

stage de formation
5 & 6 février 2015

atelier n° 4

Histologie

David Busti

Nathalie Davoust-Nataf

contact ✉ nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr

informations et ressources ✉ <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination>

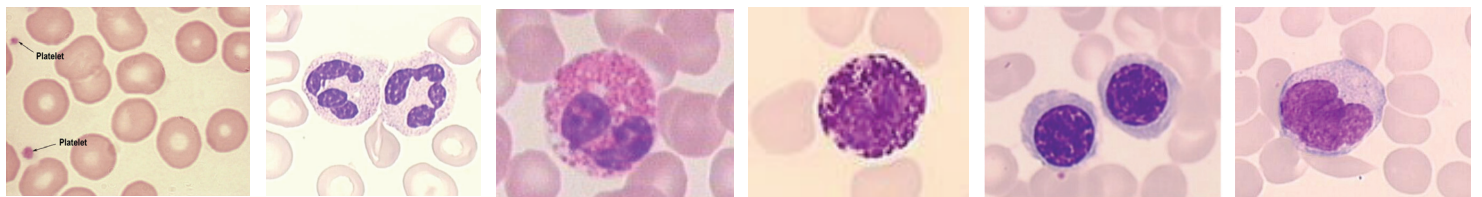
immunité
vaccination



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la
[Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale -
Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

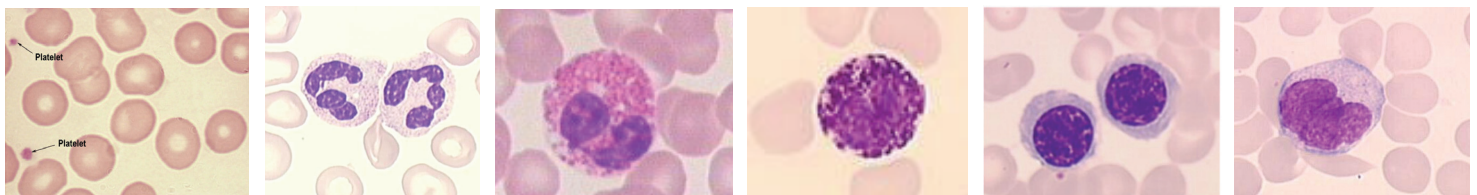
Histologie

Nathalie Davoust-Nataf, responsable des enseignements en immunologie
& David Busti, responsable pédagogique du secteur B, préparation à l'agrégation
École normale supérieure de Lyon



OBJECTIFS

- *Définition de critères de classification des cellules sanguines puis reconnaissance des différentes populations de cellules sanguines sur un frottis sanguin.*
- *Etude de la réaction inflammatoire à partir de vidéos et d'une lame histologique de peau en cours de cicatrisation.*



| david.busti@ens-lyon.fr & nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr |

A / Reconnaissance des cellules sanguines sur un frottis sanguin

I. Colorations

Les colorations vont nous permettre d'identifier et de distinguer les différentes populations de cellules sanguines, et notamment de PMN (polymorphonucléaires ou granulocytes). En effet, ils auront en fonction de *la nature du contenu de leurs granulations* des affinités variables pour chacun des colorants utilisés. Les basophiles auront une forte affinité pour le bleu de méthylène (colorant basique). Les éosinophiles auront une forte affinité pour l'éosine (colorant acide).

Deux colorations sont utilisées conjointement:

a) la coloration de May Grünwald

- éosine (acide) colore les hématies et les granulations des éosinophiles (**en rose orangé**).
- bleu de méthylène (basique) colore l'ADN des noyaux, l'ARN du cytoplasme et les granulations des basophiles (**en bleu foncé**).

b) la coloration Giemsa

- azure de méthylène colore les granulations azurophiles des neutrophiles et des plaquettes (**en mauve**).
- éosine (acide) colore les hématies et les granulations des éosinophiles (**en rose orangé**).

II. Critères de classification des différentes populations

a) Taille :

- des cellules ($> 15 \mu\text{M}$: monocytes, $10 \mu\text{M} < > 15 \mu\text{M}$: PMN et $< 10 \mu\text{M}$: lymphocytes naïfs, un lymphocyte activé pouvant être plus gros)
- des granules (grosses : basophiles et éosinophiles, petites : neutrophiles)
- du noyau (occupe presque toute la cellule pour un lymphocyte naïf)

b) Couleur :

- du cytoplasme (rose : neutrophiles et hématies, bleu pâle : lymphocytes, bleu gris : monocytes)
- des granules (éosinophile : rose orangé, basophile : bleu foncé et neutrophile : mauve)
- du noyau (très dense pour les lymphocytes, plus clair pour les monocytes)

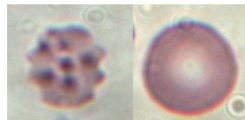
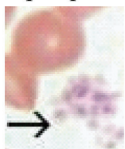
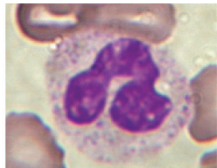
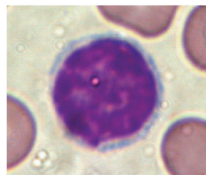
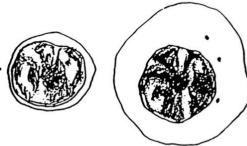
c) Forme :

- de la cellule (disque biconcave : hématies)
- du noyau (haricot ou fer à cheval ou anguleux : monocytes, rond : lymphocytes, plurilobé (2-5 lobes) : neutrophiles, bilobé : éosinophiles, non visible car caché par les granules : basophiles).

d) Fréquence des cellules :

