



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
FILIERE « Science de la Vie -SVI »
Module : « **SIGNALISATION CELLULAIRE** »

Travaux pratiques de signalisation cellulaire

Pr. Fouad BENHNINI

Année universitaire 2025-2026

TP N°1 : Étude qualitative des cellules sanguines sur frottis sanguin coloré à l'aide de la technique MGG (May-Grünwald-Giemsa)

Le sang est un tissu conjonctif liquide, composé de deux principaux éléments : le plasma sanguin et les éléments figurés.

Le plasma, représentant environ 55 % du volume sanguin total, est la phase liquide du sang. Il est constitué principalement d'eau, d'ions, et de diverses protéines telles que l'albumine, les globulines et les facteurs de coagulation. On y trouve également des nutriments, des déchets métaboliques et d'autres substances dissoutes, qui sont essentiels au transport et à l'échange de substances dans l'organisme.

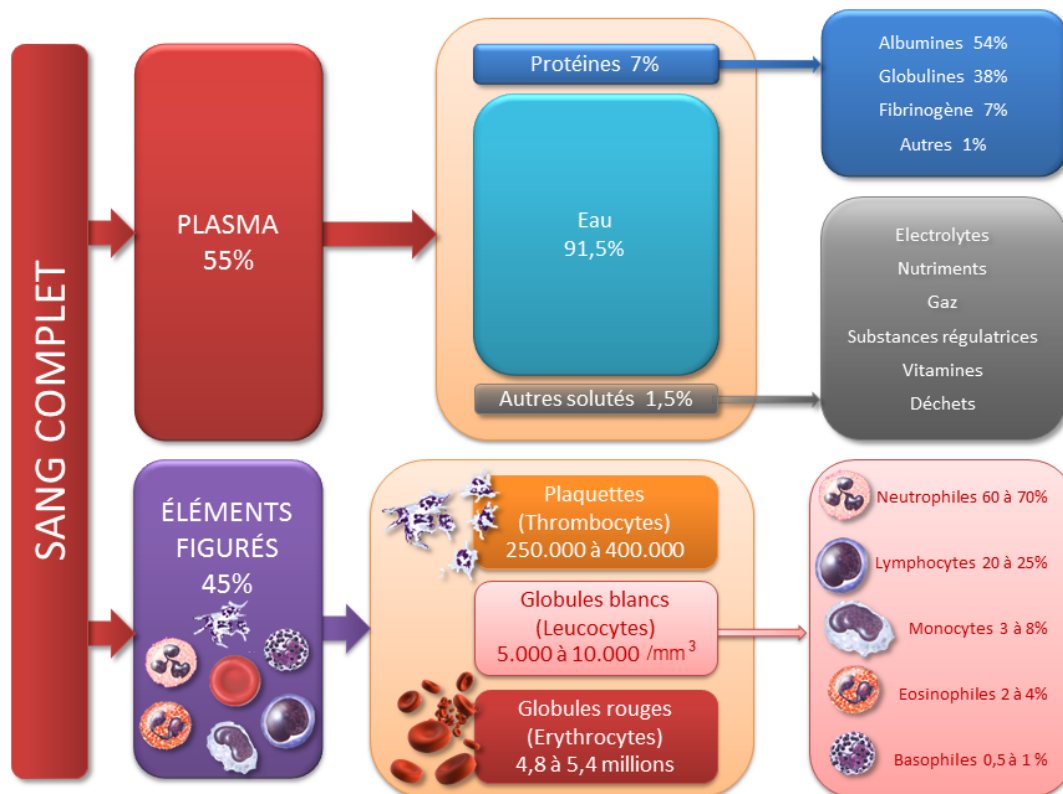
Les éléments figurés, qui forment les 45 % restants, comprennent les cellules en suspension dans le plasma. Parmi ces éléments figurés, on distingue :

Les globules rouges (érythrocytes), dont la fonction principale est le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et l'élimination du dioxyde de carbone.

Les globules blancs (leucocytes), essentiels pour la défense immunitaire de l'organisme contre les infections et autres agressions pathogènes.

Les plaquettes (thrombocytes), qui jouent un rôle clé dans la coagulation sanguine en aidant à la formation de caillots pour prévenir les hémorragies.

Ensemble, ces composants assurent le bon fonctionnement du système circulatoire et contribuent à maintenir l'homéostasie, en régulant la distribution des gaz, des nutriments et des déchets métaboliques, tout en participant à la protection de l'organisme contre les infections et les saignements.



