

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

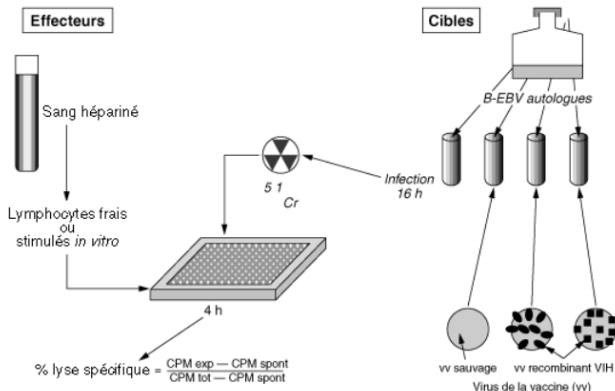
- Définition de **test de cytotoxicité**
- Quantification de la cytotoxicité des LT CD8 activés en fonction d'un agent pathogène

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}Cr
- 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

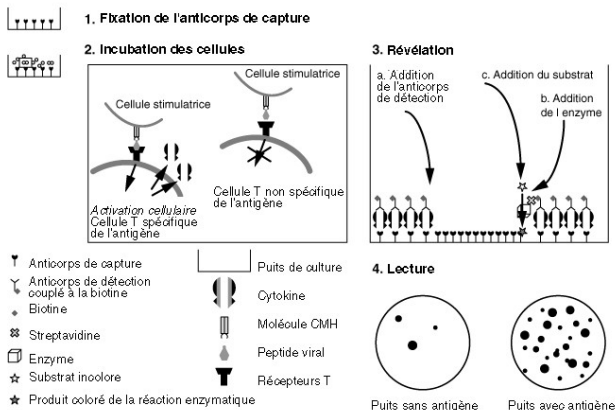
Inconvénients

- 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)



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

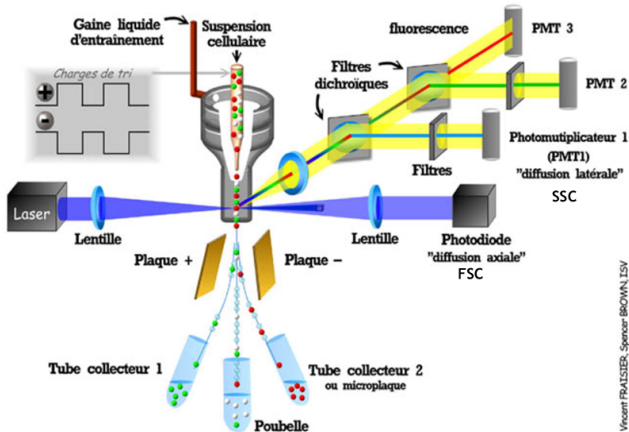
- Les LT CD8 sont activés *in vivo*
- Stimulation de cellule T in vitro avec monensine ou brefeldine A (bloquage du transport vésiculaire) incubation 6-15h
- Incubation avec anticorps spécifique antigène de surface-fluorochrome
- Lavage, fixation des cellules , perméabilisation+traitement anticorps spécifique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