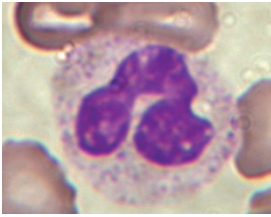
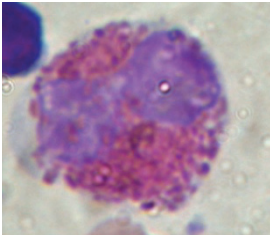
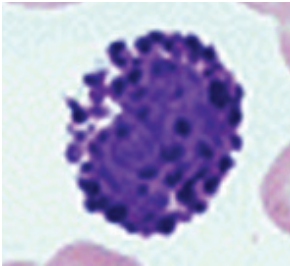
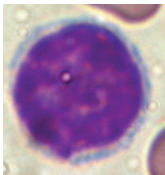
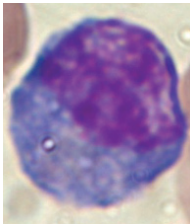
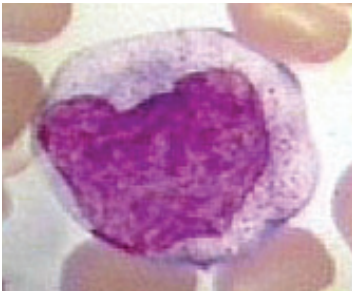
- neutrophiles (50 à 70 % des leucocytes circulants)
- lymphocytes (25 %)
- monocytes (10%)
- éosinophiles (1 à 2 %)
- basophiles (<1%)

III. Critères de reconnaissance des principales populations de cellules sanguines.

	Aspect	Nombre	Taille			
Erythrocytes ou hématies ou globules rouges			4 500 000 à 5 000 000 par mm ³	7 µm		
Thrombocytes ou plaquettes			200 000 à 400 000 par mm ³	3,5 µm		
Leucocytes polymorphonucléaires ou granulocytes		Neutrophile  Eosinophile  Basophile 	60 à 65 % 1 à 2 % 0,5 à 1 %	6 000 à 8000 par mm ³	10 à 11 µm 10 à 11 µm 10 à 11 µm	
	Leucocytes non polymorphonucléaires ou agranulocytes		Lymphocyte  Monocyte 		25 % 10 %	6 à 12 µm 15 à 20 µm

IV. Critères de reconnaissances des leucocytes.

Indiquez pour chaque cellule les principaux critères d'identification (fréquence, taille, forme du noyau, couleur du cytoplasme et couleur des granulations éventuelles).

B / La réaction inflammatoire, un exemple de réponse innée

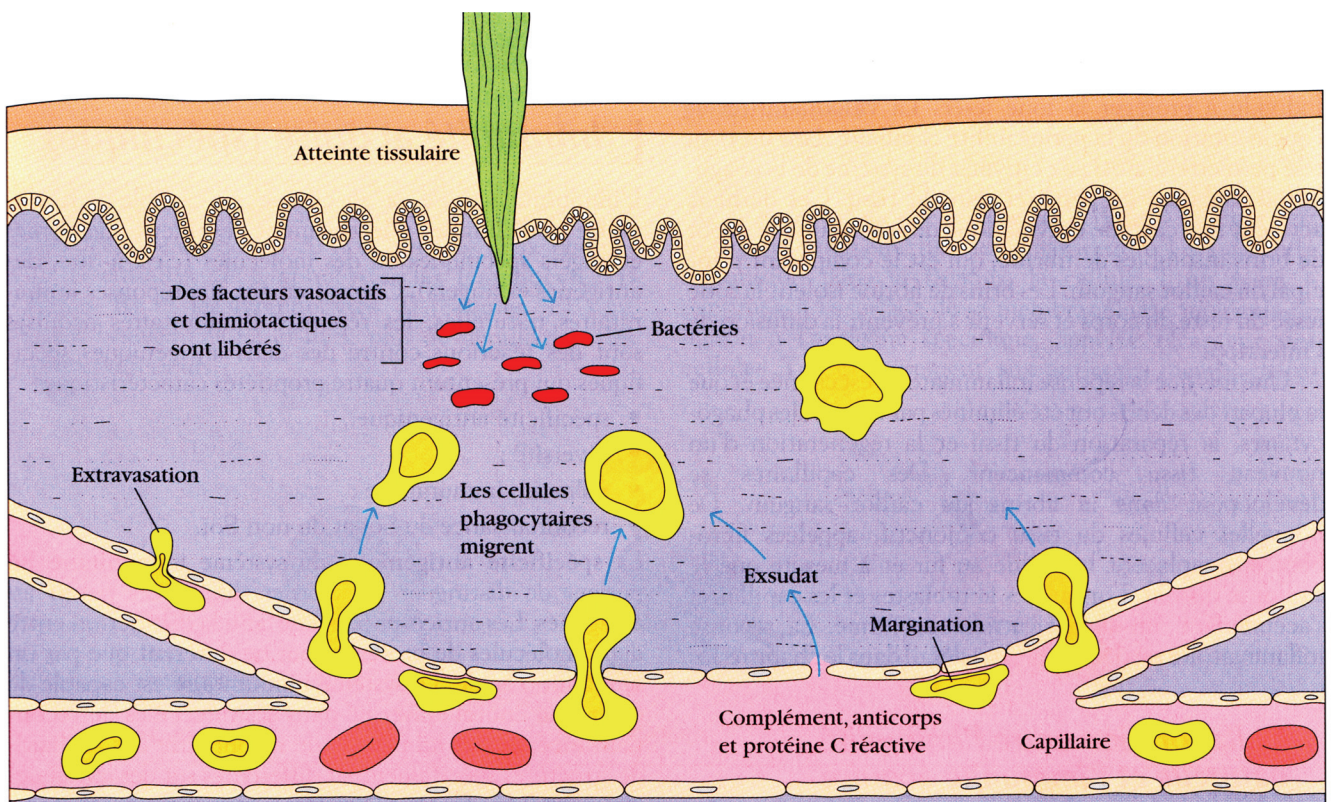
I. Définition de l'inflammation

La réaction inflammatoire correspond à la séquence d'événements induite par un dommage tissulaire ou par une infection par un microorganisme. Au 1^{er} siècle après J.-C., un médecin romain nommé Celsus (ou Celse) avait énoncé pour la première fois les quatre symptômes accompagnant l'infection d'une plaie ou « **quadrilatère de Celse** » :

