

Stage de formation
17 & 18 mars 2014

Conférences

Institut français de l'Éducation

Ateliers

École normale supérieure de Lyon (site Monod)

Histologie

David Busti

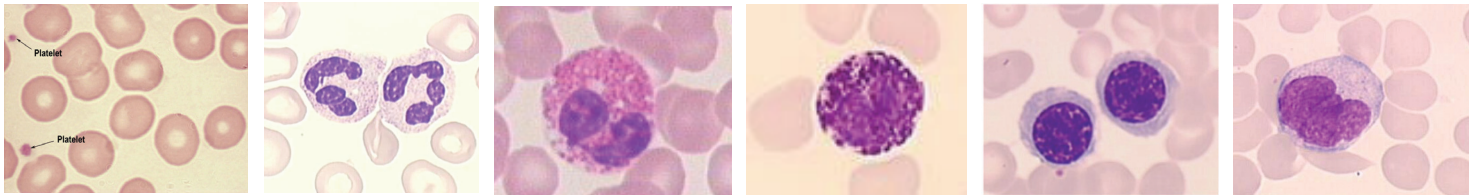
Nathalie Davoust-Nataf

Informations et ressources & **<http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination>**

immunité et vaccination

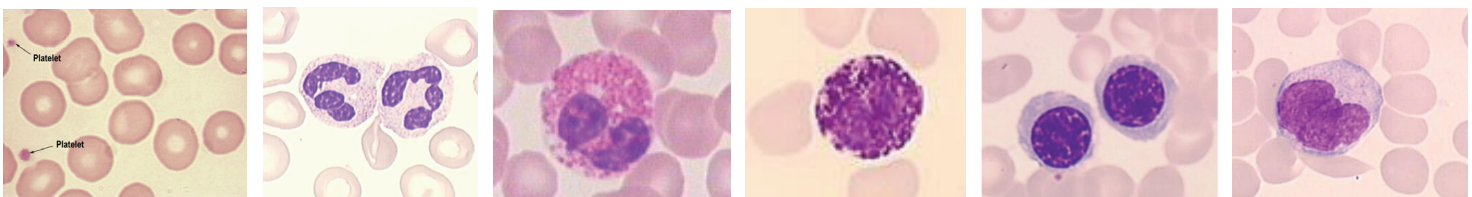
Immunité vaccination **HISTOLOGIE**

David Busti (david.busti@ens-lyon.fr)
& **Nathalie Davoust-Nataf** (nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr)



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.



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 :

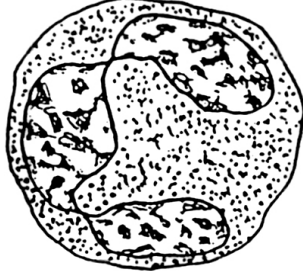


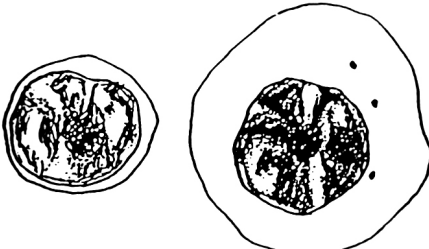
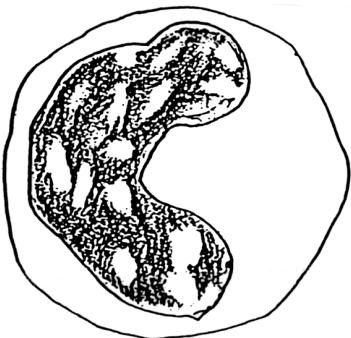
- neutrophiles (50 à 70 % des leucocytes circulants)
- lymphocytes (25 %)
- monocytes (10%)
- éosinophiles (1 à 2 %)
- basophiles (<1%)

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  50 à 70 %	6 000 à 8000 par mm ³	10 à 15 µm
	Eosinophile  1 à 3 %		
	Basophile  0,5 à 1 %		
Leucocytes non polymorphonucléaires ou agranulocytes	Lymphocyte  25 %	6 000 à 8000 par mm ³	6 à 12 µm
	Monocyte  10 %		

