

Techniques d'étude des réponses immunitaires

Techniques de phénotypage

Détection de marqueurs

Isolation de populations cellulaires

Analyse des répertoires

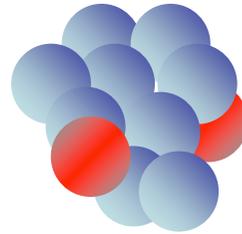
Analyse des voies de signalisation

Analyse prolifération / cycle cellulaire / Apoptose

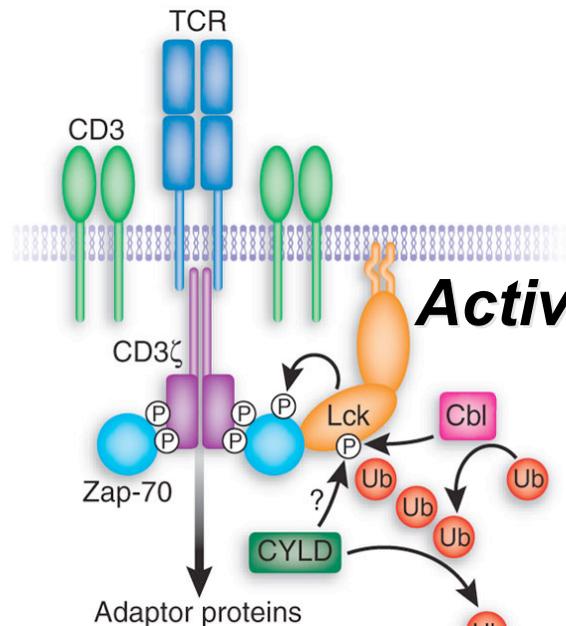
Production cytokines / facteurs solubles

