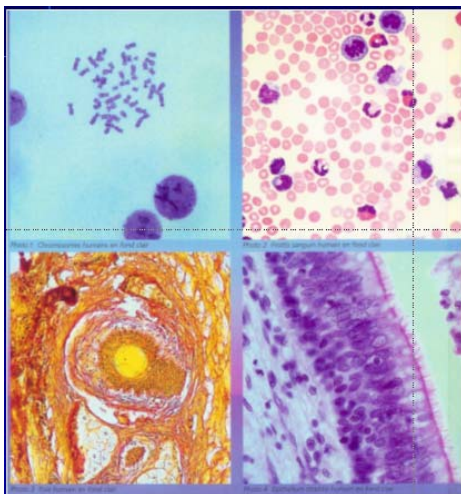
Introduction

- Différentes techniques microscopiques et leur utilité
- Coup d'œil sur les cellules sanguines
- Examen du sang vivant et applications

Quelques techniques microscopiques

Dans les laboratoires privés, hospitaliers et universitaires, différentes techniques microscopiques sont utilisées selon des besoins spécifiques. Le fond clair est la seule à être utilisée sur des préparations colorées, les autres techniques utilisent des contrastes pour mettre le travail sur du matériel non coloré.

- Microscopie à fond clair
- Contraste de phase
- Microscopie à fond noir
- Microscopie interférentielle différenciée
- Polarisation
- Microscopie électronique
- etc...

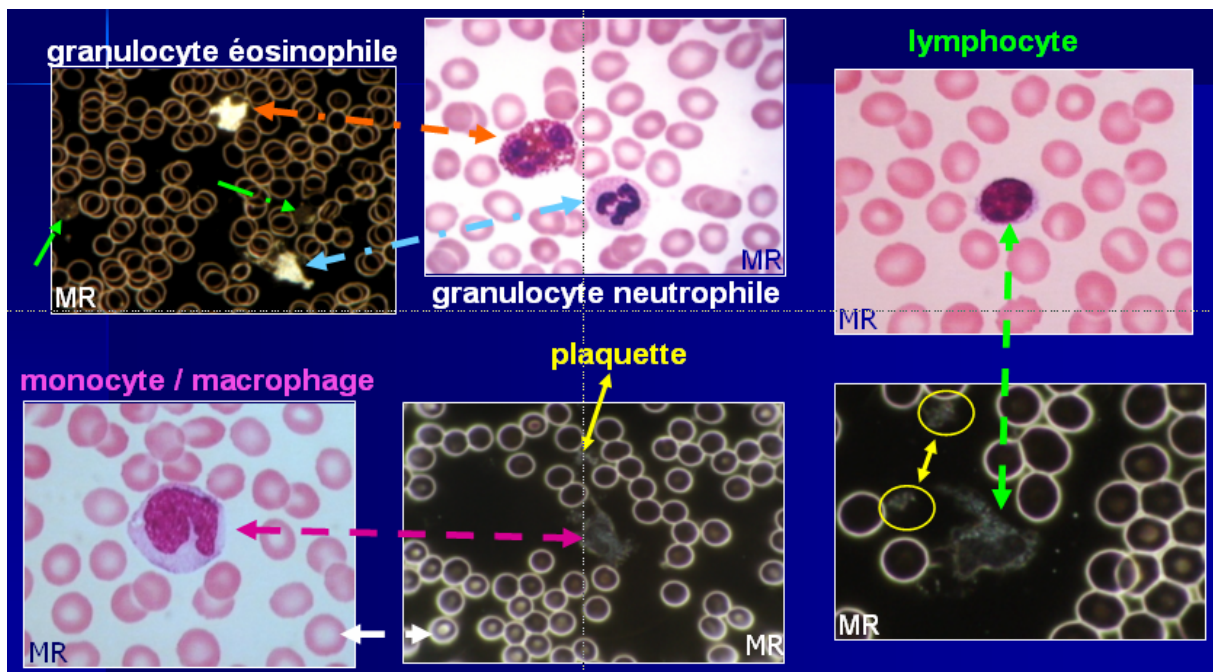


La microscopie à fond clair est la technique la plus utilisée en laboratoire de routine médicale, ceci pour des préparations + ou – épaisses et surtout colorées, comme le frottis sanguin, une recherche de bactéries avec la coloration de Gram, des coupes histologiques ou un caryotype .