III. 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

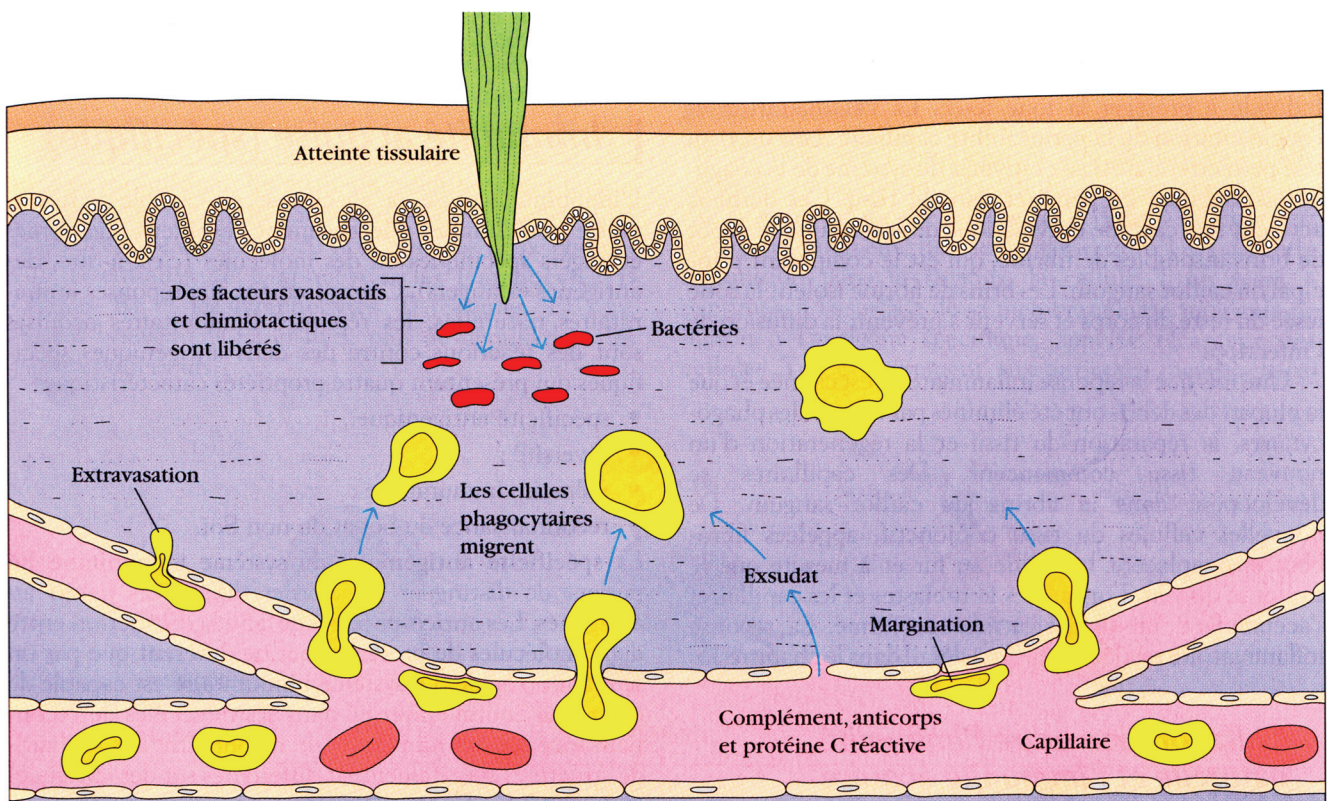
I. Définition de l'inflammation

L'inflammation a été définie au 1^{er} siècle après JC par un médecin romain nommé Celsus (ou Celse). Celui-ci énonce « le quadrilatère de Celse » décrivant les symptômes accompagnant l'infection d'une plaie :