Analyse des fonctions effectrices

Utilisation de modèles de souris



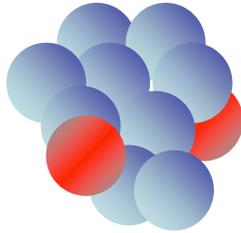
**Caractérisation /
Identification**



Activation / Fonction



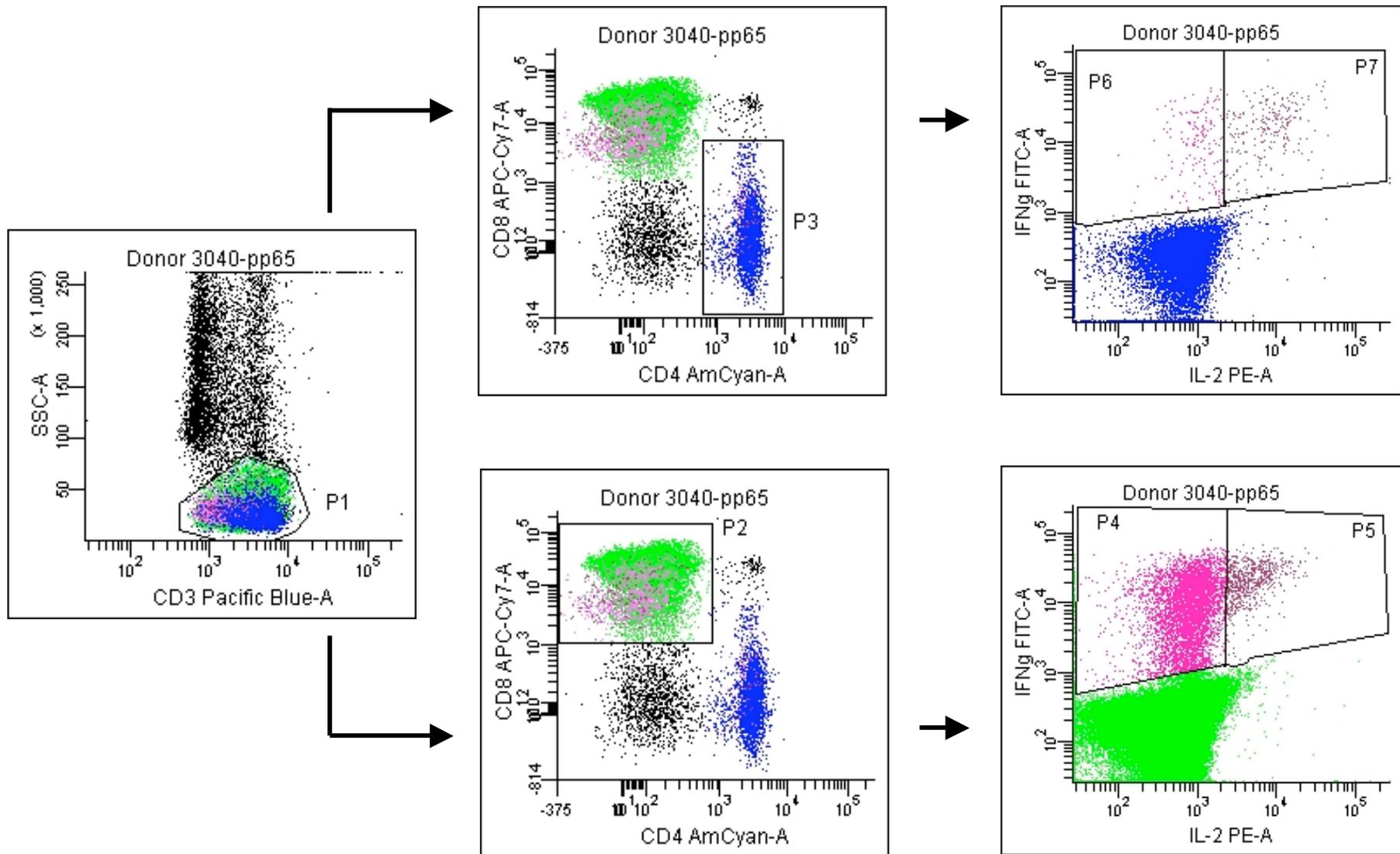
**Contexte
physiopathologique**



Caractérisation / Identification cellules et populations cellulaires

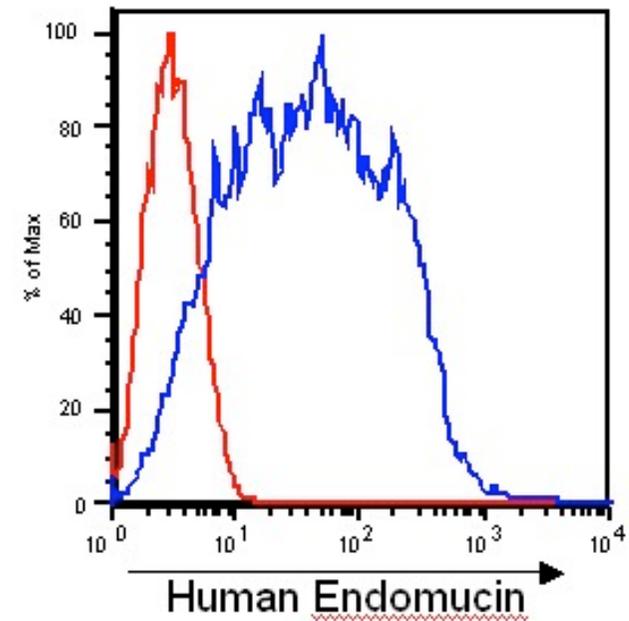
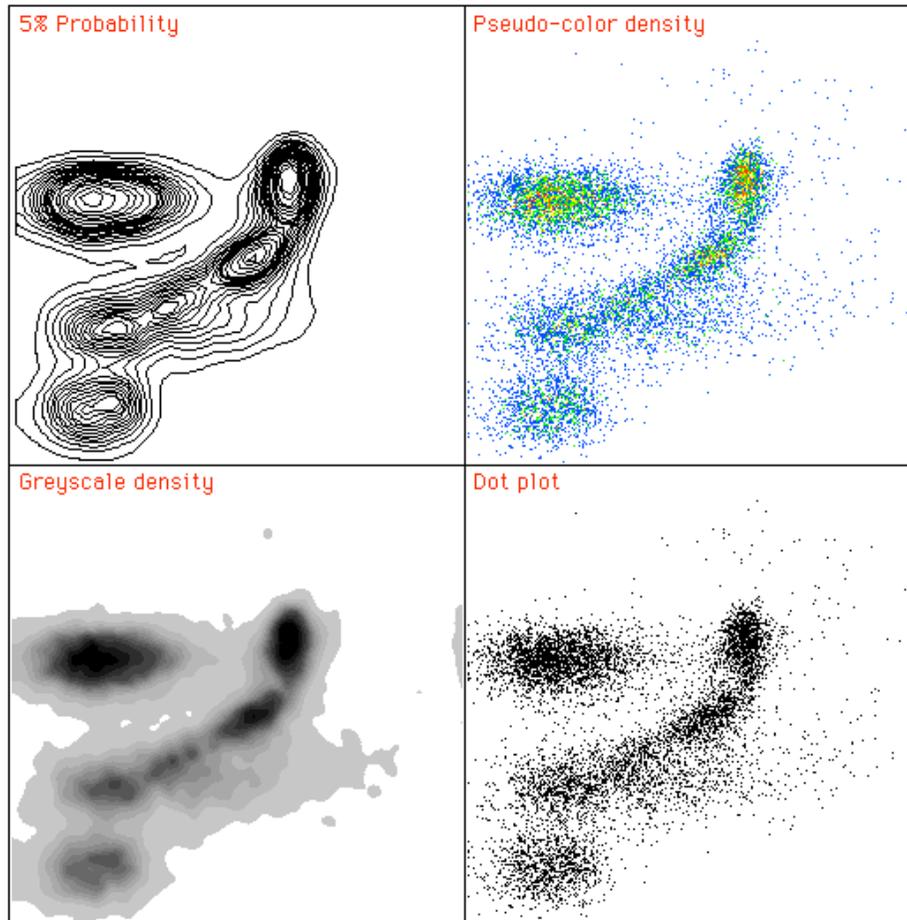
- Cytométrie en flux: marquages extracellulaires / intracellulaires
- Tri magnétique ou par cytométrie en flux de populations cellulaires
- Immunohistochimie
- Microscopie à fluorescence
- Analyse des répertoires: immunoscope

