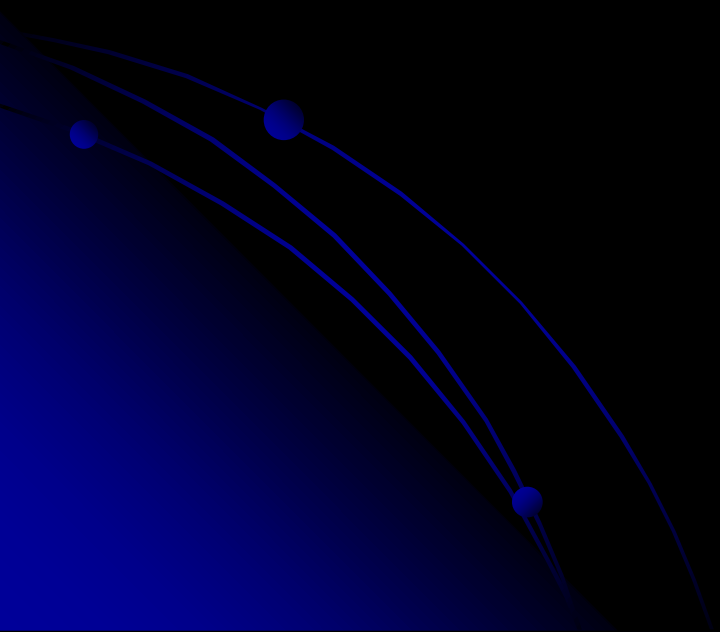
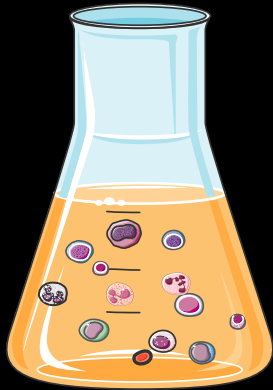


Techniques de purification d'une population cellulaire



Intérêt du tri



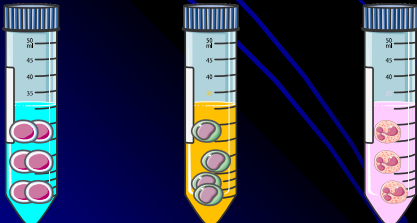
Échantillon hétérogène

- Diversité spécifique (types cellulaires)
- Diversité physiologique (ex: cellules vivantes, mortes, transfectées)



TRI

Séparation physique des cellules d'intérêt
Concentration des cellules moins abondantes
Maintien de la **viabilité**



Analyses ultérieures

(biologie moléculaire, protéomique...)

Mise en culture, injection

Observation microscopique

Sélection

(isolation, séparation, purification)

- Classification

- Par objectifs

- Sélection positive
 - Sélection négative

- Par méthodes

- Physique (centrifugation)
 - Biologique (adhésion, clonage)
 - Immunologique (billes magnétique, cytométrie)

- Paramètres d'évaluation

- Pureté
 - Rendement
 - viabilité

Méthodes physique

- Buffy-coat
- Ficoll
- élutriation

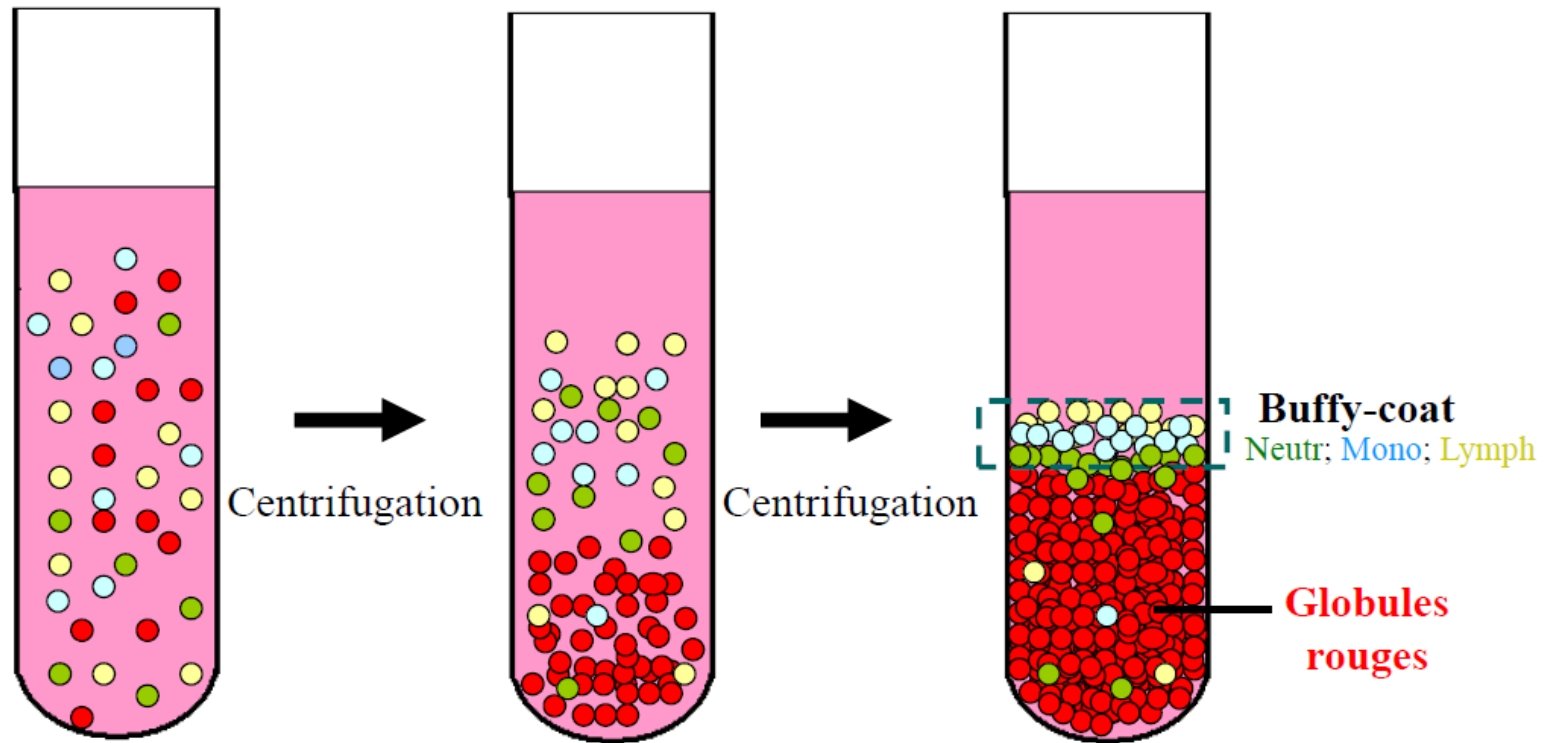
Taille et densité des cellules sanguines humaines

	Taille (µm)	Densité (masse volumique)	Vitesse de sédimentation
Globules rouges	7 (6,5-7,5)	1,098 (1,087-1,105)	
Eosinophiles	12 (12-15)	1,091 (1,087-1,096)	
Neutrophiles	12 (12-15)	1,088 (1,082-1,097)	
Basophiles	9,5 (9-10)	1,078 (1,074-1,082)	
Monocytes	15 (15-20)	1,071 (1,065-1,075)	
Lymphocytes	9 (8-10)	1,063 (1,057-1,067)	
Plaquettes	2-3	1,040	

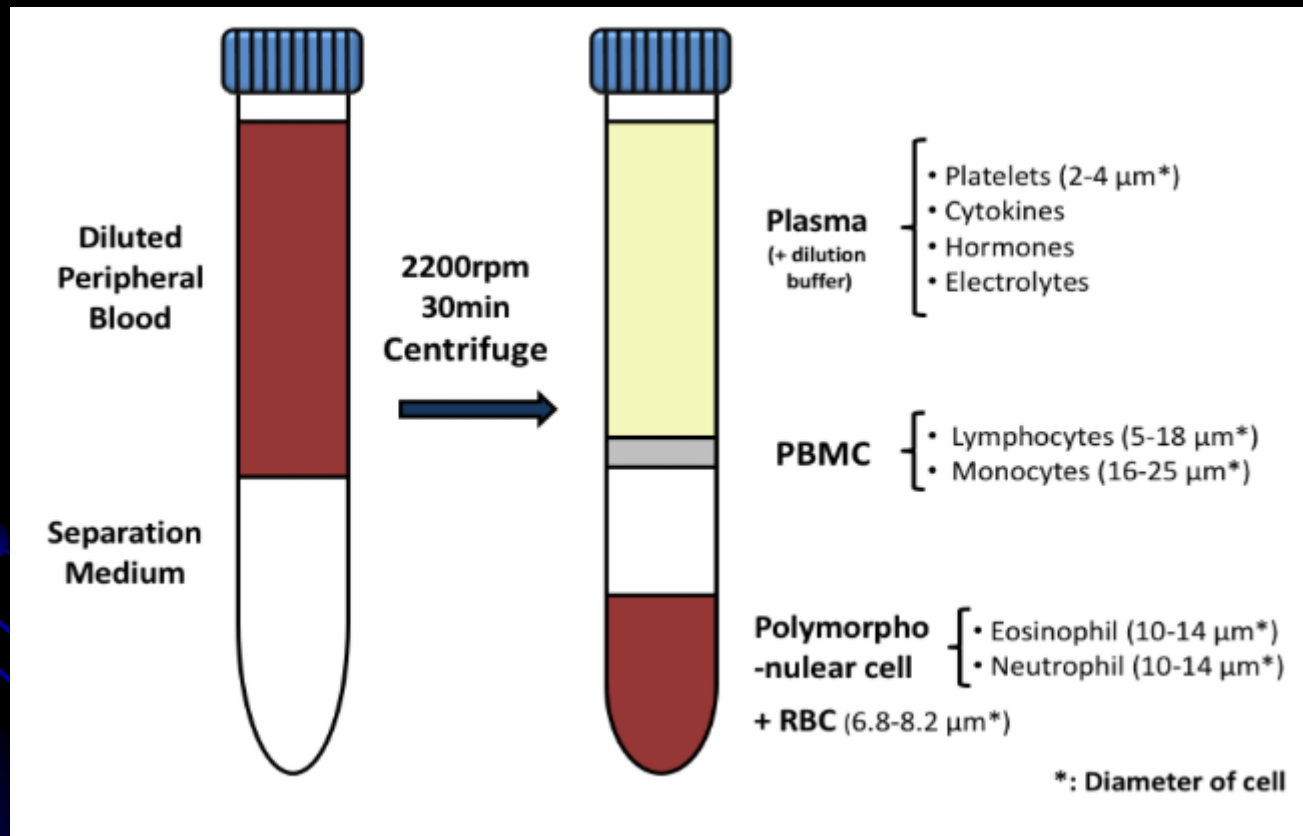
Taille et densité des cellules sanguines humaines