- *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 réponse inflammatoire

La réponse 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

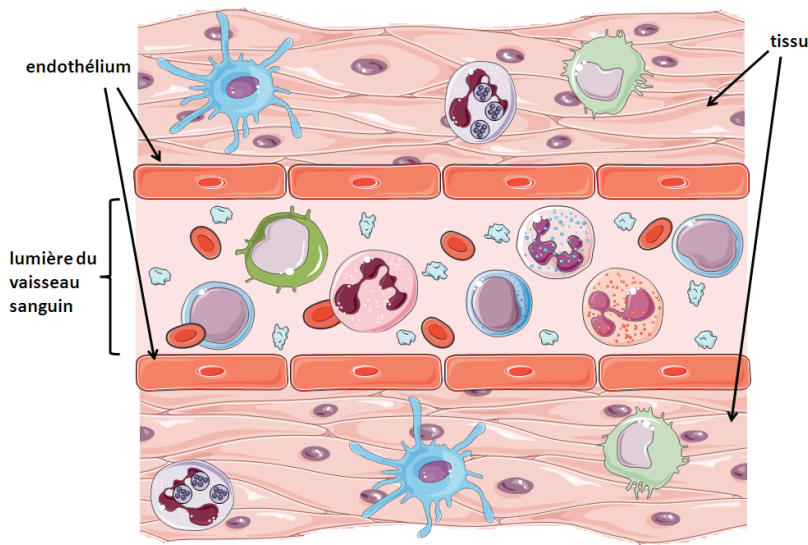
Le rôle des récepteurs de type PRR :

- Les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) sont des motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes.
- Les PRRs (*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, la sécrétion de médiateurs chimiques de l'inflammation et l'expression des molécules de co-stimulation pour les cellules présentatrices d'antigène).

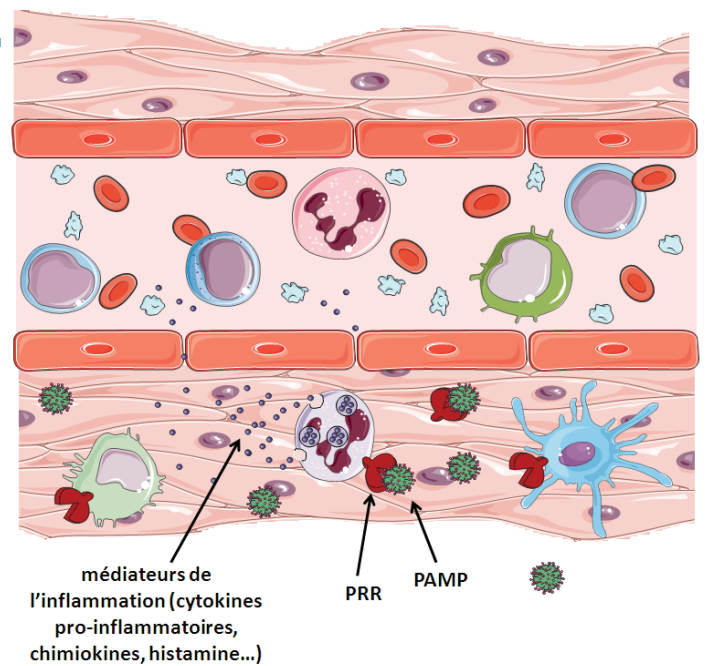
Le rôle des médiateurs chimiques de l'inflammation :

- 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).
- Chimiokines, 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

