

DES de Biologie Médicale
Enseignement d'Immunologie



ET06

Exploration des fonctions des lymphocytes

Phnom Penh
Septembre 2009

Michelle Rosenzweig
Service de Biothérapies/UPMC CNRS
UMR7211 INSERM U959
Pitié-Salpêtrière - Paris - France
michelle.rosenzweig@upmc.fr

METHODES D'ANALYSE DES LYMPHOCYTES

Quantitatif: surtout en cytométrie en flux

- Phénotypage lymphocytaire
numération des lymphocytes
répartition des \neq s. populations lymphocytaires

Qualitatif

- Etudes fonctionnelles
capacité des lymphocytes à proliférer après stimulation
marqueurs d'activation
production de cytokines
réponse cytotoxique
production d'anticorps
- Spécificité antigénique: tétramères
- Répertoire T et B

EXPLORATION QUANTITATIVE DES LYMPHOCYTES T

Phénotypage lymphocytaire en cytométrie de flux

- numération des lymphocytes totaux
- répartition des \neq s. populations T
 - cinétique/altération reconstitution des \neq s. populations T

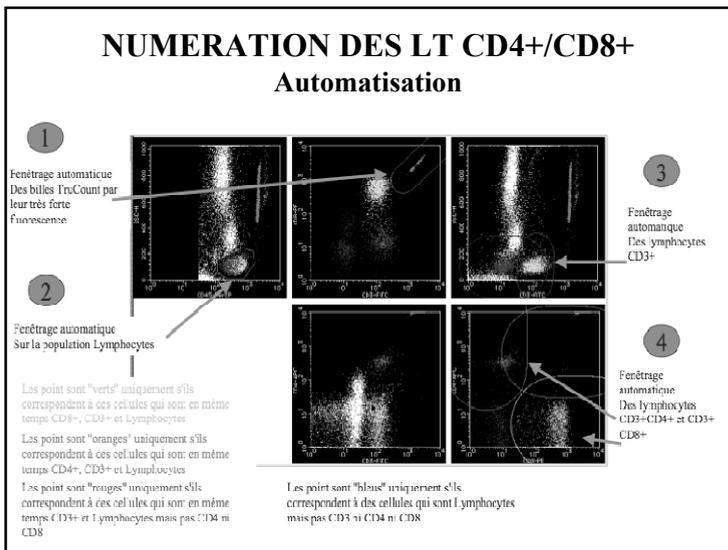
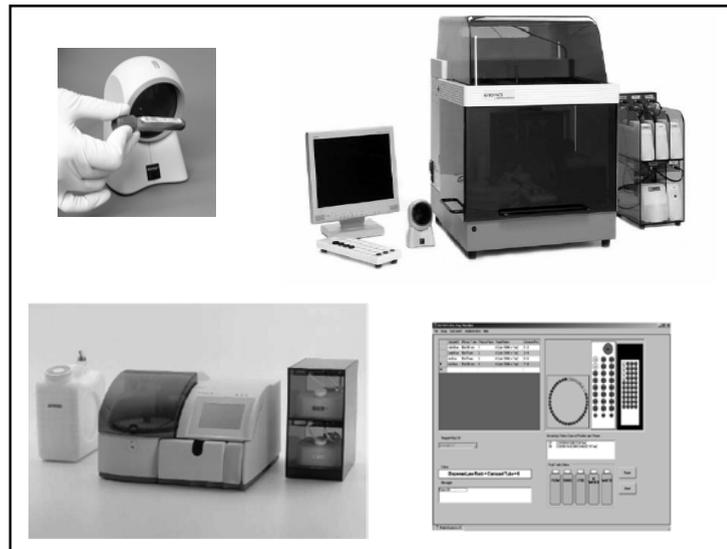
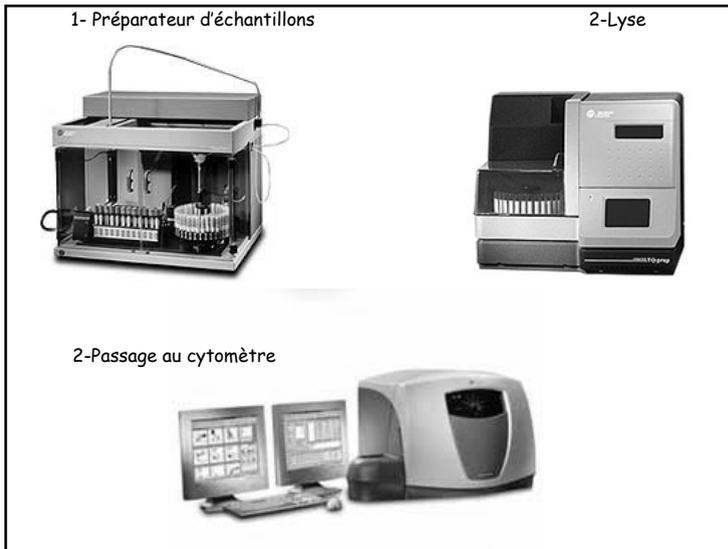
NUMERATION DES LT CD4+/CD8+ résultats

- Expression en % des lymphocytes circulants
et en valeurs absolues (cellules/mm³)

- Normes établies chez le sujet « normal »

CD4
CD8
CD4/CD8

- Contrôles de qualité intra ou inter- laboratoires sont
organiser permettent de se contrôler et de se comparer
entre laboratoires



NUMERATION DES LT CD4+/CD8+ valeurs normales

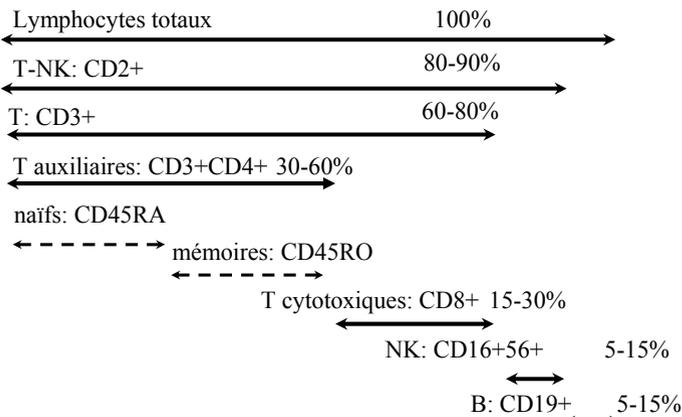
- **CD4+CD3+** **47%**
860/mm³ (± 260) et >450/mm³
- **CD8+CD3+** **26%**
480/mm³ (±160)
- **CD4+CD3+/CD8+CD3+ > 0.7**