Cytométrie en flux : marquages extracellulaires et intracellulaires



Cytométrie en flux : marquages extracellulaires et intracellulaires

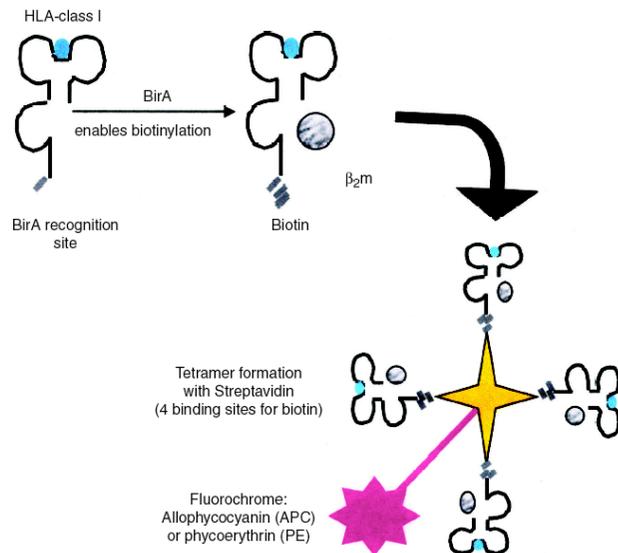
Standard Plot Options



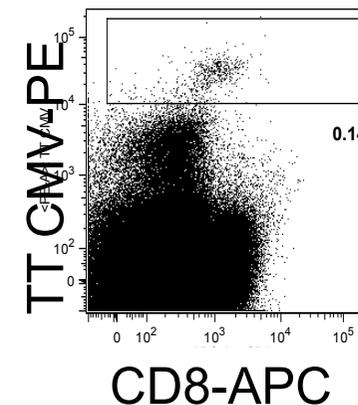
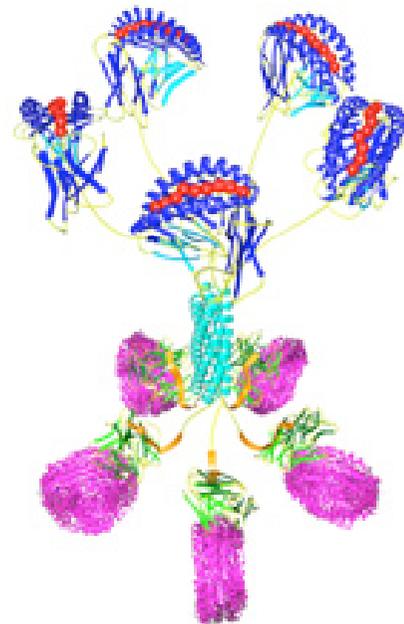
Cytométrie en flux : technique des tétramères

Cette méthode permet de détecter directement les cellules T spécifiques de l'Ag par marquage direct de leur TCR avec un complexe de deux (dimère), quatre (tétramère) ou cinq unités (pentamère) de molécules CMH de classe-I préalablement chargées de l'épitope d'intérêt. Les tétramères sont soit directement couplés à un fluorochrome, soit révélés par un anticorps secondaire. La fréquence de cellules T spécifiques de l'Ag est déterminée par cytométrie de flux. Ainsi, par analyse multiparamétrique, le phénotype des cellules T CD8⁺ ayant fixé le tétramère est également être analysé. La sensibilité de ce test est telle qu'une cellule positive sur 5 000 cellules T CD8 totales peut être détectée.