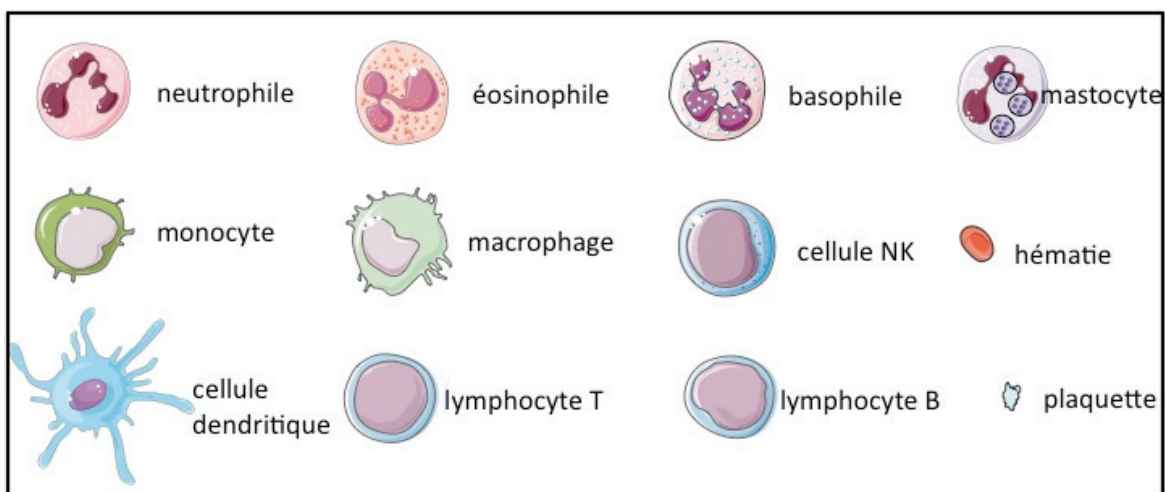


B. Inflammation



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.



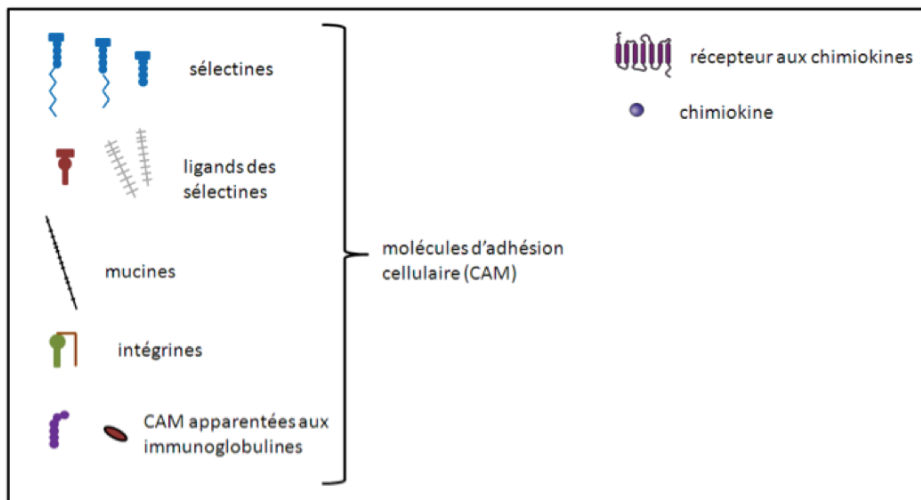
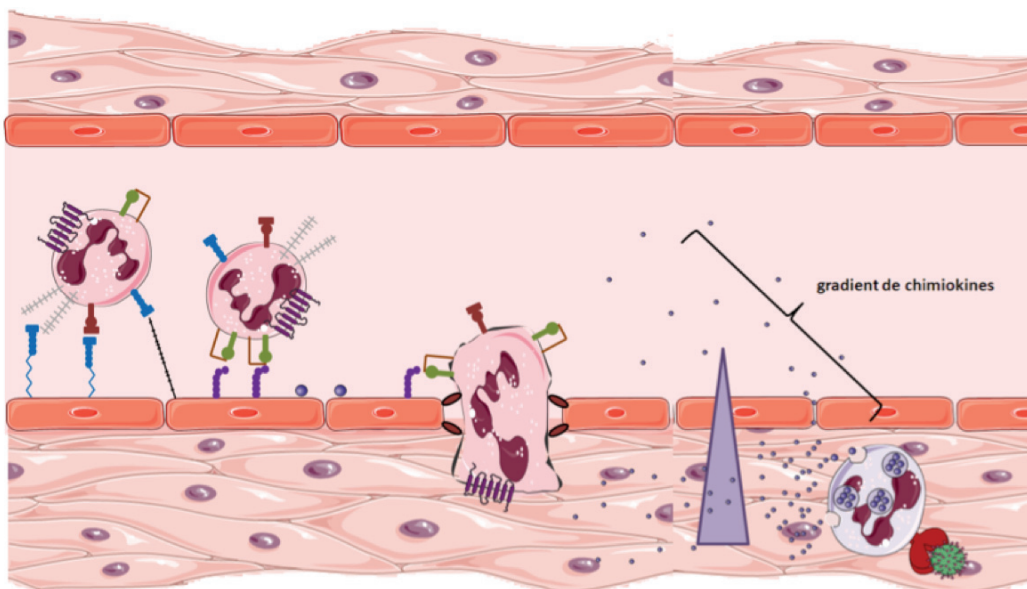
b) la phase de recrutement des leucocytes circulants (phase vasculaire)