VARIATION DES SOUS POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES

- AGE (diminution)
- dans la journée ou après un effort

LYMPHOCYTES SANGUINS PERIPHERIQUES

sous populations



LYMPHOCYTES SANGUINS PERIPHERIQUES

sous populations T

■ Activation

précoces: Ki67, CD69, CD25
tardifs: CD38, HLA-DR, CD95

■ Fonctionnalité

co-activation: CD28
Th0/Th2: CD7

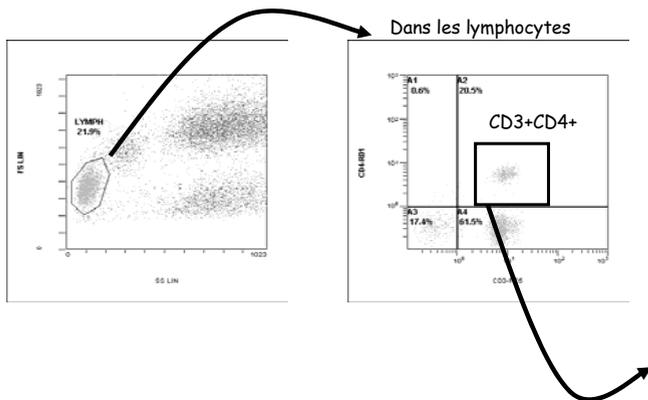
■ Fonction CD8

cytotoxicité: S6F1, CD107
Régulation: CD57

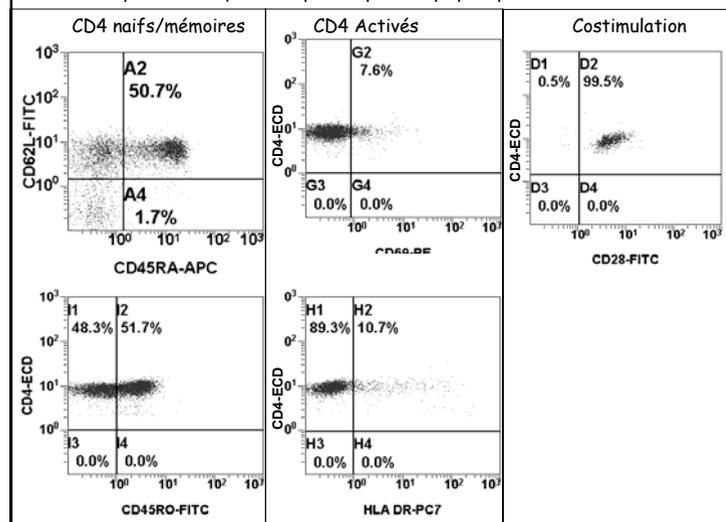
GC/TECH/99

LYMPHOCYTES SANGUINS PERIPHERIQUES

sous populations

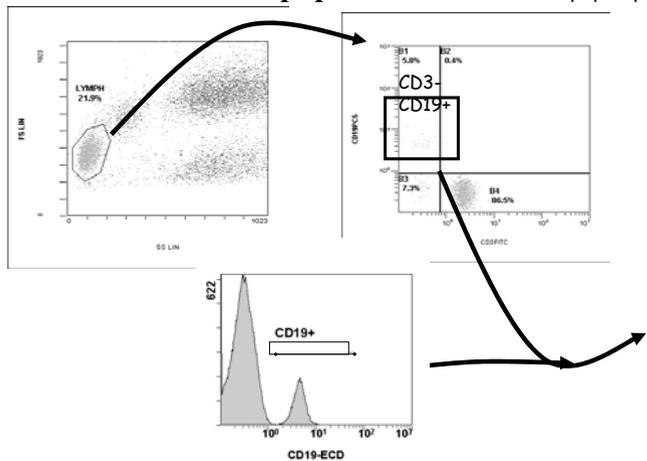


Exemples de marqueurs exprimés par les lymphocytes T CD3+CD4+

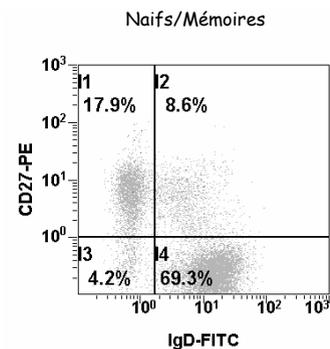


LYMPHOCYTES SANGUINS PERIPHERIQUES

sous populations Dans les lymphocytes



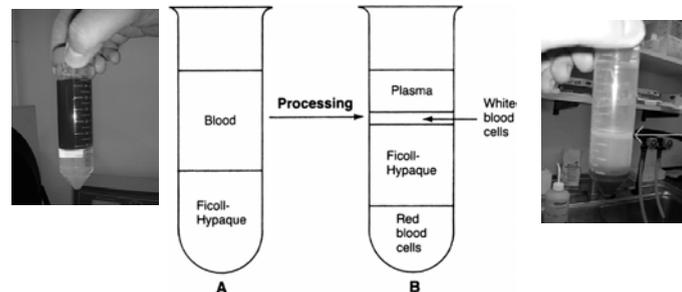
Exemples de marqueurs exprimés par les lymphocytes B



EXPLORATION DES FONCTIONS LYMPHOCYTAIRES T IN VITRO

ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES :

Préalable à de nombreuses techniques d'exploration

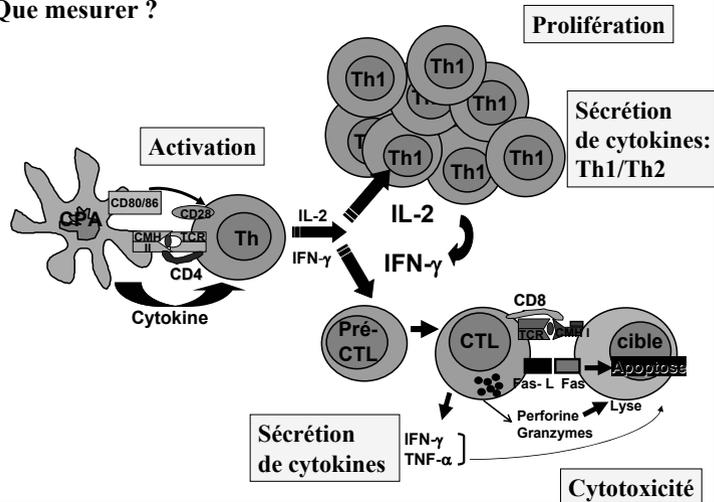


Centrifugation différentielle :
milieu de séparation : Ficoll d = 1.077

Récupération d'un anneau de CMNS
(lymphocytes et monocytes)

RAPPELS SUR LA REPOSE IMMUNITAIRE SPECIFIQUE

Que mesurer ?



**PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE :
ACTIVATEURS NON SPECIFIQUES**

1) Lectines d'origine végétale :

liaison à des sucres spécifiques sur la membrane des cellules

- | | |
|-----|-----------------------------|
| T | ☛ Phytohémagglutinine (PHA) |
| | ☛ Concanavalline A (Con A) |
| B/T | ☛ Pokeweed mitogène (PWM) |

2) Ac monoclonaux de récepteurs membranaires :

capacité d'entraîner l'agrégation de récepteurs membranaires doivent être préalablement fixés sur un support pour mimer les contacts intercellulaires

- | | | |
|---|-------------|----------------------------------|
| T | ☛ anti TCR | } souvent utilisé en association |
| B | ☛ anti IgM | |
| T | ☛ anti CD3 | |
| | ☛ anti CD2 | |
| | ☛ anti CD28 | |

**PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE :
ACTIVATEURS NON SPECIFIQUES**

3) Activateurs d'enzymes

court-circuitent les signaux membranaires

activation de voies métaboliques impliquées dans la transmission des signaux intracellulaires

- ☛ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
activateur de PKC

augmentation de la concentration de 2nd messenger

- ☛ ionomycine = ionophore calcique
activateur d'enzyme Ca²⁺ dépendante

**PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE :
ACTIVATEURS SPECIFIQUES**

1) Antigènes de rappel :

- antigènes de vaccination
 - ☛ tuberculine
 - ☛ anatoxine tétanique ...
- antigènes de l'environnement (issus de micro-organismes)
 - ☛ candidine
 - ☛ streptocoque
 - ☛ CMV...

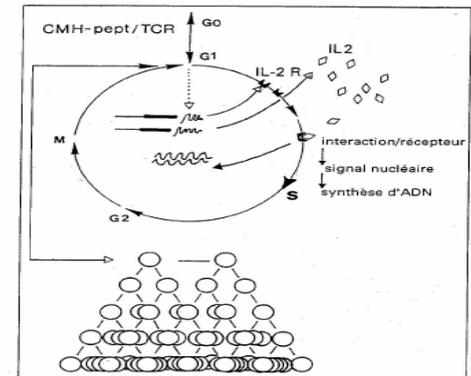
2) Alloantigènes :

- ☛ d'histocompatibilité (MLR)

Tests de prolifération

- Incorporation de thymidine tritiée 3TH
- Incorporation de Brdu
- Marquage au CFSE

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : PRINCIPE



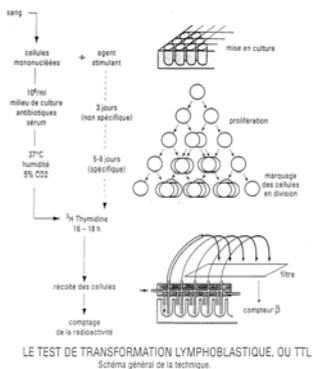
GÉNÉRATION D'UN CLONE DE LYMPHOCYTES T



Prolifération = reflet global de la capacité de réponse événement tardif

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

PROLIFERATION CELLULAIRE -1- méthode



LE TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE, OU TTL
Schéma général de la technique.

Incorporation de Thymidine Tritiée

Activation des cellules,
Incubation avec de la thymidine tritiée
Les cellules en division incorpore la molécule* radioactive

Mesure de la radioactivité incorporé dans l'ADN (cpm)

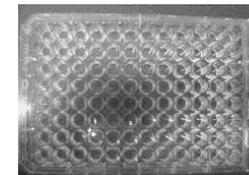
Index de stimulation:
cpm test avec agent stimulant/ cpm sans agent stimulant

Comparaison avec des normes obtenues chez des sujets sains dans les mêmes conditions

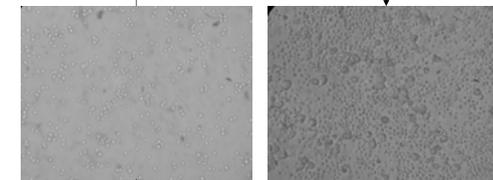
Applications

- 1) **Bilan immunitaire:**
Mitogènes: éléments de diagnostic d'un déficit sévère congénital ou acquis de l'immunité cellulaire
Antigène de rappel: test de la capacité à mettre en place des moyens de défense spécifique
- 2) **Test de compatibilité en transplantation: réaction allogénique**

Culture des cellules dans des plaques de 96 puits en présence de l'agent stimulant



Prolifération des cellules stimulées



Incorporation de Thymidine tritiée

Mesure de la thymidine tritiée incorporée: compteur à scintillation



PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

Incorporation de thymidine tritiée ³TH

Rendu de résultats :

cpm = coup par minute

$$IP = \frac{\text{index de prolifération cpm test avec agent stimulant}}{\text{cpm culture sans agent stimulant}}$$

Interprétation des résultats :

Comparaison avec des normes obtenues chez des sujets sains dans les mêmes conditions de stimulation

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : EXEMPLE

Test de Prolifération lymphocytaire à la thymidine tritiée Mr XX

<u>Mitogènes:</u>	<u>Mr XX</u>		<u>normes labo</u>	
	<u>cpm</u>	<u>IP</u>	<u>cpm</u>	<u>IP</u>
CD3	27540	41	>10000	>35
CD3+CD28	29950	45		
CD3+HL2	35620	54		

Antigènes:

	<u>Mr XX</u>	<u>normes labo</u>
Candidine	10525 15	>3000 >3
Tuberculine	15689 23	
Streptokinase 124	750 1	
Tétanos	660 1	
CMV	8657 12	

