

TP 14
Techniques d'immunologie cellulaire
TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

Les objectifs de cette séance :

Réaliser une technique d'immunologie cellulaire.

Isoler des lymphocytes.

Apprendre à manipuler des produits sanguins.

Evaluer l'immunocompétence des lymphocytes.

Les analyses à réaliser :

On réalisera ici une culture de lymphocytes humains, isolés du sang, afin de mettre en évidence l'effet de la phytohéماغglutinine (PHA) sur la multiplication des lymphocytes (activation des lymphocytes T).

Les lymphocytes de préparations purifiées, ou contenus dans le sang total, peuvent être stimulés par un agent mitogène tel que la phytohéماغglutinine (PHA) ou par un antigène. La réponse résultante peut être utilisée pour évaluer l'**immunocompétence** des cellules. La stimulation par la PHA est aussi utilisée pour produire des mitoses en vue d'une analyse chromosomique du sang périphérique (caryotype constitutionnel).

Le travail à rendre :

Rendre les fiches TP (s)

Un compte rendu sur le TTL.

Au niveau sécurité :

Tout élément souillé par le sang devra être mis en poubelle DASRI.

ÉTAPES DE LA MANIPULATION

1. ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES DU SANG

Préparer le PSM, son poste de travail.

Demander 2 tubes de sang.

Préparer l'appareil photo et le charger si besoin.

Sous le PSM

A partir d'un tube de sang.

- Diluer dans un tube stérile le sang au 1/2 en tampon PBS. Exemple : 3,5 mL de sang + 3,5 mL de PBS.

- Introduire **dans deux tubes** de cultures cellulaires stériles :

Voir l'enseignant pour le choix des tubes et l'utilisation de la centrifugeuse.

2 ml de MSL: solution de Ficoll (ramenée à température ambiante).

2 ml de sang dilué au 1/2: faire couler le sang goutte à goutte le long de la paroi du tube incliné à 45° en **évitant tout mélange** avec la solution de Ficoll.

Le gradient de ficoll :

Dans la salle et tube fermé.

- Centrifuger à 3000 rpm pendant 15 minutes. A l'issue de la centrifugation, on obtient quatre phases dans chaque tube le surnageant contenant le plasma dilué, un anneau contenant les lymphocytes, les monocytes et les thrombocytes, le Ficoll, un culot d'hématies agrégées.

Prendre une photo de ce tube.

Sous PSM

- Eliminer l'essentiel du surnageant (plasma + PBS) avec une "Pastette".

- Recueillir avec précaution l'anneau mono-lymphocytaire des deux tubes à l'aide de la "Pastette".

- Transférer la suspension cellulaire recueillie dans **deux tubes stériles** de 10 mL contenant 4 mL de milieu de culture RPMI non supplémenté.

Préciser la notion de supplémentation :

2. LAVAGE

Sous PSM :

- Mélanger le contenu du tube avec précautions : aspirations-refoulements successifs (lents) de la suspension diluée.
- Centrifuger à 2000 rpm, pendant 5-10 minutes.
- Eliminer le surnageant par aspiration.
- Renouveler éventuellement ce lavage (qui a pour but d'éliminer une partie des thrombocytes contaminants et les débris cellulaires restés en suspension lors de la centrifugation).

3 NUMÉRATION ET CONTRÔLE DE VIABILITÉ

Sous PSM

Homogénéisation des cellules :

- Mettre en suspension les lymphocytes du culot précédent dans 8 mL de milieu RPMI.
- Effectuer le comptage des cellules vivantes et mortes en cellule de kova après avoir pris les dispositions de sécurité.

Pour la numération :

Diluer une partie de la suspension cellulaire dans la solution de bleu trypan : 100 μ L de bleu + 900 μ L de suspension cellulaire.

- Homogénéiser et attendre 5 min (au delà, risque de coloration des cellules viables).

Expliquer le comptage avec la cellule de kova.

Citer les précautions à prendre avant l'utilisation (Voir l'enseignant)

- En fonction du nombre de cellules, il faudra réajuster la suspension. (*Voir l'enseignant*)

4 MISE EN CULTURE DES LYMPHOCYTES.

Sous le PSM

- Répartir la suspension à cultiver dans trois boites de cultures.
- Complémenter chaque boite. (Voir l'enseignant pour l'explication)
 - La première servira de témoin.
 - La deuxième sera additionné de 30 μ L de solution de PHA.
 - La troisième sera additionné de 50 μ L de solution de PHA.

Dans le laboratoire :

Remarque : L'utilisation des gants pour cette partie doit être comprise.

Régler le microscope.

- Observer chaque boite et **prendre une photographie.**
- Placer les boites dans l'incubateur, après avoir vérifier les paramètres.

5 SUIVI DE LA CULTURE.

Il faut voir la culture cellulaire le lendemain puis après 3 jours pour donner une interprétation.

Remarque : Attention le milieu s'évapore rapidement sur les boites.

6 Lecture des résultats.

La lecture des résultats s'obtient normalement après avoir fait des frottis et des colorations sur les boîtes après 4 jours d'incubation. Pour faciliter l'interprétation, vous prendrez des photographies des cultures à différents temps.

Durée	Boite 1	Boite 2	Boite 3
J0	Photo.	Photo.	Photo.
J1 Remettre du milieu	Photo.	Photo.	Photo.
J4	Photo.	Photo.	Photo.

7 Etude documentaire à réaliser en complément du TP pour bien appréhender l'intérêt de cette technique.

Question : Déterminer les intérêts et les applications du TTL.

Mots clés pour la recherche :

- 1 Ce test permet l'étude de l'immunité cellulaire en explorant certaines maladies.
 - Déficits immunitaires congénitaux.
 - Des hémopathies.
 - Certaines viroses
 - Des cancers métastasés.
 - Insuffisances rénales
- 2 Le TTL en réponse immunospsécifique.
- 3 Le TTL en présence d'antigènes d'histocompatibilité.

MATÉRIEL / MILIEUX ET RÉACTIFS NÉCESSAIRES

- Pipettes stériles de 1 à 10 ml
- Cônes stérilisés (pour distribuer les volumes faibles de PHA)
- Pipettes compte-gouttes stériles de type "Pasteurette"
- Boîtes de culture

1. Milieu RPMI 1640 avec tampon HEPES (modification de Dutch)

Ce milieu a été élaboré au "Roswell Park Memorial Institute". Ce milieu s'est avéré utile pour une large gamme d'applications (croissance de nombreux types cellulaires, en particulier lymphocytes dans le test de stimulation par la PHA.

Le milieu utilisé (modification de Dutch) contient un tampon organique tampon HEPES (acide N-2-hydroxyéthylpi- pérazine-N'-2éthanesulfonique) qui permet de mieux stabiliser le pH que le système CO

2. Solution de glutamine

Solution stérile à 200 mmol/L (29,2 g/L). Lors de l'utilisation de la glutamine, veiller à sa dissolution totale.

3. Sérum de veau foetal

4. Solution d'antibiotiques

Il s'agit d'une solution mixte contenant deux antibiotiques: pénicilline :10000 UI/mL et streptomycine :10000 µg/mL

5. Milieu RPMI 1640 supplémenté

La glutamine, instable en solution, est absente du milieu commercialisé: elle doit être ajoutée au milieu au moment de l'emploi.

Le milieu RPMI 1640 sera, d'autre part, supplémenté en sérum de veau foetal et additionné d'antibiotiques.

Préparation du milieu pour la mise en culture

- Milieu RPMI 1640 supplémenté en glutamine.
- Sérum de veau foetal 10% (V/V).
- Antibiotiques: pénicilline 1% (V/V), streptomycine 1% (V/V).

6. Solution de phytohémagglutinine-M, solution à 7 mg/mL

La PHA-M (extraite de *Phaseolus vulgaris*: haricot rouge) est une lectine qui possède, à la fois, une action hémagglutinante vis-à-vis des hématies et mitogène pour les lymphocytes T.

7. Tampon PBS

8. Solution de Ficoll®Diatrizoate (d = 1) Milieu de séparation des lymphocytes.

La manipulation peut être réalisée sans problème même sur un échantillon de sang datant de plusieurs jours (sang recueilli sur EDTA ou héparine). Si le sang est "vieux", la récupération des lymphocytes reste bonne (avec une viabilité proche de 100%), l'anneau de lymphocytes est parfois contaminé par des hématies (sans conséquence pour la culture).

Correction :

4 à 5 jours après la mise en culture, l'observation au microscope inversé met en évidence dans les puits contenant de la PHA l'apparition de clones de lymphocytes activés qui ont proliféré. Dans le puits témoins (sans PHA) aucune prolifération n'est observée : les lymphocytes restent au repos.

La prolifération des cellules entraîne une acidification du milieu (libération de métabolites acides); cette acidification entraîne un changement de teinte de l'indicateur coloré de pH: le rouge de phénol qui reste rosé dans le puits témoins vire à l'orangé. C'est souvent plus grande dans le puits contenant 30 μ L de PHA que dans celui en contenant 50 μ .L (effet dose-réponse perturbé lorsque la concentration en PHA devient trop forte): l'évolution de la teinte est étroitement liée à la prolifération cellulaire (des clones plus nombreux et plus volumineux sont observés dans le puits le plus acide).

Il est possible de quantifier la population de lymphocytes après quelques jours de culture. Effectuer une numération et un contrôle de viabilité des lymphocytes des trois puits (remettre les lymphocytes en suspension). Dans le témoin, on observe souvent une diminution du nombre de lymphocytes viables par rapport au jour de mise en culture (les lymphocytes non stimulés meurent rapidement en culture).

Clones de lymphocytes activés par la PHA.
Lymphocytes au repos (témoin sans PHA).

INTERPRETATION

Les lymphocytes activés peuvent aussi être mis en évidence par coloration au MGG réalisée sur frottis obtenu comme suit: après numération.

Récupérer les cellules et centrifuger pendants min à 400 g et éliminer un maximum de surnageant de façon à concentrer les cellules. Les remettre en suspension dans le liquide restant et étaler une goutte de cette suspension épaisse avec une lamelle d'étalement sur une lame dégraissée. Colorer selon la technique habituelle (MGG).

La morphologie des lymphocytes activés par la PHA est particulière. Ils présentent une morphologie proche des lymphocytes atypiques" du sang observés lors d'une mononucléose infectieuse (grande taille cytoplasme basophile).