

Cytométrie en flux pour l'analyse phénotypique des cellules mononucléaires du sang périphérique

Eason Gregoire-Mazzocco¹, Koffi Atchotin¹

1. Faculté Sciences et Sciences de l'Ingénieur, Université Bretagne sud, Centre d'enseignement et de recherche Yves Coppens

I -Introduction

Les cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) regroupent l'ensemble des cellules sanguines possédant un noyau non segmenté, comprenant principalement les lymphocytes (B, T et NK), les monocytes et les cellules dendritiques [1], [2], [3]. Elles se distinguent des granulocytes et des érythrocytes par leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, ainsi que par leur densité, propriété exploitée lors de leur isolement expérimental [2].

Les PBMC jouent un rôle central dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. Leur concentration et leur répartition reflètent l'état fonctionnel du système immunitaire. Une diminution du nombre de PBMC peut être associée à des états d'immunodéficience, à certaines infections sévères ou à des traitements immunosuppresseurs, tandis qu'une augmentation peut être observée dans des contextes inflammatoires, infectieux ou hématologiques, notamment lors de syndromes lymphoprolifératifs [4].

En recherche biomédicale, les PBMC constituent un modèle expérimental de référence. Elles sont largement utilisées pour l'étude des réponses immunitaires, de l'activation cellulaire, de la production de cytokines, ainsi que pour l'évaluation de traitements immunomodulateurs et vaccins [2]. Leur accessibilité à partir du sang périphérique et leur représentativité du compartiment immunitaire circulant en font un outil privilégié en immunologie expérimentale et clinique [1], [2].

L'analyse quantitative et qualitative des PBMC repose sur des méthodes complémentaires. Le comptage cellulaire permet d'estimer leur concentration, tandis que des techniques analytiques plus spécifiques permettent leur identification et leur caractérisation phénotypique [5]. L'isolement des PBMC est classiquement réalisé par centrifugation sur gradient de densité, notamment à l'aide de Ficoll, permettant leur séparation des autres composants sanguins avant analyse [1]. L'analyse quantitative peut être effectuée à l'aide d'une cellule de Malassez,

tandis que l'analyse qualitative peut être réalisée par cytométrie de flux.

La cytométrie en flux permet l'analyse de cellules individuelles en suspension lors de leur passage séquentiel dans un flux hydrodynamiquement focalisé traversant un faisceau laser [6]. Chaque cellule diffuse la lumière et, si elle est marquée, émet une fluorescence spécifique [6]. La diffusion avant (FSC) est proportionnelle à la taille cellulaire, tandis que la diffusion latérale (SSC) reflète la granularité et la complexité interne, permettant une première discrimination des populations et l'exclusion des débris [6].

L'identification phénotypique repose sur des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes se liant spécifiquement aux antigènes de surface [6]. Après excitation par les lasers, la fluorescence émise est détectée et quantifiée. Le CD45 est utilisé comme marqueur pan-leucocytaire pour identifier les leucocytes [7], la population lymphocytaire étant sélectionnée sur la base d'un SSC faible. Les lymphocytes T et B sont ensuite distingués par l'expression des marqueurs CD3 et CD19, et les lymphocytes T auxiliaires identifiés par l'expression du CD4 au sein de la population CD3⁺ [1].

L'objectif de ce travail est de démontrer l'efficacité de la séparation au Ficoll pour l'isolement des PBMC, ainsi que d'évaluer les méthodes d'analyse quantitative et qualitative, à savoir la numération cellulaire au Malassez et la cytométrie en flux.

II -Materiels et Methodes

II-1 Preparation de la solution d'Anticorps

2 mL de PBS ont été ajoutés à un tube de cytométrie avec 20 µL de chaque anticorps (CD4 APC, CD19 PE, CD3 FITC, CD45 PE-Cy7), puis homogénéisés et laissés dans l'obscurité.

II-2 Isolation des lymphocytes au Ficoll

2 mL de sang humain homogénéisé a été dilué avec 2 mL de PBS (Phosphate-buffered saline). 2 mL de sang dilué ont été délicatement placés sur 3mL de solution de Ficoll et centrifugés pendant 20 minutes à 600g sans freiner la centrifugeuse (à température

ambiante) afin de produire la fraction de PBMC isolés (**figure 1**).

