

DES de Biologie Médicale Enseignement d'Immunologie



ET06

Exploration des fonctions des lymphocytes

Phnom Penh
Septembre 2009

Michelle Rosenz wajg
Service de Biothérapies/UPMC CNRS
UMR7211 INSERM U959
Pitié-Salpêtrière - Paris - France
michelle.rosenz wajg@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 ≠ s. populations T**
 - cinétique/altération reconstitution des ≠ 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

1- Préparateur d'échantillons

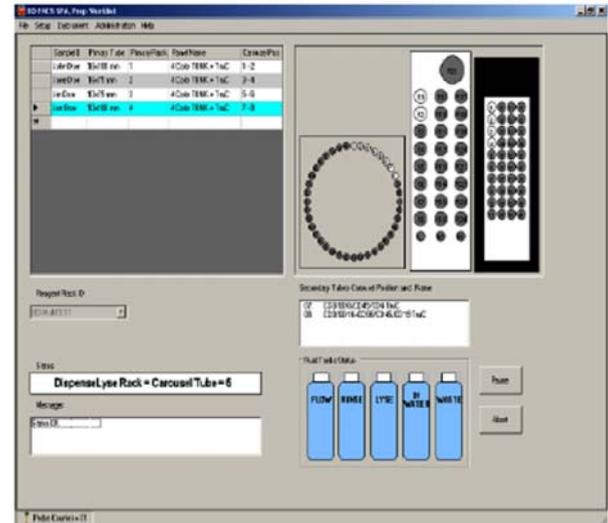


2-Lyse



2-Passage au cytomètre





NUMERATION DES LT CD4+/CD8+

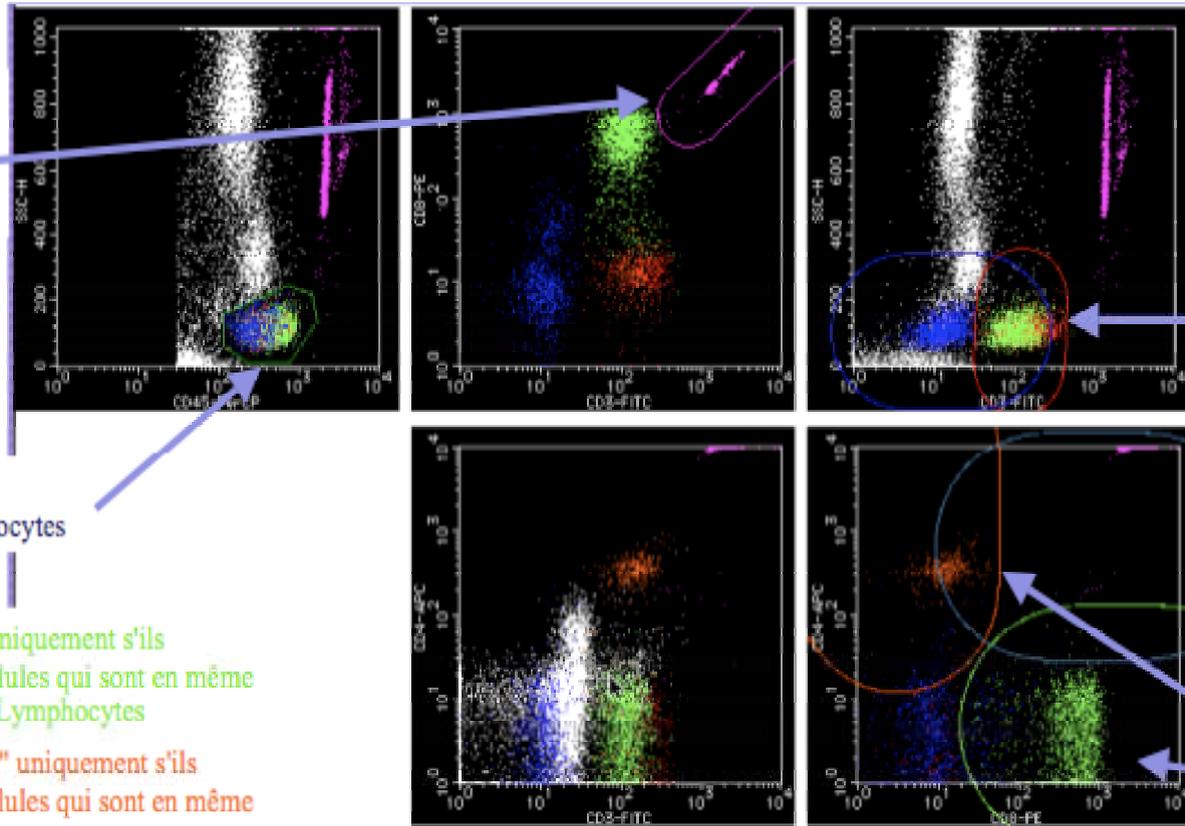
Automatisation

1

Fenêtrage automatique
Des billes TruCount par
leur très forte
fluorescence

2

Fenêtrage automatique
Sur la population Lymphocytes



3

Fenêtrage
automatique
Des lymphocytes
CD3+

4

Fenêtrage
automatique
Des lymphocytes
CD3+CD4+ et CD3+
CD8+

Les point sont "verts" uniquement s'ils
correspondent à des cellules qui sont en même
temps CD8+, CD3+ et Lymphocytes

Les point sont "oranges" uniquement s'ils
correspondent à des cellules qui sont en même
temps CD4+, CD3+ et Lymphocytes

Les point sont "rouges" uniquement s'ils
correspondent à des cellules qui sont en même
temps CD3+ et Lymphocytes mais pas CD4
ni CD8

Les point sont "bleus" uniquement s'ils
correspondent à des cellules qui sont Lymphocytes
mais pas CD3 ni CD4 ni CD8

NUMERATION DES LT CD4+/CD8+

valeurs normales

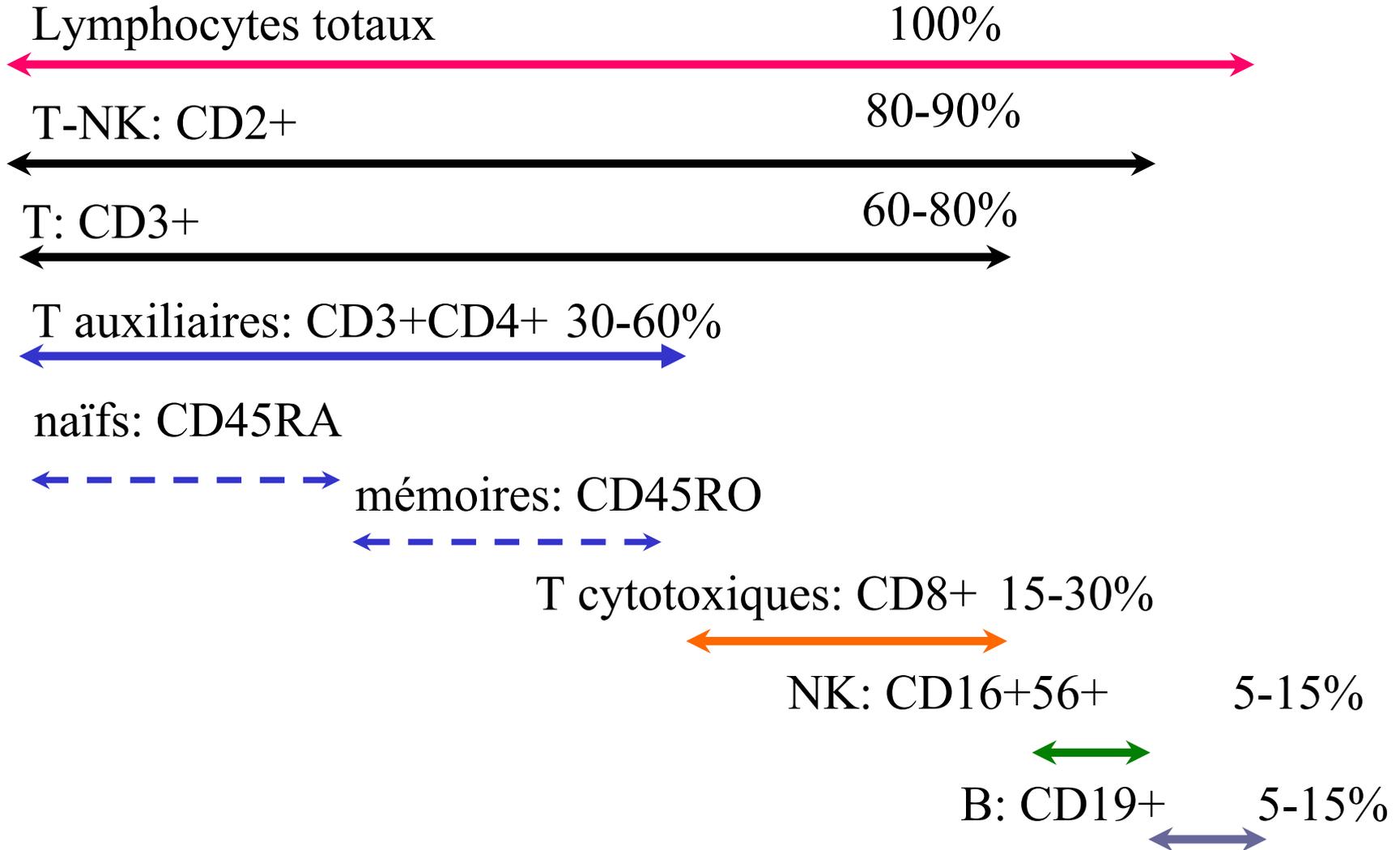
- **CD4+CD3+** **47%**
860/mm³ (± 260) et >450/mm³
- **CD8+CD3+** **26%**
480/mm³ (±160)
- **CD4+CD3+/CD8+CD3+ > 0.7**

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

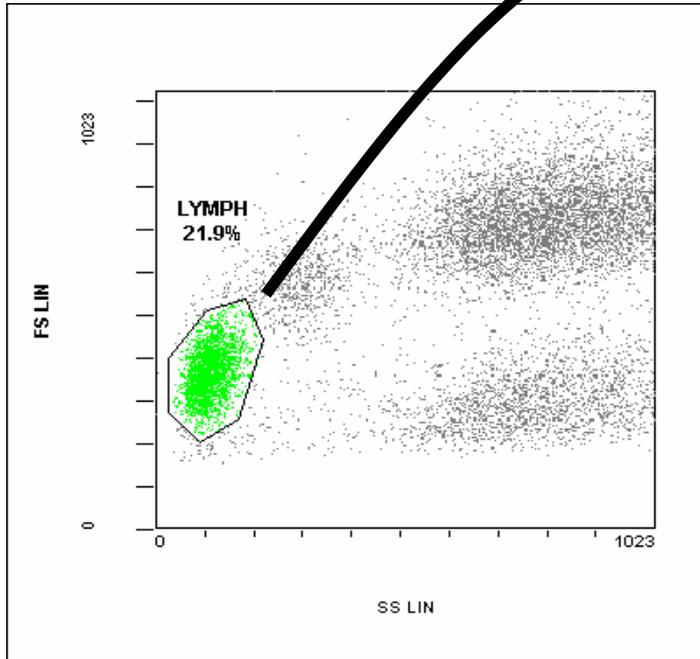
■ Fonction CD8

cytotoxicité: S6F1, CD107

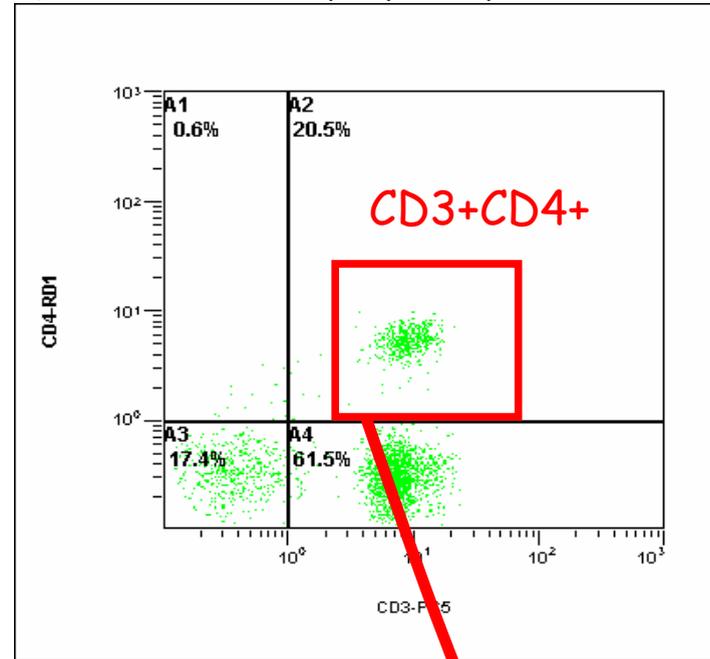
Régulation: CD57

LYMPHOCYTES SANGUINS PERIPHERIQUES

sous populations

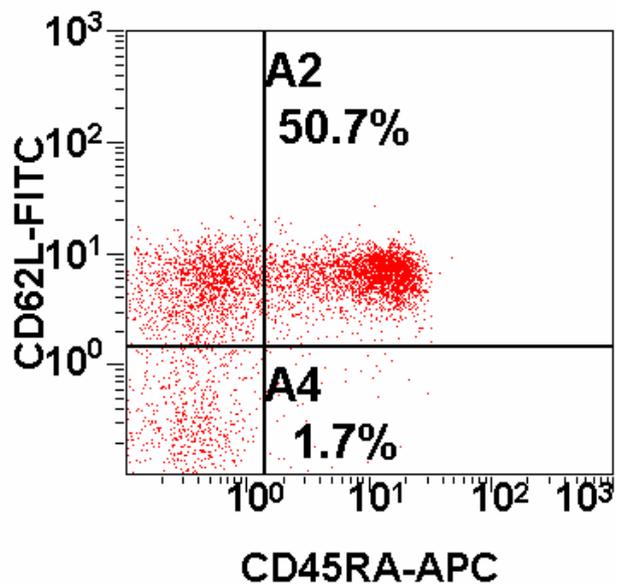


Dans les lymphocytes

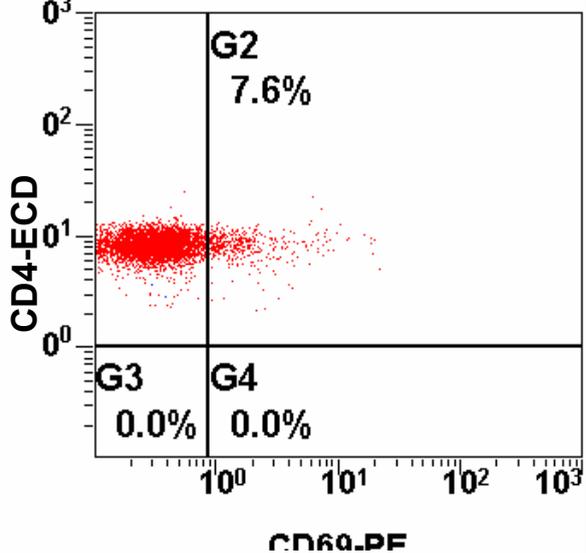


Exemples de marqueurs exprimés par les lymphocytes T CD3+CD4+

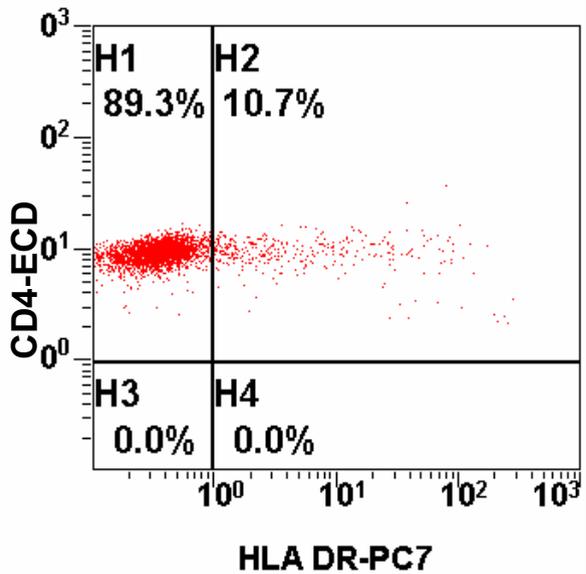
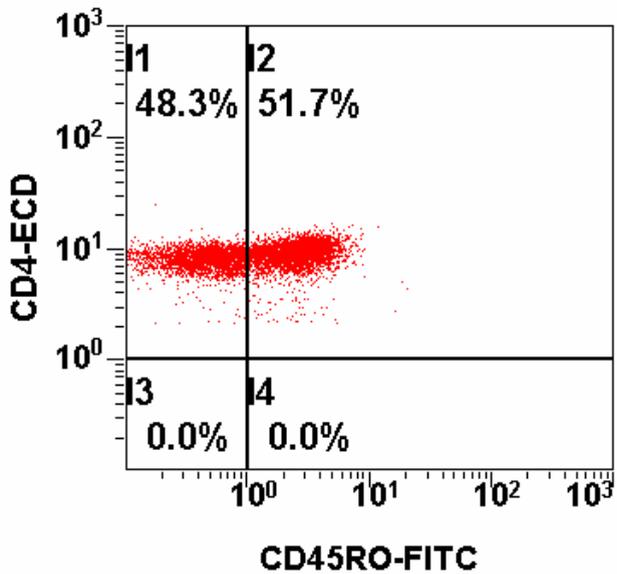
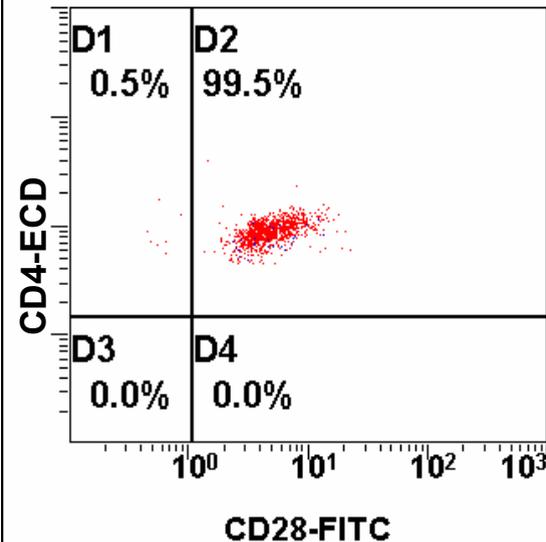
CD4 naifs/mémoires