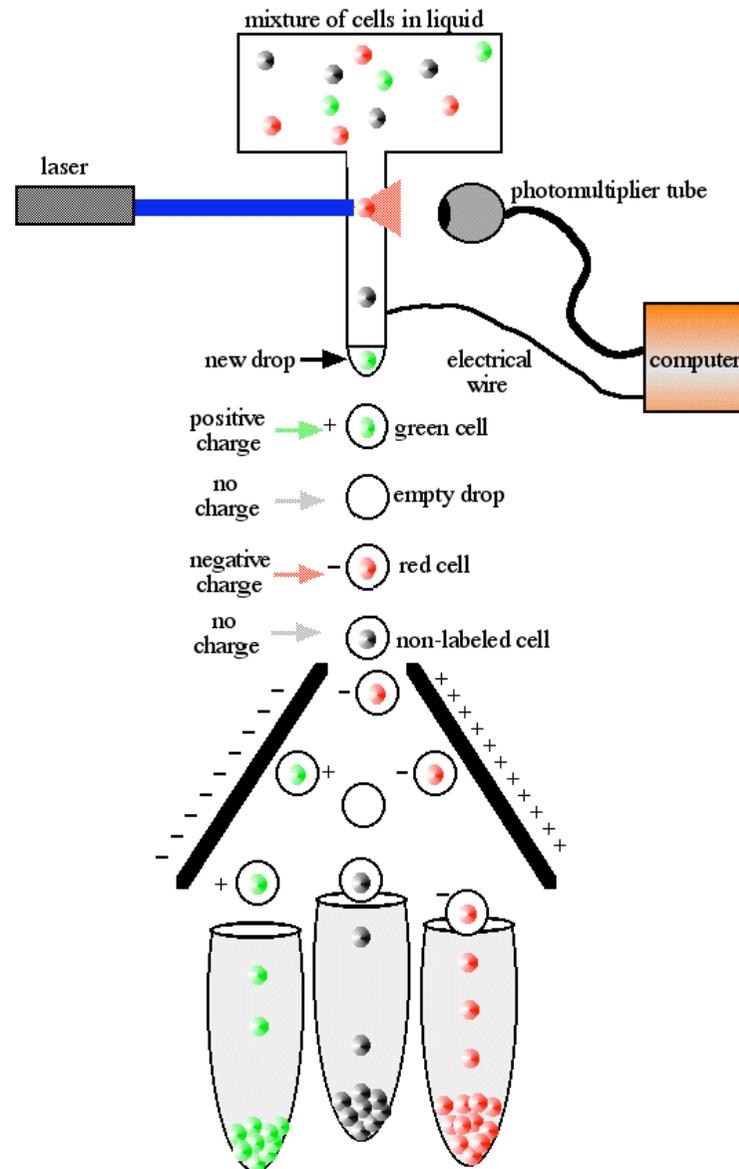
Tétramères :