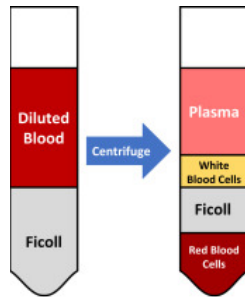


Figure 1 : Sang fractionné à partir de la centrifugation du sang sur une solution de ficoll. Dans le tube de gauche se trouve le sang dilué en rouge, et la solution de ficoll en bleu. Dans le tube de droite, le plasma est en rose, les leucocytes (PBMC) en jaune, la solution de ficoll en bleu et les érythrocytes avec les granulocytes en rouge.

II-3 Comptage manuelle

1 mL de la fraction PBMC a été isolé dans un nouveau tube et dilué avec 5 mL de PBS. Trente microlitres de cette suspension leucocytaire diluée ont été déposés sur une lame de Malassez. Les cellules ont été comptées dans 10 carrés sur les 25 de la grille, puis le nombre total de PBMC a été estimé par extrapolation à l'ensemble du volume.

II-4 Analyse Cytométrique

5000 μL de la solution leucocytaire diluée ont été centrifugés pendant 5 minutes à 600g afin d'isoler les leucocytes dans un culot. Le culot a été retiré et remis en suspension dans du 123 μL de PBS pour obtenir 5 millions de cellules par mL. 100 μL du culot remis en suspension et 100 μL de la solution d'anticorps ont été ajoutés dans un tube eppendorf, avant de vortexer et incubé pendant 20 minutes à 4°C. Après incubation, 1mL de PBS a été ajouté, avant centrifugation à 600g pendant 5 minutes. Le culot a été remis en suspension dans 300 μL de PBS, puis transféré dans un tube de cytométrie pour l'analyse cytométrique. L'acquisition a été réalisée à l'aide d'un cytomètre en flux équipé d'un laser bleu (488 nm) et d'un laser rouge (640 nm). Les signaux de fluorescence ont été détectés sur quatre canaux (FL1 à FL4) à l'aide de filtres optiques adaptés aux fluorochromes utilisés. Les fluorochromes FITC, PE, PE-Cy7 et APC ont été respectivement détectés sur les canaux FL1, FL2, FL3 et FL4.

III-Resultats

III-1 Comptage manuelle

Sur les 25 rectangles à l'intérieur de la cellule de Malassez, 10 ont été comptés (**Tableau 1**). La moyenne (4,9 cellules par rectangle) a ensuite été multipliée par 25 pour déterminer la quantité de PBMC par microlitre (≈ 123 cellules/ μL) dans la solution de PBMC diluée.

Rectangle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBMC compté	5	5	5	6	3	5	6	4	5	5

Tableau 1: nombre de cellules mononucléaires du sang périphérique comptées dans chaque rectangle de Malassez

La concentration déterminée a ensuite été utilisée pour calculer le volume de PBS nécessaire pour 5 millions de cellules par mL. En multipliant la concentration (123 cellules/ μL) par le volume centrifugé (5000 μL), on obtient la quantité de cellules dans le culot après centrifugation ($0,615 \cdot 10^6$ cellules). En divisant le nombre de cellules dans le culot ($0,615 \cdot 10^6$ cellules) par la concentration souhaitée ($5 \cdot 10^6$ cellules par mL), on obtient le volume de PBS à ajouter (0,123 mL)

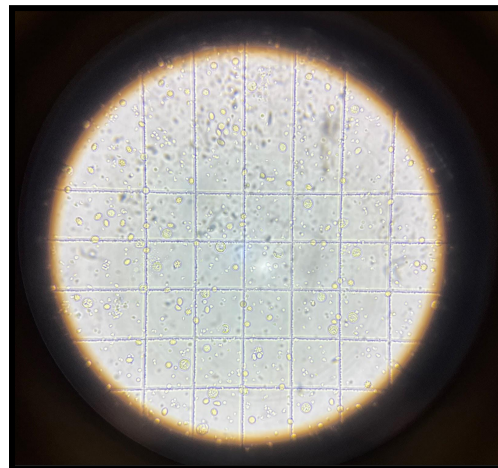


Figure 2: Un des rectangles de Malassez comptés. Il contient vingt carrés contenant des leucocytes provenant de la solution PMBC diluée.