Les quatre principales étapes de l'interaction sont :

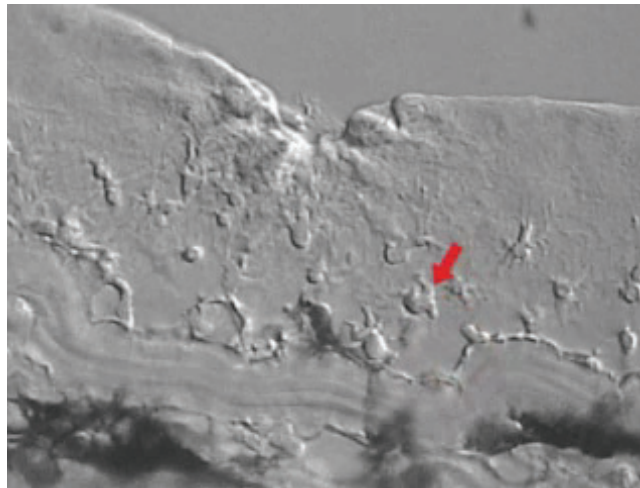
- Étape 1 : Adhérence de roulement ou *Rolling* (Sélectines – mucines)
- Étape 2 : Adhérence ferme ou margination ou *Binding* (CAM – Intégrines)
- Étape 3 : Diapédèse ou extravasation (CAM - Intégrines, chimiokines)
- Étape 4 : Migration cellulaire (gradient de chimiokines).

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.