Auto-prolifération 650

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : EXEMPLE

Test de Prolifération lymphocytaire à la thymidine tritiée Mr XY

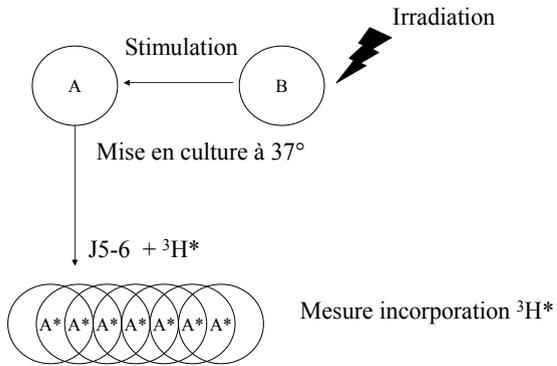
<u>Mitogènes:</u>	<u>Mr XX</u>		<u>normes labo</u>	
	<u>cpm</u>	<u>IP</u>	<u>cpm</u>	<u>IP</u>
CD3	1878	13	>10000	>35
CD3+CD28	5926	41		
CD3+HL2	5630	39		

Antigènes:

	<u>Mr XX</u>	<u>normes labo</u>
Candidine	80 1	>3000 >3
Tuberculine	121 1	
Streptokinase 124	1	
Tétanos	118 1	
CMV	99 1	

Histocompatibilité

Réaction Mixte lymphocytaire: MLR
Réponse allogénique



Histocompatibilité

Réaction Mixte lymphocytaire: MLR
Réponse allogénique

	Michel*	Jean Pierre*	Témoin Positif*
Michel			
Cpm	398	555	11187
IS	1	1,4	28,1
Jean Pierre			
Cpm	385	486	22450
IS	0,8	1	46,2

Interprétation: Michel et Jean Pierre sont identiques en HLA Classe II

Histocompatibilité

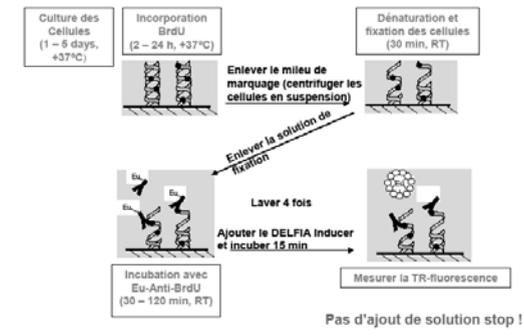
Réaction Mixte lymphocytaire: MLR
Réponse allogénique

	Jean Michel*	Edith*	Témoin Positif*
Jean Michel			
Cpm	187	2760	17732
IS	1	14,8	95
Edith			
Cpm	6814	171	93612
IS	39,8	1	547

Interprétation: Jean Michel et Edith ne sont pas identiques en HLA Classe II

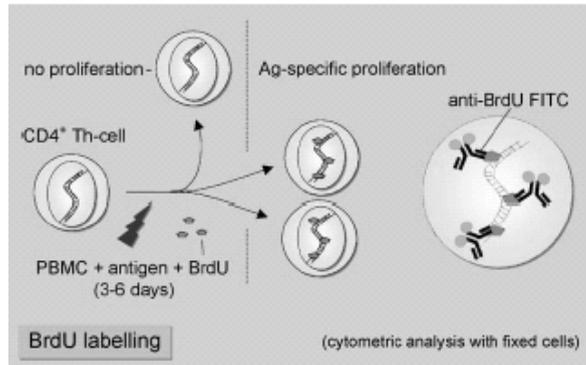
Le BrdU une alternative à la radio-activité

DELFIA Cell Proliferation protocol



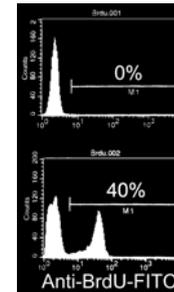
PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

Incorporation de BrdU et mesure par cytométrie en flux



A. Thiel et al, Clinical Immunology, 2004

Test au BrdU sur lymphocytes totaux



Cellules Non stimulés

Cellules stimulées
avec un anticorps Anti-CD3

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : EXEMPLE

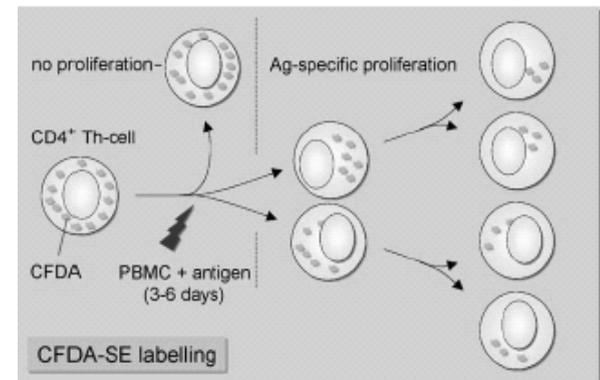
Test de Prolifération lymphocytaire par cytométrie de flux : incorporation de BrdU (stimulation CD3)

Mr XY

	Cellules Non Stimulées	Cellules Stimulées	Normes Cellules Stimulées
CD4+BrdU+	1%	4%	48 ± 5%
CD8+BrdU+	5%	10%	55 ± 6%
Lymphocytes BrdU	6%	14%	45 ± 5%

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

Marquage par CFSE et mesure par cytométrie en flux



A. Thiel et al, Clinical Immunology, 2004

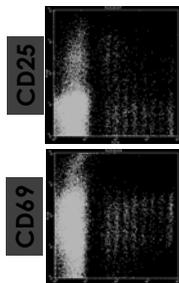
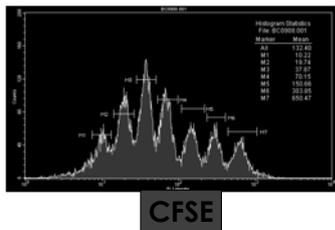
carboxy fluorescein diacetate succinimide ester