III-2 Analyse Cytometrique

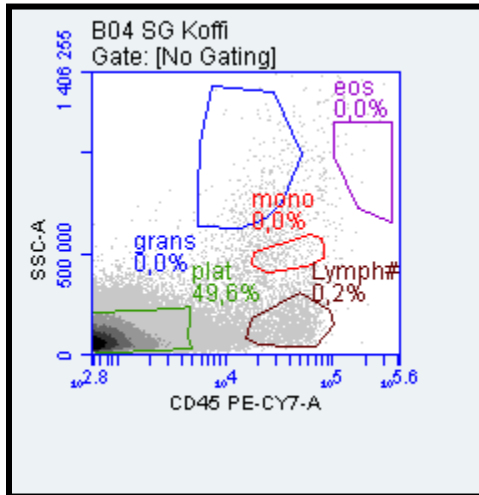


Figure 3: Le diagramme CD45/SSC permet d'identifier les leucocytes et de distinguer la population lymphocytaire, caractérisée par une forte expression du CD45 et une faible granularité. Sur 1 000 000 événements acquis, les lymphocytes représentent environ 0,16 % des événements, tandis que les monocytes et les granulocytes sont très faiblement représentés (0,02 % chacun) et les éosinophiles absents. Une proportion importante de plaquettes et de débris est observée (49,62 %), expliquant la faible proportion relative de leucocytes détectés.

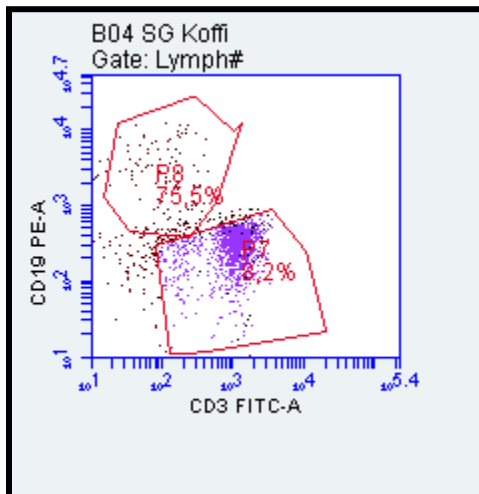


Figure 4: L'analyse de l'expression des marqueurs CD3 et CD19 au sein de la population lymphocytaire permet de distinguer les lymphocytes T et B. Les lymphocytes B CD19⁺ constituent la majorité des lymphocytes identifiés (75,47% de gate Lymph), tandis que les lymphocytes T CD3⁺ représentent une proportion plus faible (8,16% de gate Lymph).

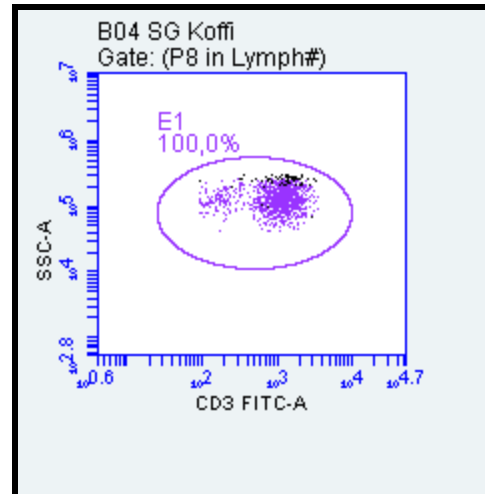


Figure 5: Le diagramme SSC/CD3 permet de vérifier que l'ensemble des événements du gate E1 correspond à des cellules présentant une faible granularité, caractéristique des lymphocytes. Les événements E1, entourés en rose, se regroupent dans la région SSC faible et CD3⁺, confirmant que l'expression du CD3 est associée à une population de morphologie lymphocytaire et validant l'analyse phénotypique des lymphocytes T.

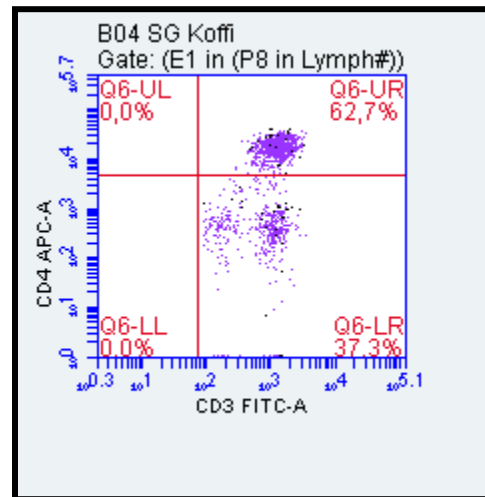


Figure 6: Le diagramme CD4/CD3 permet la caractérisation des sous-populations de lymphocytes T en distinguant les lymphocytes T CD4⁺ des autres lymphocytes T, majoritairement CD8⁺. Parmi les lymphocytes T CD3⁺ analysés, 62,71 % correspondent à des lymphocytes T CD4⁺, tandis que 37,29 % sont des lymphocytes T CD4⁻, correspondant principalement aux lymphocytes T CD8⁺.

L'analyse cytométrique a montré que les leucocytes CD45⁺ représentaient une fraction minoritaire des événements acquis, avec une forte proportion de plaquettes et de débris. La population lymphocytaire, identifiée par un SSC faible et une expression élevée du CD45, représentait environ 0,16 % des événements totaux.

Au sein de cette population, les lymphocytes B CD19⁺ constituaient la majorité des lymphocytes (75,47 %), tandis que les lymphocytes T CD3⁺ représentaient une fraction plus faible (8,16%). Parmi les lymphocytes T, les cellules CD4⁺ représentaient environ 62,71% de la population CD3⁺, des valeurs compatibles avec celles attendues dans le sang périphérique. Toutefois, le faible nombre d'événements lymphocytaires limite la précision quantitative des résultats.

IV-Discussion

L'objectif de ce travail était de quantifier et de caractériser les PBMC à partir de sang total et après isolement par gradient de densité au Ficoll, en combinant un comptage manuel et une analyse par cytométrie en flux.

Le comptage manuel a permis d'estimer la concentration de PBMC dans la fraction isolée et d'adapter la concentration cellulaire pour l'analyse cytométrique. Toutefois, la concentration obtenue était relativement faible, suggérant une perte cellulaire lors des étapes de préparation.

L'analyse cytométrique a confirmé la présence des principales sous-populations lymphocytaires, notamment les lymphocytes T CD3⁺, les lymphocytes B CD19⁺ et les lymphocytes T CD4⁺. Les profils d'expression observés sont globalement conformes aux données de la littérature concernant la distribution des lymphocytes dans le sang périphérique [4].

Néanmoins, une contamination importante par des plaquettes et des débris a été observée dans plusieurs échantillons, entraînant une proportion très faible de lymphocytes parmi les événements acquis. Cette contamination peut s'expliquer par une manipulation inadéquate du tube après la centrifugation sur Ficoll. En particulier, une agitation accidentelle du tube fractionné après centrifugation a probablement perturbé l'interface contenant les PBMC, entraînant un mélange partiel avec les autres fractions sanguines et une diminution de la pureté de la population isolée.

Ces limitations techniques réduisent la robustesse quantitative des résultats et soulignent l'importance d'une manipulation délicate lors de l'isolement des PBMC, notamment lors de la récupération de l'anneau leucocytaire. Malgré ces contraintes, la stratégie de marquage et de gating utilisée a permis

une identification correcte des principales populations lymphocytaires, validant l'intérêt de la cytométrie en flux pour l'analyse phénotypique des PBMC.

V-Bibliographie

- [1] Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al., editors. The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015. Chapter 15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500157/> doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_15
- [2] Lehle S, Völkl S, Seitz K, Goossens C, Emons J, Ruebner M, Uhrig S, Ziegler P, Theuser AK, Beckmann MW, Fasching PA, Huebner H. Effect of delayed isolation of peripheral blood mononuclear cells on cell viability and functionality. BMC Immunol. 2025 Mar 15;26(1):21. doi: 10.1186/s12865-025-00701-y. PMID: 40089714; PMCID: PMC11909936.
- [3] Mace EM. Human natural killer cells: Form, function, and development. J Allergy Clin Immunol. 2023 Feb;151(2):371-385. doi: 10.1016/j.jaci.2022.09.022. Epub 2022 Oct 1. PMID: 36195172; PMCID: PMC9905317.
- [4] Mims MP. Lymphocytosis, Lymphocytopenia, Hypergammaglobulinemia, and Hypogammaglobulinemia. Hematology. 2018;682-90. doi: 10.1016/B978-0-323-35762-3.00049-4. Epub 2017 Sep 5. PMCID: PMC7152059.
- [5] Blumenreich MS. The White Blood Cell and Differential Count. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 153. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK261/>
- [6] McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40. PMID: 29512141; PMCID: PMC5939936.
- [7] Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. Immunol Cell Biol. 1997 Oct;75(5):430-45. doi: 10.1038/icb.1997.68. PMID: 9429890.