J'arrive maintenant à la technique de la microscopie à fond noir, aujourd'hui abandonnée dans les laboratoires hospitaliers de routine. C'est la première technique utilisée pour examiner du sang, ou d'autres liquides corporels, et ceci avant que des colorations soient possibles. Il y a 30-40 ans les tréponèmes étaient encore recherchés dans une préparation fraîche au fond noir.

Les cellules sanguines en microscopie à fond clair et fond noir



Quelques images comparatives de cellules sanguines au fond noir et fond clair.

Ici un monocyte (un des trois type de leucocytes), la plus grande cellule sanguine ; au fond noir, vous la voyez en activité, avec un cytoplasme effrangé. Le creux du globule rouge se voit au fond clair par la partie centrale non colorée, au fond noir cette partie est plus ou moins blanche et ici une plaquette, toute petite cellule sans noyau comme le globule rouge. Ici deux des 3 types de granulocytes avec des fonctions différentes. Le granulocyte neutrophile avec son activité antibactérienne, et le granulocyte éosinophile qui a une activité antiparasitaire, mais également impliqué dans les réactions allergiques de type I. Ici un lymphocyte au fond clair et au fond noir.

L'examen du sang vivant et son utilité dans la pratique médicale

La technique de l'examen du sang vivant est utilisée exclusivement en médecine complémentaire pour évaluer le terrain du patient et pour suivre des traitements allo / homœo ou phyto- thérapeutiques.

Sang vivant et recherche

- effet de différentes solutions isotoniques sur les cellules sanguines
- effet des ondes électromagnétiques pulsées sur les globules rouges
- effet des métaux sur des lymphocytes en culture (test Melisa)
- effet de différents matériaux dentaires

Cette technique se prête effectivement à des applications en recherche. Avec Nicolas Stelling nous l'avons utilisé pour démontrer l'effet de la solution de Quinton®-Iso sur les granulocytes neutrophiles. Nous avons aussi eu l'occasion de comparer différentes solutions isotoniques et leurs effets sur les globules rouges et les globules blancs.

Ces deux dernières années, j'ai collaboré à des tests sur des puces de protection contre les ondes électromagnétiques pulsées où nous avons pu démontrer la forte formation de globules rouges en rouleaux sous exposition à ces champs.

La technique permet aussi de visionner des cellules venant de cultures cellulaires stimulées par des métaux.

Et depuis environ 3 ans, nous observons avec Nicolas et Marie-José Stelling l'effet de différents matériaux dentaires sur le sang vivant.

Sang natif ou anticoagulé?

Je passe maintenant au protocole de nos études. Un homme et plusieurs femmes nous ont offert leur sang. Le prélèvement s'est toujours fait à jeun. Le sang a été observé de suite après le prélèvement, c'est le témoin « sang natif », c'est-à-dire le sang de la personne sans adjonction de quoi que se soit pour l'observer (technique standard du sang vivant) = c'est le sang témoin natif qui permet de voir le sang de la personne avant les tests et dans son état naturel.

Tout de suite après a été observé le sang anticoagulé, il s'agit de nouveau d'un test témoin, pour connaître la morphologie cellulaire avant le mélange avec un matériau dentaire (par ex.). Et puis en dernier, les observations du sang anticoagulé mélangé à différents matériaux dentaires.