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

Marquage par CFSE et mesure par cytométrie en flux

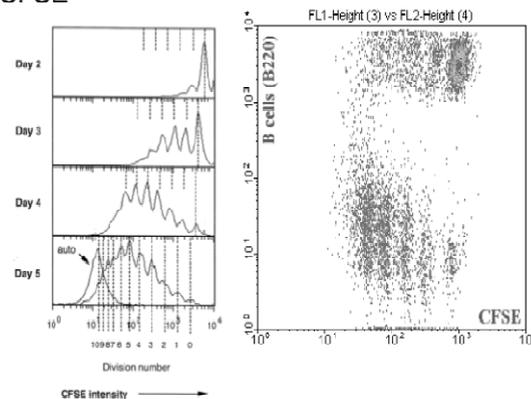
Marquage de la membrane des cellules et à chaque division diminution de 50% de la fluorescence des cellules filles par rapport à la cellule parentale

Association possible à des marquages de membrane



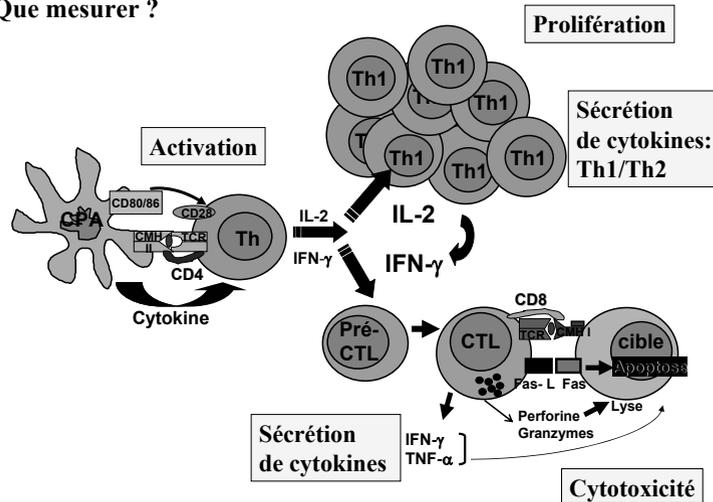
PROLIFERATION

• CFSE



RAPPELS SUR LA REPOSE IMMUNITAIRE SPECIFIQUE

Que mesurer ?



Production de cytokines

- ELISA
- Cytométrie:
 - Billes fluorescentes
 - Marquages intracytoplasmiques
- ELISPOT
- PCR quantitative

PRODUCTION DE CYTOKINES

Activation des cellules en culture
non spécifique / spécifique

Récolte du surnageant de culture après 24 à 48 h

- Dosage ELISA
- Dosage Cytométrie (Billes)

Récolte du culot cellulaire après 18 à 24 h

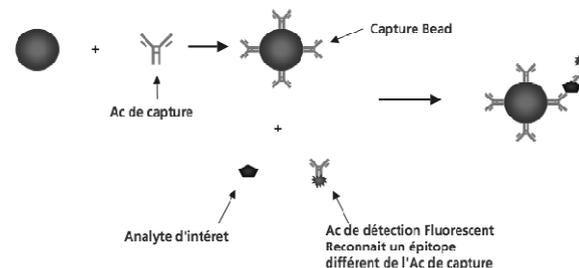
- Quantification des ARNm: RT-PCR

Quantification des cellules CD4+/CD8+ productrices

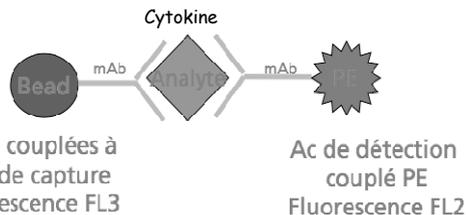
- Cytométrie
- ELISPOT

CYTOKINES SECRETEES - BILLES

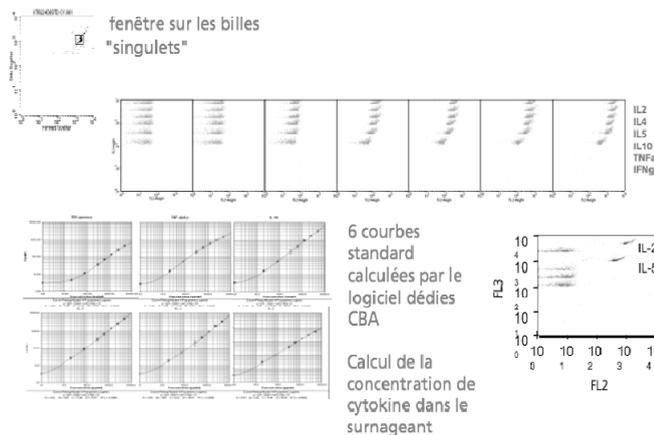
CBA: Cytometry Beads Array



CYTOKINES SECRETEES - BILLES



PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES BILLES FLUORESCENTES EN CYTOMETRIE



PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES

BD® Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine kit II

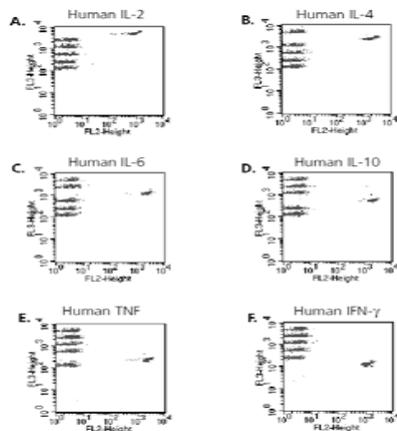
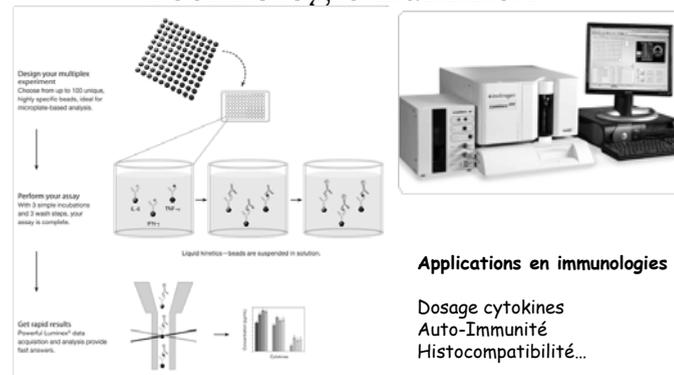


Figure 8. BD CellQuest™ Data for Detection of Individual Cytokines

PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES BILLES FLUORESCENTES EN CYTOMETRIE

Technologie Luminex



PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES

Quantification de cellules sécrétrices : par cytofluorométrie en intracytoplasmique