CD4 Activés



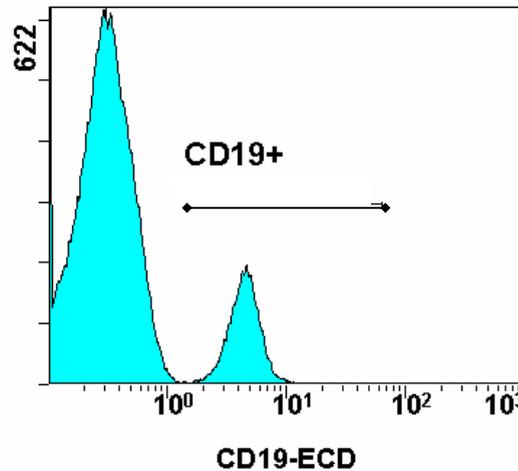
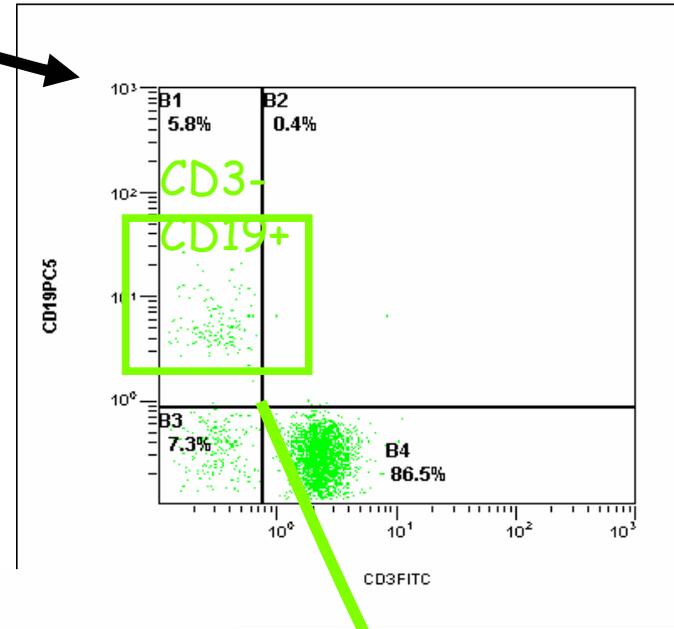
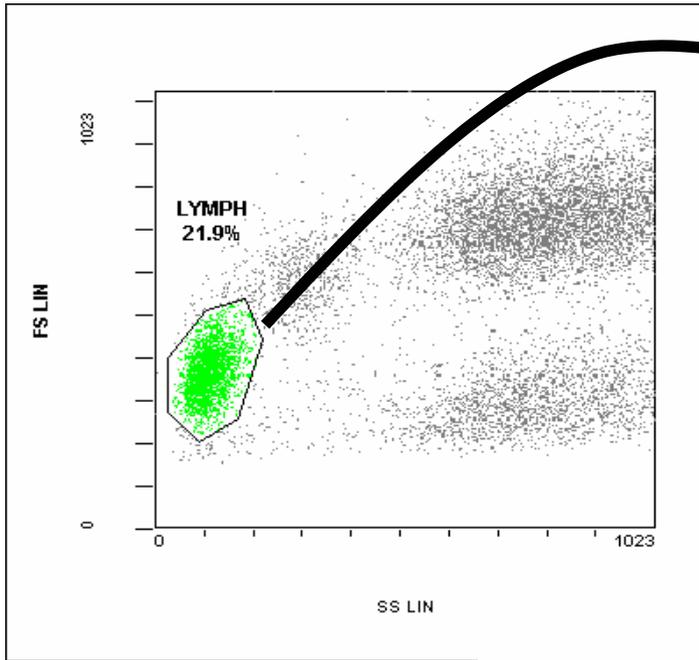
Costimulation



LYMPHOCYTES SANGUINS PERIPHERIQUES

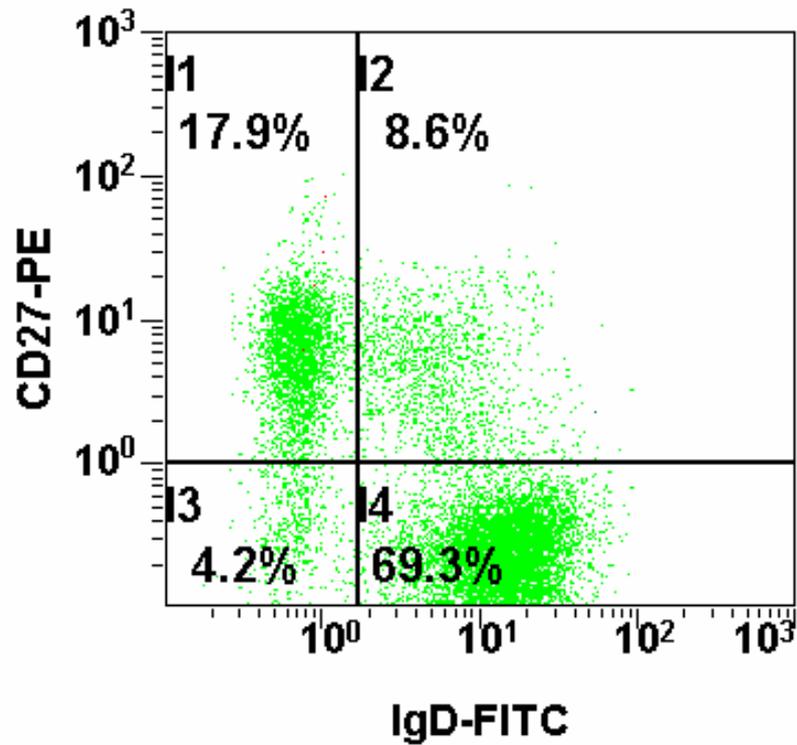
sous populations

Dans les lymphocytes



Exemples de marqueurs exprimés par les lymphocytes B

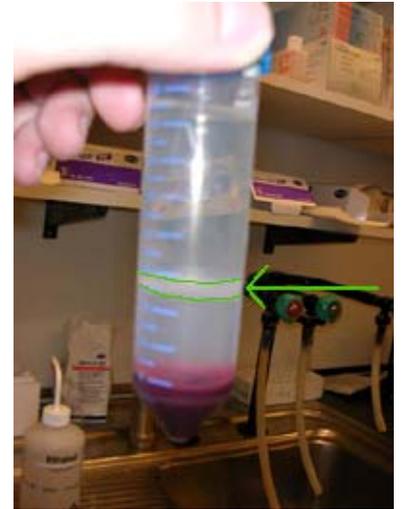
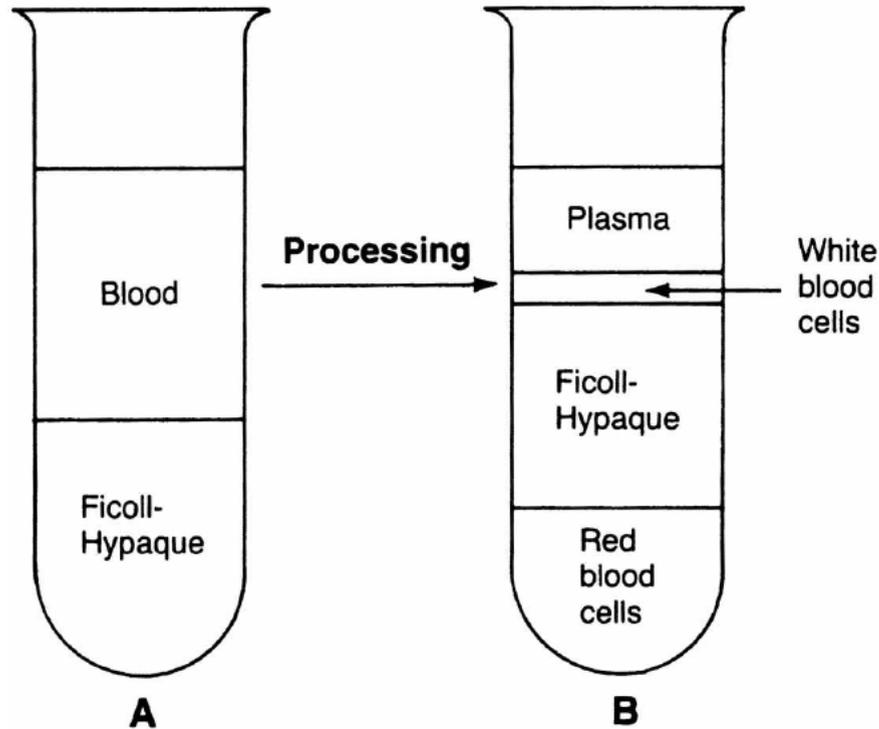
Naifs/Mémoires



EXPLORATION DES FONCTIONS
LYMPHOCYTAIRES T *IN VITRO*

ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES :

Préalable à de nombreuses techniques d'exploration

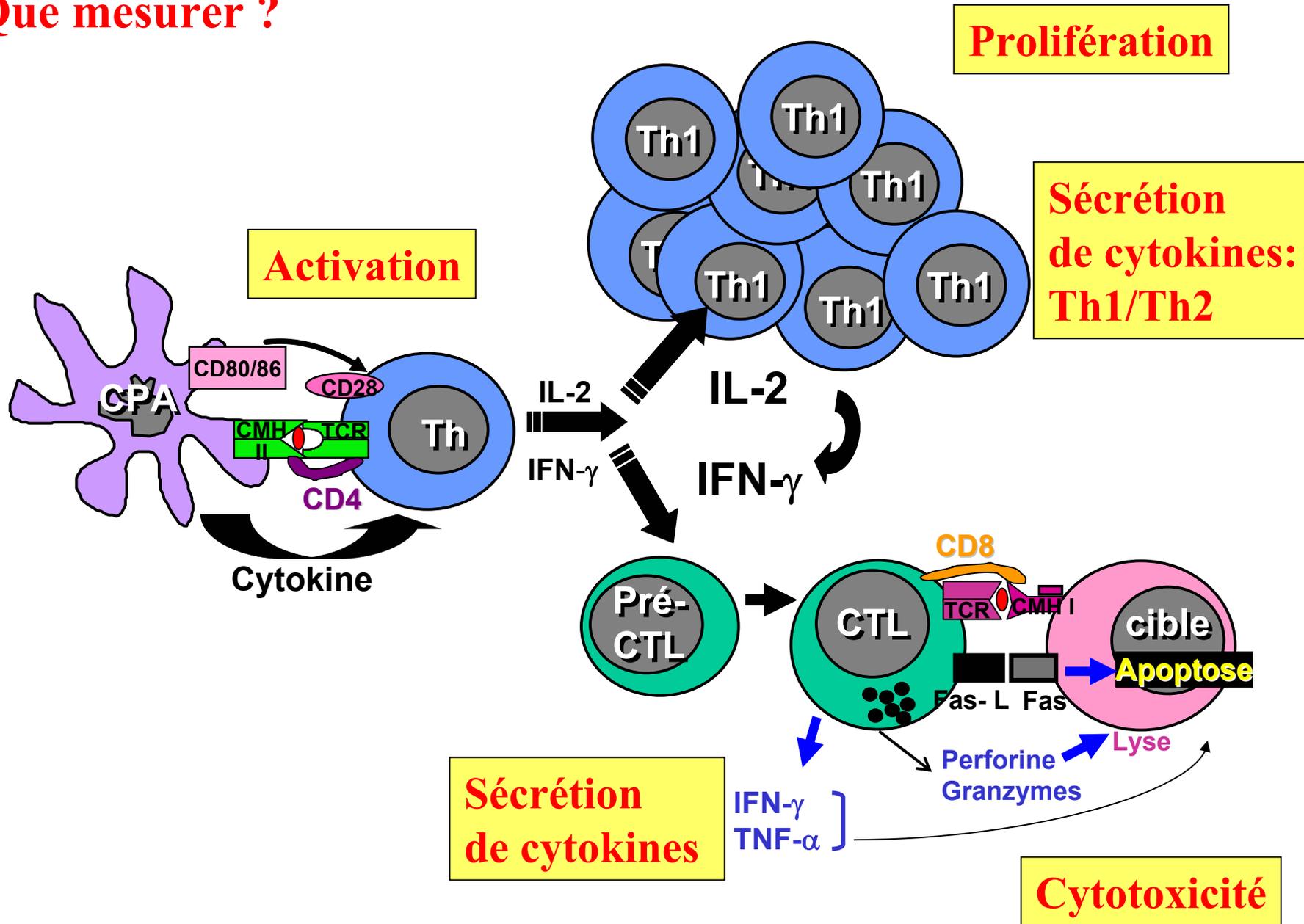


Centrifugation différentielle :
milieu de séparation : Ficoll $d = 1.077$

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

RAPPELS SUR LA REPONSE 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) |
| | ☞ Concanavaline 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 |
| B | ☞ anti IgM |

de corécepteurs impliqués dans l'activation T

- | | | |
|----------|--------------------|-------------------------------------|
| T | ☞ anti CD3 | } souvent utilisé en association |
| | ☞ 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...**

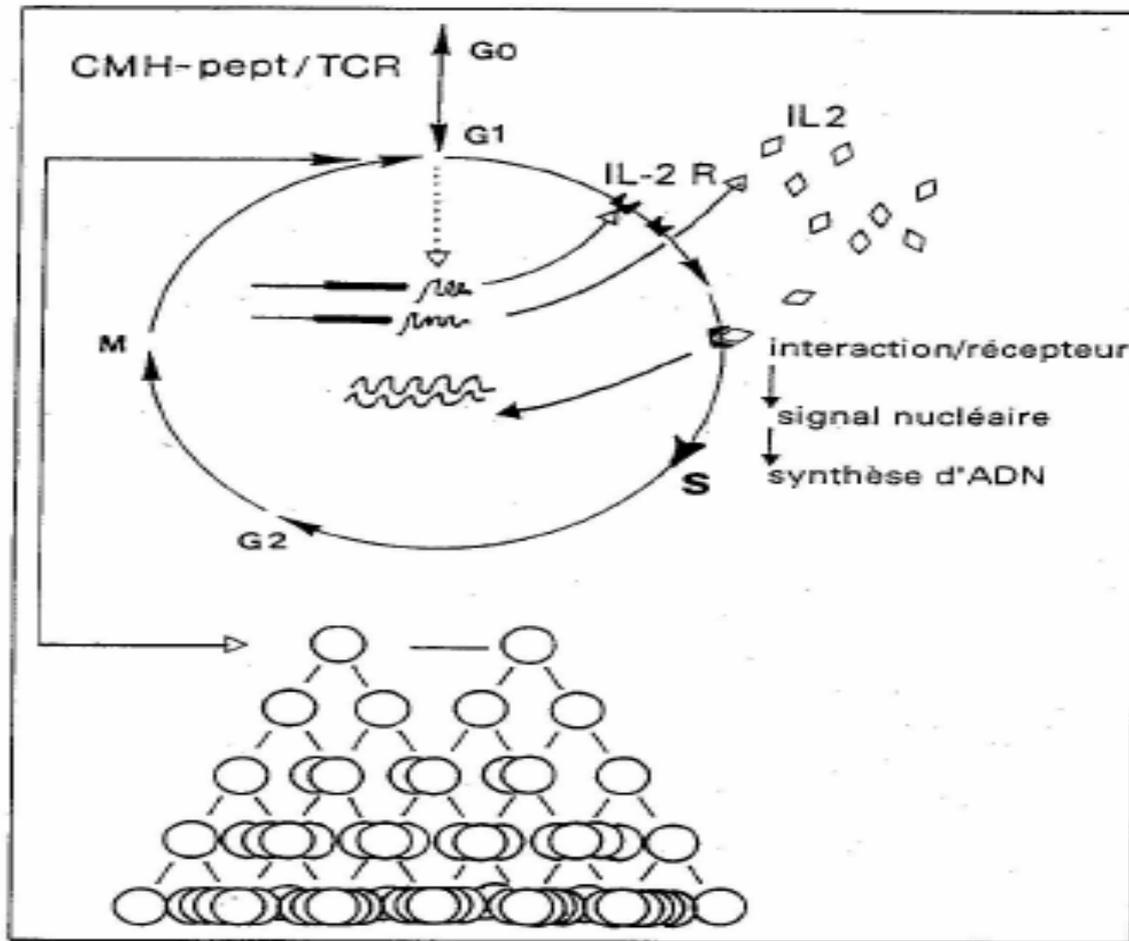
2) Alloantigènes :