Les globules blancs, ou leucocytes, jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire et se divisent en plusieurs types cellulaires ayant des fonctions spécialisées :

Les Neutrophiles : Ce sont les leucocytes les plus abondants dans le sang. Ils agissent comme des phagocytes spécialisés, capturant et détruisant les agents pathogènes, principalement des bactéries, par un processus de phagocytose. Ils représentent la première ligne de défense lors d'une infection.

Les Lymphocytes : Ces cellules sont au cœur de la réponse immunitaire spécifique. On distingue :

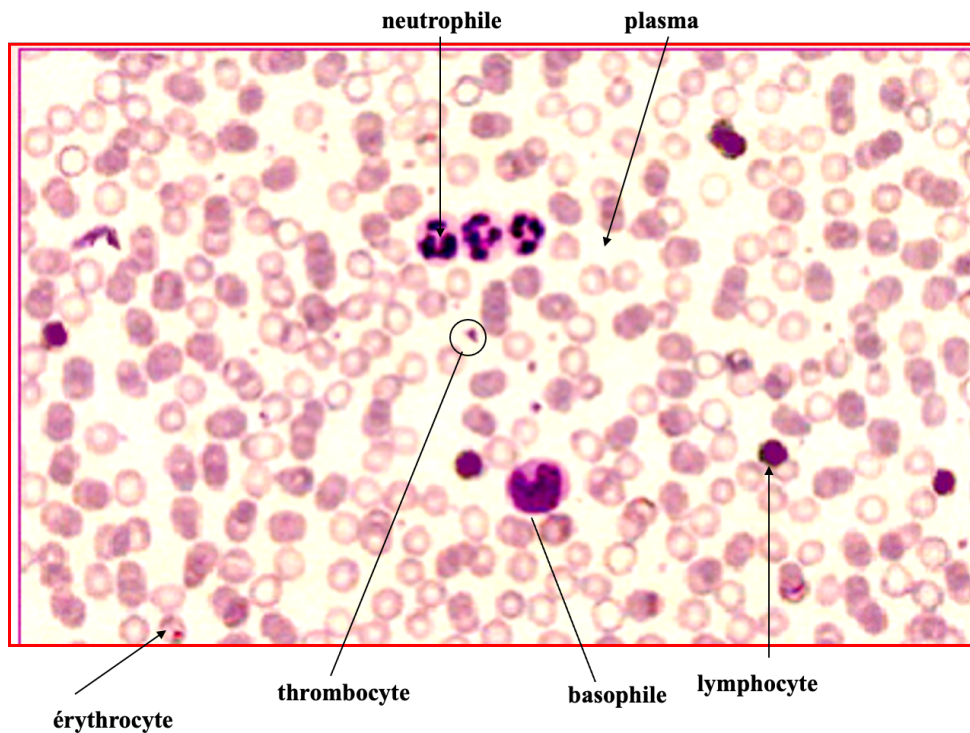
Les lymphocytes B, qui produisent des anticorps et sont responsables de l'immunité humorale (neutralisation des pathogènes via les anticorps).

Les lymphocytes T, qui attaquent directement les cellules infectées ou anormales (comme les cellules tumorales ou virales) et orchestrent la réponse immunitaire par l'activation d'autres cellules.