- ***rubor*** : rougeur (ou érythème) ;
- ***calor*** : chaleur ;
- ***tumor*** : gonflement (ou œdème) ;
- ***dolor*** : douleur.

Ces quatre qualificatifs se rapportent aux modifications tissulaires associées au processus inflammatoire :

- la **vasodilatation des artérioles** environnantes (→ *rubor, calor*) ;
- la **hausse de perméabilité capillaire**, à l'origine de l'accumulation locale de plasma ou œdème (→ *tumor*) ;
- le **recrutement de leucocytes circulants** dans le tissu enflammé.



II. Les quatre phases de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire s'articule en plusieurs phases:

1. Le **déclenchement de la réponse inflammatoire** suite à la reconnaissance de motifs pathogéniques ou à la perception de signaux de danger.
2. La **phase vasculaire** et le recrutement de cellules immunitaires innées sur le site de l'inflammation.
3. La **phase effectrice** comprenant la phagocytose et l'activation de la réponse immunitaire adaptative.
4. La **réparation du tissu lésé**.

Elle met en jeu des cellules et des médiateurs de la réponse immunitaire innée.

a- le déclenchement de la réponse inflammatoire :

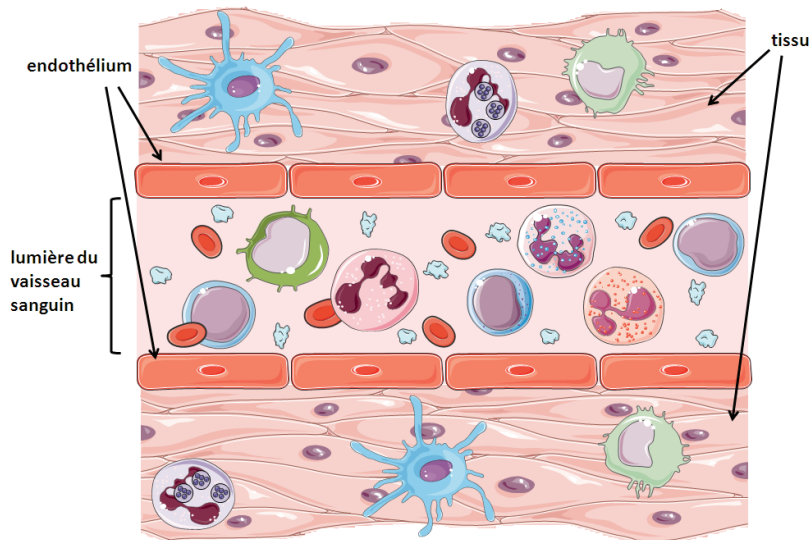
Le rôle des récepteurs de type PRR :

- Les PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) sont des motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes.
- Les PRR (*Pattern recognition receptor*) sont les récepteurs cellulaires de ces motifs pathogéniques.
- La reconnaissance d'un PAMP par un PRR déclenche l'activation de la cellule et la mise en place de mécanismes effecteurs : phagocytose, sécrétion de médiateurs de l'inflammation et expression des molécules de co-stimulation par les cellules présentatrices d'antigène, ce qui prépare la réponse adaptative.

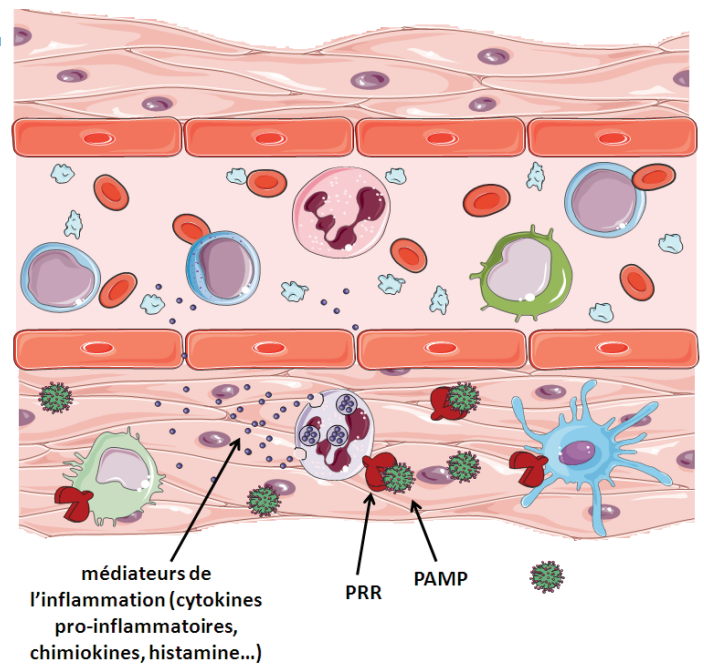
Le rôle des médiateurs chimiques de l'inflammation :

- Cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules dendritiques et macrophages activés (TNF α , IL1 et IL6), impliquées dans l'activation de l'endothélium vasculaire (action localisée) et l'induction de la fièvre (action systémique).
- Chimioquinas, telles que l'IL8, impliquées dans le chimiotactisme des leucocytes circulants vers le foyer inflammatoire ;
- Anaphylatoxines (C3a et C5a), produits de clivage des peptides C3 et C5 du complément aux fonctions pléiotropes : chimiotactisme des leucocytes, dégranulation de l'histamine et d'amines vaso-actives par les mastocytes et les basophiles, contraction des muscles lisses.
- Histamine, une molécule sécrétée par les mastocytes résidents des tissus, qui agit comme un puissant vasodilatateur ;
- Prostaglandines et leucotriènes : médiateurs lipidiques impliqués dans la vasodilatation artériolaire et le chimiotactisme des leucocytes ;

A / Homéostasie

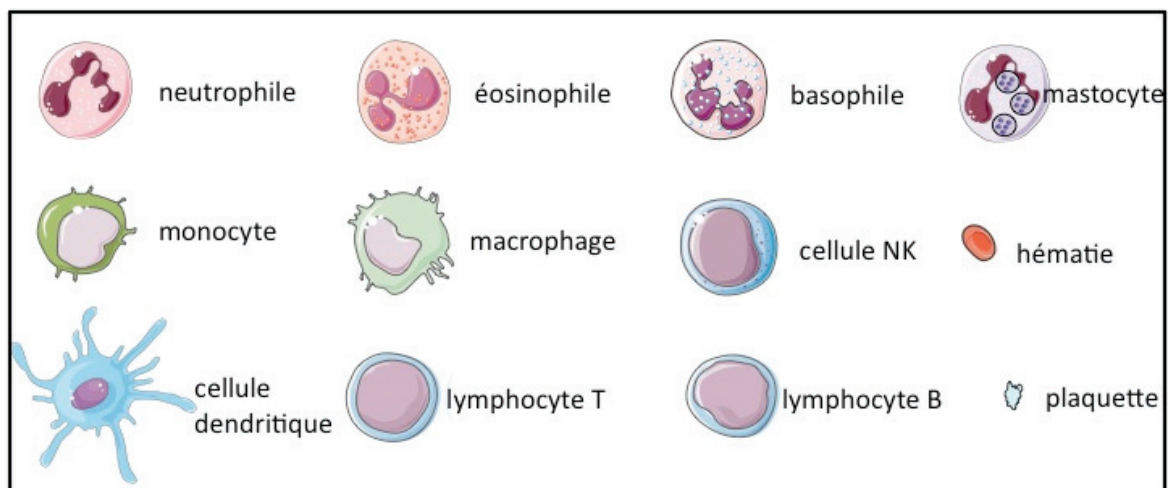


B / Inflammation



A. Les cellules immunitaires résidentes des tissus sont les *mastocytes*, les *macrophages* et les *cellules dendritiques*. Les cellules de l'immunité qui patrouillent dans l'organisme *via* le sang sont les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les cellules NK et les lymphocytes T et B. **Ce sont des cellules circulantes.**

B- Lors d'une infection, la présence de pathogène est détectée par ces cellules *via* leurs PRR, récepteurs reconnaissant les PAMP, qui sont des motifs particuliers aux agents infectieux. Les cellules immunitaires ainsi activées libèrent *des médiateurs de l'inflammation* dans le milieu extracellulaire, dont les effets combinés vont permettre le *recrutement de cellules circulantes*, *l'élimination du pathogène* et *la réparation de la lésion*.



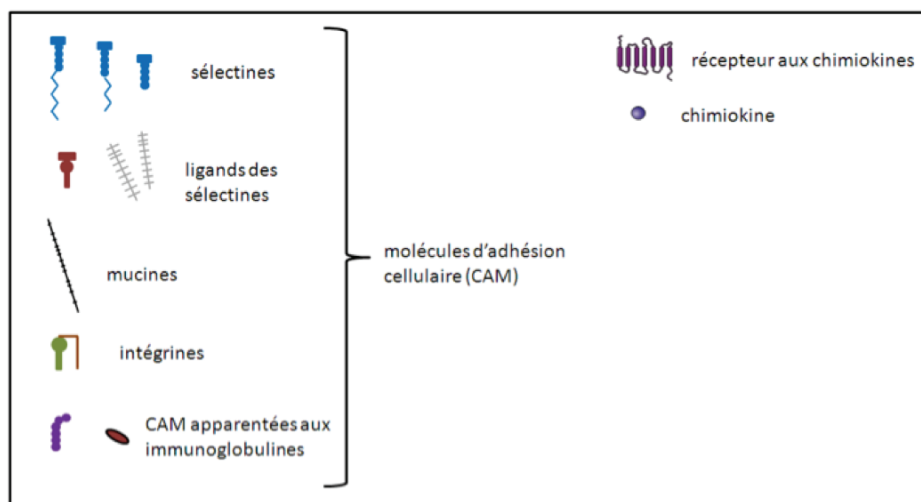
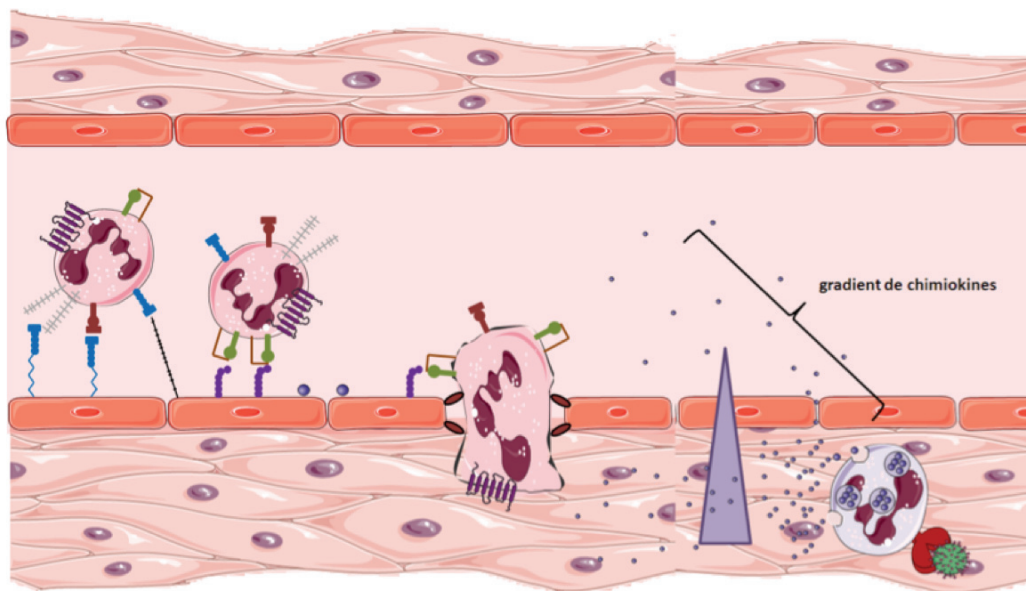
b- la phase de recrutement des leucocytes circulants (phase vasculaire)