☞ **d'histocompatibilité (MLR)**

Tests de prolifération

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

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : PRINCIPE



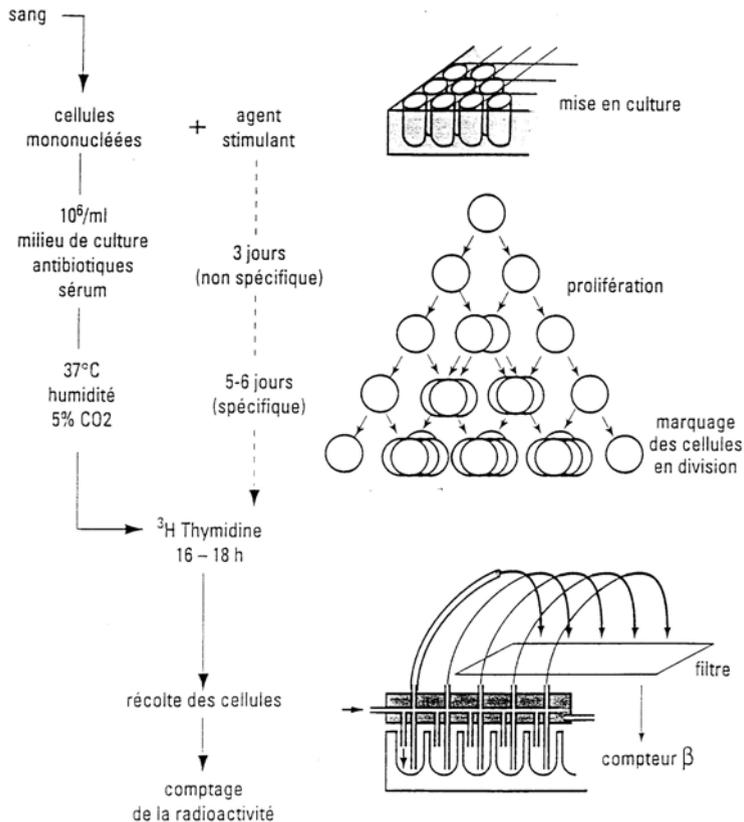
GÉNÉRATION D'UN CLONE DE LYMPHOCYTES T



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

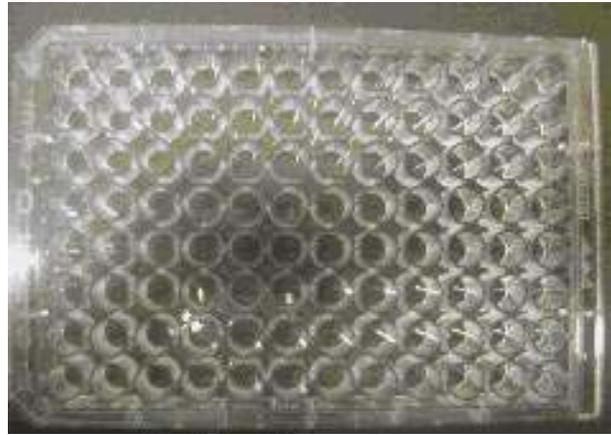
1) Bilan immunitaire:

Mitogènes: éléments de diagnostic d'un déficit sévère congénital ou acquis de l'immunité cellulaire

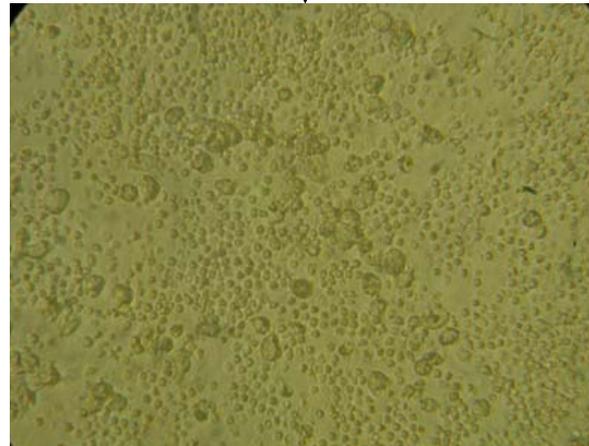
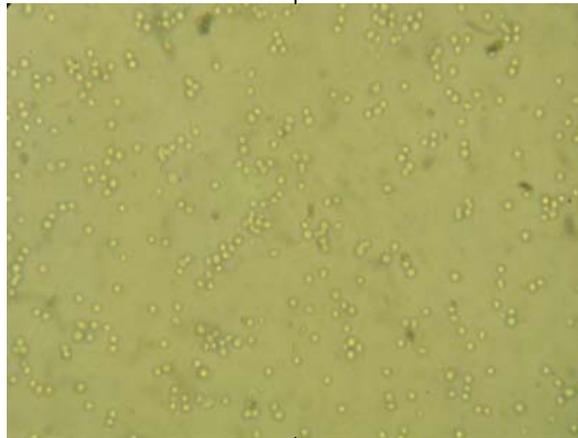
Antigène de rappel: test de la capacité à mettre en place des moyens de défense spécifique

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 tritriée incorporée: compteur à scintillation



PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

Incorporation de thymidine tritiée ^3TH

Rendu de résultats :

cpm = coup par minute

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

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

| | Mr XX | | normes labo | |
|---------------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| <u>Mitogènes:</u> | <u>cpm</u> | <u>IP</u> | <u>cpm</u> | <u>IP</u> |
| CD3 | 27540 | 41 | >10000 | >35 |
| CD3+CD28 | 29950 | 45 | | |
| CD3+IL2 | 35620 | 54 | | |
| | | | | |
| <u>Antigènes:</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

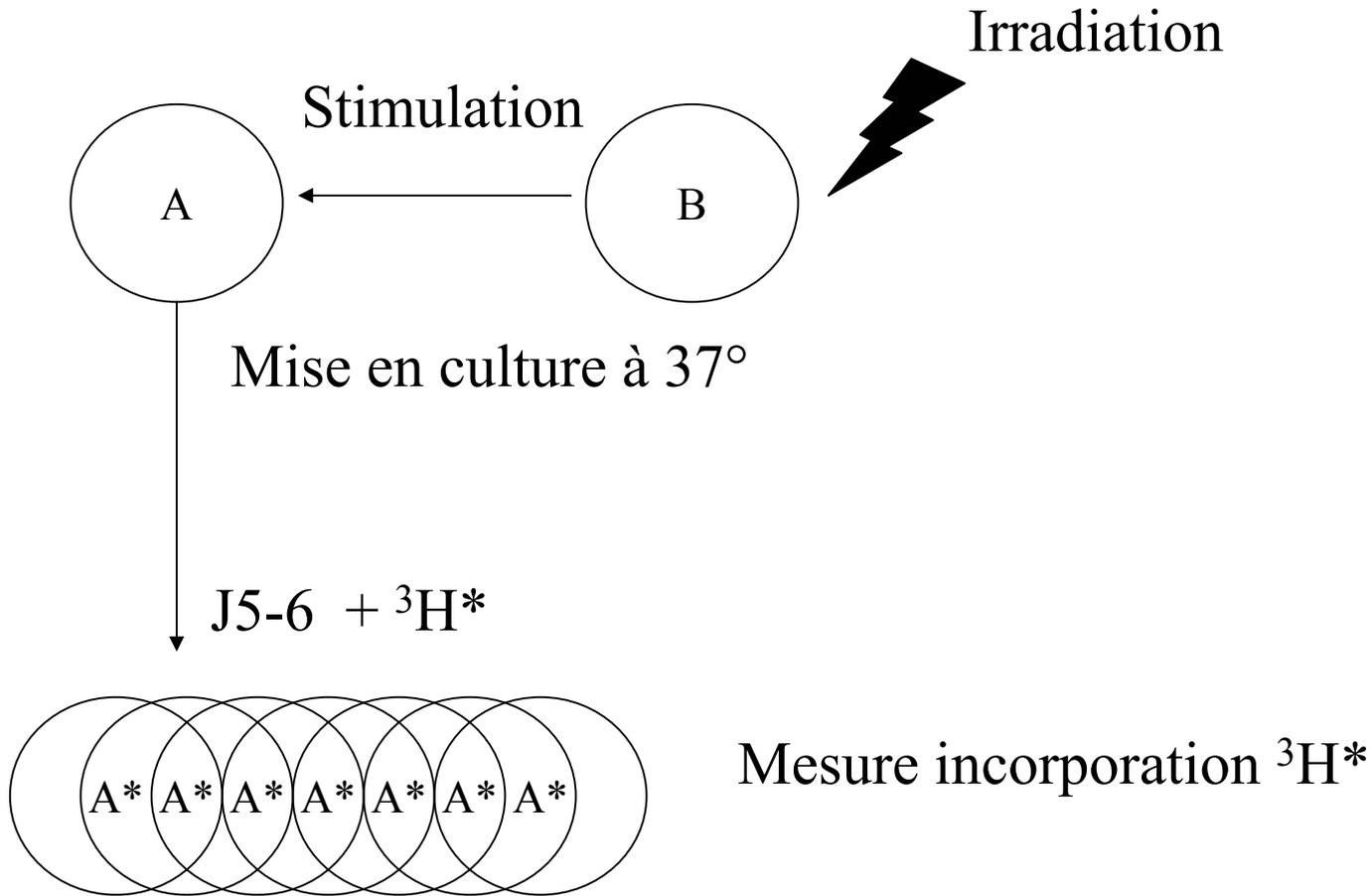
Test de Prolifération lymphocytaire à la thymidine tritiée

Mr XY

| | Mr XX | | normes labo | |
|--------------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| <u>Mitogènes:</u> | <u>cpm</u> | <u>IP</u> | <u>cpm</u> | <u>IP</u> |
| CD3 | 1878 | 13 | >10000 | >35 |
| CD3+CD28 | 5926 | 41 | | |
| CD3+IL2 | 5630 | 39 | | |
| | | | | |
| <u>Antigènes:</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

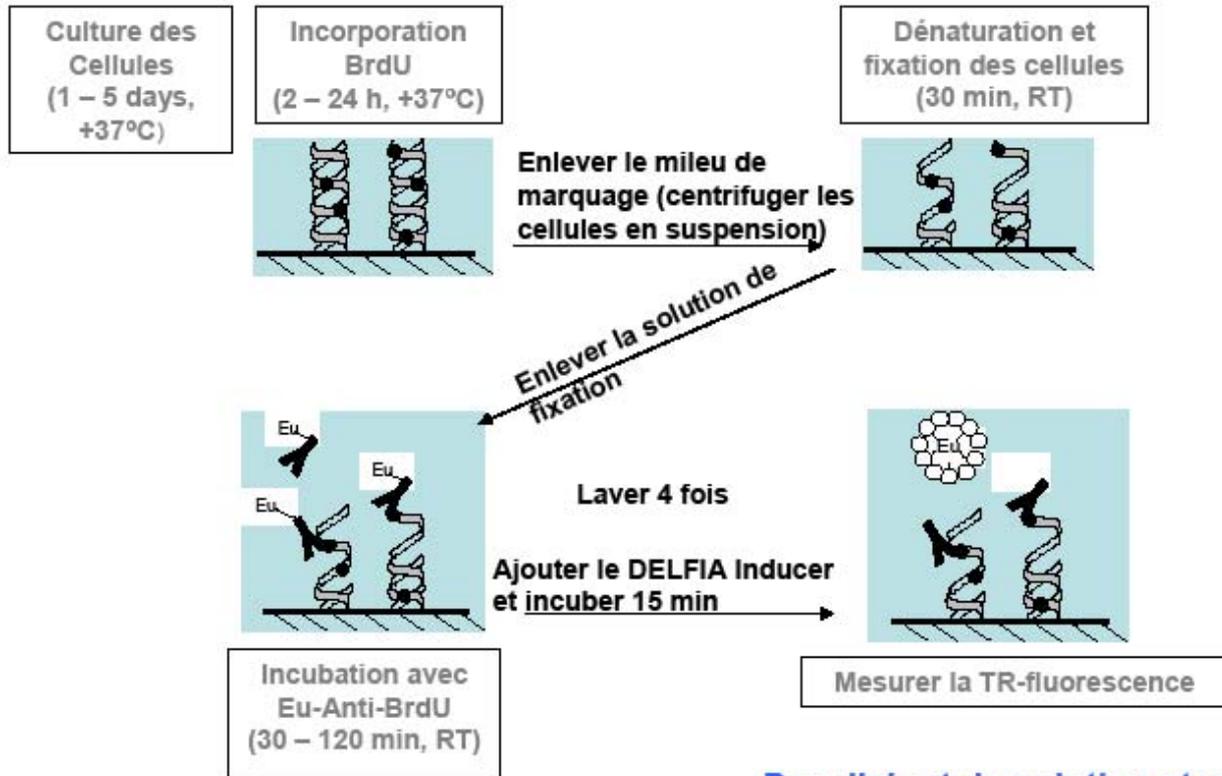
Réaction Mixte lymphocytaire: MLR Réponse allogénique

| | 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

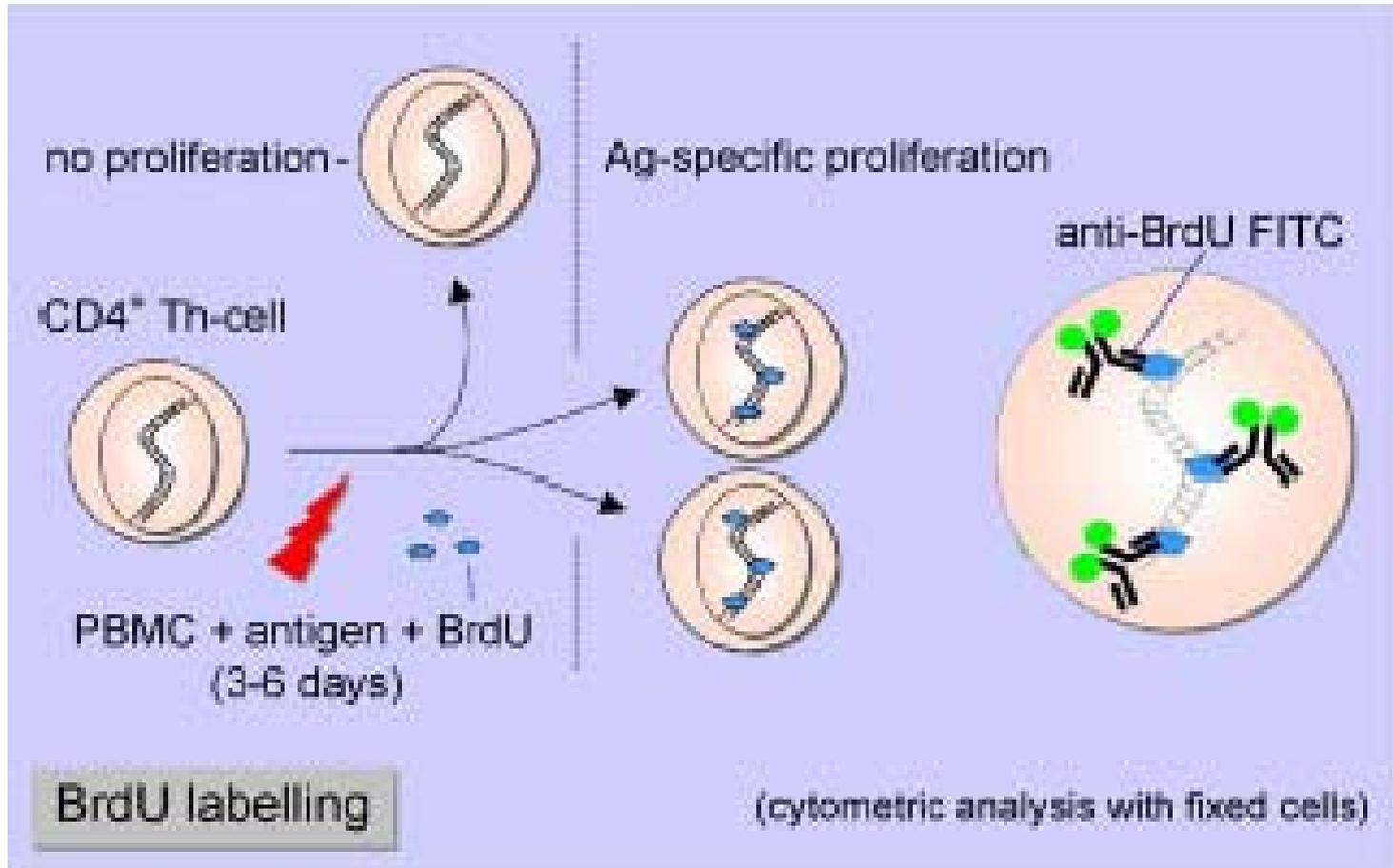
DELFIA Cell Proliferation protocol



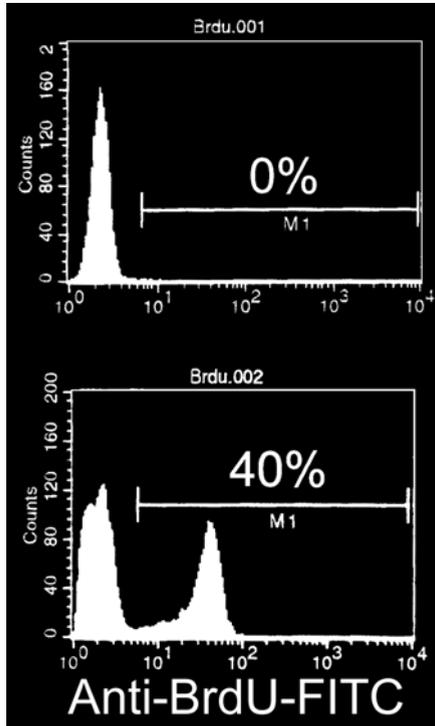
Pas d'ajout de solution stop !