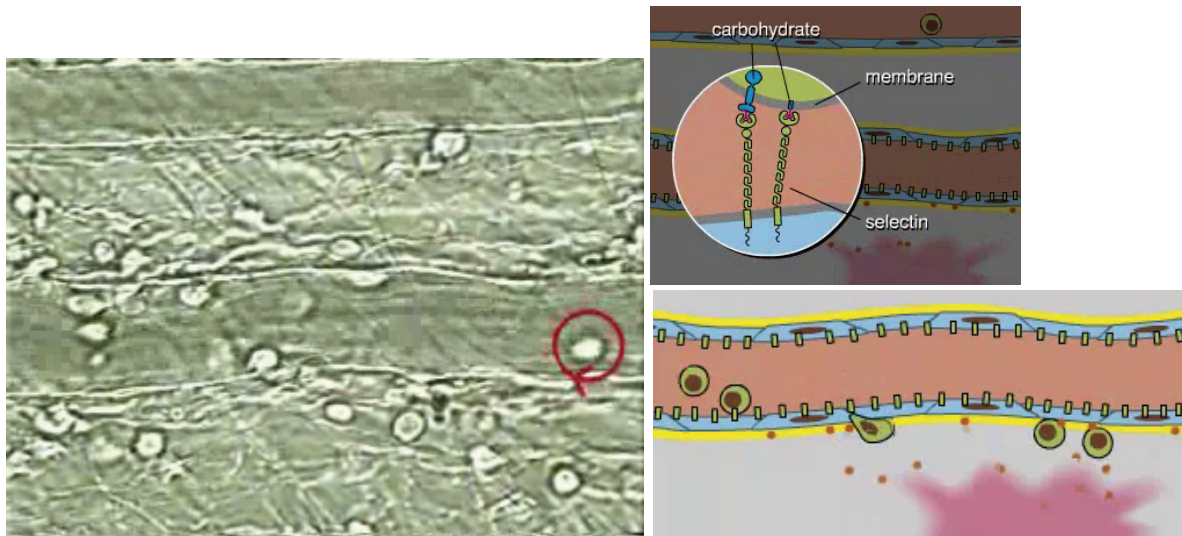


Le recrutement des leucocytes circulants peut être filmé chez l'animal après avoir induit artificiellement une zone d'inflammation. Les vidéos ci-dessous permettent de l'illustrer.



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 16 minutes, a été accélérée en 15 secondes. (Extrait de Alberts, *Biologie moléculaire de la cellule*, 2011)



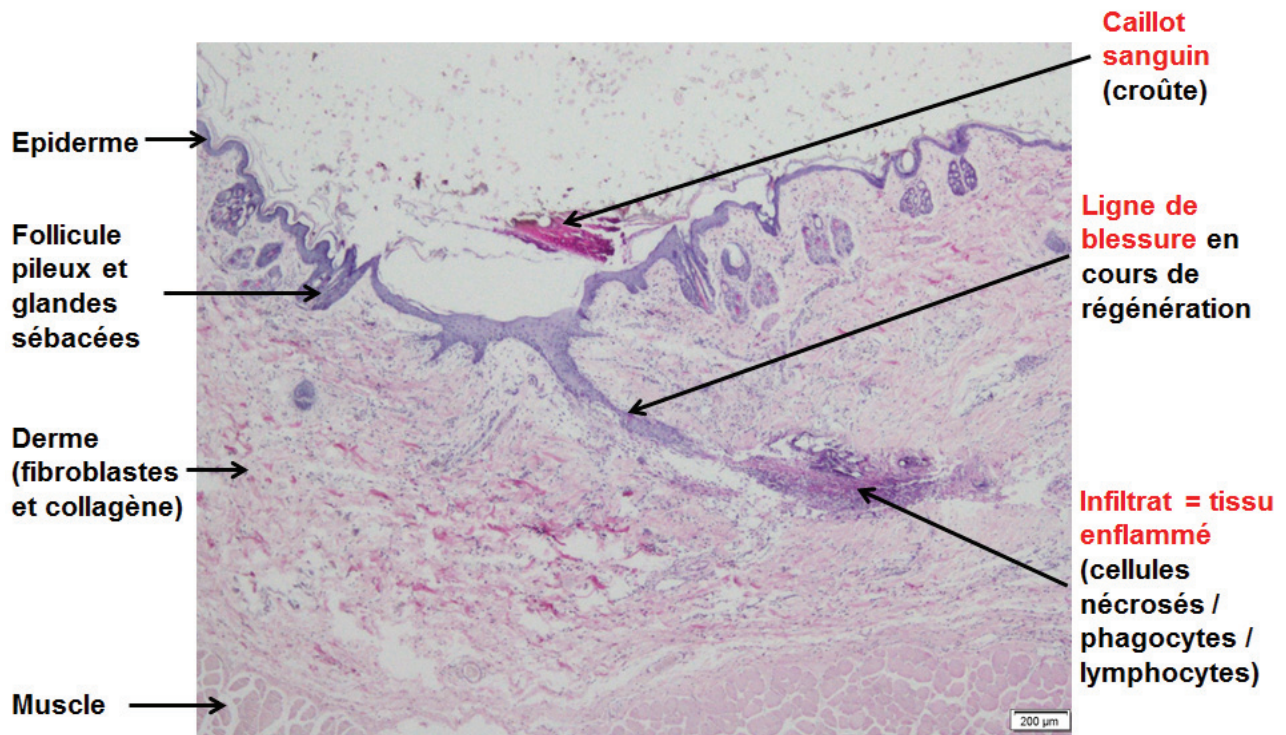
Vidéo 2 : Recrutement des leucocytes sur le site d'inflammation chez la Souris.

