

Exposé d'Immunologie 5

Mesure de l'activité cytotoxique des lymphocytes T par le test de relargage de Chrome

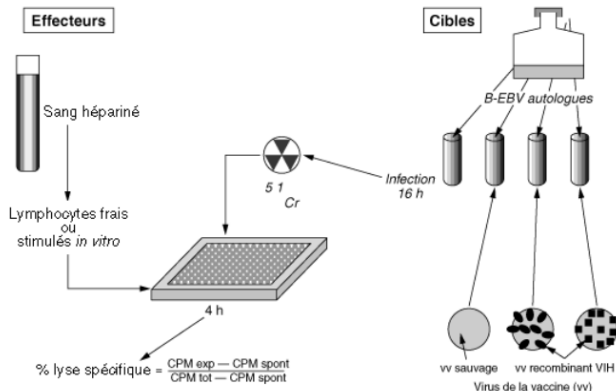
N. Ribero-Rios C.-A. Romain B. Rouger

- 1 Principe
 - Principe général
 - Mise en œuvre
- 2 Avantages et inconvénients
 - Avantages
 - Inconvénients
- 3 Techniques complémentaires
 - Technique ELISPOT
 - Marquage intracellulaire des cytokynes
 - Technique de cytométrie
- 4 Conclusion

Principe général

- Définition de **test de cytotoxicité**
- Quantification de la cytotoxicité des LT CD8 activés en fonction d'un agent pathogène

Mise en œuvre du test de cytotoxicité



Avantages

- Technique la plus couramment employée
- Détection de la cytotoxicité
- Résultats reproductibles
- Le test le plus spécifique pour détecter la cytotoxicité cellulaire
- Facile à mettre en place

Inconvénients

- Ne permet pas de détecter la mort cellulaire par apoptose
- Radioactivité (lourd à mettre en place, nécessite un traitement des déchets, des précautions de manipulation)
- Besoin de lancer une culture de cellules cibles histocompatibles (lourd et long à mettre en place)
- Problème de virus à tropisme restreint
- Sensibilité faible
- Ne quantifie pas la production de cytokynes
- Besoin d'activer plusieurs fois les cellules effectrices (peut introduire un biais)
- Parfois de forts relargages spontanés de l'isotope radioactif

Technique ELISPOT (ENZYM LINKED IMMUNOSPOT)

- Détection des cellules effectrices et cellule mémoire produisant des cytokines au niveau cellulaire (dont TCD8+) → détection des cytokines ou des interleukines par des anticorps
- Fixation des anticorps de capture puis saturation de la plaque (4°C une nuit)
- Incubation des cellules avec stimulation par antigène. Les cytokines libérés sont captés par les anticorps. Incubation 6h-1 nuit
- Lavage puis addition de l'anticorps de détection + addition d'une enzyme de révélation (méthode biotine streptavidine) et révélation en ajoutant le substrat de l'enzyme

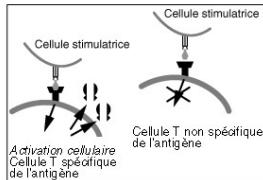
Technique ELISPOT (ENZYM LINKED IMMUNOSPOT)



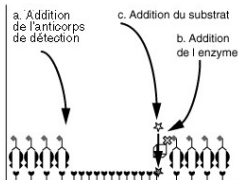
1. Fixation de l'anticorps de capture



2. Incubation des cellules



3. Révélation



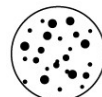
- Y Anticorps de capture
- Y Anticorps de détection couplé à la biotine
- Biotine
- ⌘ Streptavidine
- Enzyme
- ☆ Substrat incolore
- ★ Produit coloré de la réaction enzymatique

- Puits de culture
- Cytokine
- ▮ Molécule CMH
- Peptide viral
- Y Récepteurs T

4. Lecture



Puits sans antigène



Puits avec antigène

Technique ELISPOT (ENZYM LINKED IMMUNOSPOT)

Avantage	Inconvénients
<p>La plus utilisée après test de relargage au chrome</p> <p>Utilisable pour toute molécule produite par LT CD8+ (cytokine, granzymes)</p> <p>Plus sensible que relargage au chrome</p> <p>Pas besoin de culture cible</p> <p>Utilisable directement sur sang frais</p>	<p>Pas d'estimation de cytotoxicité</p> <p>Lecture essentiellement manuelle (lecture automatisée peu développée donc risque de variation de comptage entre différent expérimentateur)</p> <p>Besoin d'avoir un épitope connus pour stimuler les lymphocytes</p> <p>On ne sait pas quelles cellules ont produit les cytokines</p>