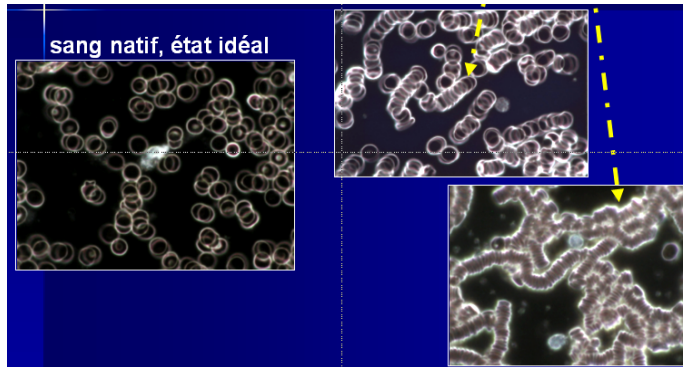
L'importance du choix d'un anticoagulant adéquat

- stabiliser le sang pour sa conservation pendant plusieurs heures
- éviter la formation spontanée de rouleaux érythrocytaires avant l'examen

Pour l'évaluation du terrain on utilise du sang natif d'une prise de sang capillaire, par contre pour la recherche, le sang doit être anticoagulé, car les différents tests prendront 30, 40, ou 60 min., ce qui ne serait pas possible avec du sang non anticoagulé.

Il était important de trouver un anticoagulant adapté à nos besoins, c.à.d. qui devait stabiliser les cellules sanguines pendant plusieurs heures et ne pas provoquer la formation de piles d'assiettes ou de rouleaux érythrocytaires.

Formation de rouleaux



Comment se présentent des rouleaux ? A gauche vous voyez le sang avec les GR bien séparés les uns des autres ; sur les deux images à droite vous voyez cette formation de rouleaux ou appelés aussi piles d'assiettes, avec deux intensités différentes de perturbation.

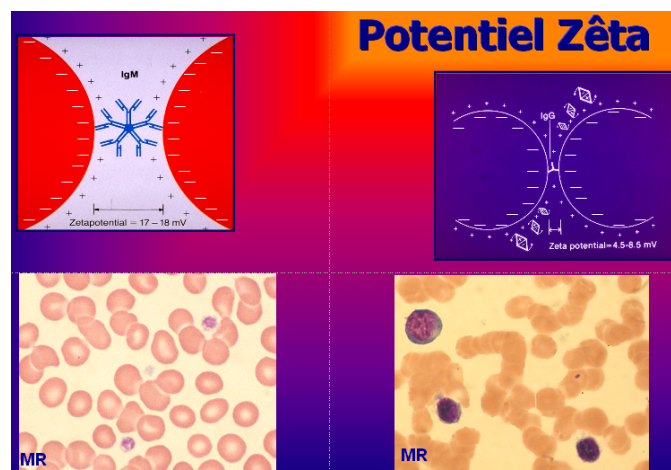
Formations des rouleaux érythrocytaires

- changement de la composition des protéines plasmatiques
- effet des ondes électromagnétiques sur les globules rouges
- modification du pH etc...

➤ Influence:

- de la constante diélectrique du milieu
- de la force ionique du milieu
- de la charge négative des globules rouges

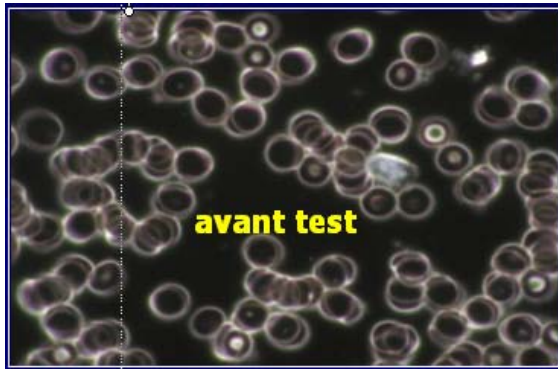
La formation de rouleaux est influencée par la composition des protéines plasmatiques, par des ondes électromagnétiques, ou le pH du milieu environnant, car ces derniers ont une influence soit sur la constante diélectrique du milieu (= constante qui décrit la réponse d'un milieu à un champ électrique, elle est liée au phénomène d'absorption ou d'émission du champ électromagnétique par le matériau), soit sur la force ionique.



