

Préparation d'une suspension cellulaire à partir de sang humain et d'un organe murin

Séparation de cellule sur coussin de Ficoll

1. Intérêt de la séparation des lymphocytes des autres éléments figurés du sang

C'est la première étape de nombreuses analyses d'immunologie cellulaire. Elle permet le typage des lymphocytes et la numération des sous-populations.

1.1. Identification des lymphocytes T

Les lymphocytes T possèdent un marqueur membranaire, le CD2 (CD signifiant Classe de Différenciation). CD2 présente de l'affinité pour une protéine membranaire des globules rouges de mouton. En utilisant cette propriété, on peut repérer puis numérer les lymphocytes T.

1.2. Identification de sous types de lymphocytes T

On distingue 2 types de lymphocytes T circulant dans le sang par la présence de marqueurs membranaires exclusifs CD8 (lymphocytes T CD8⁺ ou LT8) et CD4 (lymphocytes T CD4⁺ ou LT4). La distinction entre ces 2 marqueurs se fait grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux (importance dans le suivi clinique du SIDA).

1.3. Identification du type HLA (Human Lymphocyte Antigen)

Cette étude permet de déterminer le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Le CMH (ou HLA) est différent d'un individu à l'autre et correspond à la carte d'identité immunologique d'un individu. H est en outre indispensable au fonctionnement du système immunitaire et responsable du rejet de greffe (cas d'incompatibilité entre CMH du greffon et du receveur).

1.4. Réalisation de tests fonctionnels

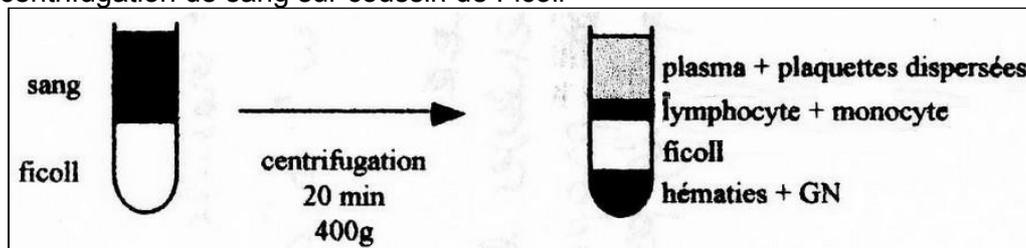
L'obtention de lymphocytes purifiés est indispensable à la compréhension de leur fonction.

2. Principe de la séparation des lymphocytes / monocytes

• La séparation des lymphocytes est obtenue par centrifugation sur un coussin de Ficoll (polymère glucidique ramifié artificiel de masse molaire élevée 400 000 Da). La solution de Ficoll est de densité égale à 1,077. Les éléments figurés ont des densités différentes:

- d (lymphocytes, monocytes, plaquettes) < 1,077 alors que
- d (hématies et granulocytes neutrophiles) > 1,077

• Effet de la centrifugation de sang sur coussin de Ficoll



A l'interface plasma-Ficoll, les lymphocytes se positionnent et forment un anneau opalescent.

• Après élimination du plasma, on récupère la couche de lymphocytes, puis ils sont lavés de façon à éliminer toute trace de Ficoll (toxique pour les cellules).

3. Mode opératoire

3.1. Matériel par binôme

- 3 mL de sang veineux héparine
- 1 tube à fond rond pour gradient
- 2 mL MSL (Milieu pour la séparation des lymphocytes)
- 1 tube à fond conique pour lavages
- 50 mL de solution de lavage de Hanks
- Solution de Lazarus pour numération des leucocytes (acide acétique 30%, Bleu de méthylène)

Risques potentiels : manipulation de sang humain, utilisation de centrifugeuses.

3.2. Protocole

- Prélever un aliquote de sang pour réaliser la numération des leucocytes du sang initial :
diluer le sang au 1/10 dans du liquide de Lazarus
incuber 5 min (au moins) pour permettre la lyse des hématies
numérer à la cellule de Malassez
- Diluer le sang au 1/2 dans la solution de Hanks.
- Préparer le coussin de Ficoll :
dans un tube à fond rond déposer 2 mL de MSL
incliner le tube
déposer 5 mL de sang dilué très soigneusement au dessus du Ficoll. Afin d'éviter tout mélange, faire couler le sang diluer lentement le long de la paroi du tube (tube maintenu incliné et pipette droite)
- Centrifugation
centrifuger 20 minutes à 400g (.....rpm) à température ambiante (18-22°C).
laisser la centrifugeuse s'arrêter lentement (pas de frein)
retirer délicatement les tubes de la centrifugeuse
contrôler la qualité de la séparation
- Éliminer soigneusement par aspiration le liquide surnageant (plasma + plaquettes) en prenant soin de ne pas atteindre la couche de lymphocytes.
- Transférer la galette de lymphocyte dans un tube à fond conique en évitant de prélever du Ficoll.
- Laver 3 fois les cellules avec 10 mL de solution de Hanks. Entre chaque lavage, centrifuger, une fois à 400g (.....rpm) - 5 minutes et les 2 dernières 150g (.....rpm) - 5 minutes.
- Éliminer le surnageant final.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 500µL de solution de Hanks.
- Réaliser une numération des lymphocytes viables, diluer au 1/16 la suspension cellulaire dans du bleu trypan (0,4%)