Les quatre principales étapes de l'interaction sont :

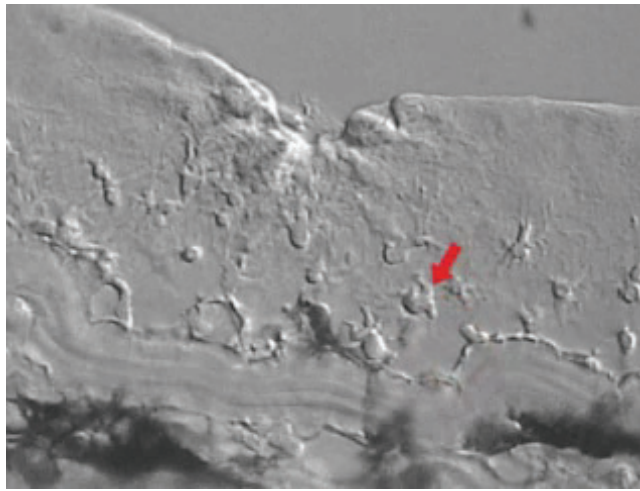
- Étape 1 : **Adhérence de roulement** ou Rolling (sélectines – mucines ; sélectines – ligands des sélectines)
- Étape 2 : **Adhérence ferme** ou margination ou Binding (CAM – intégrines)
- Étape 3 : **Diapédèse** ou extravasation (CAM – intégrines, chimiokines)
- Étape 4 : **Migration cellulaire** (gradient de chimiokines).

Les principales molécules d'adhérence cellulaires (ou CAM, pour *Cell Adhesion Molecule*) impliquées dans le recrutement des leucocytes circulants sont :

- Les **mucines**, des protéines glycosylées, et autres ligands glycosidiques ;
- Les **sélectines**, protéines interagissant avec des sucres portés par les ligands des sélectines et les mucines lors de l'adhérence de roulement ;
- Les **CAM apparentées aux Immunoglobulines** (ICAM1, V-CAM1...) ;
- Les **intégrines** (LFA-1, VLA-4, ...) interagissant avec les CAM apparentées aux Immunoglobulines, lors de l'adhérence ferme et de la diapédèse.

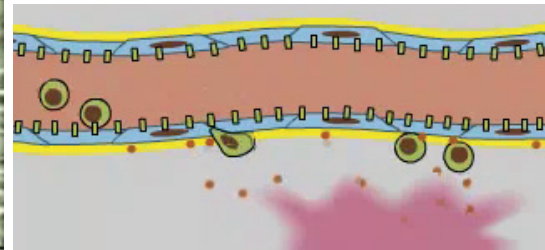
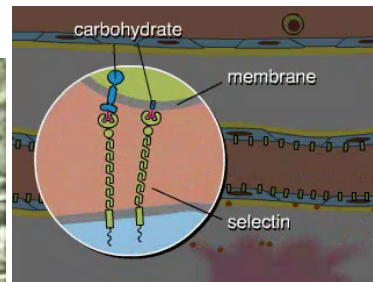


Le **recrutement des leucocytes circulants** peut être filmé chez l'animal après avoir induit artificiellement une zone d'inflammation. Les vidéos ci-dessous permettent de l'illustrer.



Vidéo 1 : Migration des phagocytes sur le site d'inflammation chez le Poisson zèbre.

Au cours de l'expérience, un poisson zèbre a été anesthésié puis une aiguille septique a été introduite à travers son tégument (haut du cliché) pour créer une zone d'inflammation. La transparence du tégument permet d'observer directement le recrutement des phagocytes (neutrophiles, flèche rouge). La vidéo d'une durée de seize minutes, a été accélérée en quinze secondes. [Extrait de B. Alberts *et al.*, 2011]