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

Incorporation de BrdU et mesure par cytométrie en flux



Test au BrdU sur lymphocytes totaux



Cellules Non stimulés

**Cellules stimulées
avec un anticorps Anti-CD3**

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : EXEMPLE

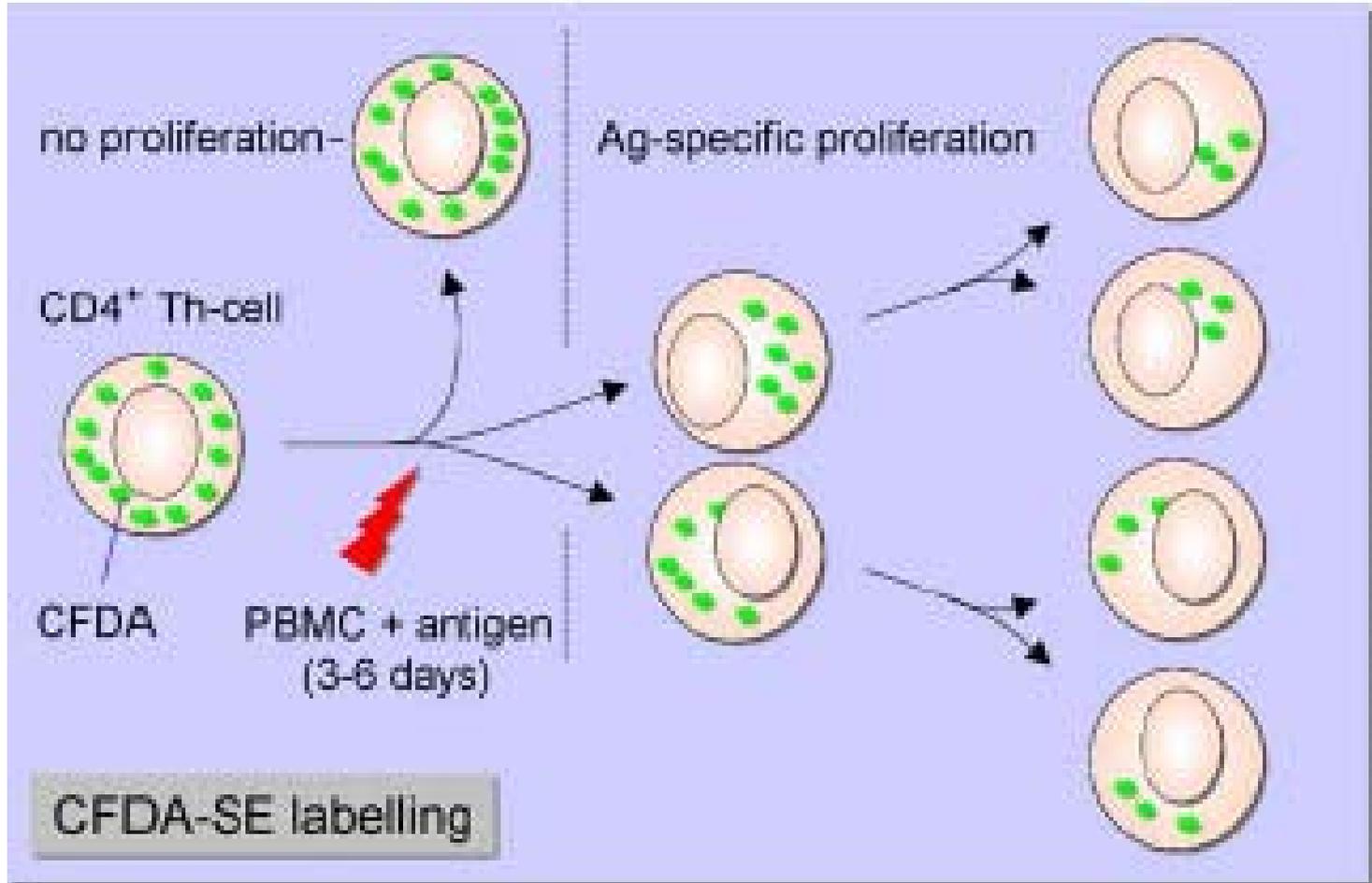
Test de Prolifération lymphocytaire par cytométrie de flux :
incorporation de BrdU (stimulation CD3)

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

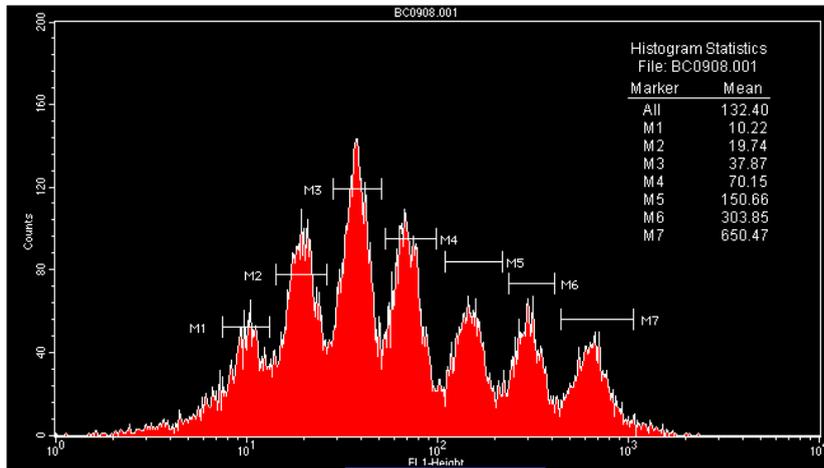
carboxy fluorescein diacetate succinimide ester

PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE : METHODES

Marquage par CFSE et mesure par cytométrie en flux

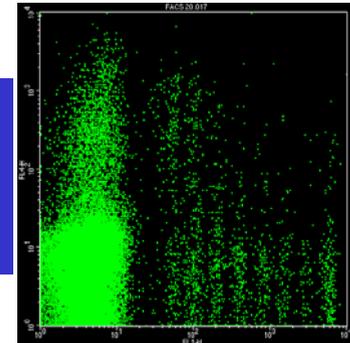
Marquage de la membrane des cellules et à chaque division diminution de 50% de la fluorescence des cellules filles par rapport à la cellule parentale