3.3. Calculer

- le nombre de lymphocytes récupérés
- le pourcentage de lymphocytes viables
- le nombre de lymphocytes viables récupérés
- le rendement de récupération des lymphocytes (sachant que dans le sang normal, les lymphocytes représentent environ 40% des leucocytes)

Préparation de cellules spléniques de souris

La rate fait partie des organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques, les MALT et les GALT. C'est dans ces structures que se déclenche et se coordonne la réponse immunitaire adaptative.

Cet organe se localise à la base de la cage thoracique du côté gauche des mammifères. Il contient majoritairement des lymphocytes et des hématies, mais aussi des cellules épithéliales et conjonctives, des monocytes, des macrophages, des plasmocytes et les granulocytes.

Matériel par binôme:

- 1 souris, trousse à dissection,
- Milieu de Hanks:
8g.L⁻¹ NaCl - 0,4g.L⁻¹ KCl - 60mg.L⁻¹ Na₂HPO₄.2H₂O - 100mg.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O - 1g.L⁻¹ CaCl₂ - 1g.L⁻¹ glucose - 100mg.L⁻¹ MgCl₂.6H₂O - 350mg.L⁻¹ NaHCO₃ - 10mg.L⁻¹ Rouge de phénol.
- eau distillée
- liquide de Lazarus (Bleu acétique), Bleu Trypan Off 0,4%

Dissection de la souris

Positionnement de l'animal dans le bac à dissection

- Placer la souris sur le dos, épingler les pattes en extension. Mouiller les poils du ventre à l'alcool.

Incisions cutanées

- Réaliser une boutonnière au dessus de l'orifice urinaire
- Engager la sonde cannelée dans la boutonnière, soulever la peau avec une pince, faire progresser la sonde cannelée progressivement jusqu'au sternum. Inciser la peau en plaçant une lame des ciseaux dans la rigole de la boutonnière.
- Incisez la peau sur les cotés (volets).
- Épingler la peau.

Incisions musculaires (Document 1)

- Inciser la paroi musculaire de l'abdomen après avoir réalisé une boutonnière au bas du ventre selon le schéma donné au document.
repérer la rate.

Prélèvement la rate et préparation des suspensions cellulaires

Suspension splénique

- Prélever la rate et l'introduire dans une boîte de Pétri contenant 2 mL de milieu de Hanks
 - Couper la rate en 2 dans le sens transversal. Maintenir solidement l'extrémité de la demi rate à l'aide d'une pince et vider le contenu de la capsule splénique à la spatule. Renouveler sur l'autre moitié.
 - Jeter la capsule vidée (tissu épithélium et conjonctif)
 - Dissocier mécaniquement et délicatement les cellules à partir du prélèvement réalisé par une série d'aspiration refoulement à la pipette pasteur, par passage à travers l'aiguille d'une seringue ou à l'aide d'un potter.
- => Maintenir une bonne vitalité cellulaire en réalisant des traitements doux.
- Introduire la suspension dans un tube à hémolyse. Rincer le matériel utilisé de façon à récupérer le maximum de cellules.
 - Éliminer les grosses impuretés soit:
 - par sédimentation de 2-3 minutes et prélèvement du surnageant.
- => une sédimentation trop longue aboutirait à un culot contenant aussi les cellules dissociées.
- par filtration sur un carré de gaze.
 - Lavages: centrifuger 10 minutes à 350g. Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 5 mL de milieu de Hanks. Renouveler plusieurs fois. Noter l'aspect du surnageant (SN).

Numération des suspensions

- Reprendre le culot cellulaire dans 500 μ L
- Réaliser une dilution au 1/10 de la suspension dans du milieu de Hanks
- Réaliser une numération en hématimètre de Malassez des cellules viables et mortes
 - après au 9/10 en bleu trypan pour la suspension de cellules spléniques.

QUESTIONS

- Analyser la composition du milieu de Hanks
- Récapituler le rôle des différentes étapes du protocole de préparation des suspensions.
- Calculer, le nombre de cellules totales récupérées, le nombre de cellules viables et le pourcentage de cellules viables.