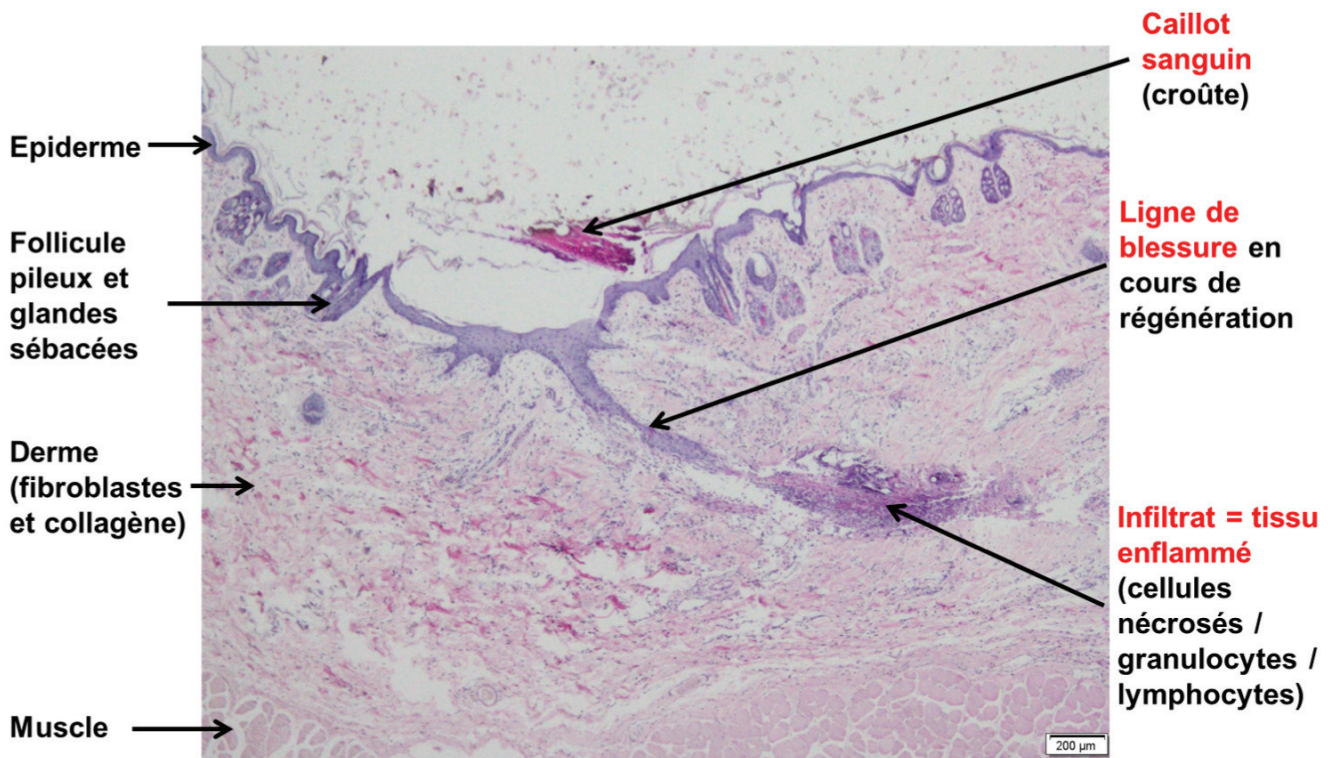


Vidéo 2 : Recrutement des leucocytes sur le site d'inflammation chez la Souris. La vidéo a été réalisée chez une souris anesthésiée. Elle permet d'observer l'écoulement sanguin dans un vaisseau en temps réel. Des ralentis permettent d'observer la phase de *rolling* (cercle rouge), de binding et de diapédèse. [Extrait de B. Alberts *et al.*, 2011]

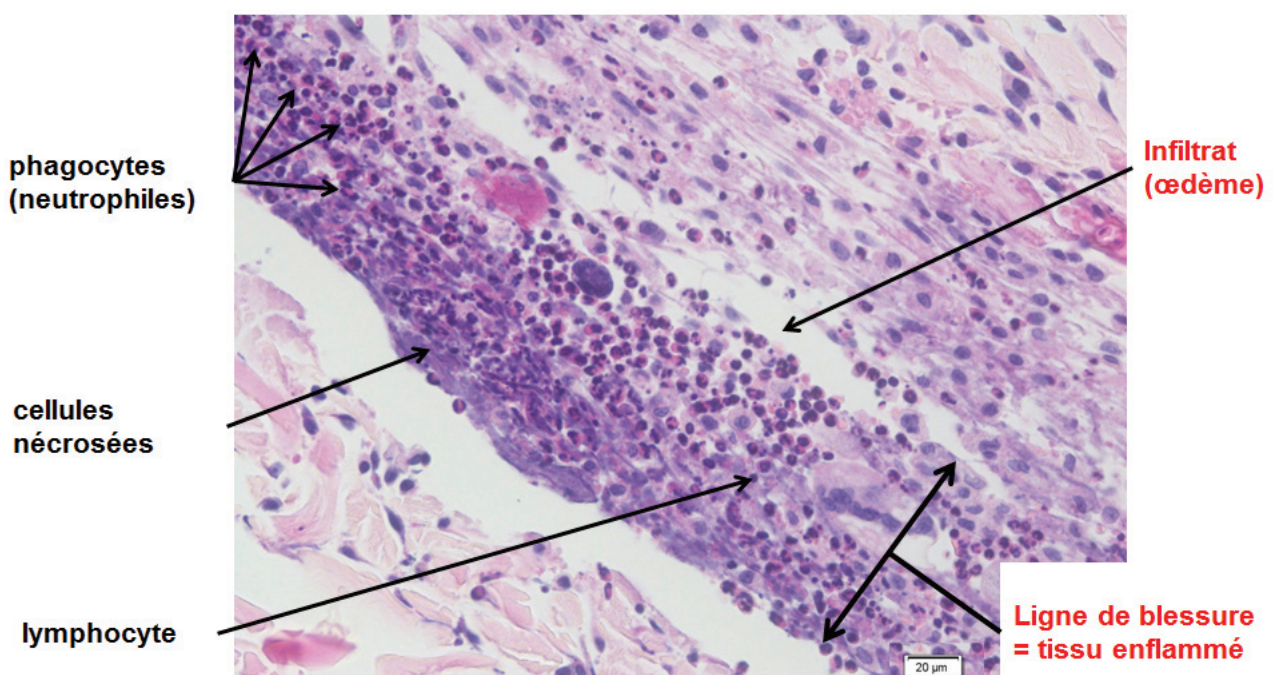
Vidéos disponibles sur internet : <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/enseigner/ressources-documentaires/recrutement-des-leucocytes>