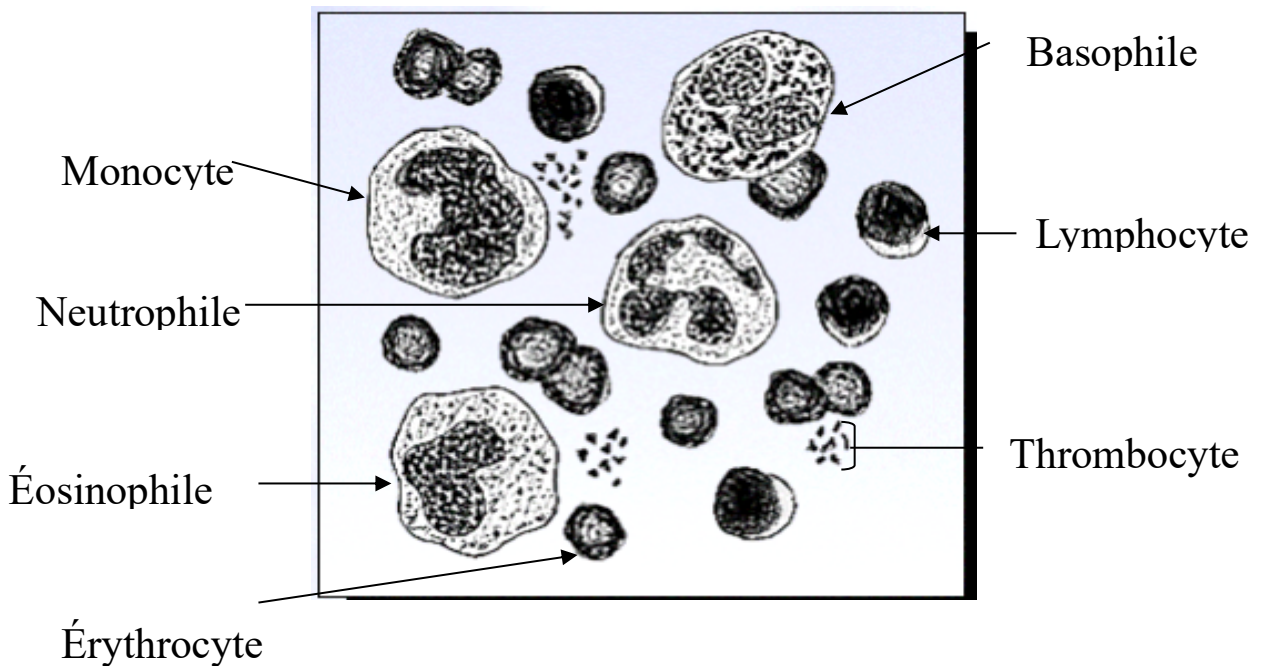
Les Monocytes : Dans le sang, les monocytes jouent un rôle important dans la phagocytose et l'élimination des pathogènes ou des cellules endommagées, ainsi que dans la libération de cytokines pour coordonner la réponse immunitaire. Une fois dans les tissus, ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques.

Les Éosinophiles : Ces leucocytes sont impliqués dans la défense contre les infections parasitaires, et ils jouent un rôle important dans les réactions allergiques en modulant la réponse inflammatoire

Les Basophiles : Ils libèrent des médiateurs inflammatoires, tels que l'histamine, et participent aux réactions allergiques et inflammatoires en amplifiant la réponse immunitaire locale, notamment dans les cas d'hypersensibilité immédiate (comme l'anaphylaxie).



Les éléments figurés du sang



La coloration de May-Grünwald-Giemsa

La coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG), ou la coloration de Pappenheim, est une méthode de coloration utilisée en hématologie pour différencier les cellules sanguines, notamment les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes, selon leurs granulations cytoplasmiques et leurs formes nucléaires. Les granulations cytoplasmiques peuvent révéler des indices importants sur le type de globules blancs présents, facilitant ainsi la classification des leucocytes en neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes. En outre, l'observation des caractéristiques nucléaires, telles que la forme, la taille, la densité chromatinienne et la couleur des noyaux, permet d'identifier les différents types de cellules sanguines, de les caractériser et de les distinguer les unes des autres.

Principe de la coloration :

Le principe de la coloration repose sur l'interaction de deux colorants neutres :

Le May-Grünwald est un colorant neutre qui contient à la fois un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène (**sous forme d'éosinate de bleu de méthylène**).

Le Giemsa est également un colorant neutre qui contient un colorant acide, l'éosine, ainsi qu'un colorant basique (qui est métachromatique), l'azur de méthylène (**sous forme d'éosinate d'azur de méthylène**).

Variabilité des Colorants :

Deux comportements distincts des colorants coexistent dans cette coloration :

La coloration orthochromatique se caractérise par le fait que le colorant conserve sa couleur une fois fixé sur le constituant cellulaire (comme dans le cas de l'éosinate de méthylène : la couleur orange de l'éosine est conservée, de même que la couleur bleue du bleu de méthylène).

La coloration métachromatique est marquée par le changement de couleur du colorant une fois fixé sur le constituant cellulaire (comme avec l'azur de méthylène bleu qui devient pourpre une fois fixé sur les constituants azurophiles).

Les affinités sélectives pour les colorants :

Les colorants May-Grünwald (éosinate de bleu de méthylène) et Giemsa (éosinate d'azur de méthylène) sont initialement dissous dans de l'alcool méthylique sous une forme inactive. Lorsque de l'eau neutre est ajoutée, ces colorants libèrent des ions colorés : des ions acides (comme l'éosine, chargé négativement) et des ions basiques (comme le bleu de méthylène et l'azur de méthylène, chargés positivement).