	Taille (µm)	Densité (masse volumique)	Vitesse de sédimentation
Globules rouges	7 (6,5-7,5)	1,098 (1,087-1,105)	
Eosinophiles	12 (12-15)	1,091 (1,087-1,096)	
Neutrophiles	12 (12-15)	1,088 (1,082-1,097)	
Basophiles	9,5 (9-10)	1,078 (1,074-1,082)	
Monocytes	15 (15-20)	1,071 (1,065-1,075)	
Lymphocytes	9 (8-10)	1,063 (1,057-1,067)	
Plaquettes	2-3	1,040	-

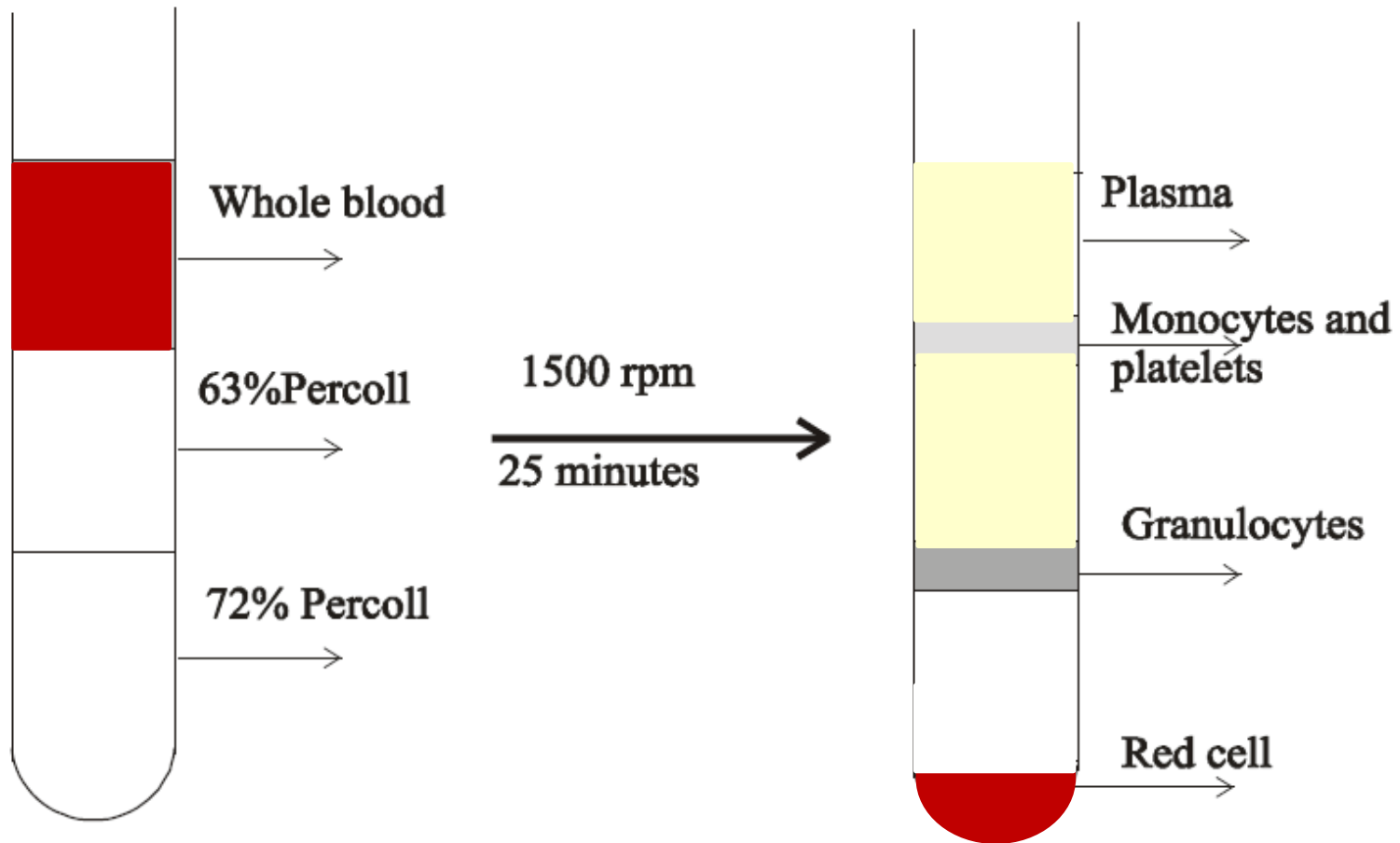
Buffy-Coat



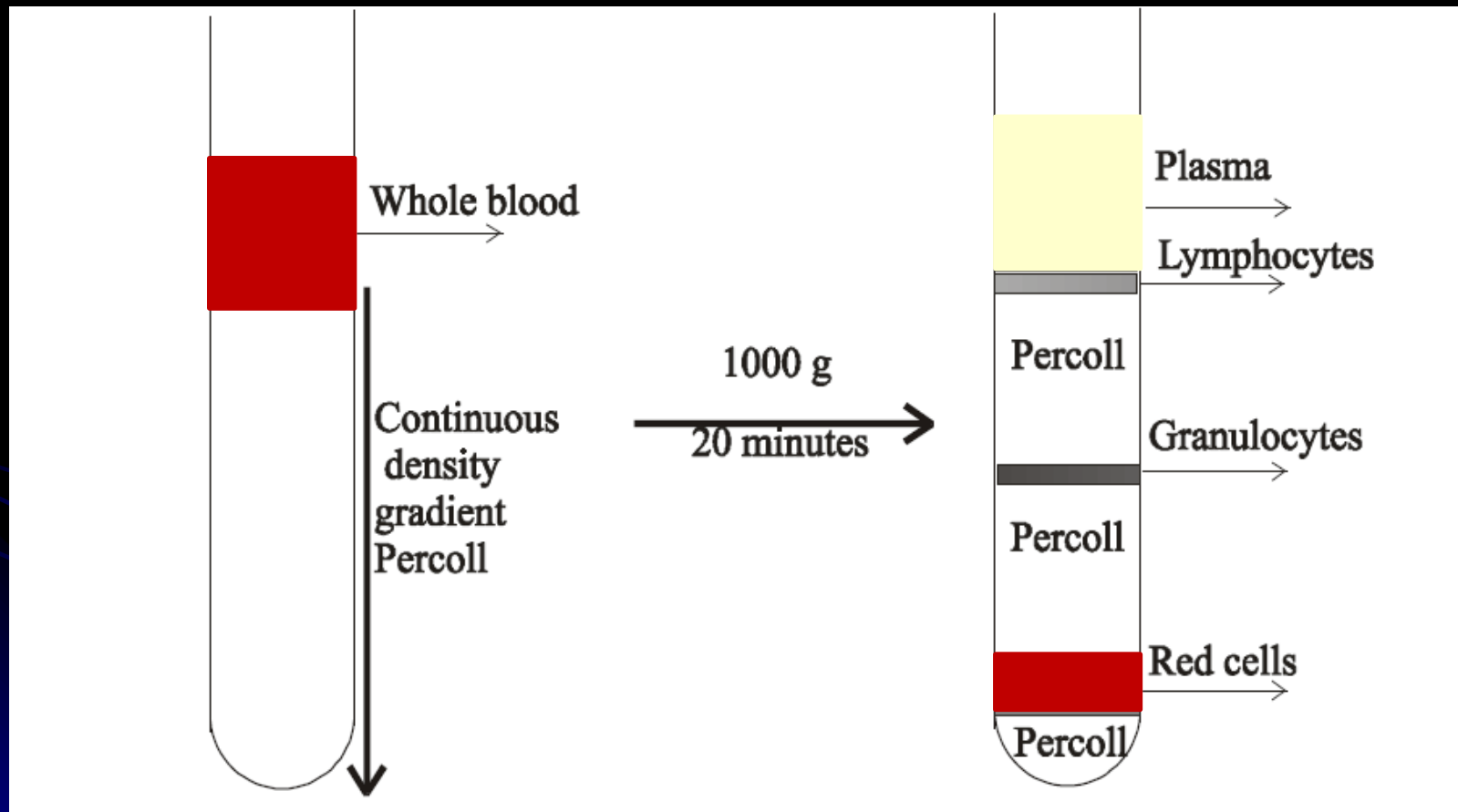
Ficoll



Ficoll



Ficoll



Sélection

(isolation, séparation, purification)