III. Observation d'une coupe de peau en régénération

Les cellules immunitaires présentes dans une peau saine sont les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. On dit que ces cellules sont des **cellules résidentes**. Si des *leucocytes circulants*, et en particulier des granulocytes (*neutrophiles, éosinophiles et basophiles*), sont observables dans un derme infecté, c'est que des événements les ont conduit à quitter la circulation sanguine et à rejoindre le lieu de l'infection.



Coupe de peau de souris en cours de régénération suite à une blessure. Au cours de la cicatrisation, les cellules de la couche basale de l'épiderme migrent vers la lésion pour reconstituer les différentes couches de l'épiderme alors que les fibroblastes migrent dans le caillot sanguin pour régénérer le derme. La zone enflammée non encore cicatrisée (infiltrat) contient un amas de cellules nécrosées, de granulocytes et de lymphocytes. [Cliché : David Busti, coupe du commerce Nublat]



noyau plurilobé) et autres polymorphonucléaires. Notez que la coupe a été colorée à l'éosine et à l'hématoxyline qui présente les mêmes propriétés que le bleu de méthylène, et que par conséquent les critères de reconnaissance des cellules sanguines sont les mêmes que pour le frottis sanguin. [Cliché : David Busti, coupe du commerce Nublat].

C / Bibliographie

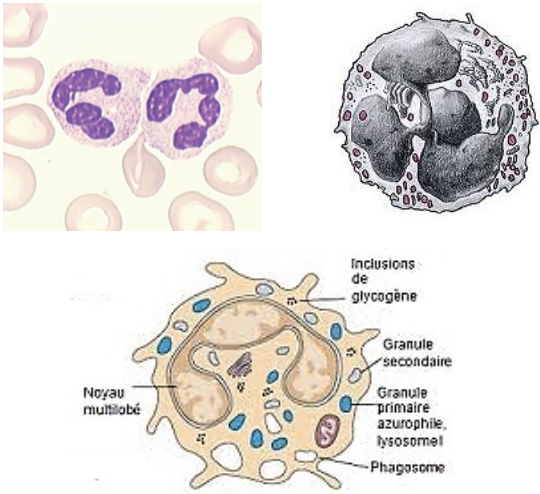
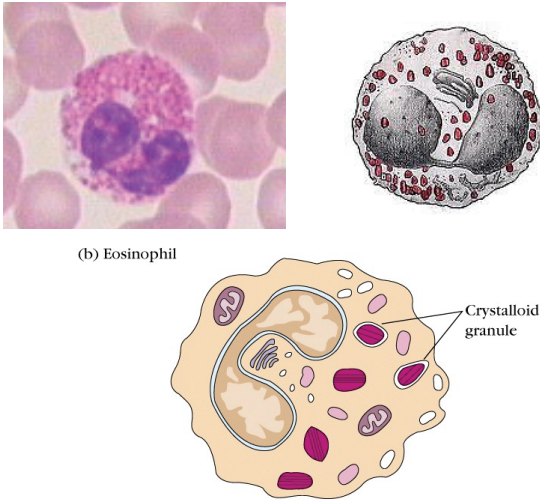
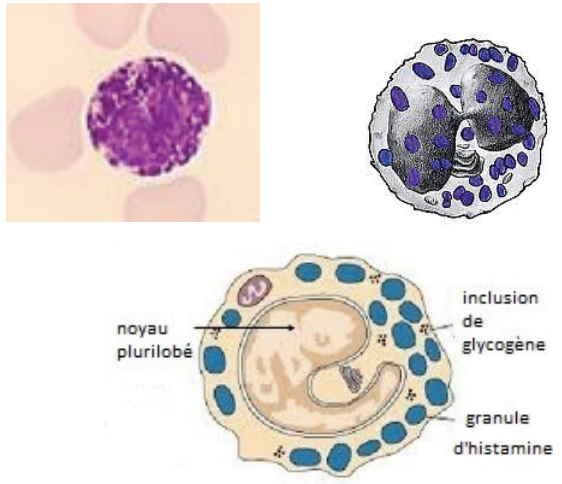
- Abul K. ABBAS, *Cellular and Molecular Immunology*, Philadelphia, Elsevier, 2007 (6^e éd.).
Abul K. ABBAS & Andrew H. LICHTMAN, *Basic Immunology : functions and disorders of the immune system*, Philadelphia, Elsevier, 2008 (3^e éd.).
Bruce ALBERTS *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*, Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 2011.
Janis KUBY, *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision*, Paris, Dunod, 2008 (6^e éd.).
David K. MALE, *Immunologie : aide mémoire illustré*, Bruxelles, De Boeck, 2005 (3^e éd.).
Kenneth MURPHY, *Janeway's Immunobiology*, London, Garland Science, 2012 (8^e éd.).
William K. OVALLE, *Netter's Essential Histology*, Philadelphia Elsevier, 2007.
Paul R. WEATHER *et al.*, *Atlas d'histologie fonctionnelle de Weather*, Bruxelles, De Boeck, 2008.

