

Détermination du pourcentage de Ly B et Ly T dans la rate de souris par cytométrie de flux

CONDORI Brunella, GOURGUECHON-BUOT Elia, PEREZ Valérie

RESUME :

Une bonne connaissance de la structure et de la composition de la rate est nécessaire à la compréhension du fonctionnement du système immunitaire. Une méthode couramment utilisée pour déterminer quels types de cellules sont présentes dans un organe et en quelles proportions est la cytométrie de flux. Dans cette étude, nous avons mesuré par cette méthode le ratio lymphocytes B / lymphocytes T dans la rate de souris. Nous avons déterminé que, parmi les cellules sélectionnées, 51.07 % étaient des lymphocytes B, et 41.44% des lymphocytes T. Ces résultats sont proches des pourcentages précédemment établis par d'autres études ; les différences entre nos résultats et ces derniers peut être expliquée par des particularités du protocole. Cette étude met donc en avant l'importance des conditions expérimentales pour la préparation des échantillons et de la compréhension des biais inhérents à la cytométrie de flux

Introduction

En plus de filtrer le sang, la rate est d'une grande importance pour l'immunité. Elle est très riche en cellules immunitaires, notamment en lymphocytes. Une bonne connaissance de la répartition des cellules immunitaires de la rate est une étape essentielle à la compréhension du rôle de cet organe.

Nous avons dans cette étude quantifié les lymphocytes B et T de la rate, par cytométrie de flux. C'est une méthode couramment utilisée pour caractériser diverses particules dans une solution, quantitativement et qualitativement. Elle est basée sur les signaux optiques perçus quand une particule traverse un faisceau lumineux. Ici, la distinction entre les cellules immunitaires se fait tout d'abord sur les caractéristiques morphologiques et structurelles des cellules, afin de distinguer les lymphocytes des autres types cellulaires. La distinction entre lymphocytes B et T est basée sur la reconnaissance spécifique de récepteurs cellulaires par des anticorps liés à des fluorophores. Les marqueurs de surface utilisés dans cette étude sont le CD19 et le CD3, qui sont couramment employés pour marquer les lymphocytes B et T respectivement.

Matériel et Méthode

Les souris saines ont été sacrifiées et leur rate prélevée, 3 heures avant le marquage. Elles ont été broyées et filtrées pour éliminer les débris, puis les cellules

ont été lavées avec du tampon FACS (PBS et 10% de FCS) et centrifugées à 1800 rpm pendant 5 min à 20°C. Le culot cellulaire a été repris dans 500 mL de Red Blood cells lysis buffer et incubé 3 min à température ambiante sous agitation légère.

Quatre tubes de 100 µL ont été centrifugés à 1800 rpm pendant 5 min. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 100 µL de solution de tampon FACS. Pour le marquage, 100 µL de chaque solution d'anticorps, diluée au 1/50, a été ajoutée aux cellules selon les combinaisons suivantes : CD3-APC, CD19-FITC ou CD3-APC et CD19-FITC. Des cellules non marquées ont été utilisées comme contrôle négatif. Les solutions ont été complétées avec du tampon FACS pour obtenir un volume final de 300 µL.

Les cellules ont été incubées à 4°C pendant 30 min puis centrifugées à 1800 rpm pendant 5 min. Elles sont remises en suspension dans 1 mL de tampon FACS, et recentrifugées selon les mêmes paramètres. Elles ont finalement été resuspendues dans 400µL de tampon FACS. Les tubes ont ensuite été recouverts dans du papier aluminium jusqu'à leur analyse par FACScalibur.

Résultats

Le témoin négatif a été utilisé pour déterminer un réglage du FACS de manière à observer notre population d'intérêt, déterminer la gate soit une fenêtre d'observation et pour déterminer les coordonnées du cadran (Fig.1). Nous avons choisi de faire une gate serrée pour éviter de prendre une proportion trop importante de cellules apoptotiques. Les cellules marquées avec uniquement CD3-APC ou CD19-FITC ont servi à déterminer la compensation, cependant les spectres d'émission de FITC et APC étant suffisamment distincts, ce n'était pas nécessaire.

Dans la gate, il y a 84,93 % des cellules (Fig.2). Parmi elles, il y a 51,07 % de cellules CD19+ CD3- qui sont les lymphocytes B et 41,44% de cellules CD19- CD3+, soit les lymphocytes T. De plus, on observe 0,55% de notre échantillon doublement marqué (CD19+ CD3+) qui représentent 0,41% des cellules échantillonnées. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce sont des agglomérats de lymphocytes B et T. Dans la gate, il y a aussi 6,94% des cellules CD19- CD3- qui sont certainement des cellules NK, des ILC, voire des cellules apoptotiques.