- Classification

- Par objectifs

- Sélection positive
 - Sélection négative

- Par méthodes

- Physique (centrifugation)
 - **Biologique (adhésion, clonage)**
 - Immunologique (billes magnétique, cytométrie)

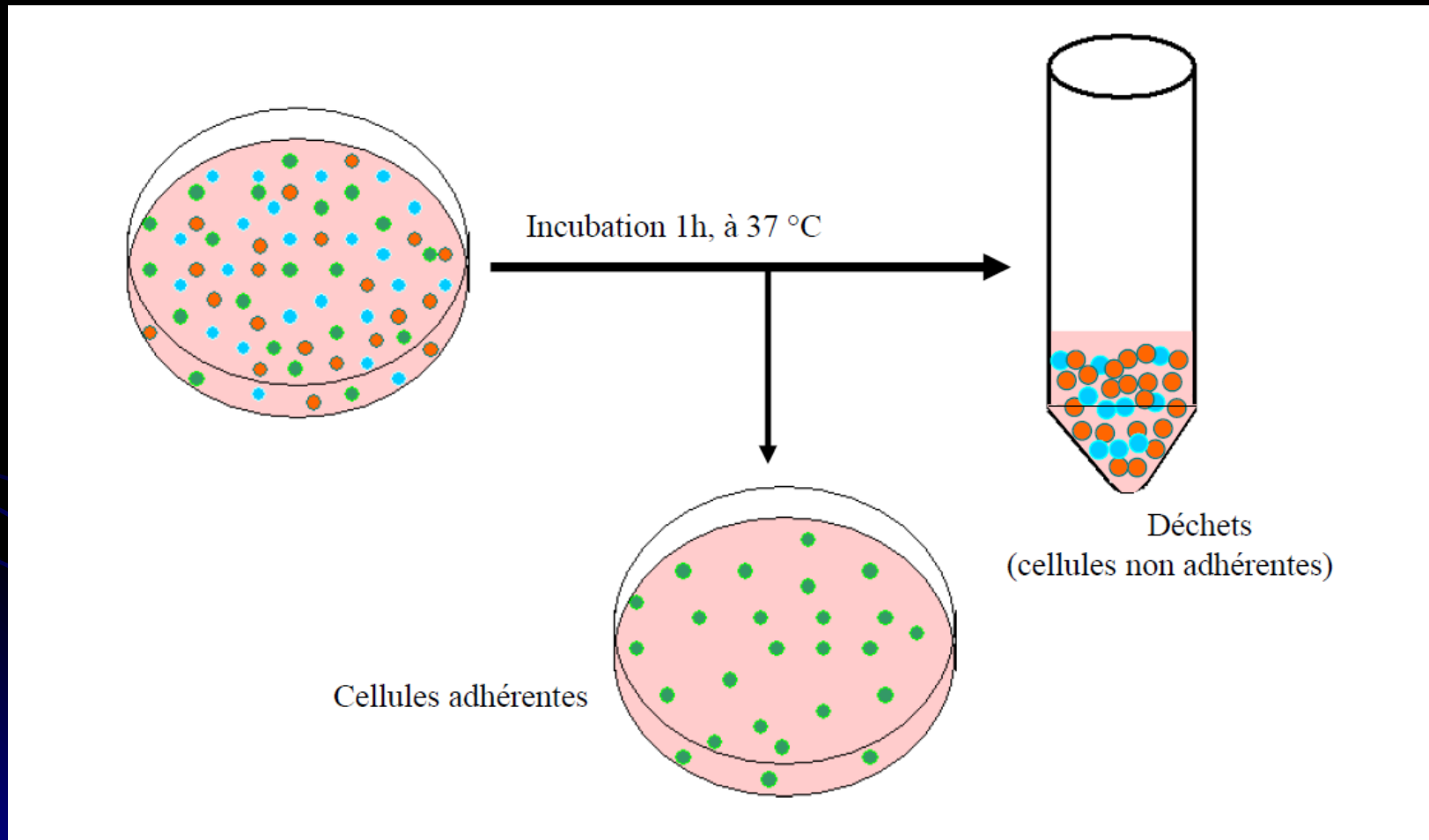
- Paramètres d'évaluation

- Pureté
 - Rendement
 - viabilité

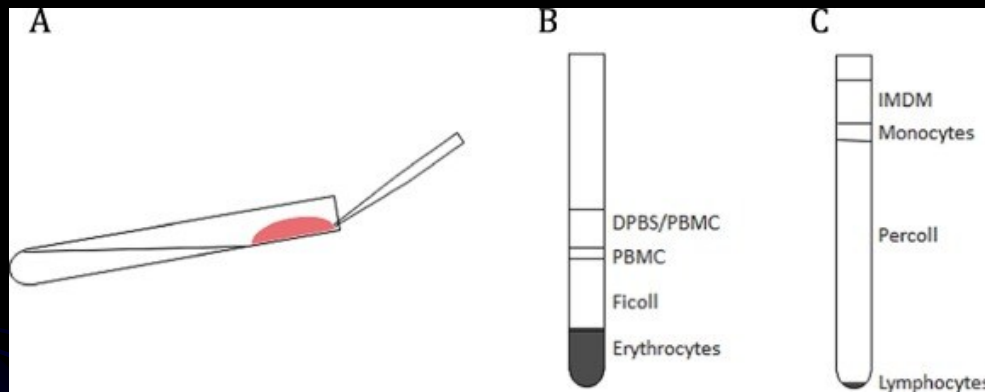
Méthodes biologiques

- Adhésion
- Clonage
- Chimique

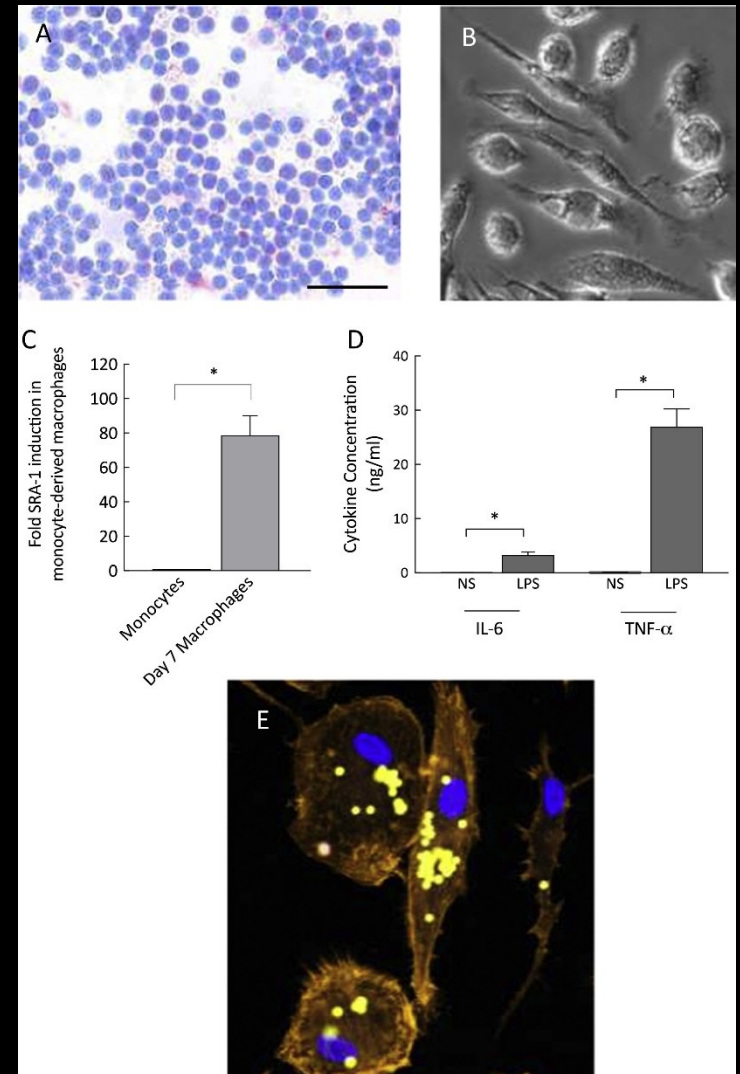
Adhésion sur boîtes plastiques



A simple and effective method for the isolation and culture of human monocytes from small volumes of peripheral blood



PBMC : Human peripheral blood mononuclear cells



Méthodes biologiques

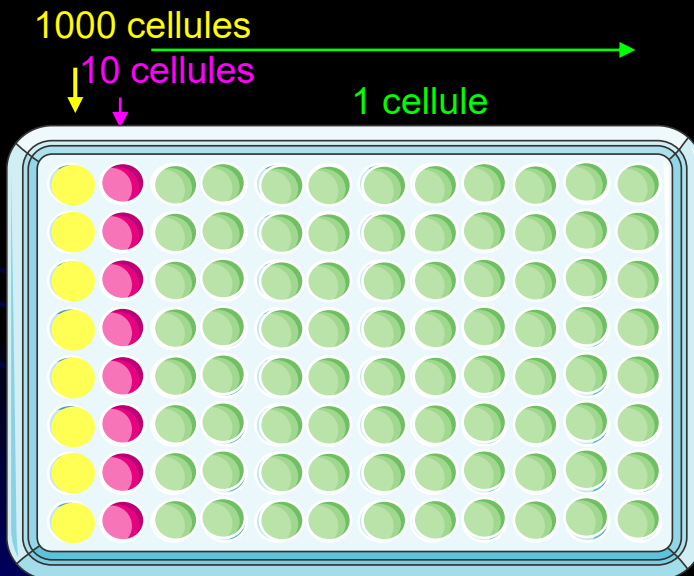
- Adhésion
- **Clonage**
- Chimique

Clonage (1)