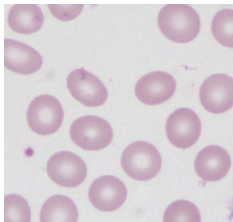
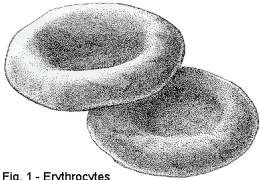
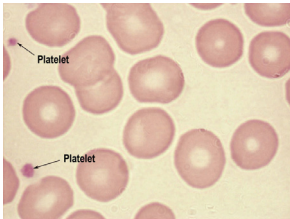
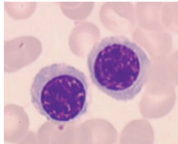
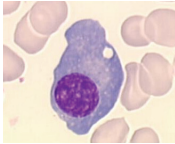
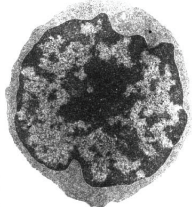
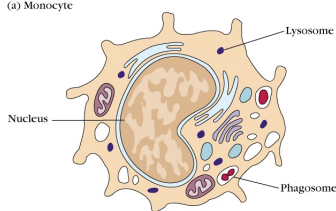
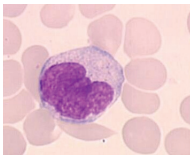
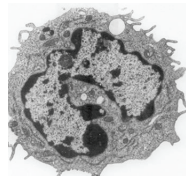
Dossier scientifique complet et proposition de progression pédagogique :

<http://accs.ens-lyon.fr/accs/ressources/immunité-et-vaccination/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire>

Les cellules de la lignée granulocytaire possèdent de nombreuses granulations dont les propriétés permettent d'en distinguer trois types.

Leurs noms dérivent de l'affinité de leurs granules pour certains colorants.

	Neutrophiles	Eosinophiles	Basophiles
Granulocyte (-polymorphonucléaire)		 (b) Eosinophil	
Signes particuliers	- Noyau plurilobé de 3 à 5 lobes - Nombreuses petites granulations dans le cytoplasme : - granulations primaires azurophiles (lysozyme, peroxydase, défensine, protéase) - granulations secondaires neutrophiles (lysozyme, collagénase, lactoferrine)	- Noyau bilobé - Cytoplasme contenant des grosses granulations éosinophiles, arrondies, colorées en rouge-orangé (peroxydase, hydrolases acides...)	- Noyau volumineux, irrégulier, fissuré pouvant prendre un aspect de trèfle - Nombreuses grosses granulations basophiles contenant de l'histamine.
Taille	10 à 15 μm de diamètre	10 à 15 μm de diamètre	10 à 12 μm de diamètre
Durée de vie	Courte : < 24 heures	Très courte : 4 à 5 heures dans la circulation sanguine, puis 8 à 12 jours dans les tissus.	Très courte : 5 à 7 heures
Fonctions	- Phagocytose sur le site de l'inflammation - Dégranulation - Pièges à bactéries	- Réponse inflammatoire allergique - Immunité antiparasitaire.	Rôle dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (allergie) et retardée par expression des récepteurs de surface pour le Fc des immunoglobulines IgE (proches fonctionnellement des mastocytes)
Nombre Distribution	50 à 70 % des leucocytes 2 000 à 7 000 /μL Essentiellement dans le sang mais aussi dans les tissus lors de la réponse inflammatoire	1 à 3 % des leucocytes 40 à 300 /μL Nombre augmenté dans le sang des sujets allergiques	0,5 à 1 % des leucocytes 75 /μL Dans le sang

Type cellulaire	Hématites (érythrocytes, globules rouges)	Plaquettes	Lymphocytes (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK)	Monocytes
	  Fig. 1 - Erythrocytes		 <i>naïf</i>  <i>activé et différencié</i> 	  
Morphologie et principales fonctions	Dépourvus de noyau Forme de disque biconcave Présence d'hémoglobine $\alpha_2\beta_2$. Fonction de transport du dioxygène (O_2) des poumons vers les tissus, transport d'une partie du dioxyde de carbone (CO_2) Durée de vie de 120 jours <i>5 000 000 par mm^3, 7 μm de diamètre</i>	Fragments cellulaires anucléés Granulations mauves (granules plaquettaires) Durée de vie 8 à 12 jours Rôle fondamental dans les processus de l'hémostase et de la coagulation <i>200000 à 400000 par mm^3, 3,5 μm de diamètre</i>	Petits lymphocytes naïfs : 6-8 μm Grand lymphocytes : 9-12 μm, plasmocytes, cellules NK Noyau rond, chromatine épaisse dense Cytoplasme bleu pâle avec assez peu d'organites (<i>naïfs</i>) Les lymphocytes T sont impliqués dans l'immunité cellulaire. Leur maturation s'effectue dans le thymus. Ils sont identifiés par l'expression de marqueurs pan-T : anti-CD3. T-CD4 : T helpers ou T auxiliaires T-CD8 : T cytotoxiques ou T suppresseurs Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale, ils effectuent leur maturation dans la moelle osseuse. <i>25 % des leucocytes, 6 à 12 μm de diamètre</i>	Cellules de grande taille Noyau volumineux central ou périphérique, réniforme. Microvillosités et expansions cytoplasmiques visibles en microscopie électronique Après être passés du sang dans les tissus, les monocytes s'y différencient en macrophages qui se trouvent disséminés dans l'ensemble de l'organisme. Fonctions cellulaires : phagocytose, présentation de l'antigène (macrophages activés)... <i>10 % des leucocytes, 15 à 35 μm de diamètre</i>