

# Exposé d'Immunologie 5

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

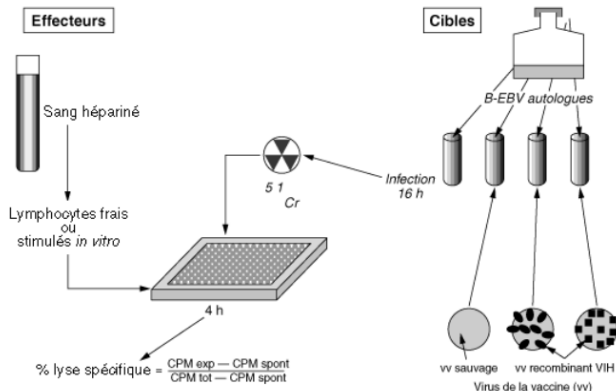
N. Ribero-Rios   C.-A. Romain   B. Rouger

- 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

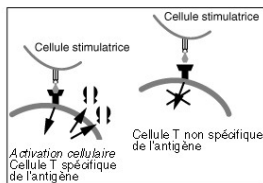
# Technique ELISPOT (ENZYM LINKED IMMUNOSPOT)



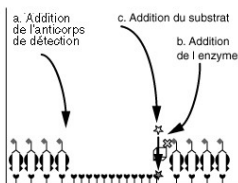
## 1. Fixation de l'anticorps de capture



## 2. Incubation des cellules



## 3. Révélation



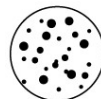
- Y Anticorps de capture
- Y Anticorps de détection couplé à la biotine
- Biotine
- ⌘ Streptavidine
- Enzyme
- ☆ Substrat incolore
- ★ Produit coloré de la réaction enzymatique

- Puits de culture
- ◐ Cytokine
- ▤ Molécule CMH
- ◊ Peptide viral
- ⌘ 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

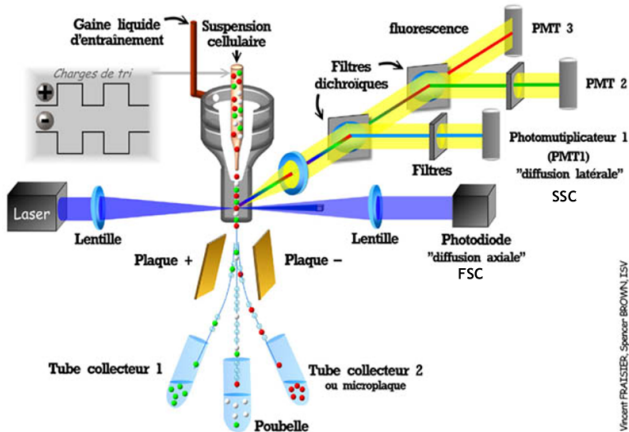
- Les LT CD8 sont activés *in vivo*
- Stimulation de cellule T in vitro avec monensine ou brefeldine A (bloquage du transport vésiculaire) incubation 6-15h
- Incubation avec anticorps spécifique antigène de surface-fluorochrome
- Lavage, fixation des cellules , perméabilisation+traitement anticorps spécifique 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 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"><li>● Possibilité de multi marquages</li><li>● Rapide et peut être réalisé sur du sang frais ou cellule de moelle osseuse ou tumeur</li><li>● + sensible que le test au chrome (chaque cellule est passée)</li><li>● Gestion des déchets et protection du personnel manipulant moins lourd</li><li>● Possibilité de récupérer les cellules</li><li>● Possibilité de caractériser les cellules</li><li>● Monitorer la mort d'une cellule cible → plus sensible que test au chrome</li><li>● Economie de réactifs quand plusieurs test en même temps sur l'échantillon</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Coût de départ du cytomètre</li><li>● Risque de chevauchement des spectres des fluorochromes</li></ul>

# Conclusion

- Différentes techniques permettent l'évaluation de la spécificité des Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. 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<sup>+</sup>.

- 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/>
- 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\\_ouils\\_dexploration\\_de\\_lactivite\\_des\\_lymphocytes\\_t\\_cd8\\_](http://www.jle.com/fr/revues/vir/e-docs/les_ouils_dexploration_de_lactivite_des_lymphocytes_t_cd8_)
- New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity Liubov Zaritskaya<sup>1</sup>, Michael R Shurin<sup>2</sup>, Thomas J Sayers<sup>3</sup>, and Anatoli M Malygui, Expert Rev Vaccines. 2010 June ; 9(6) : 601–616. doi :10.1586/erv.10.49.