- Un clone est une population de cellules dérivant toutes de la même cellule mère par divisions successives
- Pourquoi cloner?
 - Cellules en souffrance: sélections des plus résistantes
 - Tester les sérum
 - Hybridomes: production d'un anticorps unique

Clonage (2)

- Les cellules sont cultivées dans des petits volume en dilution au 1/10, 1/100, 1/1000; jusqu'à obtenir une implantation théorique de une cellule par puits



- Les 2 premières rangées servent de « sauvetage »
- Les 8 autres rangées permettent de sélectionner les clones

- Réussi si 70% de puits positifs
- Ajout de macrophages 5×10^3 / puits avant de distribuer les hybridomes mort au bout de 3-4 jours

Méthodes biologiques

- Adhésion
- Clonage
- Chimique

Immortalisation de cellules normales (non cancéreuses) par transfection

* **Expression d'un oncogène**

- Expression stable d'un oncogène virale responsable de la transformation des cellules

Ex C-Myc oncogène codant pour un facteur de transcription régulant la prolifération et la mort cellulaire /

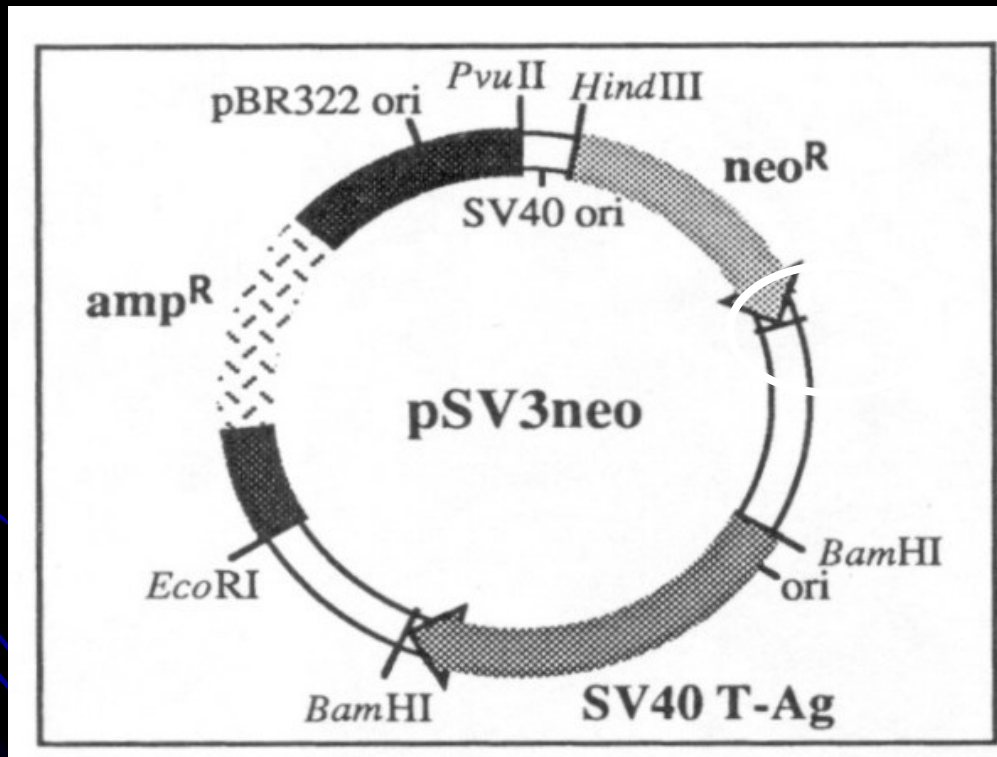
* **Sur-expression d'un récepteur de facteur de croissance**

Ex : Rcp GM-CSF

* **Sur-expression d'une protéine kinase régulant la prolifération cellulaire**

Ex : p210 protéine dérégulée dans la LMC

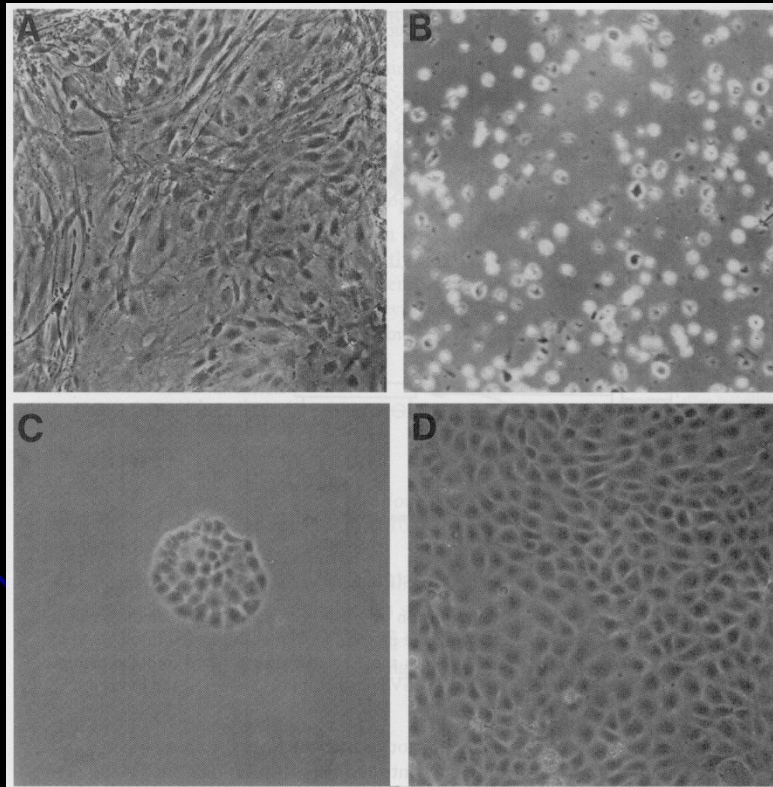
Principe : expression par transfection cellulaire d'une protéine virale



Sélection antibiotique

Principe : expression d'un gène de résistance à un ATB (ex néomycine) permettant de sélectionner les cellules transfectées (obtention de lignée clonale stable)

**A) Sans
sélection**



**B)Avec
sélection,
population
non
transfectée**

**C-D) Avec
sélection,
population
transfectée**

Sélection

(isolation, séparation, purification)

- Classification

- Par objectifs

- Sélection positive
 - Sélection négative

- Par méthodes

- Physique (centrifugation)
 - Biologique (adhésion, clonage)
 - Immunologique (billes magnétique, cytométrie)

- Paramètres d'évaluation

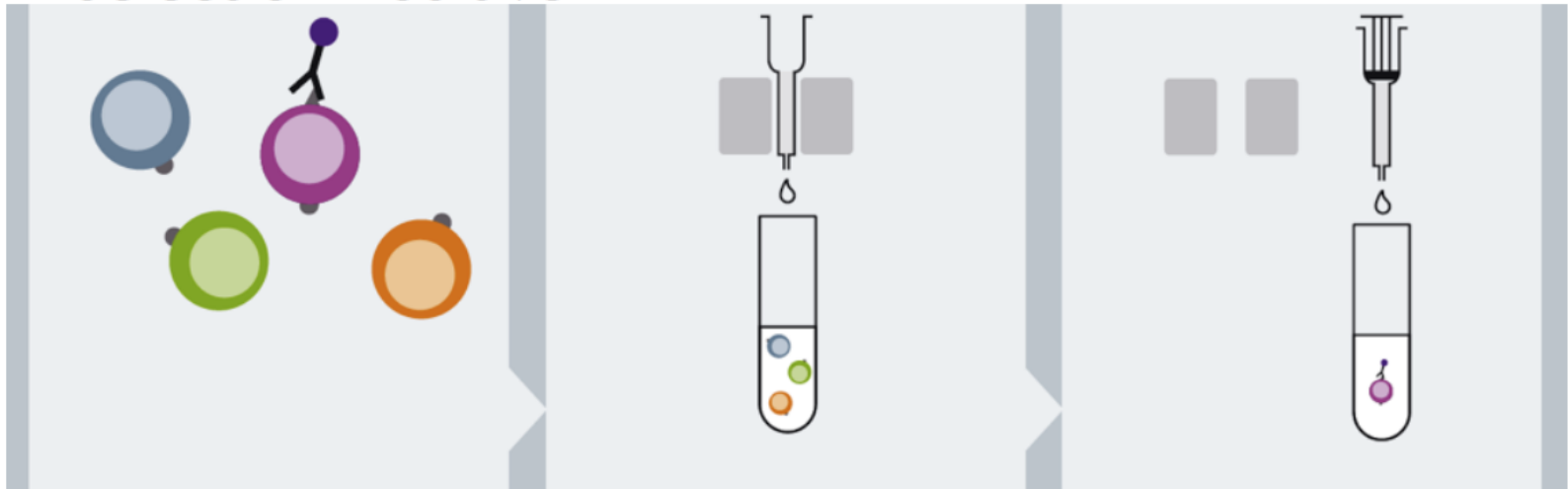
- Pureté
 - Rendement
 - viabilité

Méthodes immunologiques

- Tri magnétique
- Tri par cytométrie en flux
 - Mécanique
 - électrostatique

Tri magnétique

Sélection Positive



Marquage des
cellules d'intérêt
avec un anticorps
couplé à une bille
magnétique

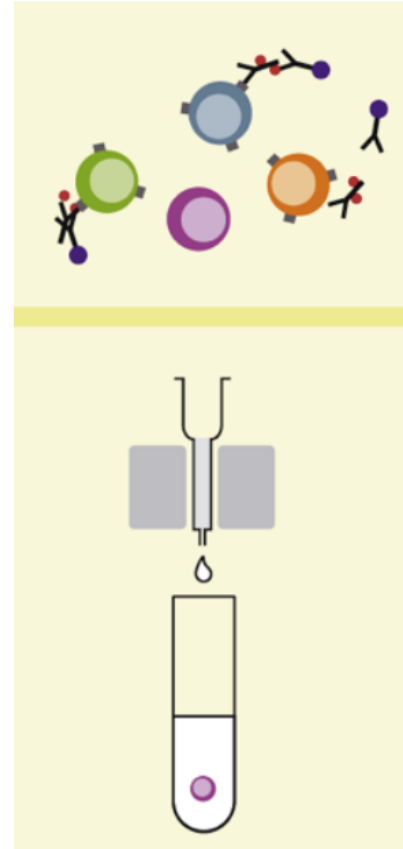
Les cellules
d'intérêt sont
retenues par un
aimant, les cellules
négatives sont
éluées