Discussion

Les lymphocytes B de notre échantillon représentent 51,07% de lymphocytes de la rate. Théoriquement, il devrait y avoir 60% de lymphocytes B. Cela représente alors seulement 85% des lymphocytes B théoriques. Les lymphocytes T représentent 41,44% des cellules de la gate. Il y a, théoriquement, 40% de lymphocytes dans la rate. Même si ce résultat paraît correct, on ne peut pas l'établir clairement. En effet, les 6,94% de cellules doublement négatives pourrait être en partie des lymphocytes T qui sont entrés en apoptose et donc la proportion réelle de lymphocytes T pourrait être plus élevée.

Ces différences peuvent être expliquées par les manipulations qui n'ont pas suivi tout le protocole normalement en vigueur, et qui ont pu notamment entraîner une

Figure 1 : A. Visualisation de la gate (en rouge) effectuée, B. Fluorescences des cellules de la gate (FL1-H : CD19-FITC ; FL4-H : CD3-APC).

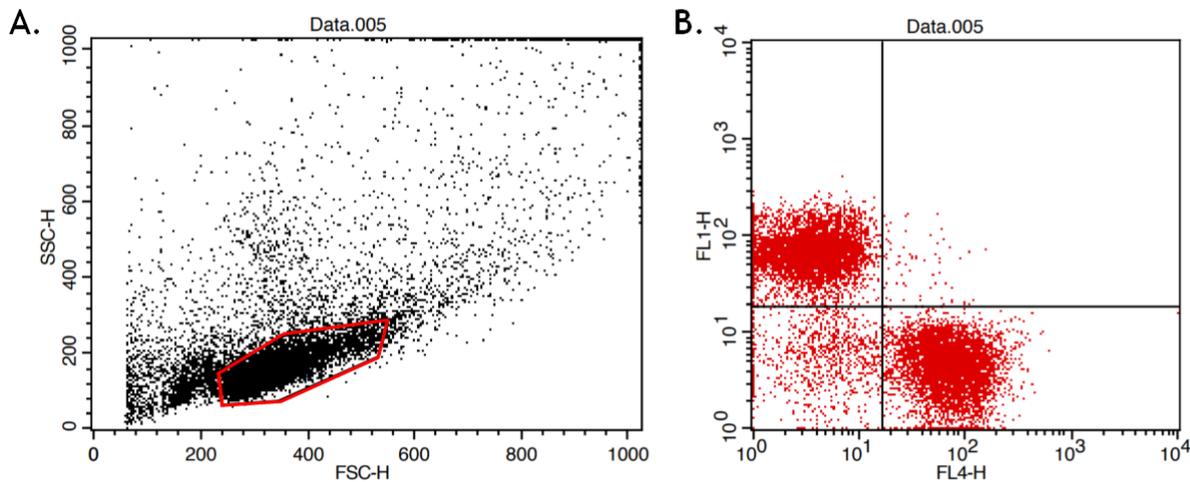


Figure 2 : Statistiques associées à la population cellulaire étudiée.

Quadrant Statistics

File: Data.005	Log Data Units: Linear Values
Sample ID:	Patient ID:
Tube: Untitled	Panel: Untitled Acquisition Tube List
Acquisition Date: 13-Mar-18	Gate: G1
Gated Events: 12355	Total Events: 16739
X Parameter: FL4-H (Log)	Y Parameter: FL1-H (Log)
Quad Location: 16, 18	

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	6310	51.07	37.70	4.07	3.28	72.81	65.93
UR	68	0.55	0.41	43.88	36.19	59.73	48.98
LL	857	6.94	5.12	5.73	4.42	6.52	5.33
LR	5120	41.44	30.59	83.34	69.38	4.93	4.17

apoptose importante des cellules. Il n'y a également pas eu de contrôle isotypique pour vérifier les liaisons non spécifiques. Ce contrôle aurait permis d'avoir un signal plus spécifique. Cela aurait aussi pu permettre d'éliminer une proportion de cellules doublement positives, même si la fluorescence des CD19+ CD3+ est similaire à celles observées pour les lymphocytes T et B, ce qui oriente plutôt vers l'hypothèse des agglomérats. De plus, il est possible qu'un certain nombre de plasmocytes n'a pas été pris en compte dû à la gate serrée. Il aurait été intéressant de connaître la proportion de cellules apoptotiques et nécrotiques, grâce à des marquages par annexine et iodure de propidium.

Nos résultats sont cohérents avec la théorie, mais de meilleures conditions expérimentales ainsi que des marquages supplémentaires auraient pu permettre d'obtenir de meilleurs résultats. Il est également possible, en utilisant des marqueurs spécifiques d'autres types cellulaires, comme le CD138 (spécifique des plasmocytes), d'étudier plus précisément la composition en cellules immunitaires de la rate, afin d'obtenir des données supplémentaires pouvant servir par exemple de base de comparaison entre différents phénotypes.