Association possible à des marquages de membrane

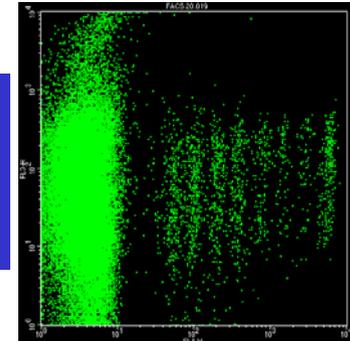


CFSE

CD25

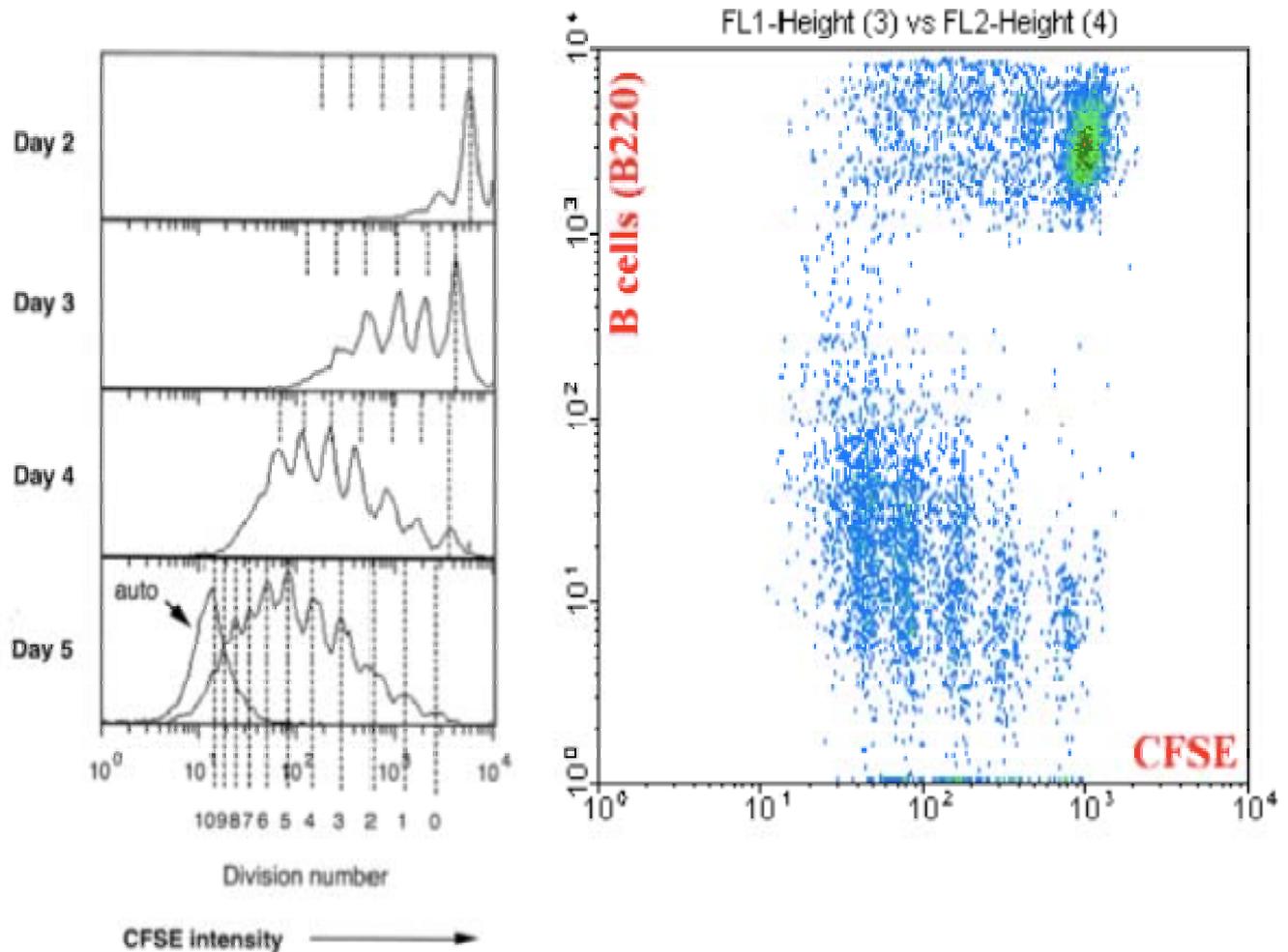


CD69



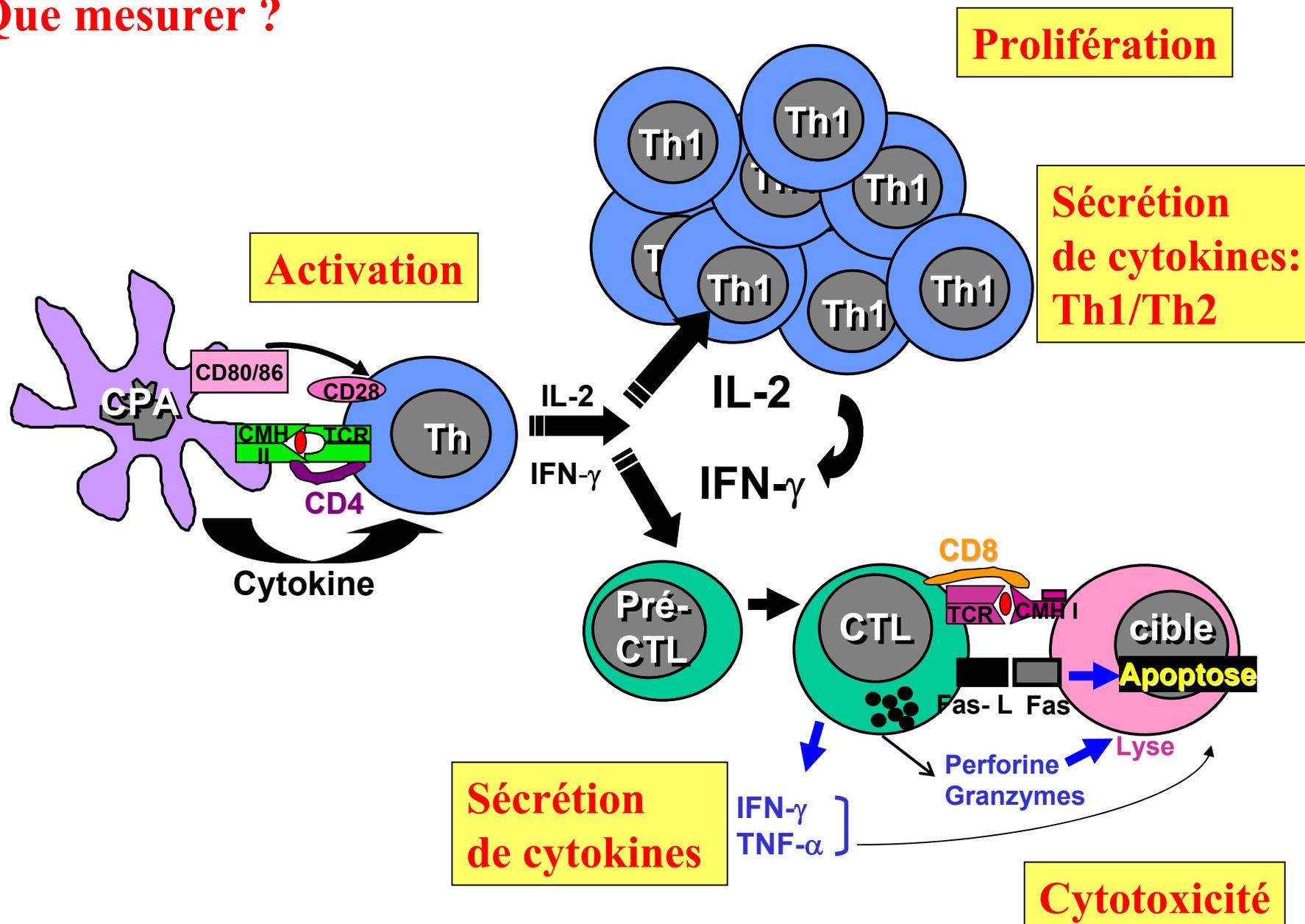
PROLIFERATION

- CFSE



RAPPELS SUR LA REPONSE 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

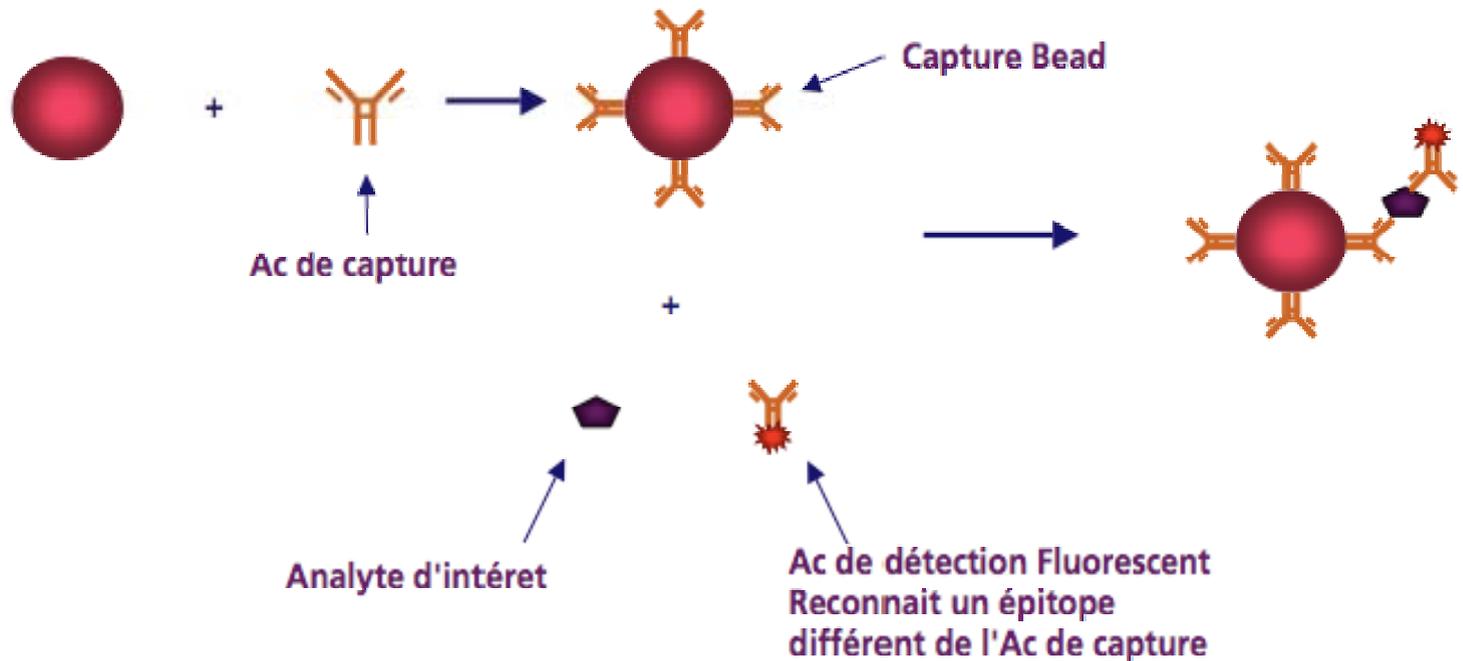
- Quantification des ARNm: RT-PCR

Quantification des cellules CD4+/CD8+ productrices

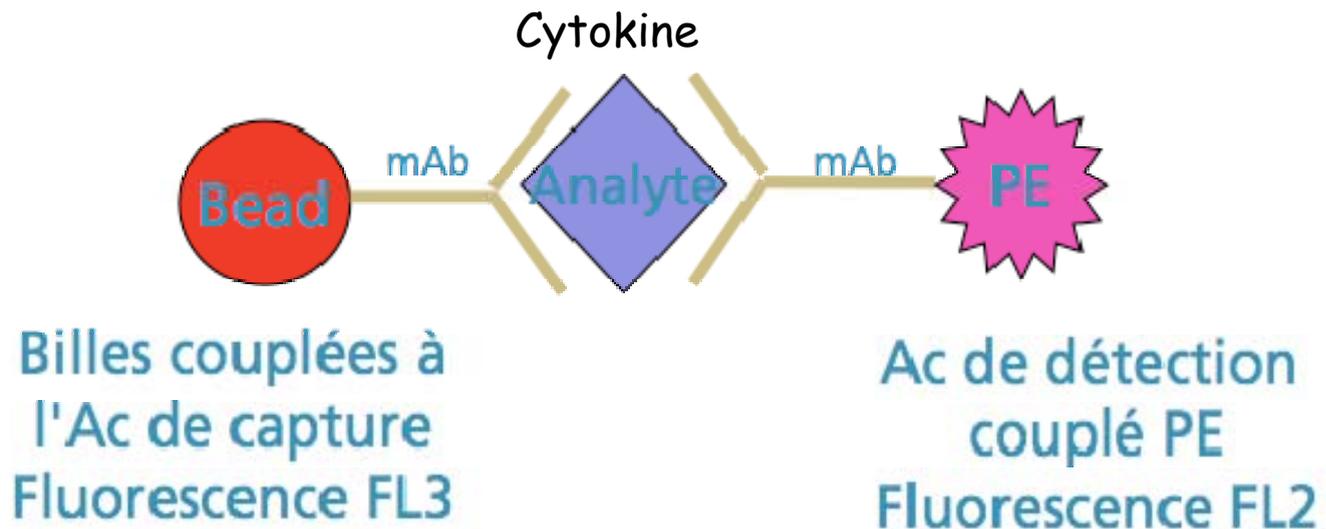
- Cytométrie
- ELISPOT

CYTOKINES SECRETÉES - BILLES

CBA: Cytometry Beads Array



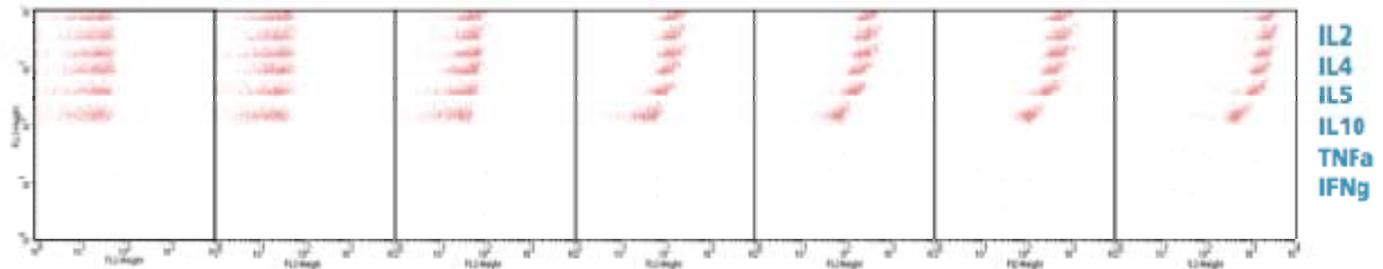
CYTOKINES SECRETÉES - BILLES



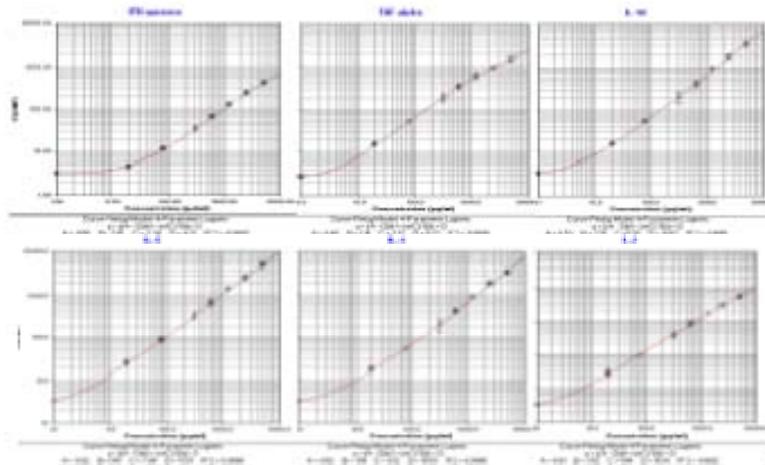
PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES BILLES FLUORESCENTES EN CYTOMETRIE



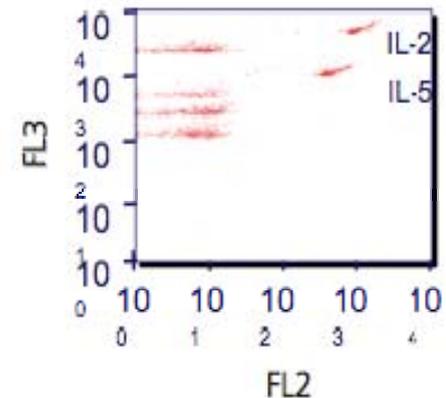
fenêtre sur les billes "singlets"



IL2
IL4
IL5
IL10
TNFa
IFNg



6 courbes standard calculées par le logiciel dédiés CBA



Calcul de la concentration de cytokine dans le surnageant

PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES

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

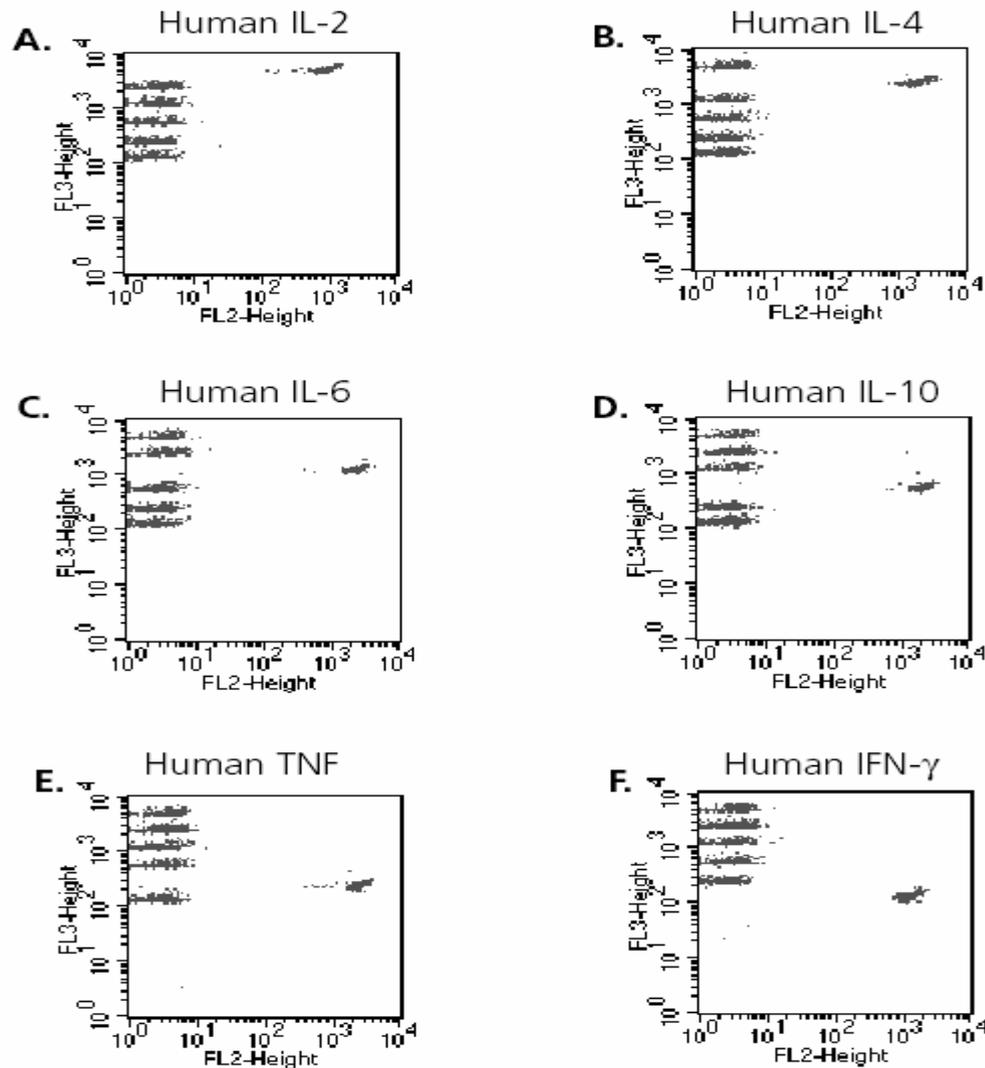
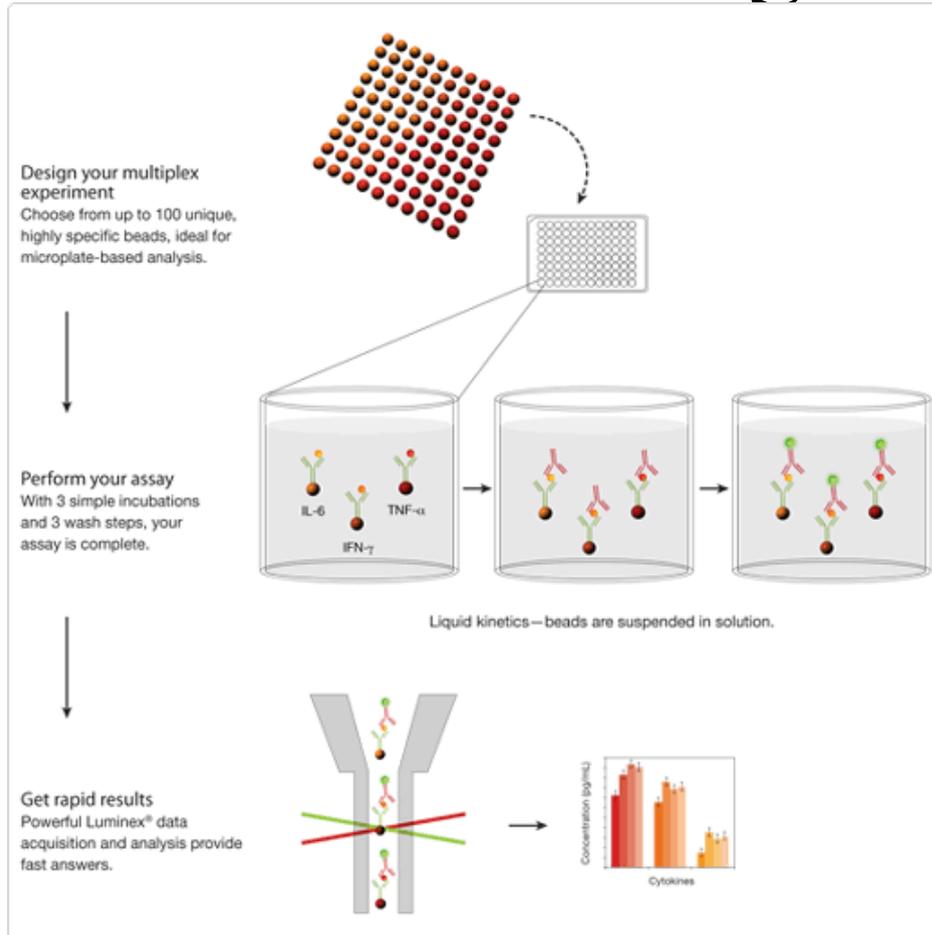


Figure 8. BD CellQuest™ Data for Detection of Individual Cytokines

PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES BILLES FLUORESCENTES EN CYTOMETRIE

Technologie Luminex



Applications en immunologies

Dosage cytokines
Auto-Immunité
Histocompatibilité...