Elution des
cellules d'intérêt

Tri magnétique

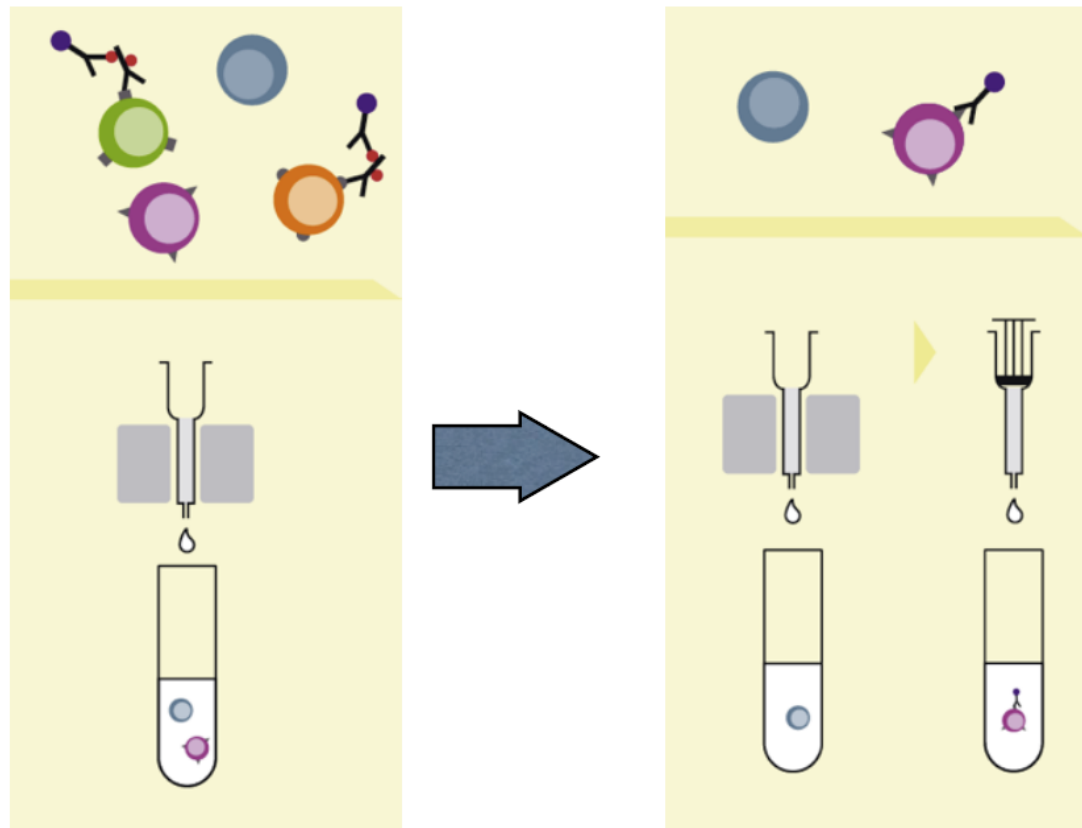
Sélection négative

Marquage indirect, système biotine/avidine

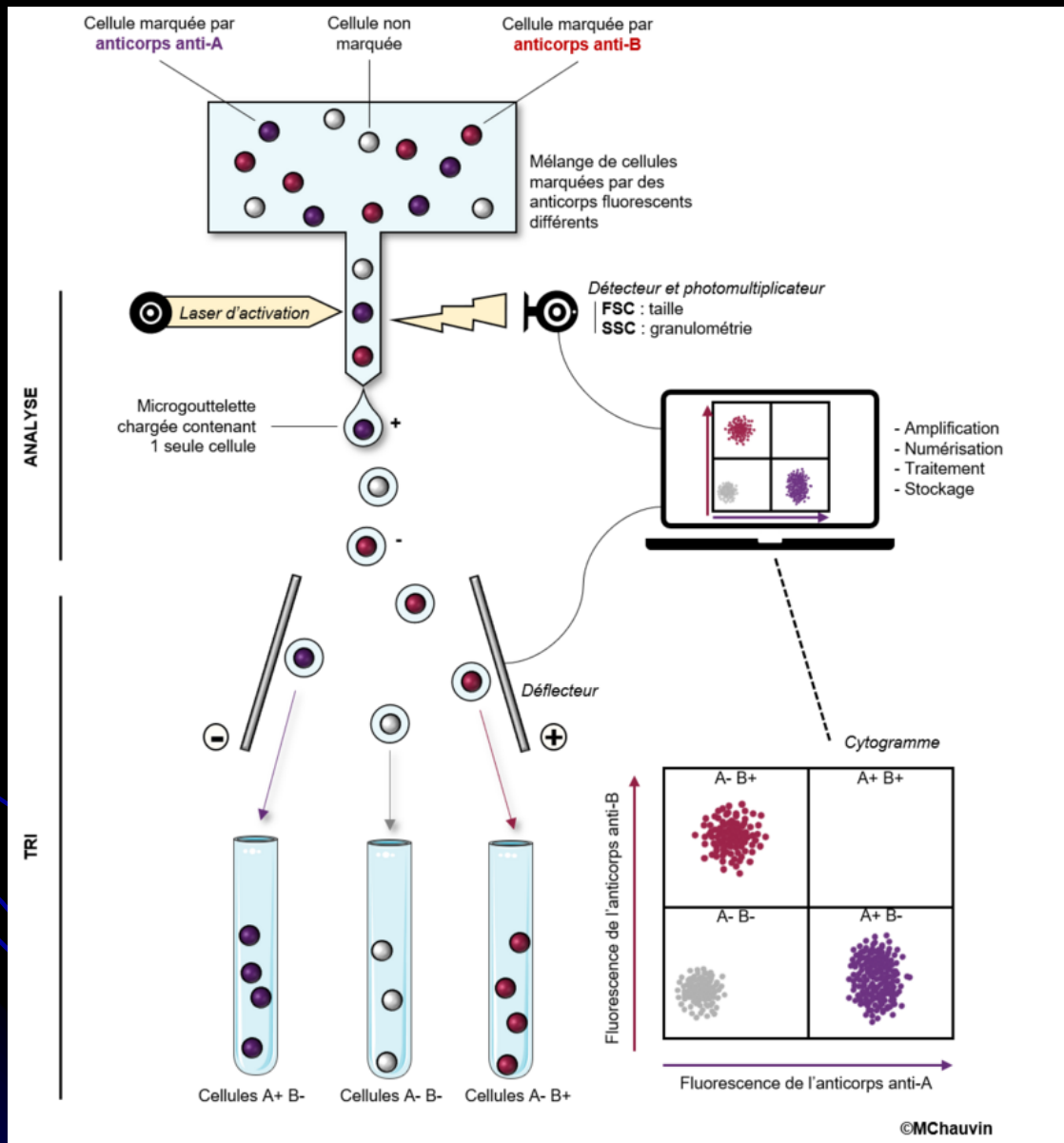


Tri magnétique

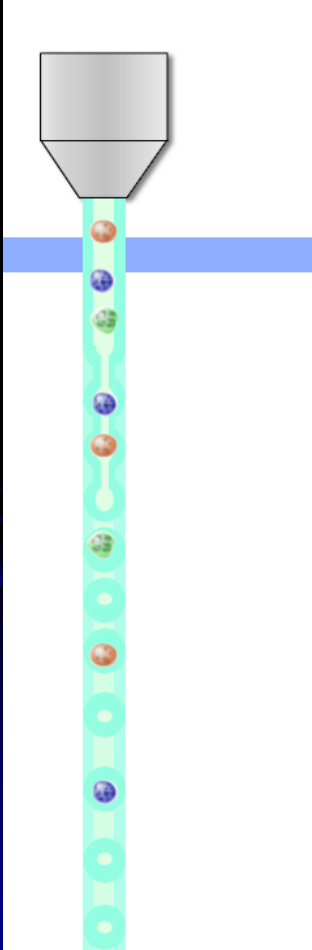
Tri séquentiel



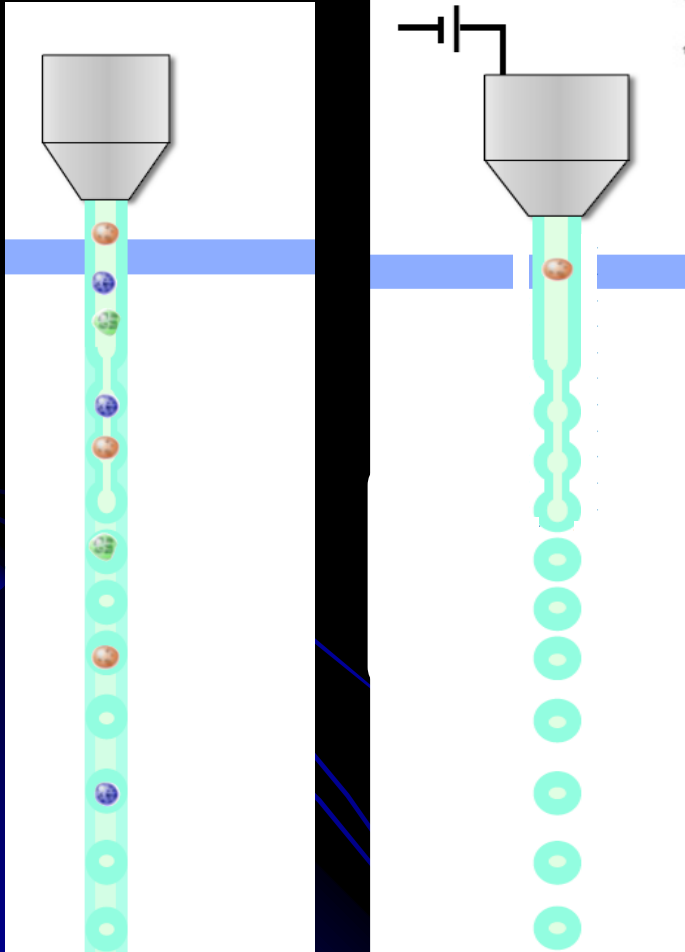
Tri électrostatique



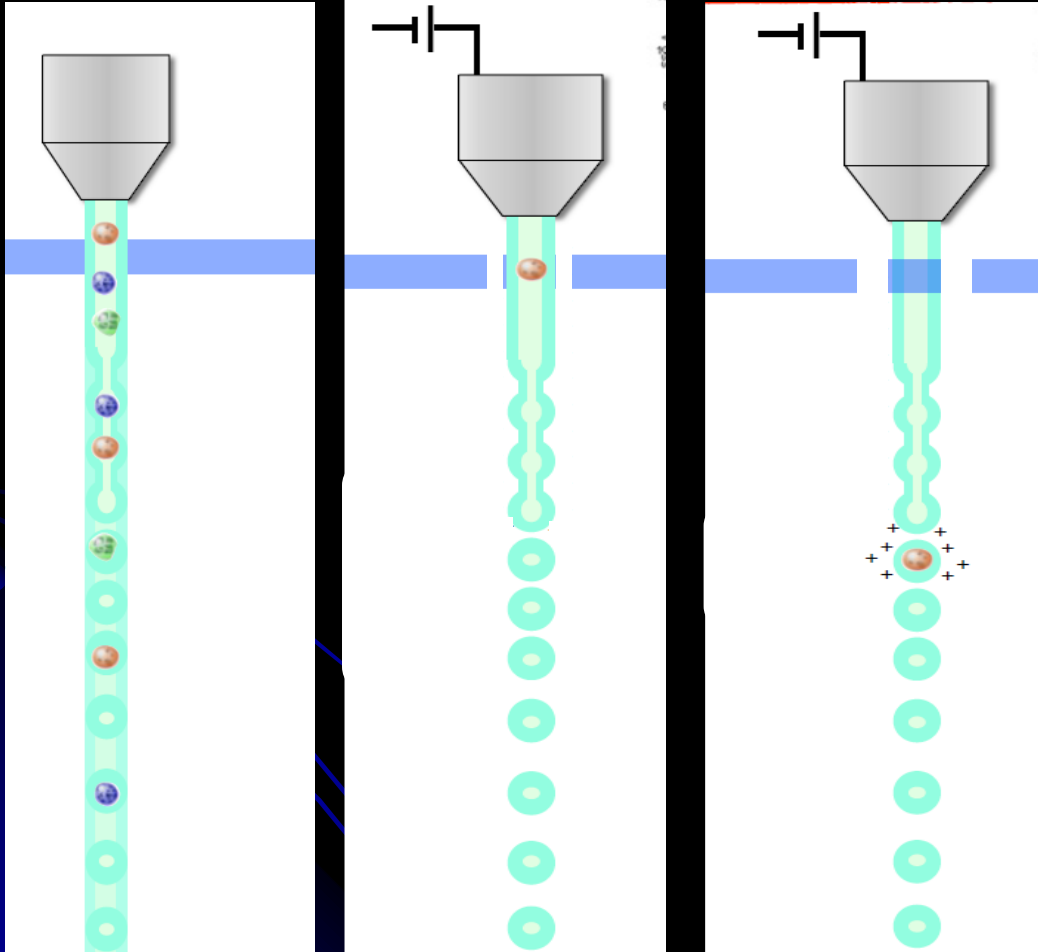
Tri électrostatique



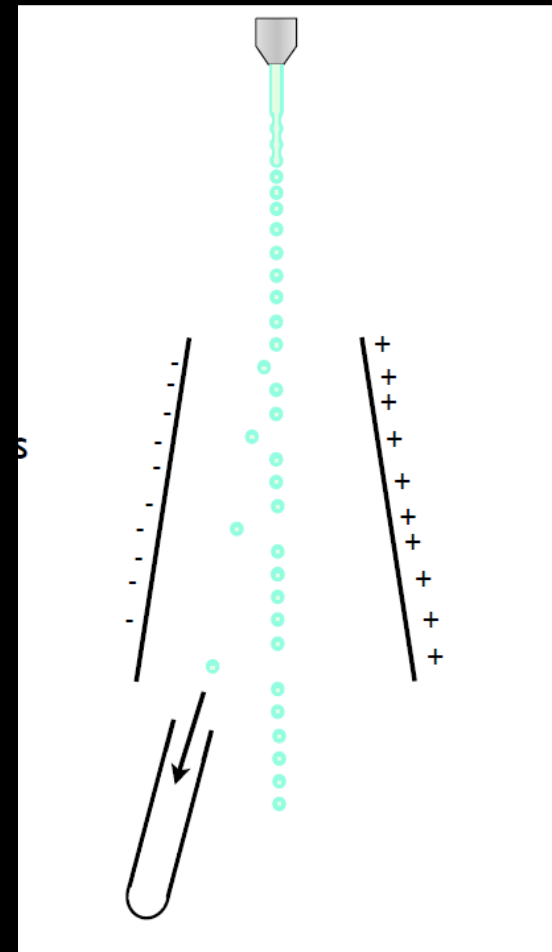
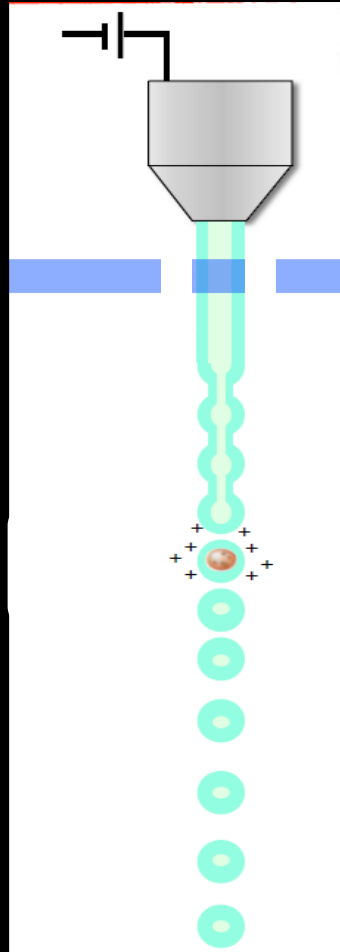
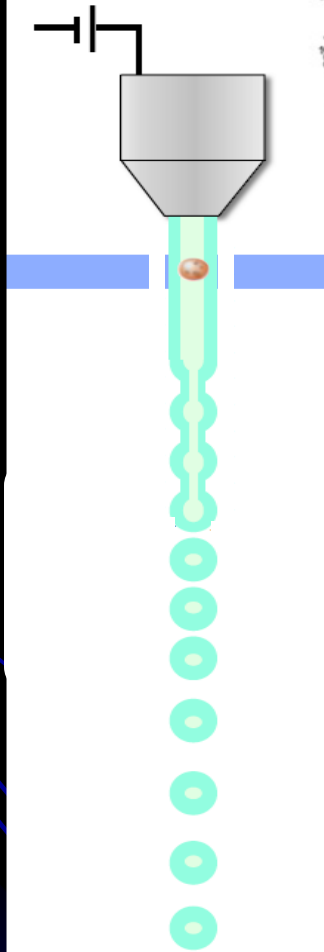
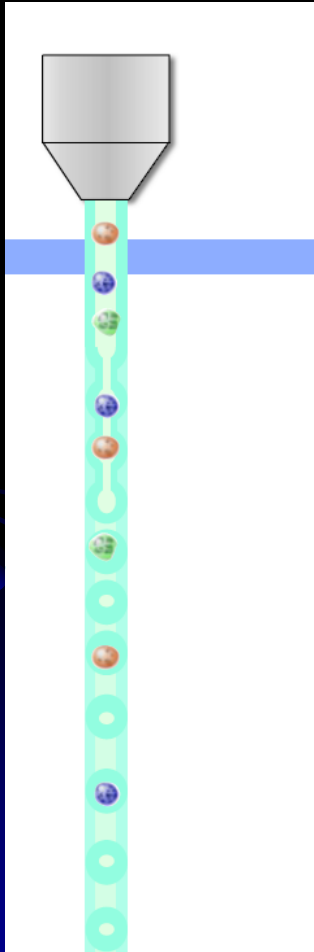
Tri électrostatique