Ces ions interagissent de manière sélective avec les structures cellulaires en fonction de leur charge : les structures chargées positivement (+) attirent les colorants acides, tandis que les structures chargées négativement (-) attirent les colorants basiques. Ce processus confère à chaque composant cellulaire une teinte caractéristique et permet ainsi de distinguer clairement les constituants cellulaires sous le microscope.

Les structures cellulaires peuvent être classées selon leur affinité pour les colorants en quatre grandes catégories :

1- Acidophiles ou éosinophiles : Ce sont des structures riches en protéines basiques, chargées positivement (+), qui ont une forte affinité pour les colorants acides, comme l'éosine. Ces structures apparaissent typiquement en **rouge ou rose**.

2- Basophiles : Ces structures, chargées négativement (-), contiennent souvent des acides nucléiques ou des composants riches en ARN. Elles attirent les colorants basiques, tels que le bleu de méthylène ou l'azur de méthylène, et se colorent en **bleu ou violet**.

3- Neutrophiles : Les structures neutrophiles n'ont pas une affinité marquée pour les colorants acides ou basiques. Cela conduit à **une coloration intermédiaire, souvent un mélange de gris ou de violet pâle**, plutôt que des couleurs intenses comme le rose ou le bleu.

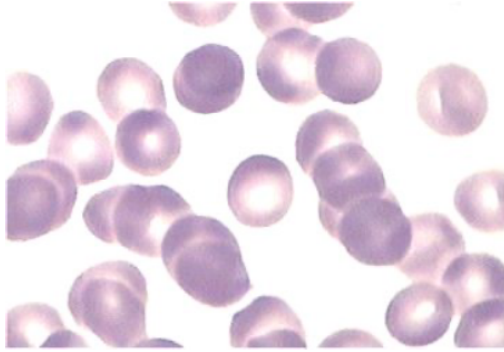
4- Azurophiles : Les structures azurophiles sont celles qui fixent des colorants métachromatiques, comme l'azur de méthylène. Ce phénomène provoque un changement de couleur, donnant aux structures une teinte pourpre distincte.

1. Affinité acidophile ou éosinophile :

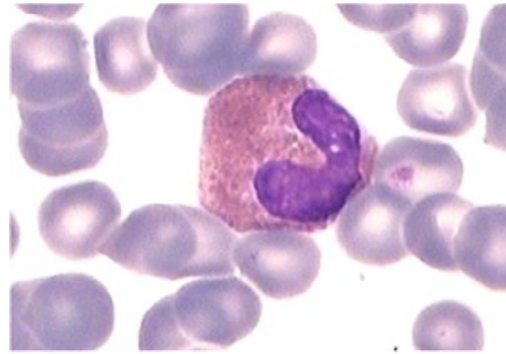
Les structures cellulaires basiques présentent une forte affinité pour les ions éosinates, leur conférant des teintes variant du gris rosé au rouge orangé. Ce phénomène est particulièrement observable dans les hématies (globules rouges) et le cytoplasme des polynucléaires (granulocytes), notamment celui des neutrophiles.

Cependant, c'est au niveau des granules des polynucléaires éosinophiles (PE) que cette affinité se manifeste de manière significative, leur conférant une coloration orange caractéristique. Ces granulations sont riches en protéines spécifiques et en enzymes, jouant un rôle clé dans la réponse immunitaire contre les infections parasitaires et dans les réactions allergiques.

Cytoplasme gris rosé des hématies



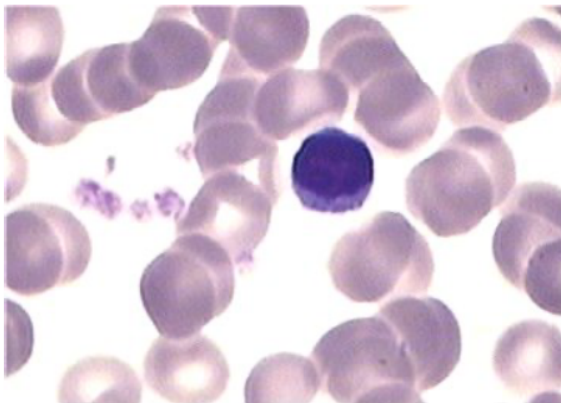
Granulations orangées du PE



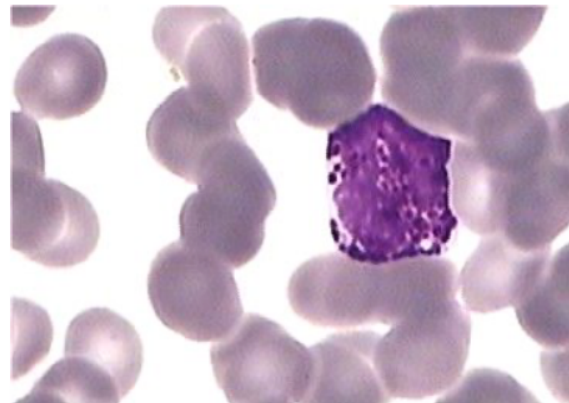
2 - Affinité basophile :