Les modification citées changent le Potentiel Zêta

La charge électrique à la surface des GR est négative (anions = l'acide *N*-acétyl-neuraminique). Les GR suspendus dans le plasma sont entourés d'un nuage cathodique (de charge positive). La densité du nuage cathodique est plus forte proche de la membrane que sur la partie externe de cette couche. Cette différence entre la charge + à la surface des GR et celle dans la couche externe est mesurable et s'appelle le potentiel zêta. Physiologiquement cette valeur est à 17-18 mV, mais ce potentiel peut tomber à env. 5mV et provoquer ainsi une agglutination des GR ou la formation de rouleaux ; c'est le cas ici à droite.

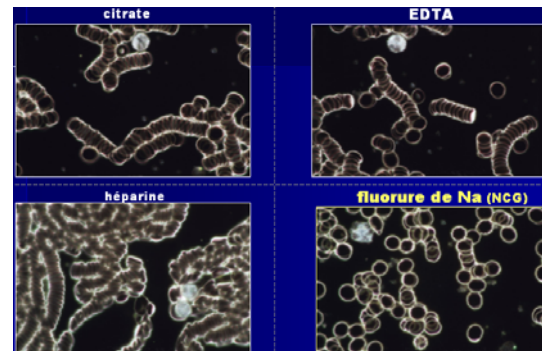
Ondes électromagnétiques pulsées



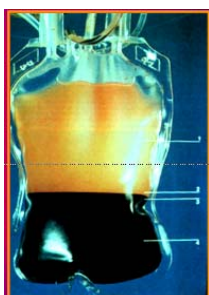
Images d'une expérience avec un téléphone portable. En haut à g. le sang **natif** avant test, les GR sont assez isolés ; en haut à dr. un nouveau prélèvement qui montre que les GR ont formé d'intenses rouleaux ; et à en bas à g, un nouveau prélèvement après 2 heures hors de portée d'ondes électromagnétiques, on observe que les GR sont +/- dans le même état qu'avant l'essai.

Différents anticoagulants testés

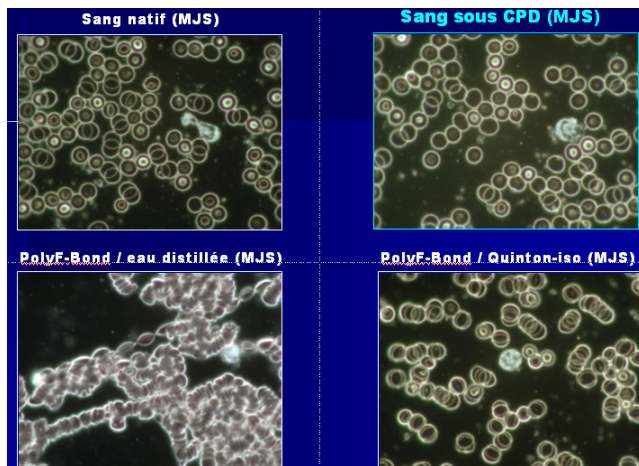
Connus dans les laboratoires d'hématologie ou de chimie clinique



Images qui correspondent aux anticoagulants cités, et ce n'est que le fluorure de sodium qui ne provoquait pas de formation importante de rouleaux.



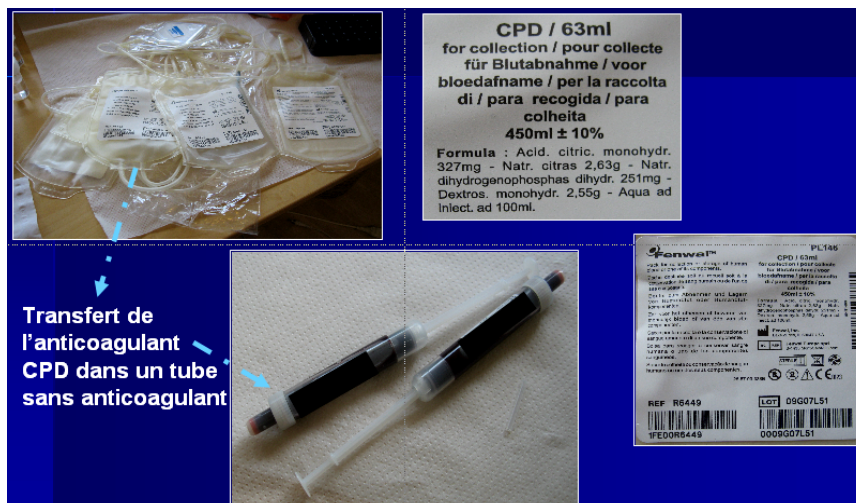
On s'est posé la question s'il n'y avait pas un autre anticoagulant qui pouvait être encore meilleur que le fluorure de sodium, et c'est ainsi que nous avons commencé les tests avec un anticoagulant utilisé en médecine transfusionnelle.