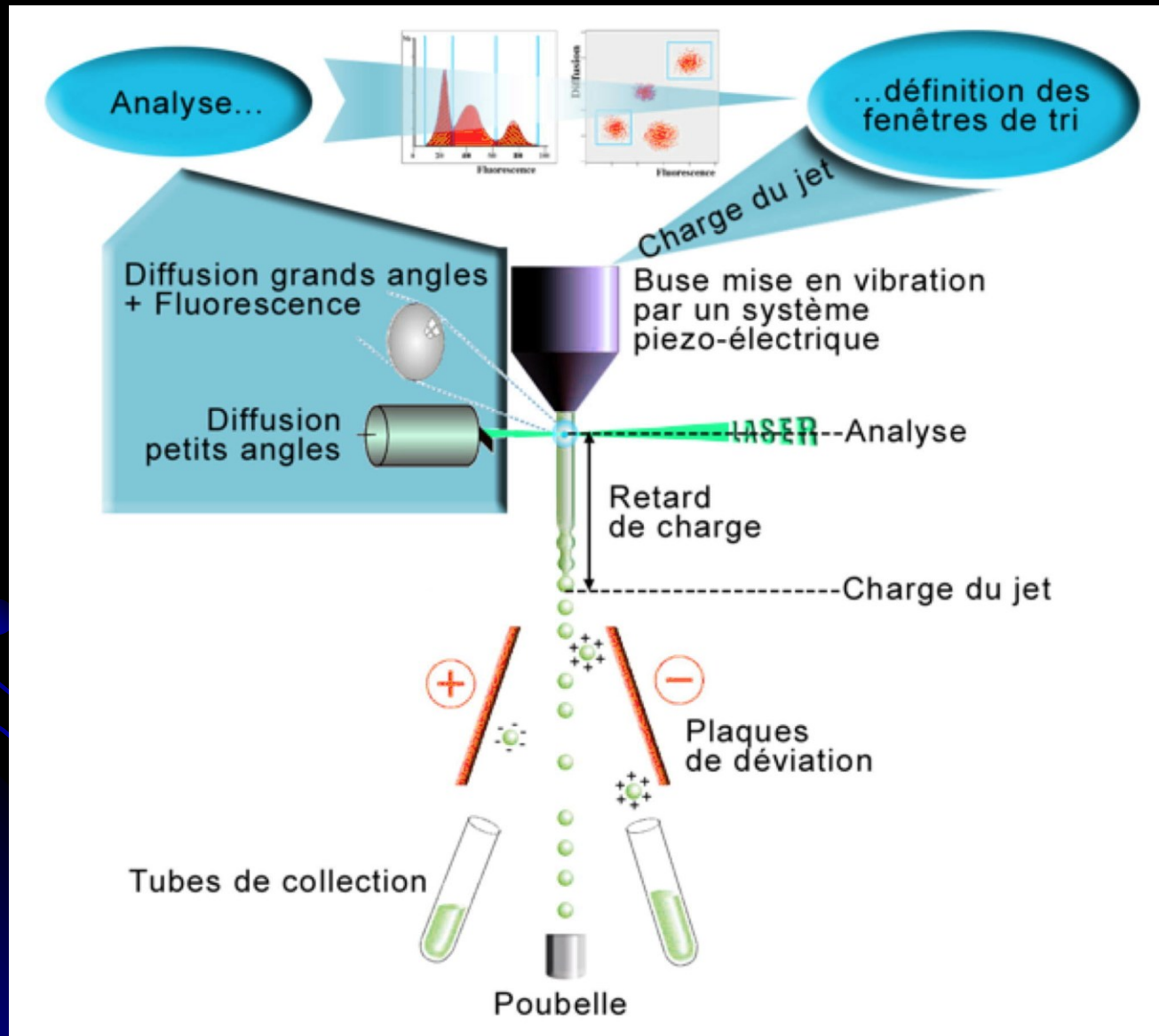
Tri électrostatique



Tri électrostatique



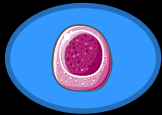
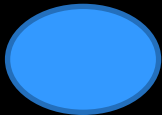
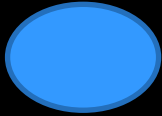
Tri électrostatique



Tri électrostatique

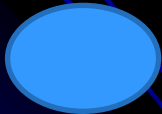
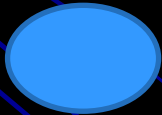
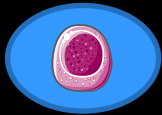
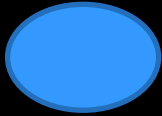
- Modes de tri
 - Enrichissement
 - Pureté
 - Clonage

Tri électrostatique



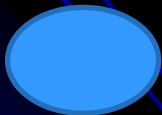
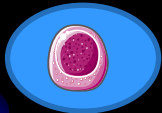
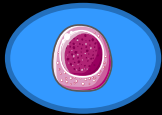
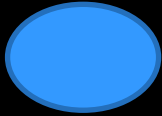
Mode	Tri?
Enrichissement	Oui
Pureté	Oui
Clonage	oui

Tri électrostatique



Mode	Tri?
Enrichissement	Oui
Pureté	Non
Clonage	Non

Tri électrostatique



Mode	Tri?
Enrichissement	Oui
Pureté	Oui
Clonage	Non

Tri électrostatique

	Pureté	Rendement	Exclusion
Clonage	99-100%	+	+++
Pureté	95%	++	++
Enrichie	65-85%	+++	+

Tri électrostatique

3 règles fondamentales

- Pression différentielle constante
échantillon/liquide de gaine
- $[\text{échantillon/ml}] = \text{Vitesse} \times 1000$
 - Ex: si on tri à 40 000 évènements/sec, il faut un échantillon à 40 millions de cellules/ml
- Diamètre de la buse /diamètre de la cellules
=3 à 5 fois supérieur

Tri électrostatique

- Préparation de la machine:
 - Stérilité
 - Mode de tri
 - Plaques de déflexion
- Est-ce faisable?
 - Population initiale 1%
 - Besoin de 1.10^6 cell viables
 - Vitesse 10 000 cell/sec
 - Rendement de 50%
 - Temps?

Tri électrostatique

- Préparation de la machine:
 - Stérilité
 - Mode de tri
 - Plaques de déflexion
- Est-ce faisable?
 - Population initiale 1%
 - Besoin de 1.10^6 cell viables
 - Vitesse 10 000 cell/sec
 - Rendement de 50%



5h30

Tri électrostatique vs magnétique

- $50 \cdot 10^6$ cellules en 4h
- Pureté 99,9%
- Rendements: 50 à 80%
- Multiparamétrique
- Multi-voies
- Tout type de fluorescence

- $4 \cdot 10^9$ cellules en 15 min
- Pureté : 70-90%
- Rendement : 50 à 70%
- Monoparamétrique
- Une seule voie
- Marquage de surface

Isolation of Highly Pure Primary Mouse Alveolar Epithelial Type II Cells by Flow Cytometric Cell Sorting

Bio Protoc. 2016 November 20; 6(22):

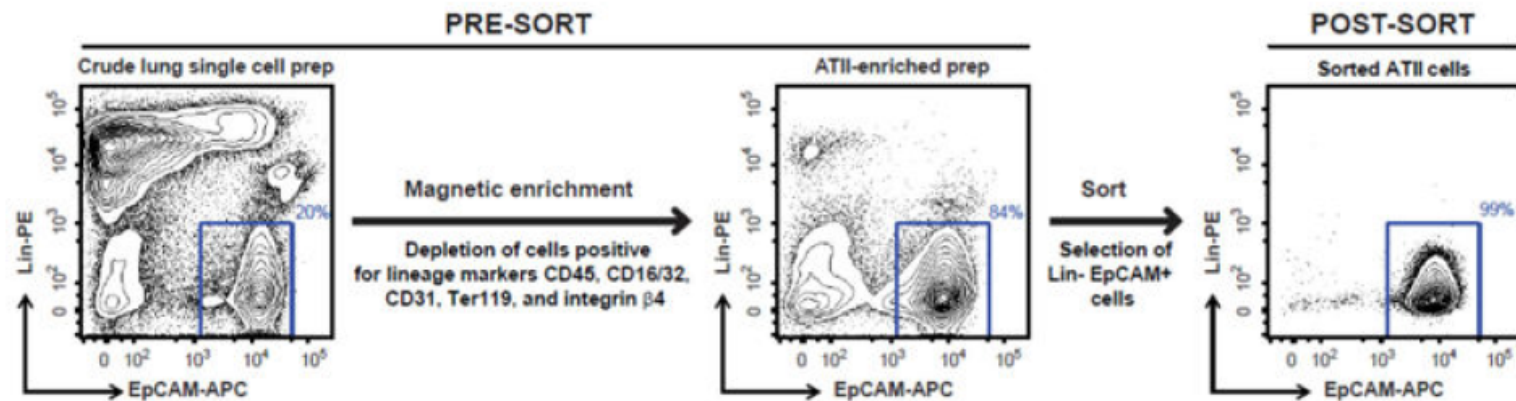


Figure 8. FACS sorting strategy for isolating highly pure murine ATII cells

Shown are representative flow cytometric plots of lung cells collected before and after magnetic enrichment, and after sorting. Displayed on the y-axis is staining for Lin markers (CD45, CD16/32, CD31, Ter119 and integrin β 4) while the x-axis shows EpCAM staining. Events displayed on the plots are DAPI negative single cells. A gate around Lin⁻ EpCAM⁺ cells, as shown above, is used to sort the cells.