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*, de *binding* et de diapédèse. (Extrait de B. Alberts *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*, 2011)

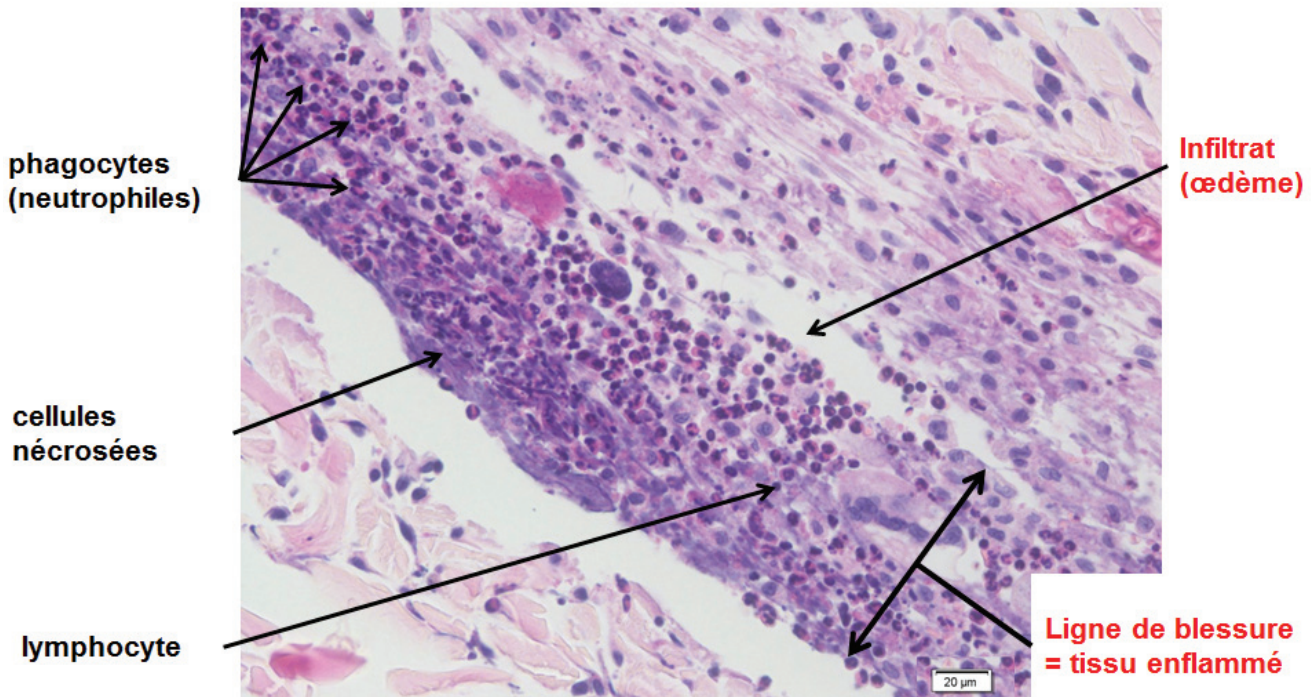
Vidéos disponibles sur <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/enseigner/ressources-documentaires/recrutement-des-leucocytes>

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 phagocytes et de lymphocytes. (Cliché David Busti, coupe du commerce Nublat)



Détail de la zone infiltrée (non encore cicatrisée) de la coupe précédente. Un plus fort grossissement sur la zone encore enflammée permet de reconnaître des lymphocytes (à gros noyau violet sombre et rond), des cellules nécrosées, des neutrophiles (à cytoplasme rose et 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 Nublaf)

C / Bibliographie

- Abul K. ABBAS, *Cellular and Molecular Immunology*, Philadelphia, Elsevier, 2007 (6^e ed.).
- 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 Hhystology*, 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://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire>