

Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique ou de la moelle osseuse

1. Equipements utilisés

L'isolement des cellules mononucléées du sang périphérique, ou de la moelle osseuse est effectué à partir d'échantillons sanguins par une technique manuelle utilisant un gradient de densité. Plusieurs méthodes sont mises en œuvre à la Plateforme de Ressources Biologiques :

- gradient de densité classique (Lymphocyte separation medium[®], Eurobio) : ce gradient se présente sous la forme de flacons de 100 mL à 500 mL. Il doit être distribué dans des tubes 15 ou 50 mL avant l'ajout du sang ou de la moelle. Cette technique est adaptée à tous les volumes de sang ou de moelle, mais nécessite une maîtrise technique importante. En particulier deux étapes sont critiques : le dépôt du sang ou de la moelle sur le gradient de densité qui risquent de se mélanger et la récupération de l'anneau des cellules mononucléées. Si elles sont mal réalisées, ces deux étapes peuvent provoquer une perte de l'échantillon ;
- tubes uni-SEP[®] (NOVAMED) : ce sont des tubes pré remplis avec le gradient de densité qui se trouve sous une membrane poreuse. Ces tubes permettent une manipulation plus rapide des échantillons de sang sans risque de mélanger les phases. Les volumes de gradient sont fixes (*cf.* tableau ci-dessous reprenant les directives de la fiche constructeur : NOVAMED *ltd.*), ces tubes ne peuvent donc être utilisés qu'avec des échantillons de volume suffisant.

Type de tube	Uni-SEP [®] U-02	Uni-SEP [®] U-04	Uni-SEP [®] U-10	Uni-SEP [®] U-16
Volume de gradient	2,0 mL	3,0 mL	10,0 mL	15,0 mL
Volume de sang	2,0 à 4,0 mL	2,0 à 5,5 mL	10,0 à 17,5 mL	18,5 à 25,0 mL

- tubes CPT[®] (Becton-Dickinson) : la manipulation de ces tubes est beaucoup plus facile que la réalisation d'un gradient de densité classique mais le risque de contamination par des granulocytes ou des globules rouges est accru ainsi que celui de perte de l'échantillon (tubes en verre pouvant casser). L'échantillon doit être techniqué dans les 2 heures suivant la collecte ce qui impose un délai d'acheminement très court.

Les échantillons de sang ou de moelle osseuse sont traités de façon stérile dans un environnement de confinement L2 et sous Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Les cellules ainsi isolées sont donc utilisables pour des cultures à long terme. Les cellules isolées peuvent être préparées et données immédiatement à l'utilisateur ou congelées. En routine, la Plateforme de Ressources Biologiques utilise comme milieu de congélation cryopréservateur une solution contenant 4% d'albumine humaine et 10 % de DMSO. D'autres milieux de congélation peuvent être utilisés sur demande.

2. Personnel

L'isolement des cellules mononuclées du sang périphérique est effectué par les techniciens de laboratoire de la Plateforme de Ressources Biologiques qui sont formés et habilités à fréquence régulière spécifiquement sur cette technique.

3. Matrices prises en charge

Les techniciens peuvent traiter jusqu'à 8 échantillons sanguins simultanément.

Matrice	Sang total		Aspiration de moelle osseuse
Support du prélèvement	Tube CPT [®] citrate de sodium	Tubes héparinate de lithium ou EDTA	Tubes EDTA
Quantité d'échantillon	8 mL*	12 mL*	Minimum 1 mL
Technique d'isolement	Gel séparateur CPT [®]	Gradient de densité ou tubes Uni-sep [®]	
Conservation	Température ambiante (< 2 h)	Température ambiante (< 48 h)	
Conditions de congélation	Sérum de veau fœtal 90% - DMSO 10 %	Albumine 4% - DMSO 10% puis congélation en azote liquide ; culot sec puis congélation à -80°C ; tampons de lyse particuliers (à la demande)	
Délai technique interne	1 heure	1 heure	

* Considérer en moyenne 0,6 million de cellules/mL de sang (Cette valeur peut fortement varier en fonction du type de prélèvement) et une efficacité du gradient de 60 ± 20%.

Les anticoagulants utilisés pour collecter le sang sont à envisager en regard des recherches souhaitées.

Quelques exemples non exhaustifs :

- l'EDTA est un chélateur du Ca²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺ et autres ions métalliques, il peut donc interférer avec les dosages de ces molécules. Il a longtemps été décrit que l'EDTA

pouvait influencer les techniques de PCR, cependant les récentes publications suggèrent que les concentrations d'EDTA ne sont pas suffisantes pour jouer un rôle [1] ;

- l'héparinate de lithium ne doit pas être utilisé si l'objectif est d'extraire l'ADN des cellules en vue d'effectuer des techniques de PCR, l'héparine étant connue pour être un inhibiteur de PCR ;
- Certains Kits de manipulation sont incompatibles avec l'utilisation de l'un ou l'autre de ces anti-coagulants.

Si les demandes de recherche sont effectuées sur une collection préexistante, il est nécessaire de vérifier que la méthode de recueil des cellules mise en place est compatible avec la recherche à effectuer.

Points de vigilance :

- les tubes de sang ne doivent surtout pas être congelés ni conservés à +4°C ;
- ils doivent être traités dans les 48 heures maximum après le recueil ;
- les tubes CPT[®] doivent être traités dans les 2 heures suivant la collecte.

4. Contrôles qualité disponibles sur les échantillons de cellules obtenus

La qualité et la pureté des cellules mononuclées du sang périphérique obtenues doivent être adéquates pour l'application prévue en aval. C'est pourquoi la Plateforme de Ressources Biologiques accorde une grande importance aux contrôles qualité réalisés sur les échantillons de cellules mononuclées de sang périphérique purifiées. Les différents contrôles qualité décrits ci-dessous sont disponibles et sont réalisés de routine ou sur demande.

- Numération cellulaire

La numération des cellules mononuclées du sang périphérique est effectuée, en routine, avant congélation par une technique automatisée sur Micros60[®] (Horiba, Montpellier, France). Cet automate est capable de différencier et de compter les leucocytes, les plaquettes et les hématies dans le sang total grâce à leur différence de taille et d'impédance (résistance au débit exercé par l'appareil). Il est aussi capable de différencier les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes par leur différence d'impédance et leur degré de résistance à la lyse. Grâce au Micros60[®], la Plateforme de Ressources Biologiques

est en mesure de donner des indications sur la compositions des suspensions cellulaires préparées.

- Viabilité cellulaire

La Plateforme de Ressources Biologiques s'assure, en routine, de la viabilité des cellules avant congélation dans l'azote, par coloration au bleu Trypan en cellule de Malassez. Le bleu Trypan est un colorant dit d'exclusion. En effet, cette molécule entre dans les cellules, mais les cellules vivantes ont la capacité de l'expulser immédiatement. En revanche, les cellules mortes perdent cette capacité et se colorent en bleu. Il est donc possible d'évaluer la viabilité d'une population cellulaire par comptage manuel en faisant le rapport du nombre de cellules bleues sur le nombre de cellules totales. Le bleu Trypan étant toxique pour les cellules, le comptage doit se faire extemporanément.

La Plateforme de Ressources Biologiques n'effectue la congélation du prélèvement que si la viabilité cellulaire est supérieure à 50%.

- Non contamination des réactifs de congélation

La Plateforme de Ressources Biologiques s'assure régulièrement de la qualité des réactifs utilisés pour la congélation en termes de contamination bactérienne. Pour cela, à chaque préparation de milieu de congélation (Albumine 4% et albumine-DMSO 20%), un contrôle de non-contamination bactérienne est réalisé. Un aliquot de chaque milieu est conservé à l'étuve au moins 48 heures. La présence d'une éventuelle contamination bactérienne est objectivée visuellement puis au microscope par le technicien.

5. Caractérisation cellulaire par cytométrie de flux

Sur demande nous pouvons mettre en place une caractérisation phénotypique de la population cellulaire congelée avant et/ou après congélation en fonction de paramètres d'intérêts à discuter au préalable.

La cytométrie en flux est une technique multiparamétrique permettant l'étude de plusieurs caractéristiques (taille, complexité et fluorescence) d'une cellule isolée entraînée par un flux liquide. Les mesures sont effectuées lorsque les cellules passent, les unes derrière les autres, dans une chambre d'analyse traversée par une source lumineuse excitatrice (généralement un laser).