Marquage intracellulaire des cytokynes

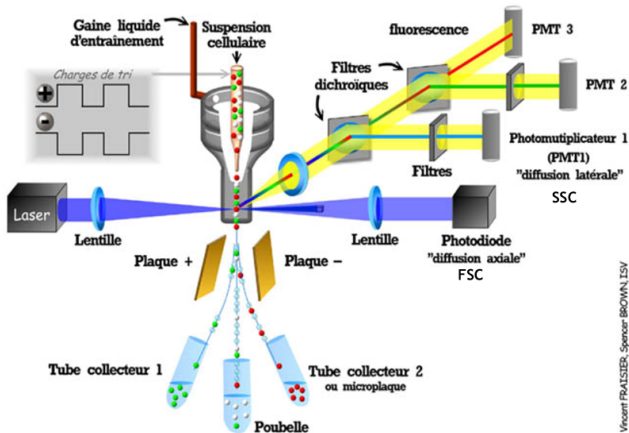
- Les LT CD8 sont activés *in vivo*
- Stimulation de cellule T in vitro avec monensine ou brefeldine A (bloquage du transport vésiculaire) incubation 6-15h
- Incubation avec anticorps spécifique antigène de surface-fluorochrome
- Lavage, fixation des cellules , perméabilisation+traitement anticorps spécifique au cytokine (cytométrie de flux)

Marquage intracellulaire des cytokynes

Avantage	Inconvénients
<p>Grand nombre de cellules analysées en même temps</p> <p>Utilisation de plusieurs anticorps avec différents fluorochromes</p> <p>Permet de déterminer le phénotype des cellules (anticorps contre antigène de surface)</p>	<p>Ne permet pas d'évaluer la cytotoxicité</p>

Technique de cytométrie

Représentation schématique d'un cytomètre de flux



Vincent TRAISIER, Spencer BROWN, ISV

Technique de cytométrie

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">● Possibilité de multi marquages● Rapide et peut être réalisé sur du sang frais ou cellule de moelle osseuse ou tumeur● + sensible que le test au chrome (chaque cellule est passée)● Gestion des déchets et protection du personnel manipulant moins lourd● Possibilité de récupérer les cellules● Possibilité de caractériser les cellules● Monitorer la mort d'une cellule cible → plus sensible que test au chrome● Economie de réactifs quand plusieurs test en même temps sur l'échantillon	<ul style="list-style-type: none">● Coût de départ du cytomètre● Risque de chevauchement des spectres des fluorochromes

Conclusion

- Différentes techniques permettent l'évaluation de la spécificité des Lymphocytes T CD8⁺. Une technique historique évalue une fonction de cytotoxicité : c'est la technique de relargage de l'isotope 51 du chrome.

Elle tend à être remplacée par des techniques alternatives (Elispot, cytométrie) plus sensibles et plus rapides, et qui mesurent également d'autres fonctions ou marqueurs des lymphocytes T CD8⁺.

- Technique de quantification sur la cytotoxicité et la sécrétion de cytokines : utile pour avoir une meilleure vue d'ensemble de la réponse immunitaire, une meilleure compréhension de la protection contre les pathogènes, de la réponse immunitaire des maladies auto-immunes et cancers, et pour produire de meilleurs vaccins.

Références

- [http ://etudiantsfr.net/analyses-de-lymphocytes-t-specifiques-dantigenes/](http://etudiantsfr.net/analyses-de-lymphocytes-t-specifiques-dantigenes/)
- Y. Rivière, F. Buseyne, D. Scott-Algara. Les outils d'exploration de l'activité des lymphocytes T CD8+. Virologie. 2000 ;4(6) :463-71.
([http ://www.jle.com/fr/revues/vir/e-docs/les_outils_dexploration_de_lactivite_des_lymphocytes_t_cd8_](http://www.jle.com/fr/revues/vir/e-docs/les_outils_dexploration_de_lactivite_des_lymphocytes_t_cd8_)
- New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity Liubov Zaritskaya¹, Michael R Shurin², Thomas J Sayers³, and Anatoli M Malygui, Expert Rev Vaccines. 2010 June ; 9(6) : 601–616. doi :10.1586/erv.10.49.