Activation des cellules
non spécifique/spécifique

Blocage de la sécrétion

Marquage de membrane
Ag de surface

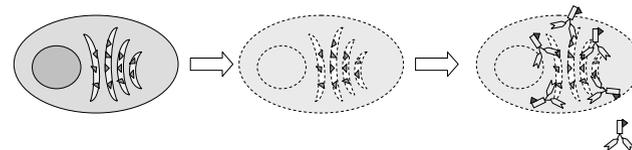
Marquage intracellulaire
cytokine

Lecture en cytométrie de flux



PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES

Quantification de cellules sécrétrices : par cytofluorométrie en intracytoplasmique



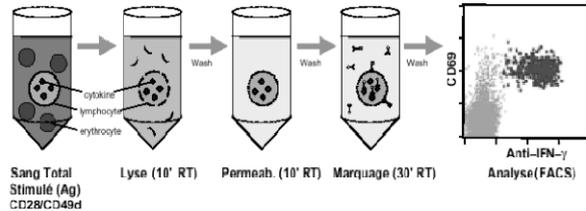
Cellules T activées traitées par
un inhibiteur qui bloque le
transport des protéines
⇒ blocage des CK dans le RE

Fixation et
perméabilisation
des cellules

Pénétration des Ac
anti CK et liaison aux
CK intracytoplasmiques

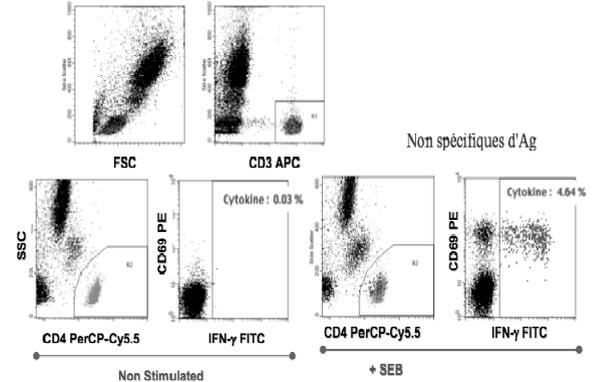
d'après Immunobiology 5, C. A. Janeway

ACTIVATION ET CYTOKINES



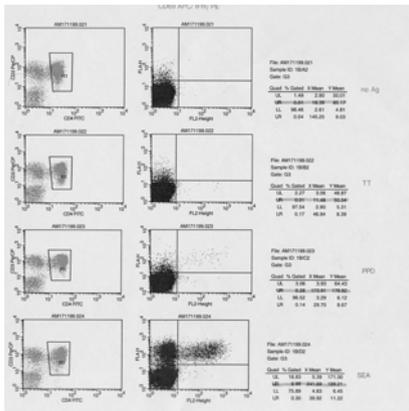
CYTOKINES INTRACELLULAIRES

Staining IFN- γ FITC / CD69 PE / CD4 PerCP-Cy5.5 / CD3 APC



PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES

Marquage de membrane CD 3/CD4/CD69 + intracellulaire pour mesurer la production d'INF- γ après stimulation



Stimulation :

1) Absence d'antigène
CD69+INF+=0.01%

2) Toxine tétanique
CD69+INF+=0.01%

3) PPD
CD69+INF+=0.29%

4) SEA
CD69+INF+=6.96%

PRODUCTION DE CYTOKINES : APPLICATIONS

Recherche d'un défaut de production dans les déficits de l'immunité cellulaire :

- VIH déficit TH1 (IL2, IFN γ)

Stimulations chroniques du système immunitaire :

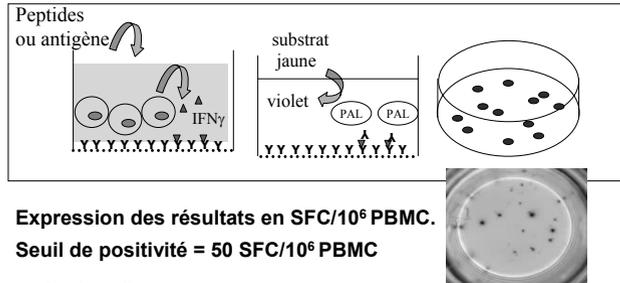
- infections virales : IFN γ

- pathologies d'origine allergique : IL4

PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES ELISPOT

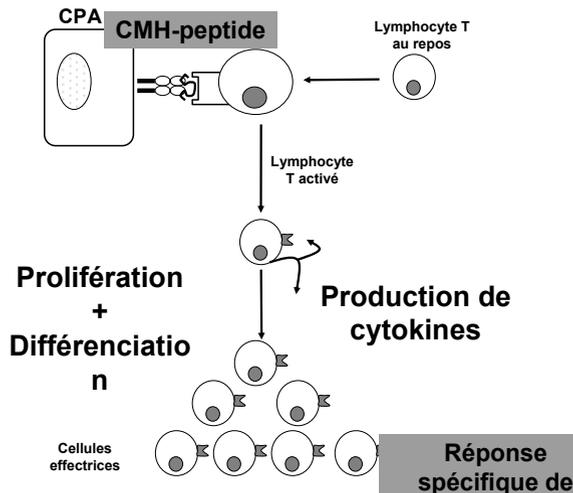
(Enzyme Linked Immuno Spot)

Exemple : Quantification des cellules T productrices d'IFN γ après stimulation par des peptides de 9 aa ☒ réponse des LT CD8+ spécifiques
stimulation par des antigènes ☒ réponse des LT CD4+ spécifiques

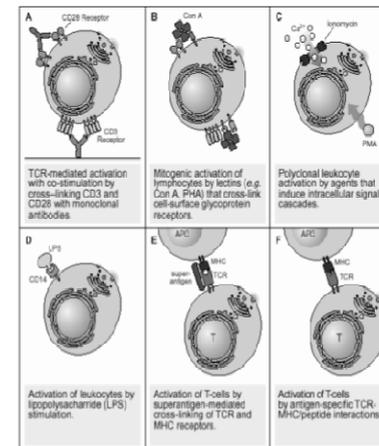


SFC= spot forming cell

RAPPELS SUR LA REPOSE IMMUNITAIRE SPECIFIQUE



TETRAMERES



La stimulation Antigénique est la plus spécifique

•L'utilisation d'un Antigène spécifique (peptide) permet donc de :

