

TD 05 : Techniques d'isolement et de séparation des lymphocytes

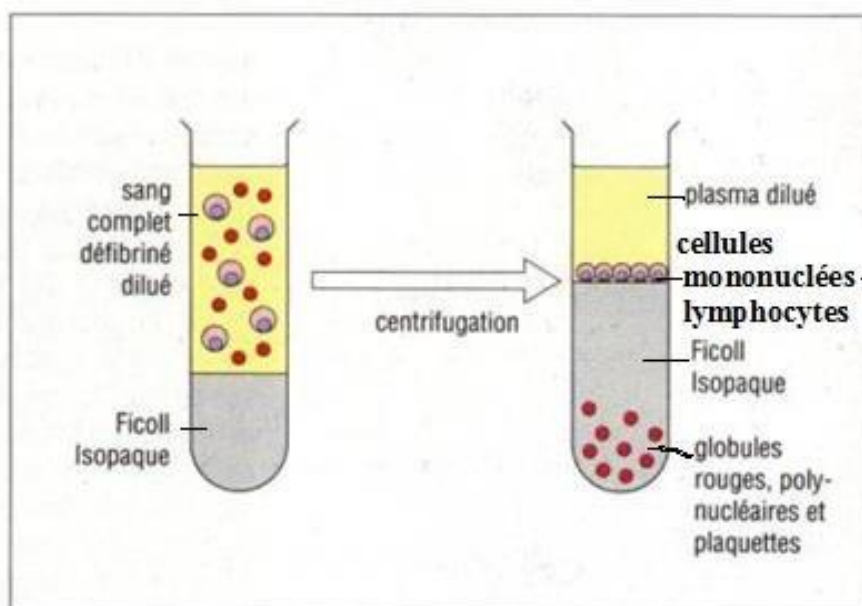
I- Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

La séparation des cellules mononuclées du sang périphérique est réalisée par centrifugation sur un gradient de densité Ficoll-hypaque, car chaque population cellulaire du sang périphérique a une densité différente. Une centrifugation permet de recueillir une couche de cellules mononuclées à l'interface plasma Ficoll. Cette couche contient environ 80% de lymphocytes T, 10 % de lymphocytes B et 10 % de monocytes.

➤ La technique des gradients de Ficoll

Le sang prélevé sur anticoagulant est dilué dans un milieu de culture et déposé à la surface d'un tube rempli à moitié de Ficoll. Après centrifugation, les cellules de faibles densité, lymphocytes et monocytes, flottent au-dessus du Ficoll alors que toutes les autres composantes du sang forment un culot au fond du tube. Les cellules mononuclées peuvent être récupérées à l'aide d'une pipette. Lors d'une incubation des flacons de culture, les monocytes adhèrent au plastique.

Séparation des lymphocytes sur Ficoll

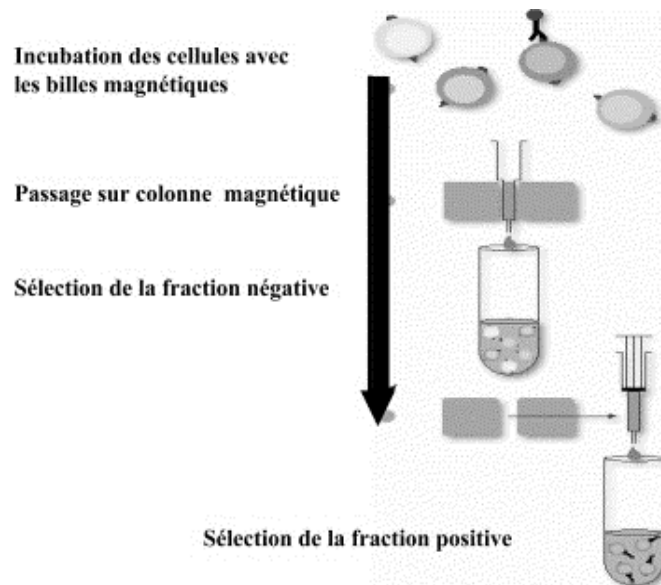


II- Séparation de lymphocytes T et B

Plusieurs techniques sont utilisées pour séparer les sous-populations lymphocytaires :

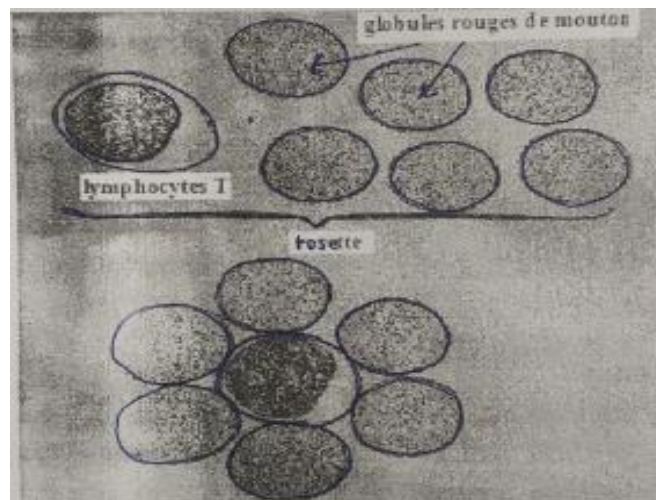
II-1 La technique des billes magnétiques

Une technique utilise des billes magnétiques recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifique (par exemple anti-CD₄, anti-CD₂ pour les lymphocytes T et anti-CD₁₉ pour les lymphocytes B). Ces billes sont mélangées à la population cellulaire et se fixent sur les cellules reconnues par leurs anticorps. Ces cellules peuvent alors être éliminées ou séparées par application d'un champ magnétique.



II-2 La méthode des rosettes

Les lymphocytes T expriment des molécules d'adhésion comme CD₂, cet antigène interagit avec LFA-3(CD58) à la surface d'érythrocytes de mouton (globules rouges), cela permet la formation de rosettes composées d'une cellule T avec plusieurs érythrocytes. Les cellules formant des rosettes peuvent être séparées des lymphocytes B (n'ayant pas formé de rosette) par centrifugation à travers un gradient de Ficoll. Les rosettes se trouvent dans le culot et les globules rouges sont ensuite éliminés.



II-3 Séparation de population cellulaire à l'aide d'anticorps

Elle consiste à séparer des cellules exprimant un antigène spécifique à l'aide de l'anticorps correspondant fixé de façon non covalente sur le plastique d'une boîte de pétri.

Le mélange cellulaire est déposé sur la boîte recouverte de l'anticorps. Les cellules exprimant l'antigène se fixent sur la boîte. Les cellules non fixées peuvent être éliminées, avec précaution, par lavage de la boîte. Un exemple d'application de cette technique est la séparation des cellules Th et Tc en utilisant des anticorps anti-CD4 ou anti-CD8 ; après avoir séparé les lymphocytes T des lymphocytes B.