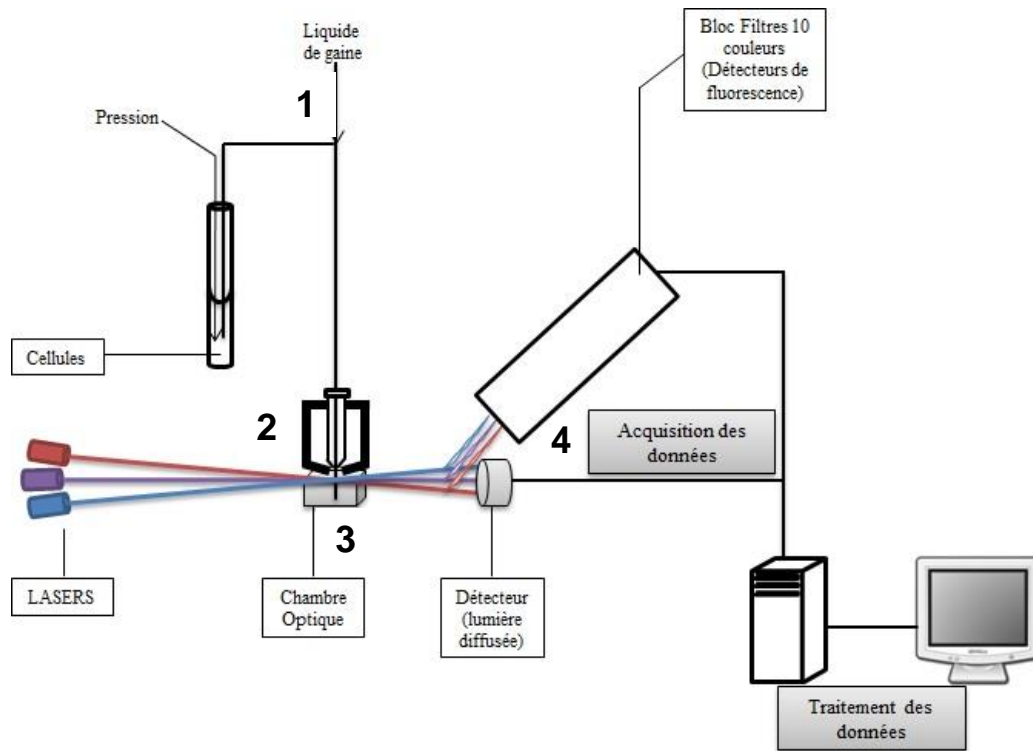


Schéma général du principe de la technique de cytométrie

Etape 1 : la suspension cellulaire est lentement injectée au centre d'un flux de liquide (liquide de gaine) ;

Etape 2 : la création d'une mince veine porteuse dans le liquide de gaine contraint les cellules à s'aligner les unes derrière les autres : c'est la focalisation hydrodynamique ;

Etape 3 : le jet de liquide, à l'air libre, croise un faisceau laser qui excite les cellules ;

Etape 4 : les signaux lumineux émis par les cellules sont captés et transmis par des photomultiplicateurs.

Après passage d'une cellule dans la chambre d'analyse, le cytomètre en flux permet d'obtenir trois types d'informations :

- la taille relative de la cellule, qui est évaluée à partir de la diffraction de la lumière incidente aux petits angles ;
- la complexité relative de la cellule (nombre et taille des organites, rapport nucléocytoplasmique,...), qui est appréciée à partir de la diffraction la lumière incidente aux grands angles ;
- l'intensité de fluorescence relative de la cellule qui est obtenue après excitation de marqueurs fluorescents ou fluorochromes fixés à cette cellule. Après avoir été excités par la lumière incidente, les fluorochromes réémettent des photons d'une longueur d'onde inférieure. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de chaque fluorochrome commercialisé sont connues, ce qui permet leur utilisation seul ou groupés.

Les signaux optiques émis par la cellule sont récupérés par différents détecteurs et convertis en signaux numériques analysables sur un ordinateur à l'aide d'un logiciel. L'ordinateur mémorise toutes les données individuelles, dans l'ordre de passage de chaque cellule.

La technique de cytométrie permet de nombreuses applications :

- l'immunophénotypage, qui permet de caractériser les différentes populations cellulaires dans une suspension hétérogène (Exemple : pourcentage de lymphocytes T ; lymphocytes B et NK présents dans la suspension cellulaire) ;
- un dosage relatif ou quantitatif d'antigènes membranaires ou intracellulaires (Exemple : dosage de cytokines) ;
- une vérification de la viabilité ;
- une analyse du cycle cellulaire ;
- des tests fonctionnels comme l'analyse de la phagocytose, du stress oxydatif...

Le cytomètre utilisé par la Plateforme de Ressources Biologiques est un Navios[®] (Beckman Coulter, Paris, France) qui possède 3 sources d'excitation laser, violet (longueur d'onde 405 nm), bleu (longueur d'onde 488 nm), et rouge (longueur d'onde de 638 nm). Le cytomètre est équipé de détecteurs lui permettant d'analyser 12 paramètres (10 paramètres de fluorescence ainsi que les paramètres de taille et de complexité). Nous pouvons réaliser en routine, l'ensemble des analyses citées ci-dessus avant et/ou après congélation, dans les limites d'un panel de 10 couleurs. Chaque analyse nécessite 1.10^6 cellules au début du marquage pour un résultat optimal.

6. Performances attendues

Le tableau ci-dessous résume les performances des différentes techniques d'isolement des cellules mononuclées du sang périphérique mises en œuvre par la Plateforme de Ressources Biologiques.

	Numération cellulaire	Viabilité cellulaire	Contamination des cellules congelées	Contamination des milieux	Rendement après décongélation
Sang total EDTA sur Ficoll	> 0,4 million de cellules / mL de sang	> 50%	Absence de contamination	Absence de contamination	> 50%
Sang total EDTA sur Unisep®	> 0,4 million de cellules / mL de sang	> 50%	Absence de contamination	Absence de contamination	> 50%
Sang total héparinate de lithium sur Unisep®	> 0,4 million de cellules / mL de sang	> 50%	Absence de contamination	Absence de contamination	> 50%
Sang total sur tubes CPT® citrate de sodium	> 0,4 million de cellules / mL de sang	> 50%	Absence de contamination	Absence de contamination	> 50%

Points de vigilance :

Les techniques d'isolement proposées par la Plateforme de Ressources Biologiques sont optimisées pour permettre d'obtenir un nombre de cellules le plus élevé possible de manière à avoir suffisamment de matériel pour toutes les applications prévues en aval. Mais la quantité/pureté peut cependant varier en fonction des pathologies.

Quelques exemples :

- Aplasie Médullaire : le nombre de leucocytes est drastiquement diminué ($< 0,5 \cdot 10^6/\text{mL}$) [2] ;
- Leucémie Lymphoïde Chronique : le nombre de leucocytes est fortement augmenté ($> 5 \cdot 10^6/\text{mL}$) [3] ;
- Cancer : risque de contamination de la population de cellules mononuclées par des granulocytes [4].

De même, la qualité comme la quantité des cellules mononuclées isolées après le gradient de densité peuvent être influencées par divers critères tels que :

- les éventuels traitements suivis par les patients : par exemple, les chimiothérapies sont responsables d'une diminution des leucocytes circulants [5] ;

- le tabagisme ou même l'âge peuvent influencer le nombre de leucocytes circulants [6].

Le rendement après décongélation peut également être influencé par des critères tels que :

- une forte contamination en granulocytes au moment de la congélation impactera le rendement car ces cellules ne supportent pas la congélation en azote [3] ;
- dans le cas de leucémies ou de lymphomes, certaines cellules tumorales sont particulièrement sensibles aux chocs thermiques et risquent d'être également perdues [7].

Il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble de ces critères avant toute mise en place de collection biologique.

7. Contrôles qualité ponctuels

La Plateforme de Ressources Biologique a aussi mis en place une procédure de vérification régulière de la qualité de ses techniques. Des ampoules témoins sont congelées régulièrement et une étape de décongélation est effectuée deux fois par an afin de vérifier la viabilité cellulaire et de calculer un rendement qui correspond au rapport du nombre de cellules vivantes après décongélation sur le nombre de cellules vivantes congelées initialement et qui renseigne sur la qualité de la congélation. Tous les réactifs utilisés sont régulièrement testés pour leur stérilité.

Une fois par an lors de la décongélation des ampoules témoins, les cellules sont reprises dans du milieu de culture puis mises à l'étuve pendant 3 jours. La présence d'une éventuelle contamination bactérienne est objectivée visuellement puis au microscope par le technicien.

8. Conclusion

La Plateforme de Ressources Biologiques s'assure que la qualité des cellules mononuclées du sang périphérique obtenues avec les techniques d'isolement mises au point sont compatibles avec les applications prévues en aval si possible.

Si les demandes d'échantillons interviennent sur une collection déjà établie, il faut alors cibler la quantité de cellules demandée en fonction des recherches à faire :

Quelques indications non exhaustives :

- phénotypage par cytométrie : 1 à 5 millions de cellules par échantillon ;

- PCR : 1 à 5 millions de cellules par échantillon ;
- analyse fonctionnelle : 10 à 20 millions de cellules par échantillon ;
- tri de populations ± rares : 10 à 50 millions de cellules par échantillon.

L'ensemble des résultats générés lors de la mise au point et de la validation des techniques d'isolement de cellules de la Plateforme de Ressources Biologiques fait l'objet d'un rapport détaillé. La mise en œuvre de la technique d'isolement de cellules est ensuite clairement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

Bibliographie :

- [1] - H Khosravinia, KP Ramesha. Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology* (2007) 6(3):184-187.
- [2] - Zeng Y, Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. *Cancer Res* (2001) 15;61(12):4756-60.
- [3] - Nabhan C, Rosen ST. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review. *JAMA* (2014) 3;312(21):2265-76.
- [4] - Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* (2001) 15;61(12):4756-60.
- [5] - Sanchez-Perez L, Suryadevara CM, Choi BD, Reap EA, Sampson JH. Leveraging chemotherapy-induced lymphopenia to potentiate cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* (2014) 3;3(7).
- [6] - Brass D, McKay P, Scott F. Investigating an incidental finding of lymphopenia. *BMJ*. (2014) 3;348:1721.
- [7] - Nejlund S, Smith J, Kraan J, Stender H, Van MN, Langkjer ST, Nielsen MT, Sölétormos G, Hillig T. Cryopreservation of Circulating Tumor Cells for Enumeration and Characterization. *Biopreserv Biobank*. 2016.

Mise à jour : mai 2016