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**

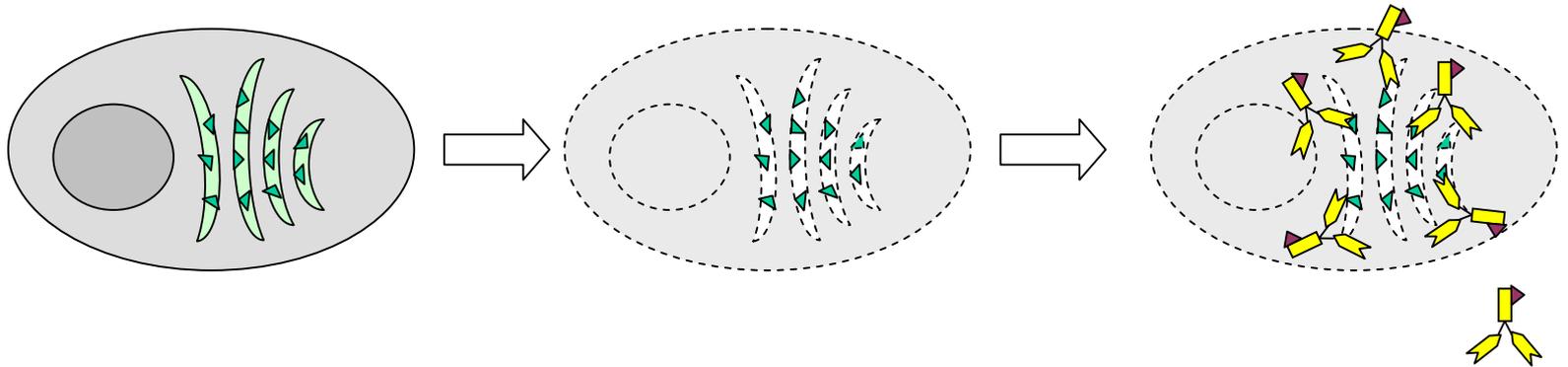
**Marquage intracellulaire
cytokine**

Lecture en cytométrie de flux



PRODUCTION DE CYTOKINES : METHODES

Quantification de cellules sécrétrices : par cytofluorométrie en intracytoplasmique



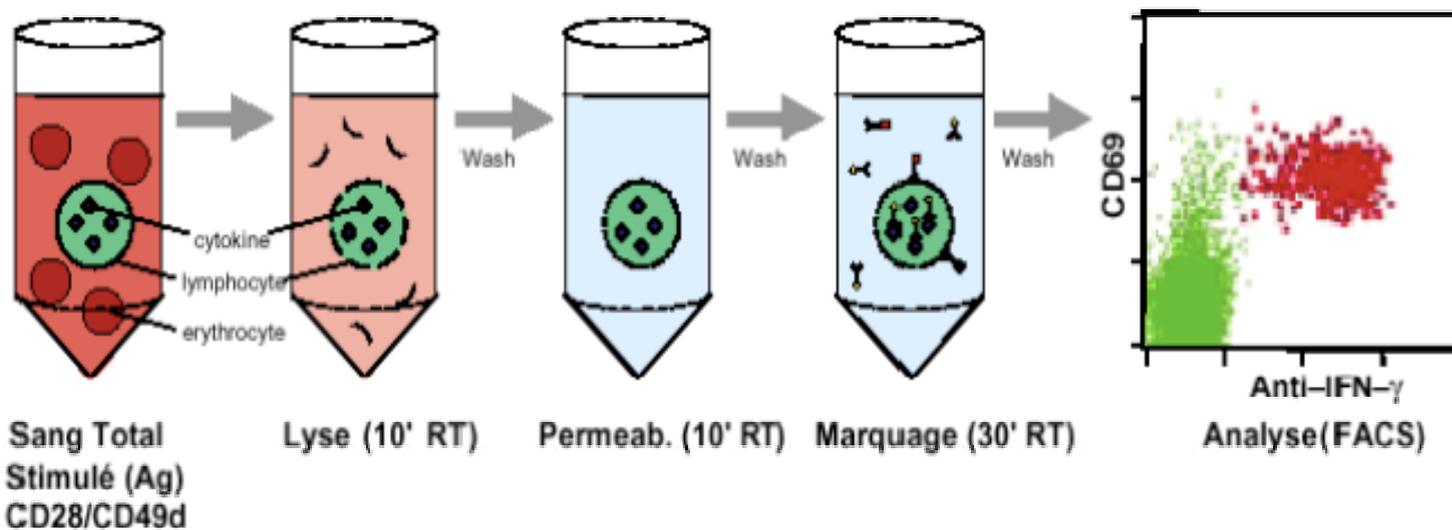
Cellules T activées traitées par un inhibiteur qui bloque le transport des protéines ⇒ blocage des CK dans le RE

Fixation et perméabilisation des cellules

Pénétration des Ac anti CK et liaison aux CK intracytoplasmiques

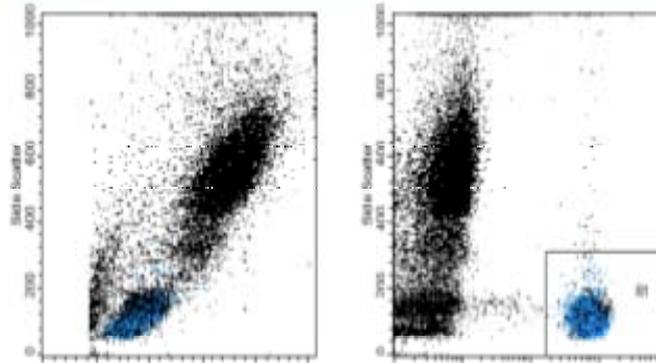
d'après Immunobiology 5, C. A. Janeway

ACTIVATION ET CYTOKINES

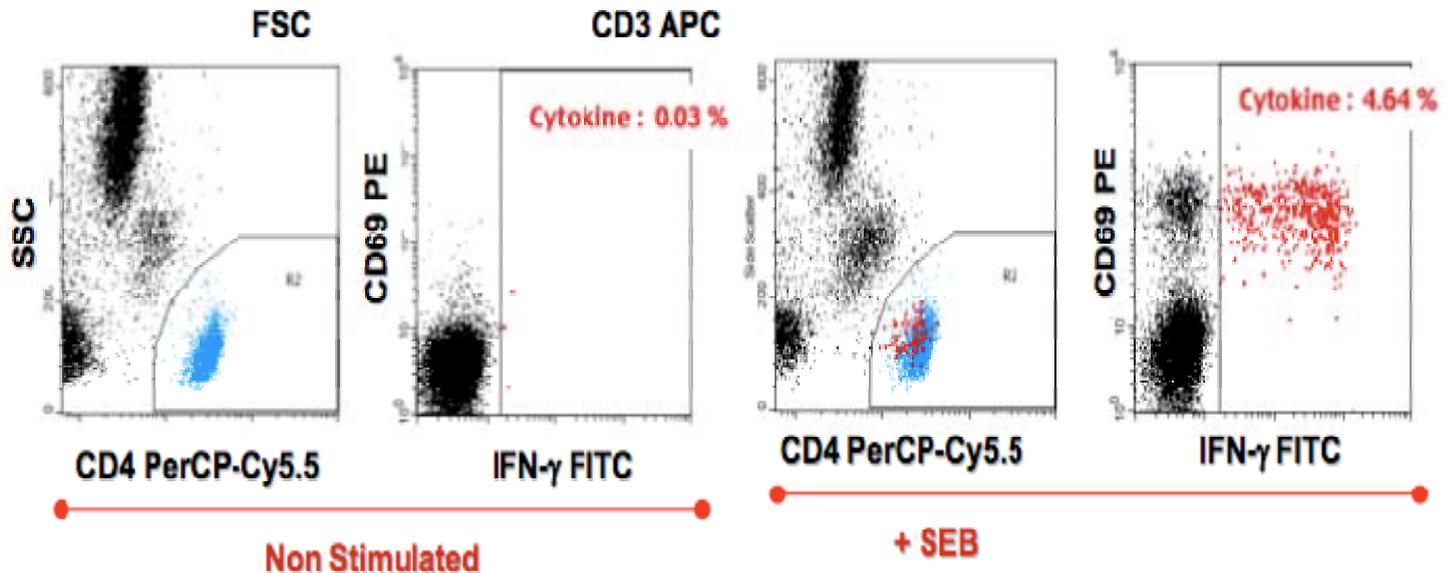


CYTOKINES INTRACELLULAIRES

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

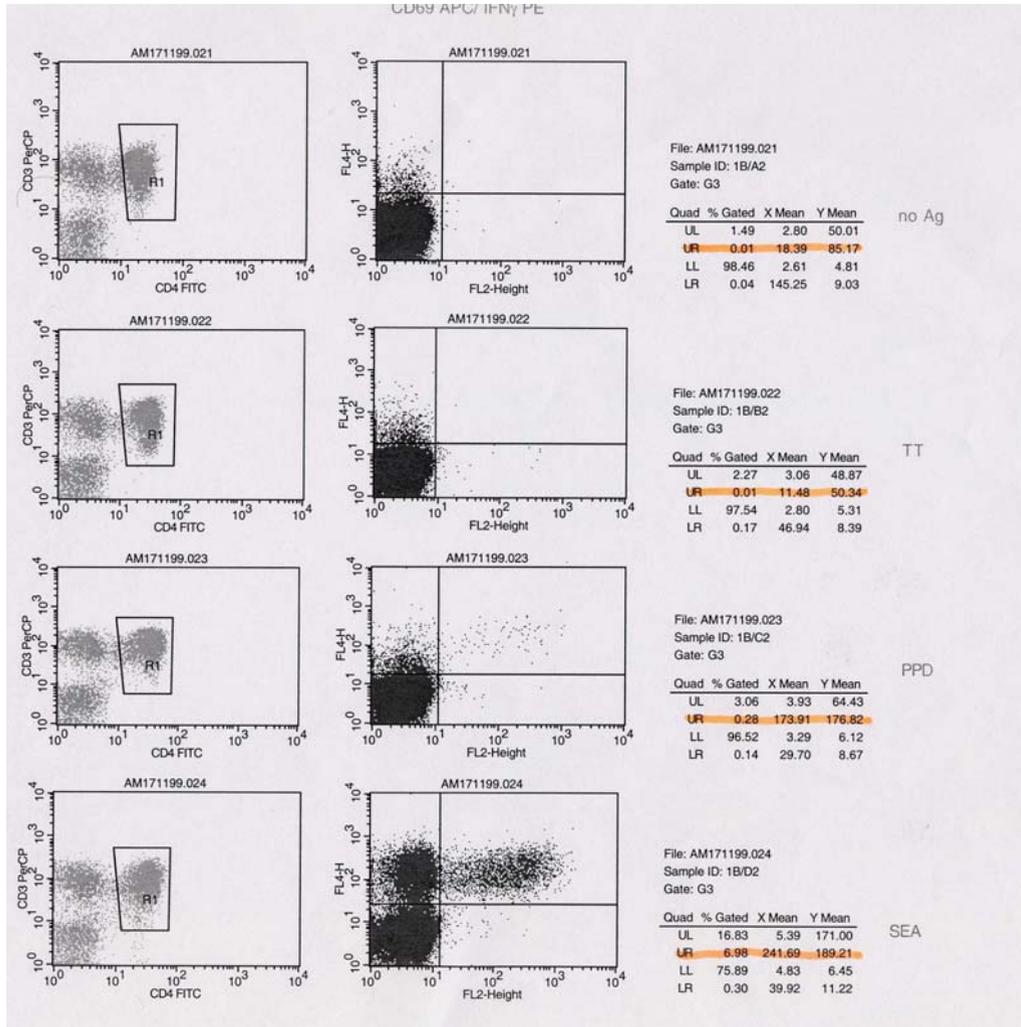


Non spécifiques d'Ag



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)

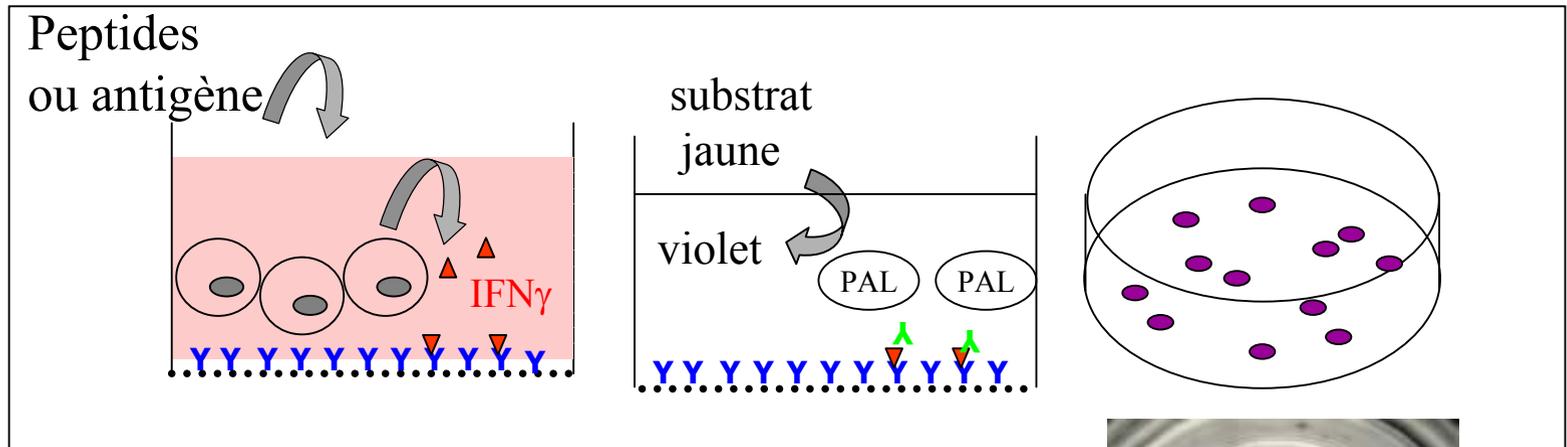
Stimulations chroniques du système immunitaire :

- 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 \boxtimes **réponse des LT CD8+ spécifiques**
stimulation par des antigènes \boxtimes **réponse des LT CD4+ spécifiques**



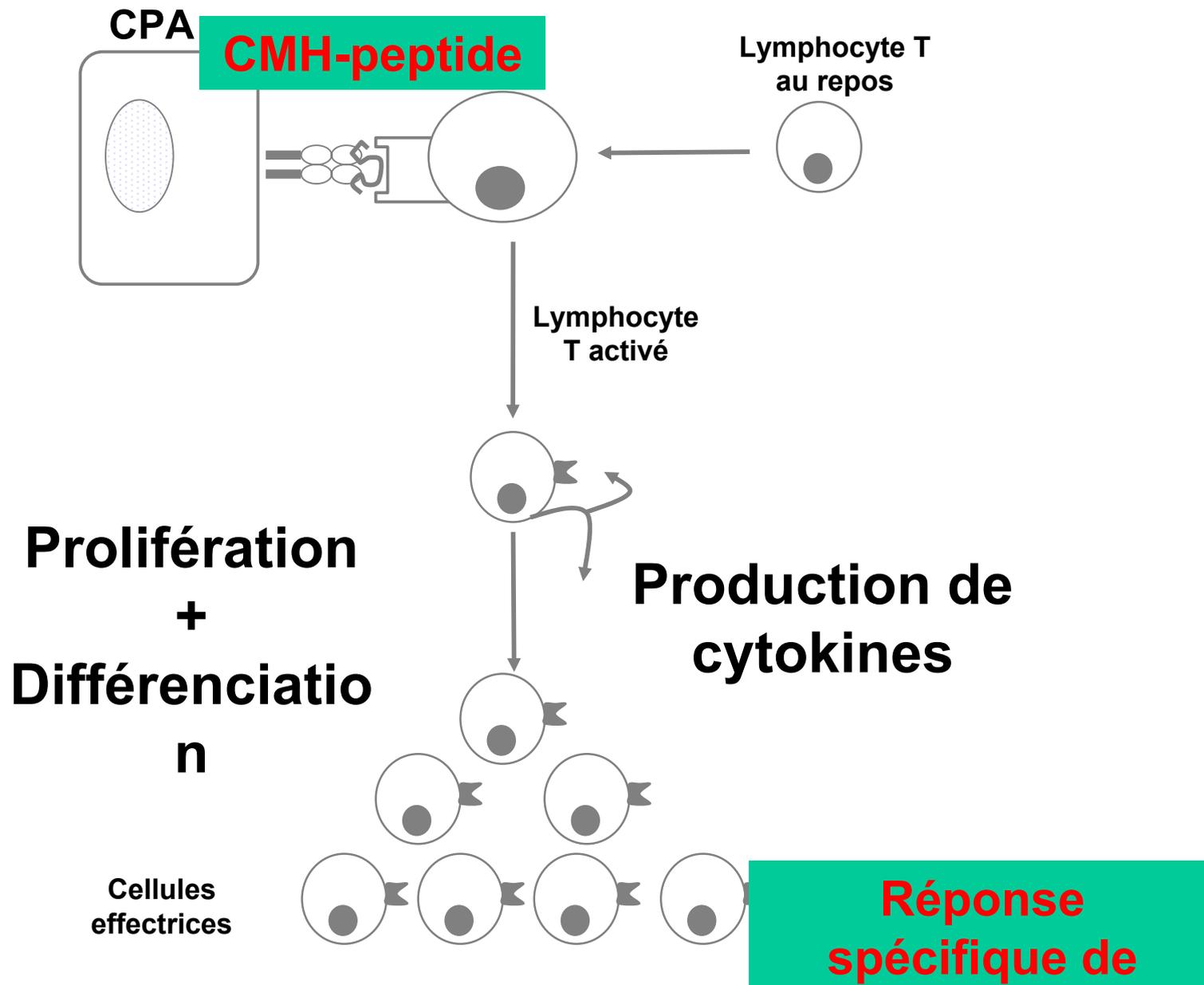
Expression des résultats en SFC/10 6 PBMC.

Seuil de positivité = 50 SFC/10 6 PBMC

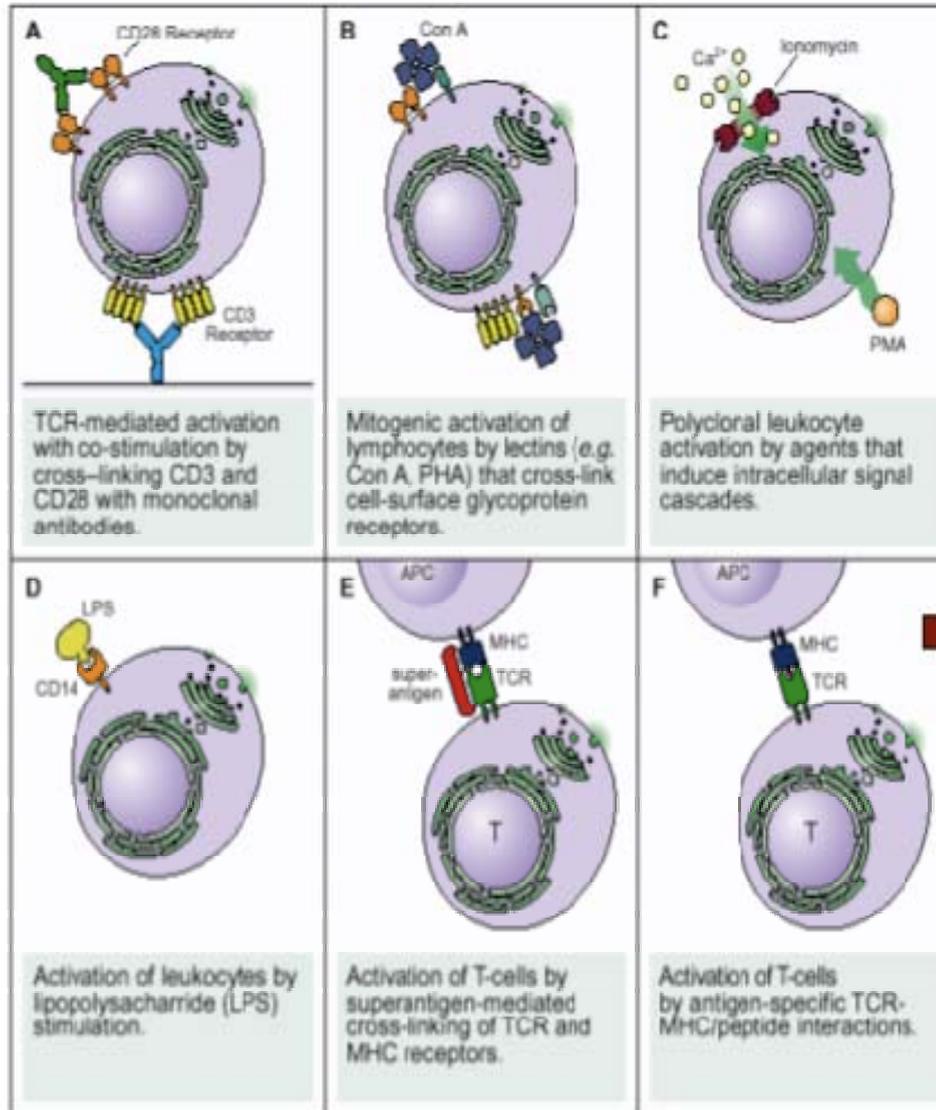


SFC= spot forming cell

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

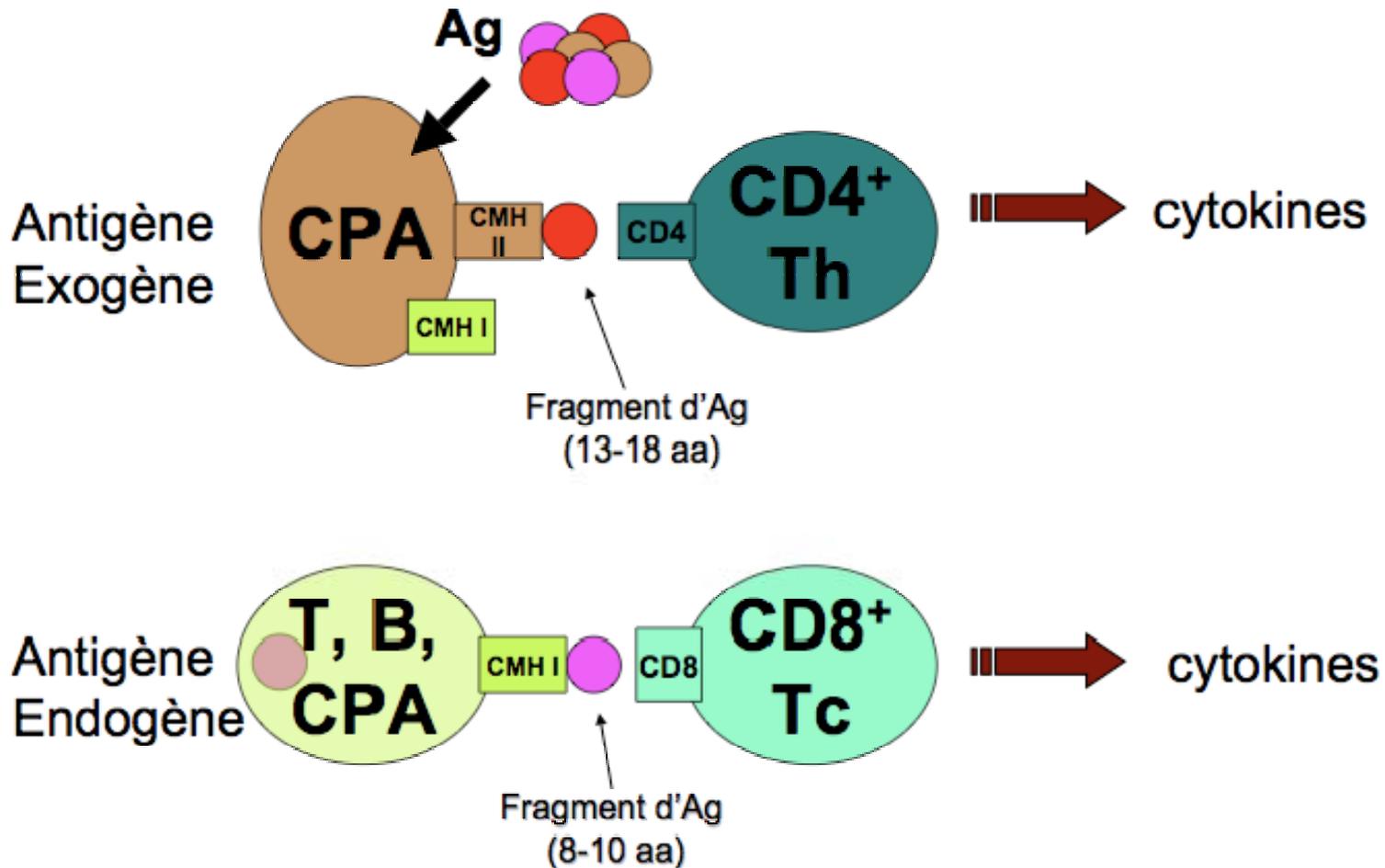
TETRAMERES

- 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

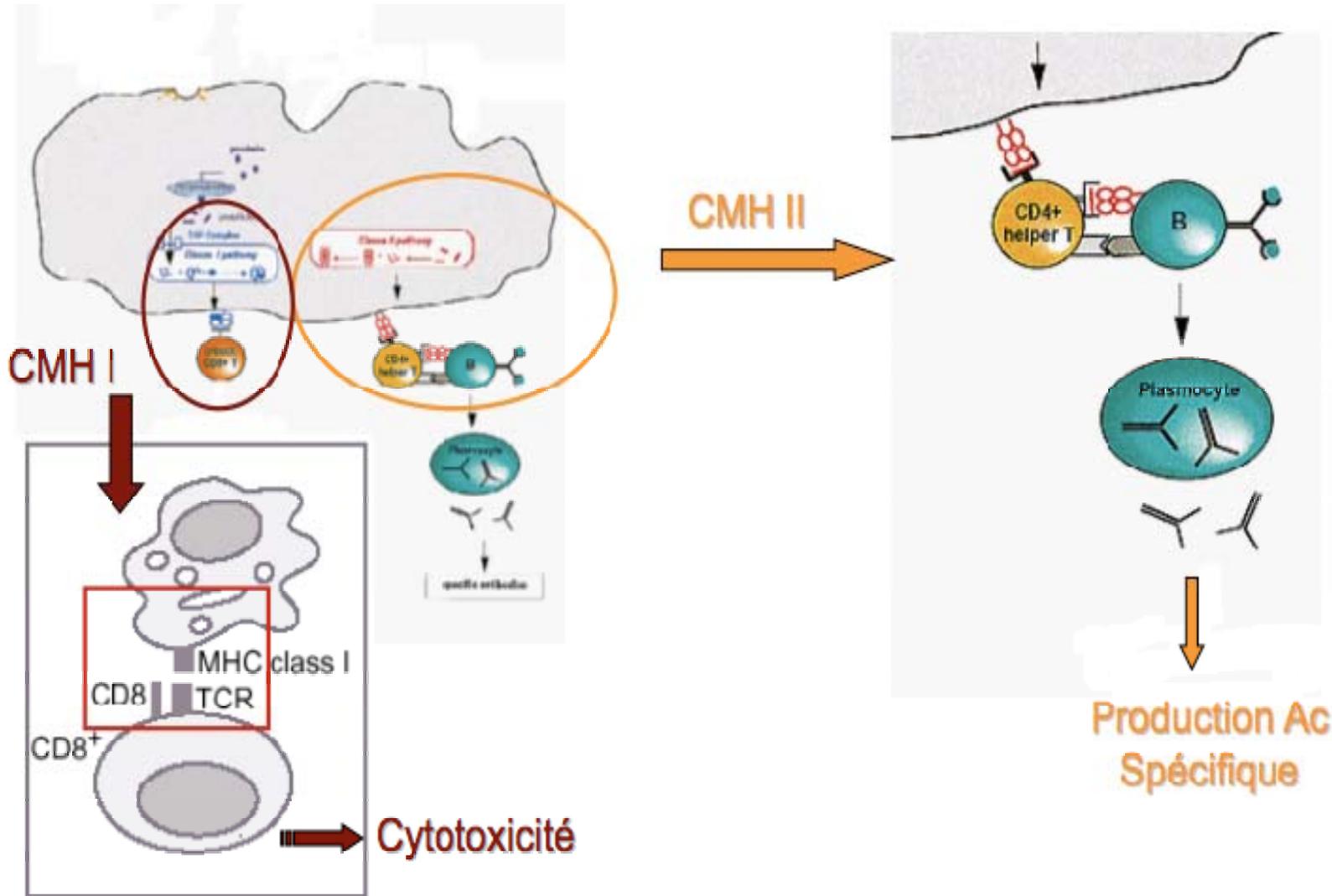
TETRAMERES

- 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

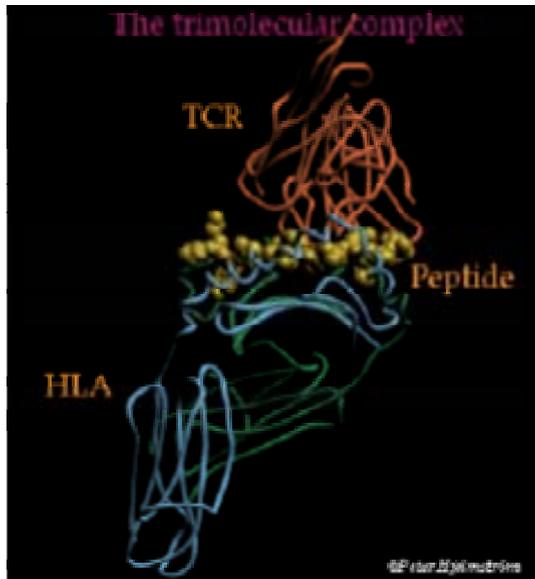


TETRAMERES



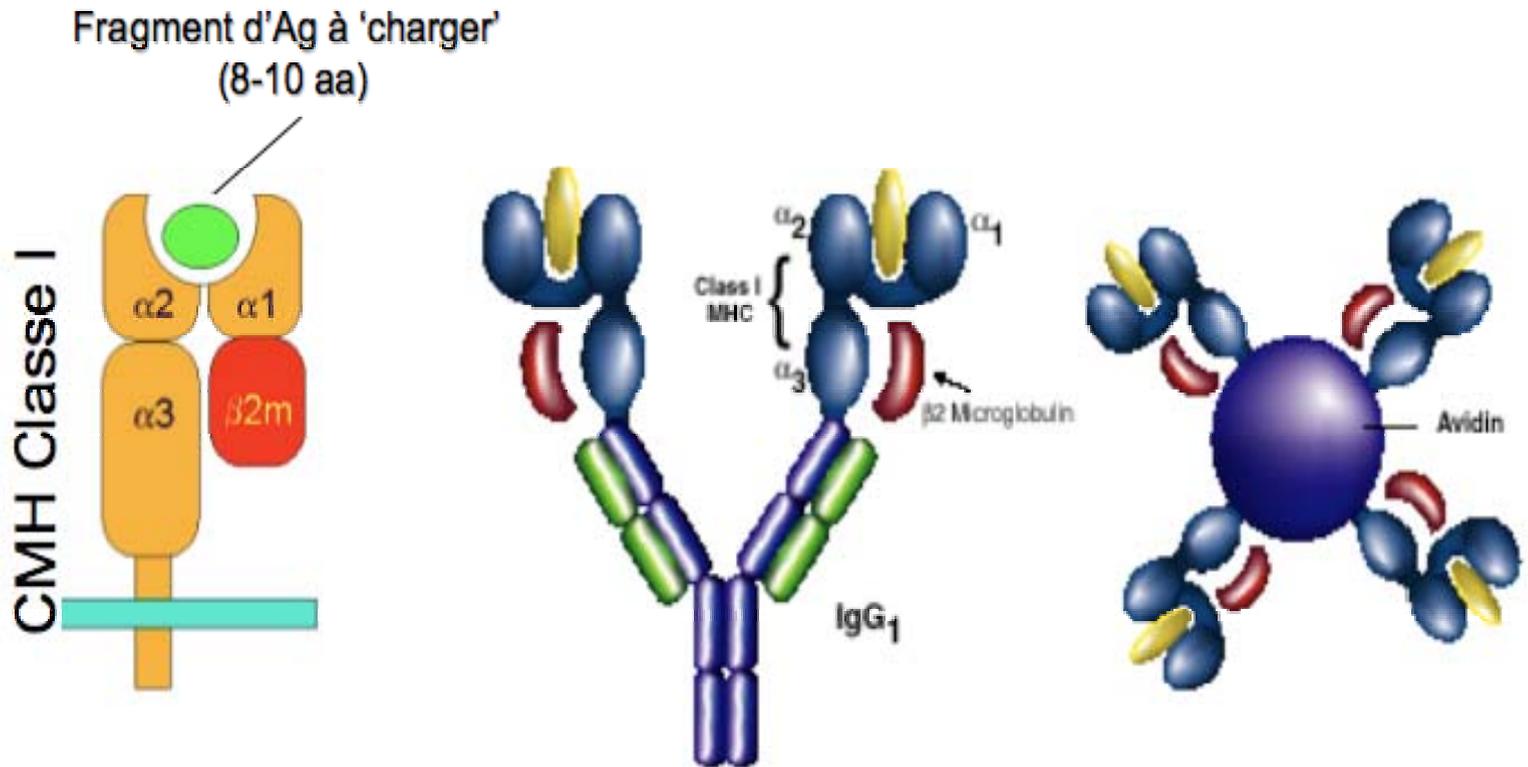
TETRAMERES

- Afin d'identifier spécifiquement et stimuler une cellule T, il convient de reproduire les interactions entre un peptide, une molécule du CMH (Classe I ou II) et TCR, i.e. s'affranchir de la cellule portant le CMH