- Stimuler des cellules
- Identifier spécifiquement des cellules

TETRAMERES

- La réponse Immunitaire primaire à un antigène nécessite obligatoirement sa reconnaissance par un lymphocyte T
- Le lymphocyte T ne peut reconnaître seul un Antigène soluble
- L'Ag (peptide) doit être présenté au Lympho T par une molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- La reconnaissance a lieu par une interaction entre une molécule du CMH (portée par une cellule spécialisée ou non) et le TCR du L_T

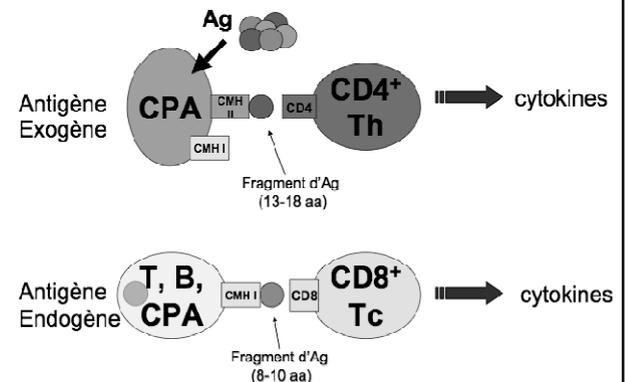
TETRAMERES

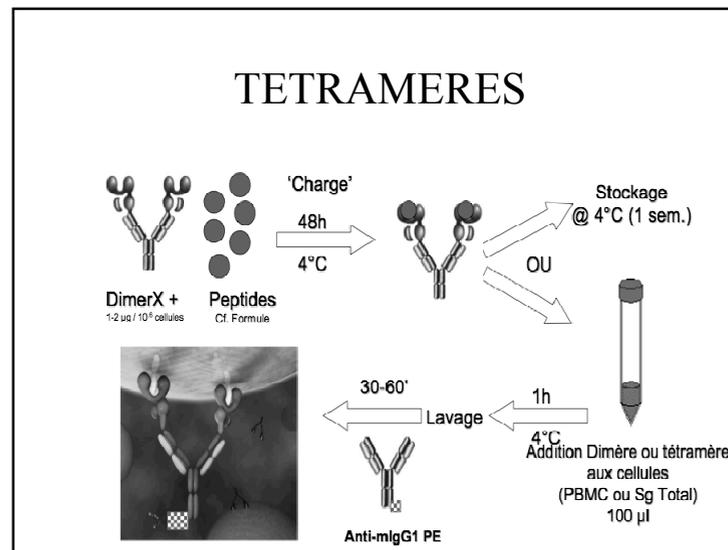
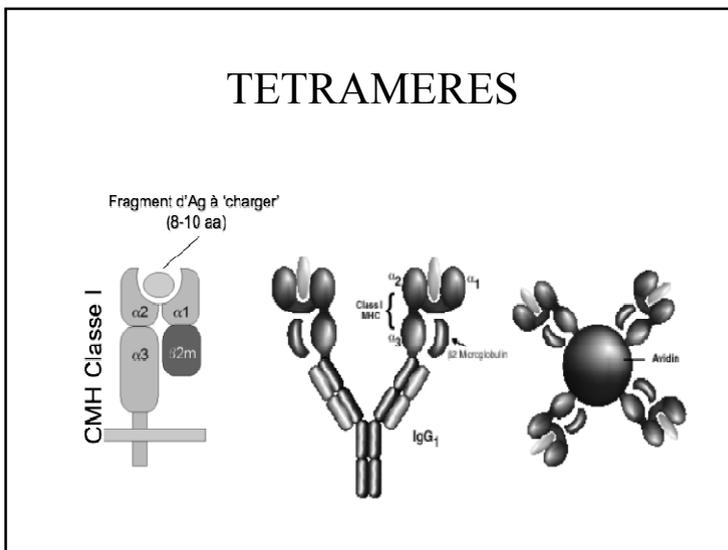
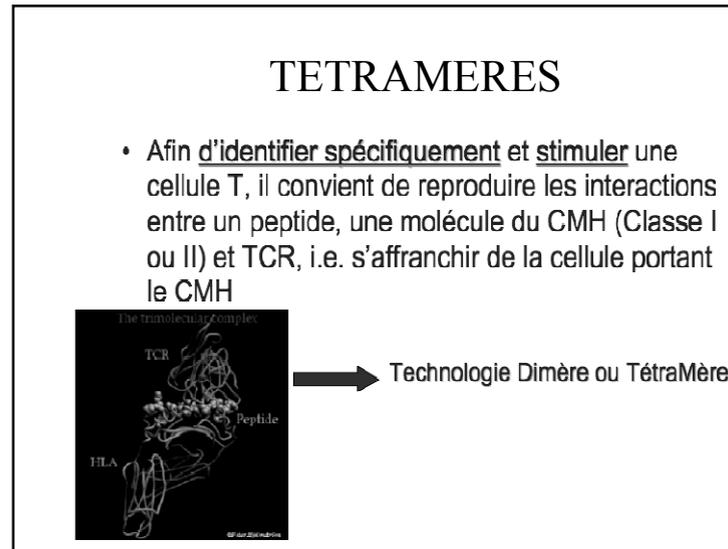
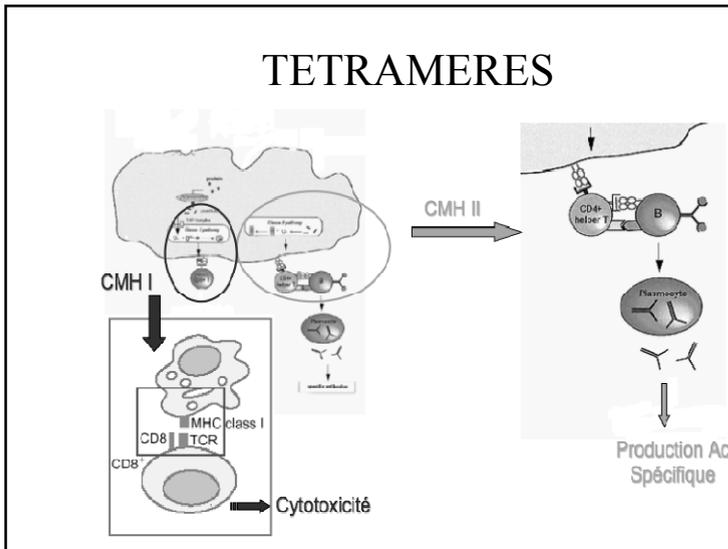
- Les antigènes exogènes sont 'traités' (fragmentés) par des cellules spécialisées, Cellules Présentatrices d'Antigènes ou CPA (Lymphos B, macrophages ou cellules dendritiques) et présentés par une molécule du CMH de Classe II
- Les antigènes endogènes (générés dans une cellule, i.e. Ag viral) sont dégradés dans la cellule même et présentés par une molécule du CMH de Classe I