Les images avec du CPD :

en haut à gauche le sang natif = sans anticoagulant ; à droite en haut le sang anticoagulé au CPD quasiment identique au sang natif. Et en bas un test avec du PolyFBond à gauche reconstitué avec de l'eau distillée, à droite avec du Quinton®-Iso. On observe une énorme différence entre les deux solvant : grâce au Quinton®-Iso, le sang reste presque dans son état initial avec ce fond de cavité/ciment.

L'anticoagulant choisi



Cet anticoagulant est le citrate-phosphate-dextrose ou CPD. Une petite quantité est transférée depuis un de ses sachets dans un tube initialement prévu pour un prélèvement sans anticoagulant.

Prélèvement et préparation

Témoin 1

= Sang natif



La prise de sang est effectuée à l'aide d'un butterfly. Une goutte de sang prélevée directement depuis le tuyau est étalé entre lame et lamelle et sert de témoin de sang natif.

Sang anticoagulé Témoin 2

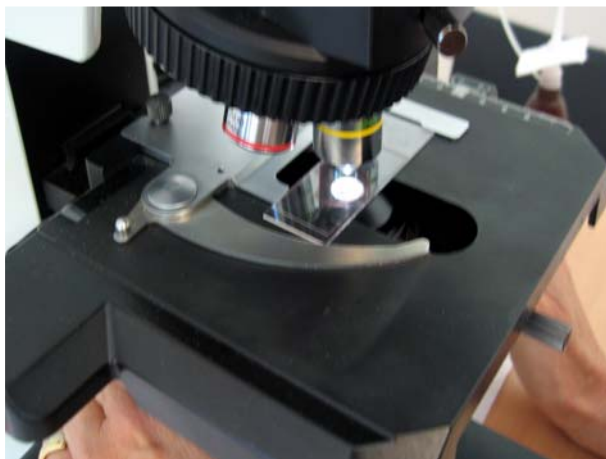


Une petite goutte de sang CPD est prélevé et étalée entre lame et lamelle pour l'examiner par la suite au microscope à fond noir. Ceci est notre témoin sang anticoagulé.

Observation au microscope à fond noir

enregistrement de films

prise de photos

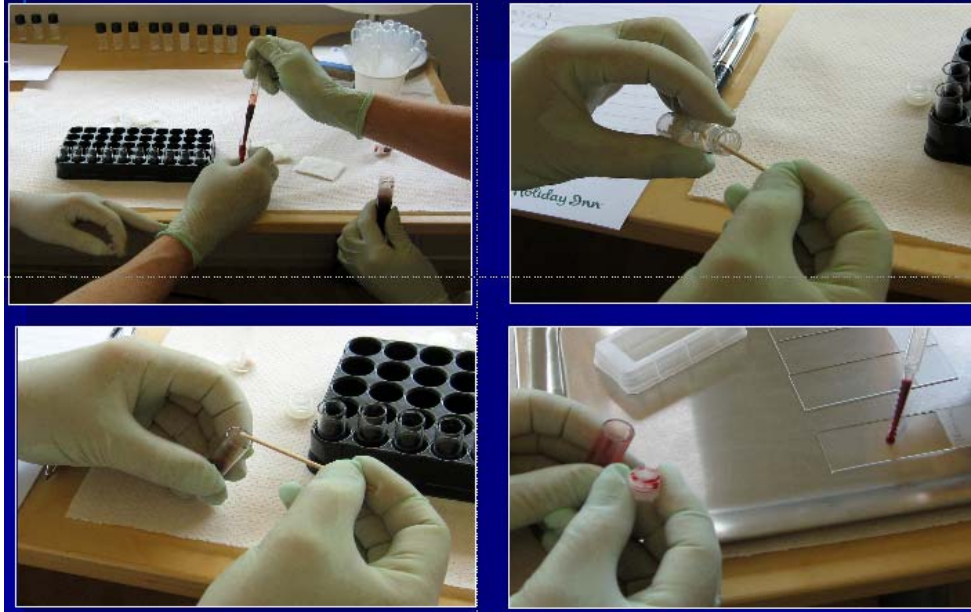


Pour l'observation nous utilisons un microscope Olympus BX avec ampoule 100W pour observation au fond noir, des photos ont été prises de tous les échantillons et témoins et un certain nombre de petits films enregistrés.

Deux techniques différentes ont été utilisées pour tester les matériaux dentaires :

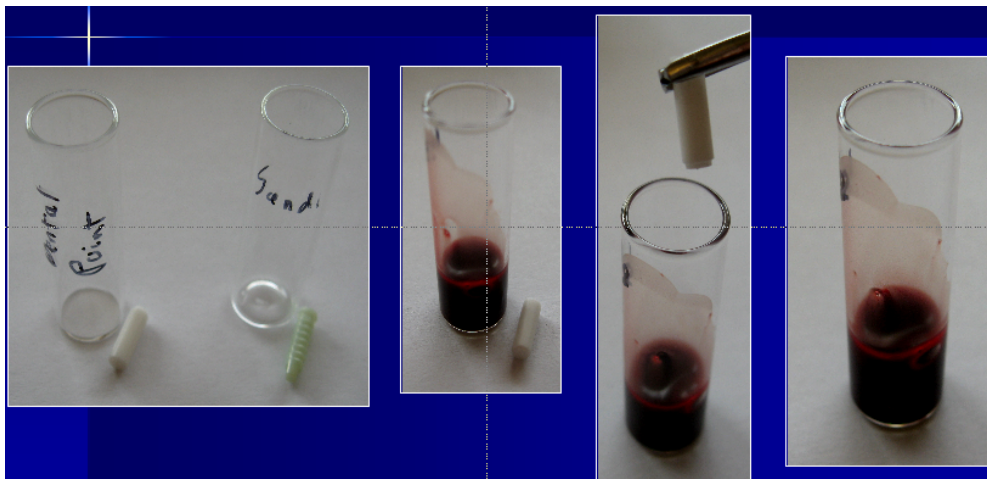
pour la première, des matériaux solides ont été limés et une pointe de cure dent (et pas une pointe de couteau en métal !) de la poudre mélangée au sang anticoagulé. Le tout est délicatement mélangé, et 1 goutte de ce sang est directement observé au microscope.

Matériau réduit en poudre



Pour la seconde technique, le matériau brut (p.ex. un implant) a été placé dans du sang anticoagulé, le tout laissé au minimum 10 min. (jusqu'à 30 min.) avant observation au microscope.

Matériau brut



Jusqu'à maintenant vous avez vu exclusivement des [photos](#) de l'examen du sang vivant, et je vous parlais de cellules en mouvement, car vivantes.

La présentation se poursuivait avec une vidéo, comme lors de la deuxième partie.

Celles-ci ont été enregistrées par Difproduction www.difproductions.com 04 70 99 62 12.

Avant de passer la parole à Marie-José Stelling, j'aimerais dire qu'elle m'a été extrêmement précieuse pendant ces années de travail, car très souvent c'est elle qui protocolait tous les détails de nos expériences ... et elle s'occupait aussi de notre bien être culinaire !

Fin de la 1^{ère} partie. Monika Ramseyer, Centre de Prévention et Santé, Sombacour 10,
CH-2013 Colombier, Suisse, [41] (0)32 843 36 20.