

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

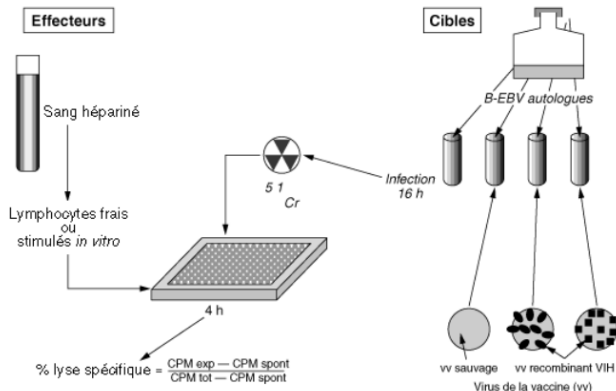
Principe général

- 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

- Mise en culture d'un nombre déterminé de cellules / confluence
- Marquage des protéines cytoplasmiques des cellules cibles au $^{51}\text{Chrome}$
- Infection des cellules cibles par un agent pathogène
- Mise en contact des cellules cibles avec les cellules effectrices (LT CD8+ spécifiques)
 - ▶ granzyme B
 - ▶ perforine
- Mesure de la radioactivité du surnageant
- Calcul du taux de lyse

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

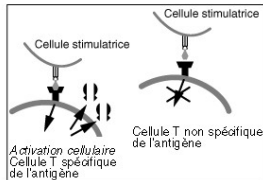
Technique ELISPOT (ENZYM LINKED IMMUNOSPOT)



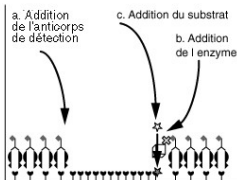
1. Fixation de l'anticorps de capture



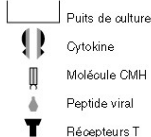
2. Incubation des cellules



3. Révélation



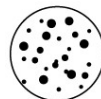
- Y Anticorps de capture
- Y Anticorps de détection couplé à la biotine
- Biotine
- ⌘ Streptavidine
- Enzyme
- ☆ Substrat incolore
- ★ Produit coloré de la réaction enzymatique



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

Technique de cytométrie

Conclusion

- Expérience historique
- Pas vraiment d'équivalent quant à la quantification de la cytotoxicité

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_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 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.