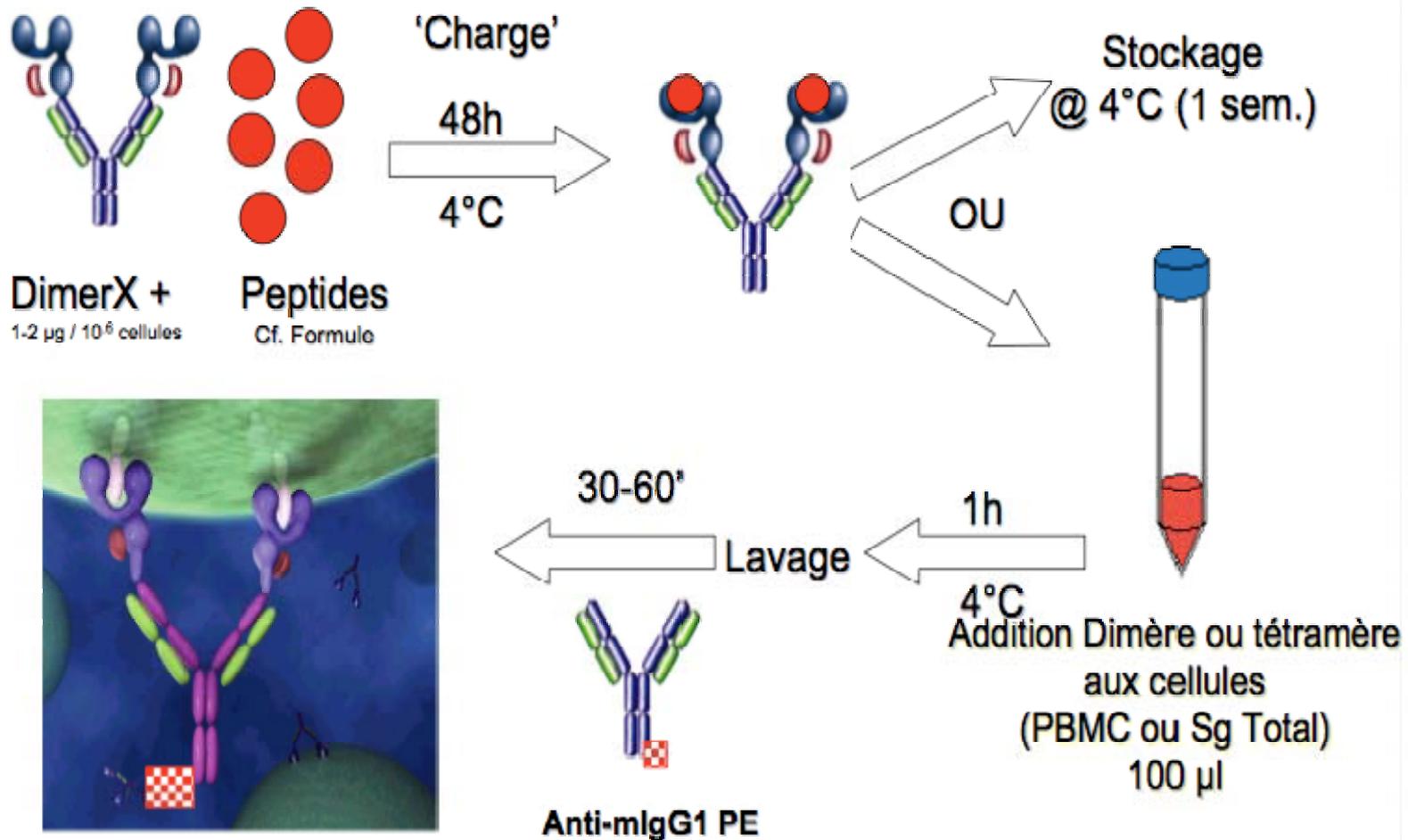


Technologie Dimère ou TétraMère

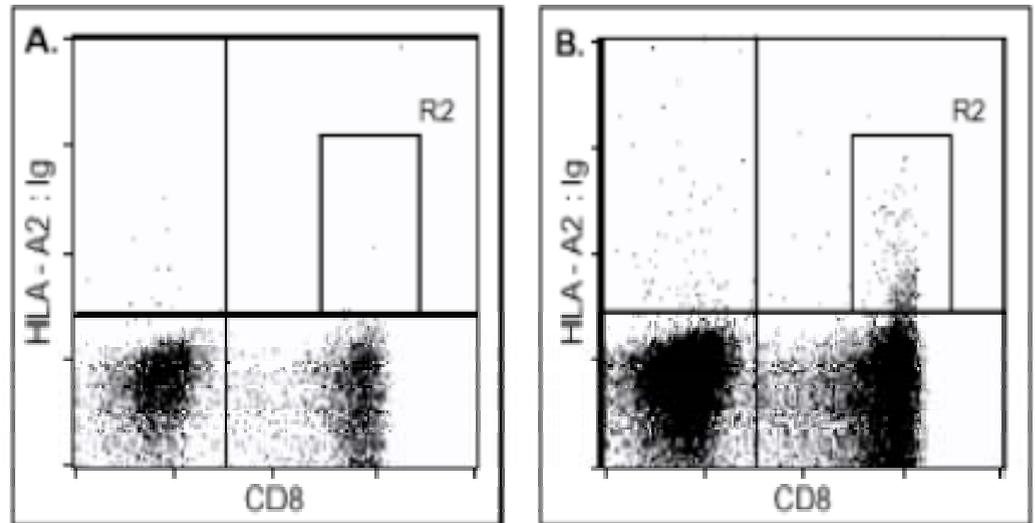
TETRAMERES



TETRAMERES



TETRAMERES

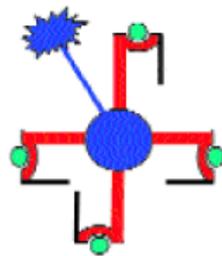


DimerX | HLA-A2
(4°C/24h)
CD8-FITC
anti-mIgG1-PE

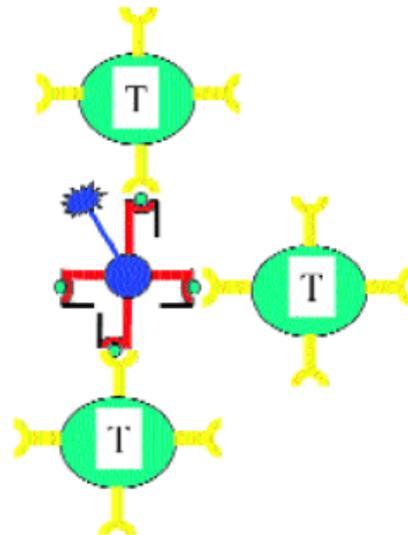
Typage HLA nécessaire

TETRAMERES

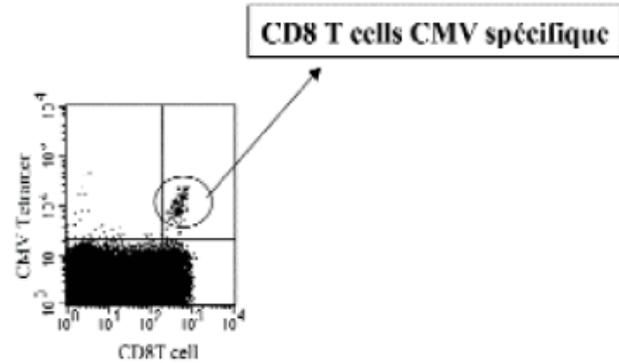
A.



B.



C.



Lymphocytes T spécifiques reconnaissant un peptide du virus CMV (par exemple)



Molécule H1.A de classe I biotinylée

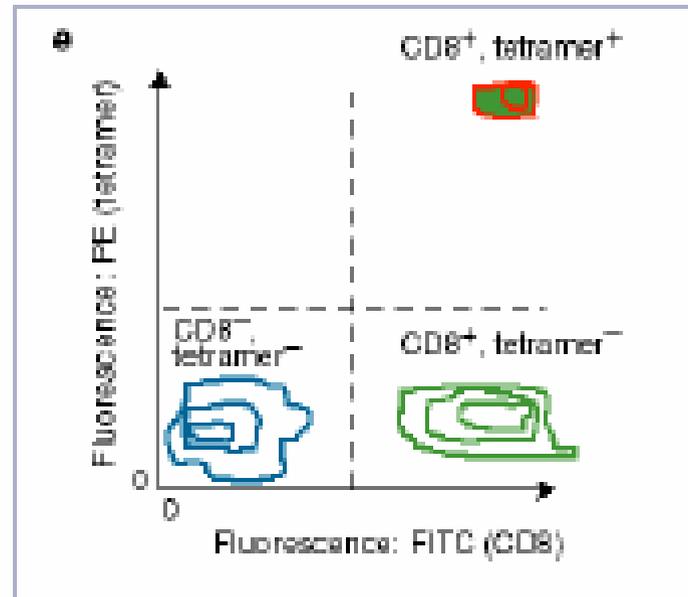
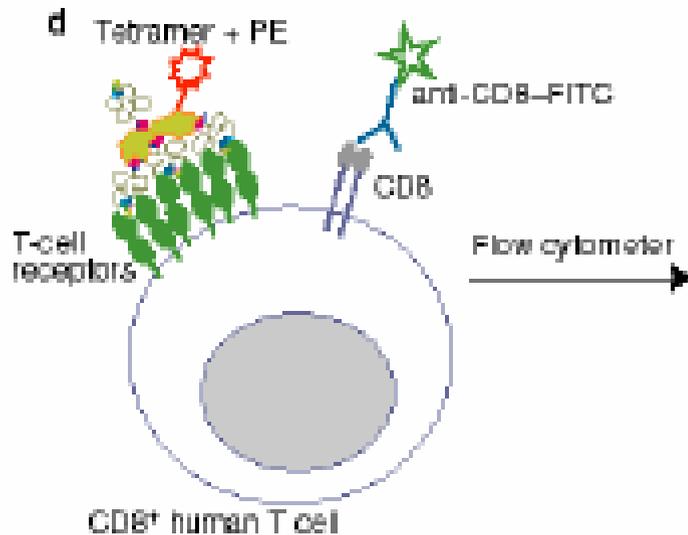


Peptide dérivé du CMV



Streptavidine couplée à un fluorochrome

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



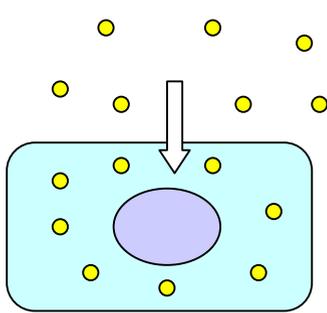
Tests de cytotoxicité

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

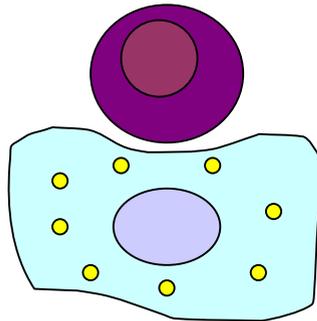
CYTOTOXICITE : METHODES

Activité Natural Killer = cytotoxicité spontanée

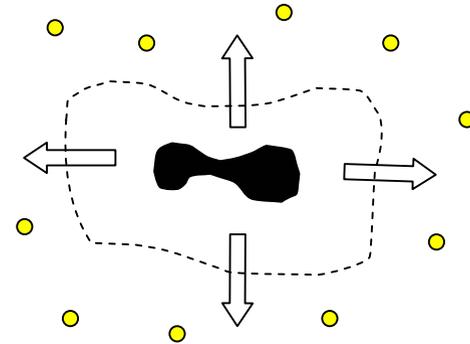
Par test de relargage au chrome



**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 $\mu\text{g/ml}$**

QUAND?

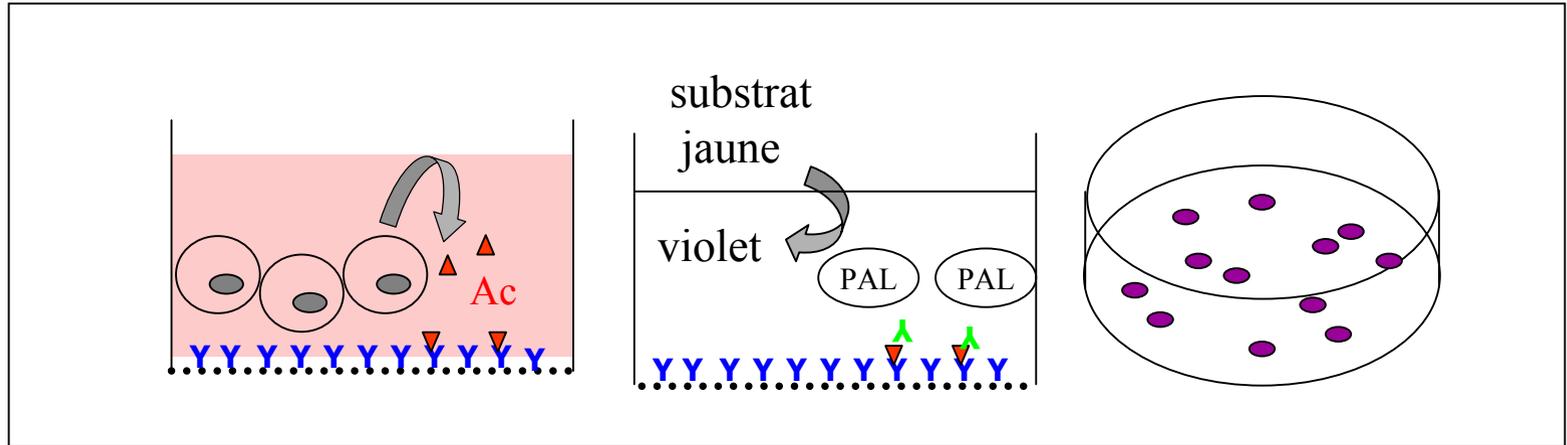
**HYPOGAMMAGLOBULINEMIE OU DYSGLOBULINEMIE
DIAGNOSTIQUEE PAR ETUDE QUANTITATIVE DES Ig
SERIQUES**

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 :

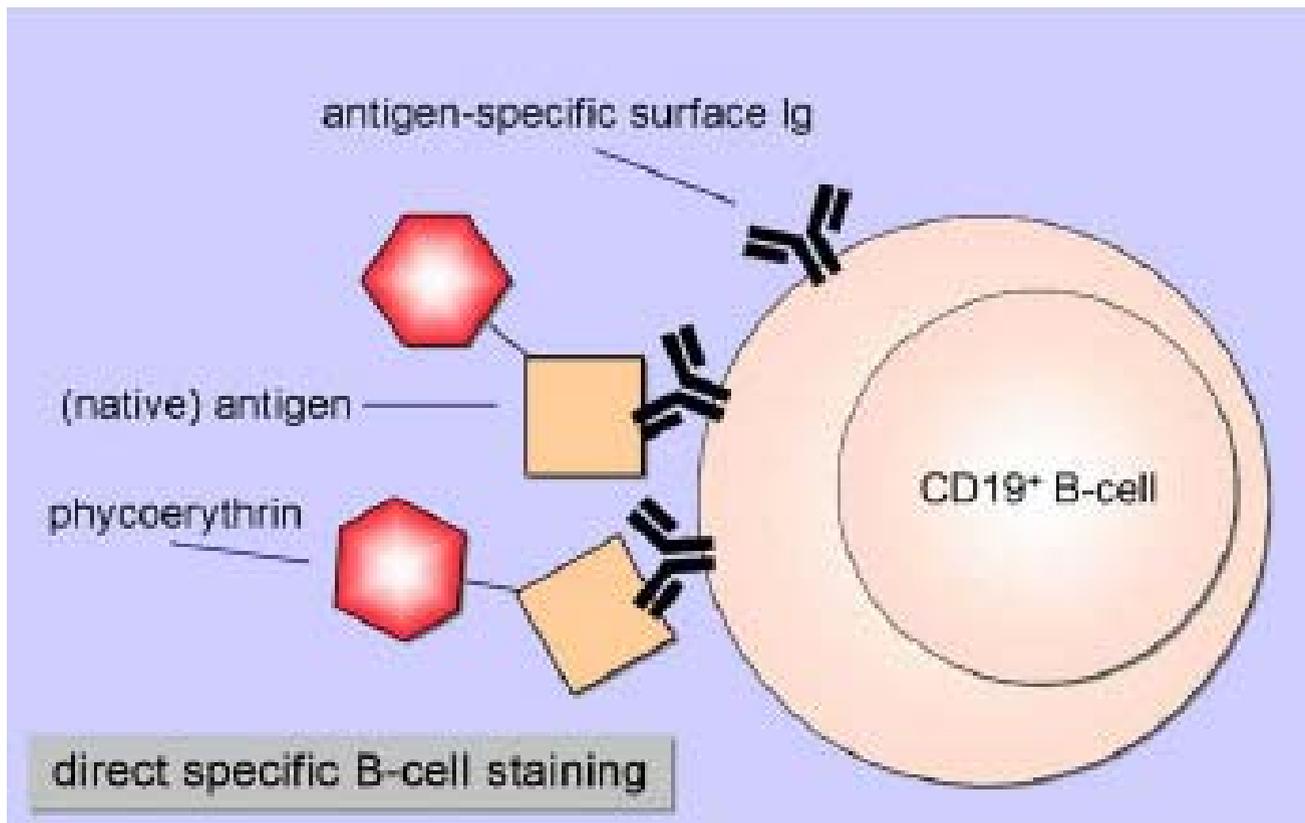
- Ac anti classes d'immunoglobulines :

→ 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!!!