TETRAMERES

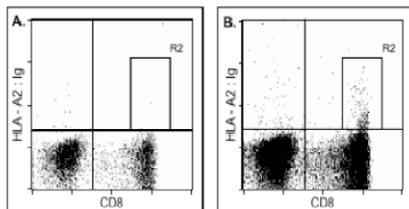
- Expression des molécules du CMH :
 - Classe I : virtuellement toutes les cellules
 - Classe II : uniquement sur les CPA
- Les cellules sont restreintes à une classe de CMH donné, i.e. elles ne reconnaissent qu'un type de molécule :
 - Classe I : T CD8+ (T cytotoxique)
 - Classe II : T CD4+ (T helper)
- La taille du peptide reconnu varie en fonction du type de molécule du CMH :
 - Classe I : 8 – 10 acides aminés
 - Classe II : 13 – 18 acides aminés

TETRAMERES





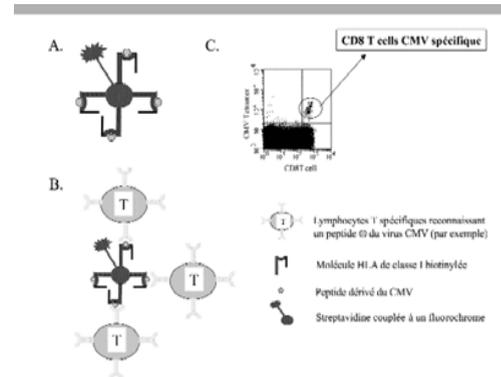
TETRAMERES



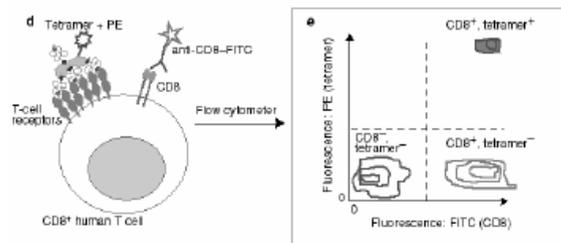
DimerX I HLA-A2
(4°C/24h)
CD8-FITC
anti-mIgG1-PE

Typage HLA nécessaire

TETRAMERES



Quantification des lymphocytes T CD8 spécifiques d'épitopes viraux par les tétramères HLA I/ peptides



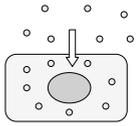
Tests de cytotoxicité

- Méthode de relargage du chrome
- Cytométrie:
 - CD107
 - Granzyme/Perforine
- ELISPOT
 - IFN-g
 - Granzyme/Perforine

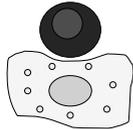
CYTOTOXICITE : METHODES

Activité Natural Killer = cytotoxicité spontanée

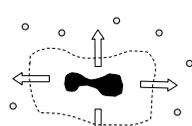
Par test de relargage au chrome



Cellules cibles K562
marquées
avec du $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$



Addition des cellules NK
aux cibles marquées



Cibles tuées larguent
Le chrome radioactif

Immunobiology 5, C. A. Janeway

Cibles = lignée cellulaire K562 dérivée d'une leucémie érythromyéloïde n'exprimant pas de CMH de classe I
différents rapport effecteurs/cibles pour déterminer l'intensité de la lyse (6 rapports de 40/1 à 1/1)

EXPLORATION DES FONCTIONS LYMPHOCYTAIRES B *IN VITRO*

PRODUCTION D'ANTICORPS *IN VITRO* : METHODES

Récolte de surnageant de culture après 6 à 7 jours de culture

Après une activation par un agent stimulant
des lymphocytes B (activateur polyclonaux)

Dosage immuno-enzymatique : ELISA
Ac spécifiques des différentes classes ou sous classes d'IgG
concentration de l'ordre du µg/ml

QUAND?

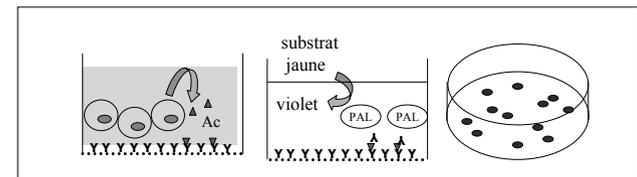
HYPOGAMMAGLOBULINEMIE OU DYSGLOBULINEMIE
DIAGNOSTIQUEE PAR ETUDE QUANTITATIVE DES Ig
SERIQUES

PRODUCTION D'ANTICORPS *IN VITRO* : METHODES

Récolte des cellules après 6 à 7 jours de culture

Après une activation par un agent stimulant
des lymphocytes B (activateur polyclonaux)

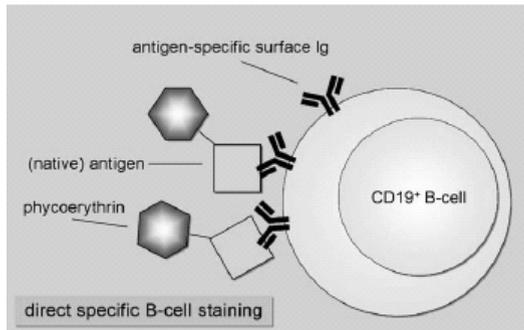
Quantification des cellules sécrétrices d'Ac : ELISpot B



Y Ac coatés sur les membranes :

- Ac anti classes d'immunoglobulines :
→ réponse non spécifique
- antigène particulier :
→ réponse spécifique

DETECTION DE CELLULES SPECIFIQUES



A. Thiel et al, Clinical Immunology, 2004

MAIS Problème de la très faible fréquence de lymphocytes B spécifiques : 1 à 10 cellules/ml de sang!!!