Les structures cellulaires acides présentent une forte affinité pour le bleu de méthylène, leur conférant des teintes de bleu plus ou moins soutenues. Les granulations des polynucléaires basophiles (PB) se distinguent particulièrement par leur teinte violet-noir caractéristique, résultant de la présence de médiateurs de l'inflammation, tels que l'histamine, qui jouent un rôle essentiel dans les réactions allergiques et inflammatoires. Cette affinité pour les colorants basiques est également observée dans les cytoplasmes des mononucléaires et des plaquettes.

Cytoplasme bleu soutenu du petit lymphocyte



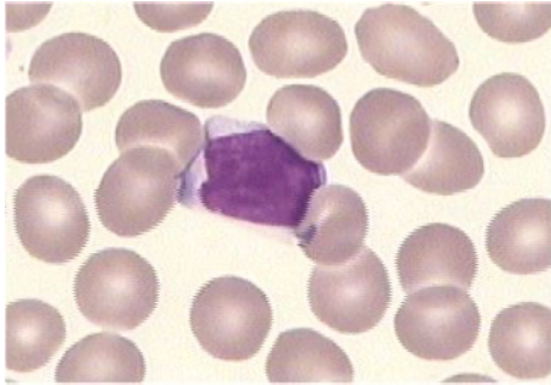
Granulations bleues noires du PB



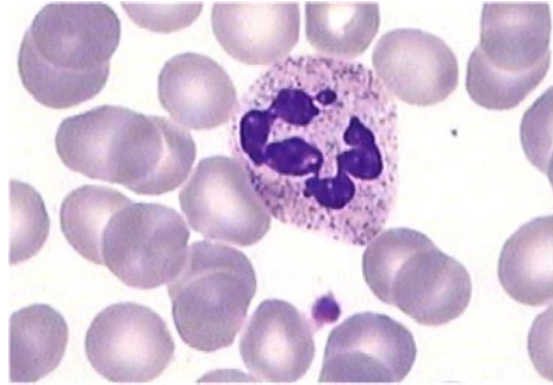
3 - Affinité neutrophile :

Certaines structures cellulaires ont la capacité de se lier à la fois aux ions acides et basiques, ce qui se traduit par une coloration violette de leurs composants. Cette caractéristique est notamment observable dans la chromatine des cellules nucléées et les granulations des polynucléaires neutrophiles (PN), qui affichent une teinte intermédiaire révélant leur affinité mixte pour les colorants.

Noyau du grand lymphocyte



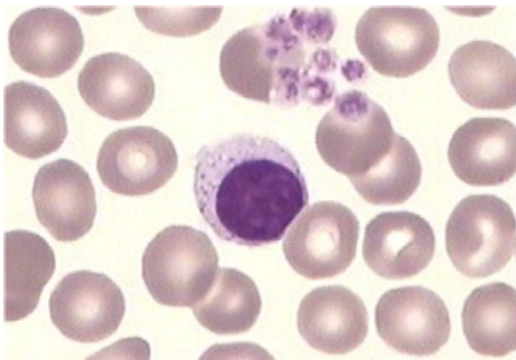
Granulations violettes du PN



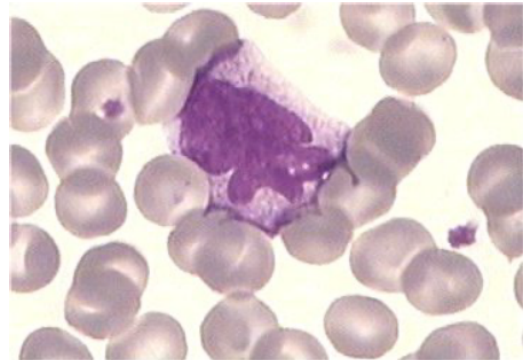
4 - Affinité azurophile :

Cette affinité métachromatique est principalement observée au niveau des granulations des monocytes, des grands lymphocytes et des thrombocytes, donnant ainsi une teinte distincte de rouge pourpre aux structures qui captent l'azur de méthylène.