Isolation of Highly Pure Primary Mouse Alveolar Epithelial Type II Cells by Flow Cytometric Cell Sorting

Bio Protoc. 2016 November 20; 6(22):

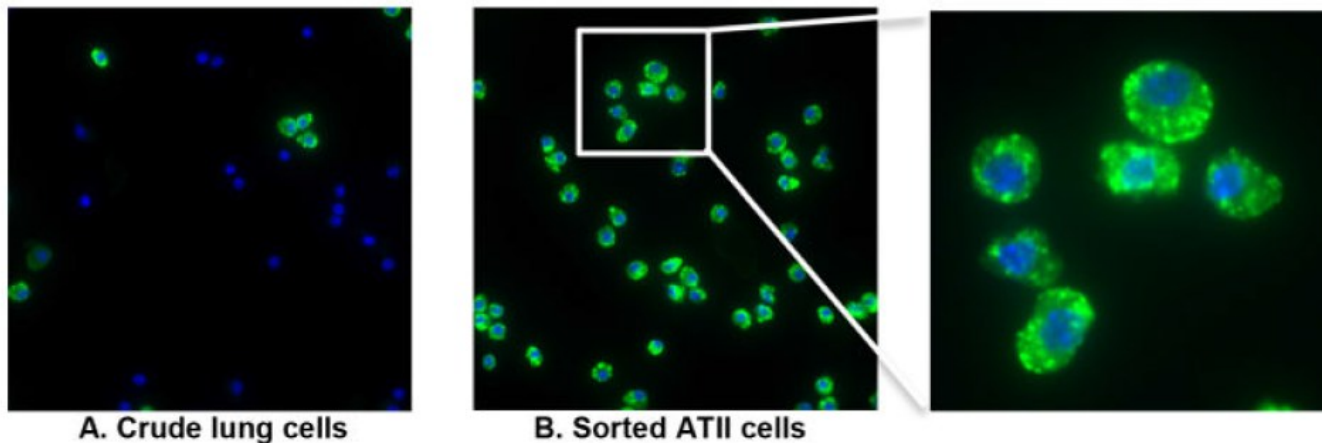
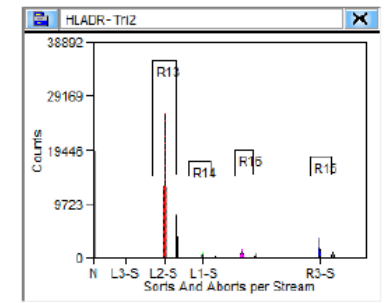
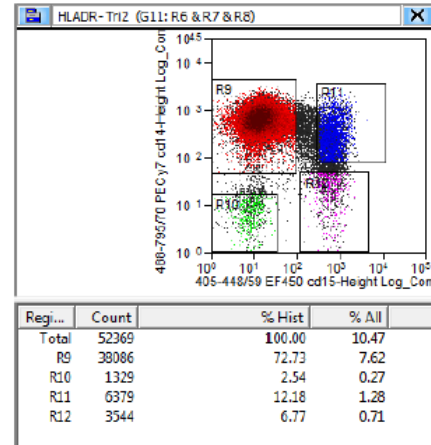
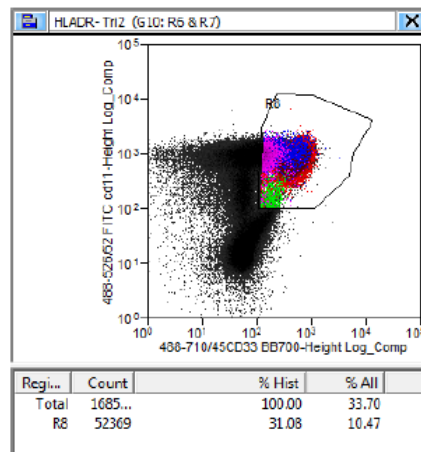
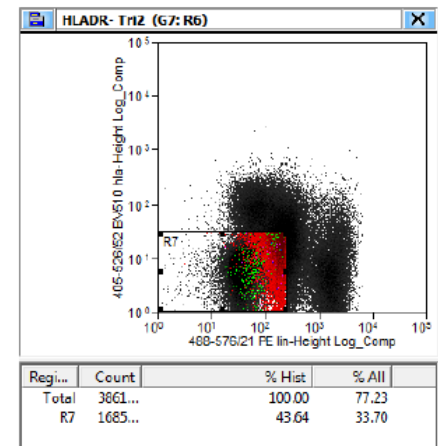
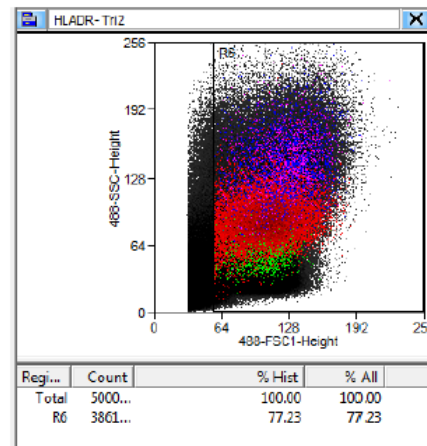


Figure 9. Purity of sorted ATII cells

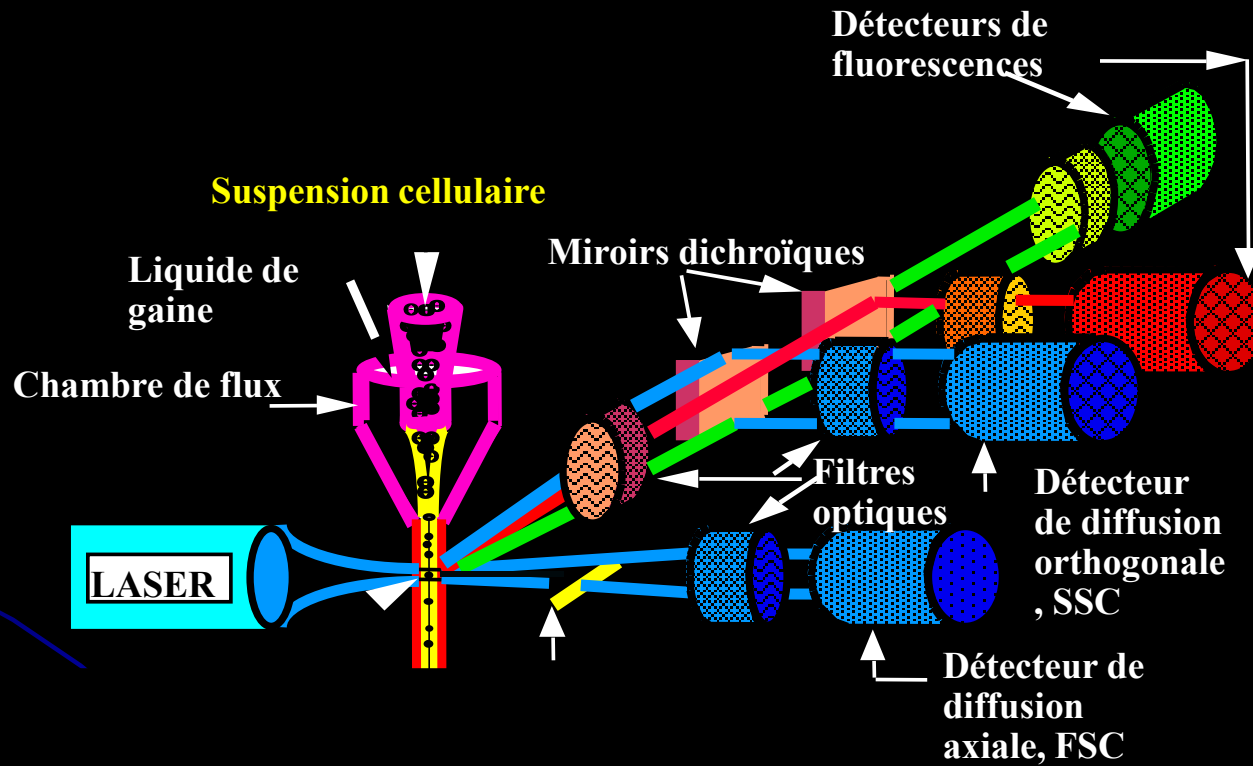
Cells from (A) crude lung digest and (B) ATII cells after FACS sorting were spun onto slides and stained for pro-SP-C, a specific ATII marker, to assess purity.

DETAILS DES ANALYSES AFFERENTES AU PROJET :

- Échantillon Trié sur colonne HLADR-
- Récupération des populations :
 - R9: CD14+ CD15-: 1 812 385 cellules
 - R10: CD14-CD15-: 46 587 cellules
 - R11: CD14+ CD15+: 209 196 cellules
 - R9: CD14- CD15+: 72 780 cellules



Tri par cytométrie en flux



Tri électrostatique