Granulations du grand lymphocyte et des plaquettes



Granulations en poussière du monocyte



Protocole expérimental 1 : **Observation des cellules sanguines avec la solution de Ringer**

A) Matériel requis :

- Solution de Ringer
- Eau distillée
- Lames à bord rodé dégraissées à l'alcool
- Lamelles couvre-objets
- Alcool éthylique ou méthylique à 95 %
- Pissette d'eau distillée
- Échantillon de sang de rat
- Papier absorbant pour éliminer les excès de liquide
- Pince pour manipuler les lames
- Microscope optique

B) Étapes :

1. **Préparation de l'échantillon :**
 - Mélanger une petite quantité de sang avec un volume égal de solution de Ringer pour maintenir un environnement physiologique favorable aux cellules.
2. **Préparation des lames :**
 - Dégraisser et nettoyer soigneusement les lames en utilisant de l'éthanol à 95%.
3. **Réalisation du frottis :**
 - Déposer une goutte de sang de taille moyenne à environ 1,5 cm du bord droit d'une lame propre.
 - Utiliser une lamelle couvre-objet inclinée à environ 45 degrés pour étaler la goutte de sang. Poser délicatement le bord de la lamelle en contact avec la goutte, puis la faire glisser rapidement vers la gauche de la lame.
 - Le frottis devrait être une fine couche monocellulaire, s'étendant idéalement jusqu'à environ 1 cm du bord opposé.
 - Agiter légèrement la lame pour accélérer le séchage du frottis.
4. **Fixation du frottis :**
 - Plonger la lame dans l'alcool à 95 % pendant 3 à 5 minutes pour fixer le frottis.
 - Retirer la lame et laisser le frottis sécher complètement à l'air libre.
5. **Observation au microscope :**
 - Placer la lame sous le microscope optique.
 - Commencer par un objectif faible pour localiser le frottis, puis augmenter le grossissement pour examiner les détails des cellules sanguines.

Protocole expérimental 2 : Coloration May-Grünwald-Giemsa

A) Matériel requis :

- Lames à bord rodé dégraissées à l'alcool
- Lamelles couvre-objets
- Eau tamponnée à pH 6,8 (PBS, Phosphate-Buffered Saline)
- Alcool éthylique ou méthylique à 95 %
- Pissette d'eau distillée
- Échantillon de sang de rat
- Papier absorbant pour éliminer les excès de colorant
- Bécher, boîte de Laveran ou boîte de Pétri
- Pince pour manipuler les lames
- Microscope optique

B) Étapes :

1. **Préparation du frottis :**
 - Préparer un frottis de sang sur une lame propre sans solution de Ringer, en suivant les étapes de l'Étape 3 du protocole 1.
2. **Coloration avec May-Grünwald :**
 - Immerger la lame dans une solution de May-Grünwald pendant 5 minutes.
 - Après 5 minutes, transférer la lame dans de l'eau tamponnée (PBS, pH 6,8) et laisser agir 5 minutes supplémentaires.
 - Rincer brièvement la lame à l'aide d'une pissette remplie d'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant sans compromettre la coloration.
3. **Coloration avec Giemsa :**
 - Plonger la lame dans une solution de Giemsa diluée (1 volume de Giemsa pour 10 volumes d'eau tamponnée, PBS à pH 6,8).
 - Laisser agir entre 15 et 20 minutes pour une coloration optimale.
 - Rincer rapidement la lame avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant, puis égoutter et sécher légèrement avec du papier absorbant.
4. **Séchage :**
 - Laisser la lame sécher complètement à l'air libre avant observation.
5. **Observation au microscope :**
 - Placer la lame sous le microscope.
 - Commencer avec un objectif de faible grossissement pour localiser le frottis, puis augmenter le grossissement pour examiner les détails des cellules.
 - Observer et documenter les érythrocytes, leucocytes et plaquettes en notant les différences de coloration et les caractéristiques morphologiques.
6. **Compte-rendu :**
 - Prendre des photos et noter les observations en utilisant un grossissement de x20, puis x40. Identifier et consigner les caractéristiques distinctives des différentes cellules dans le tableau suivant :

Cellule		Forme	Noyau	Cytoplasme	Granulations	Schéma
Globules rouges						
Globules blancs	Granulocyte neutrophile					
	Granulocyte éosinophile					
	Granulocyte basophile					
	Lymphocyte					
	Monocyte					
Plaquettes						