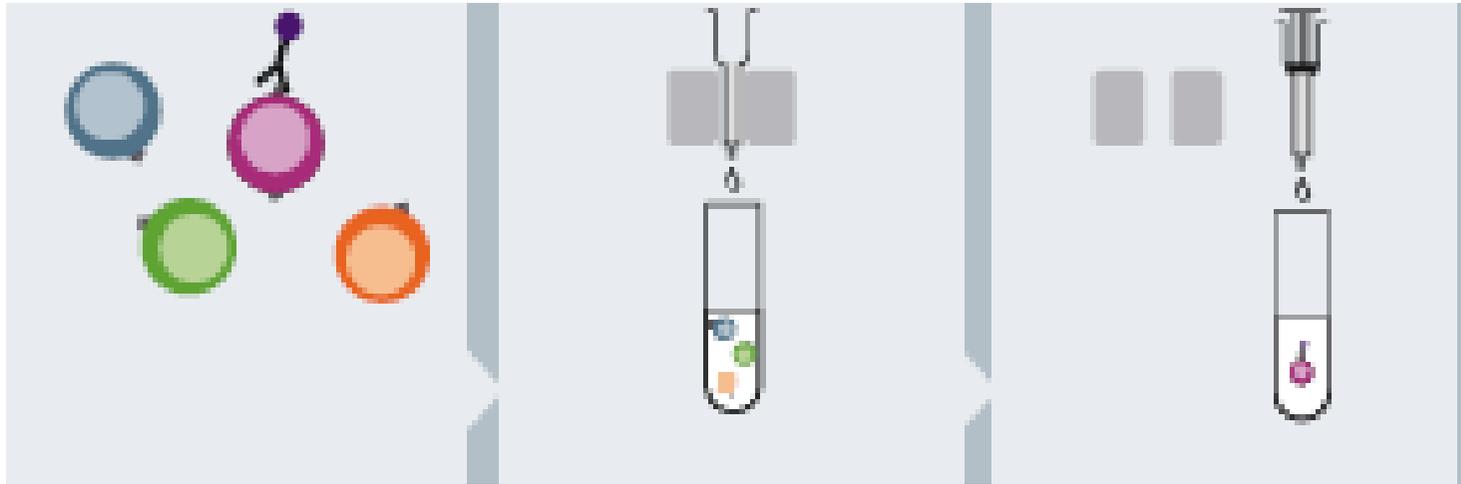
Pentamères :



Cytométrie en flux : Tri cellulaire



Tri cellulaire par tri magnétique



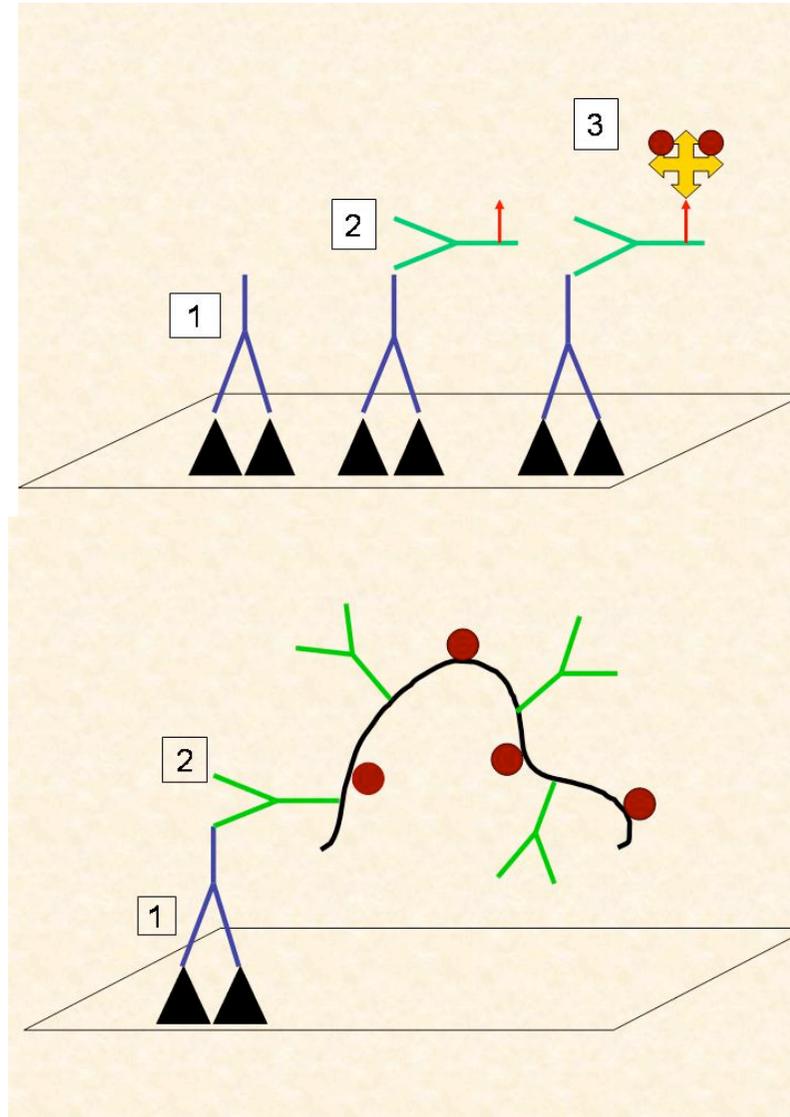
A MiniMACS™ Separation Unit holds one MS Column.



A MiniMACS™ Separation Unit shown with an LD Column.



Immunohistochimie



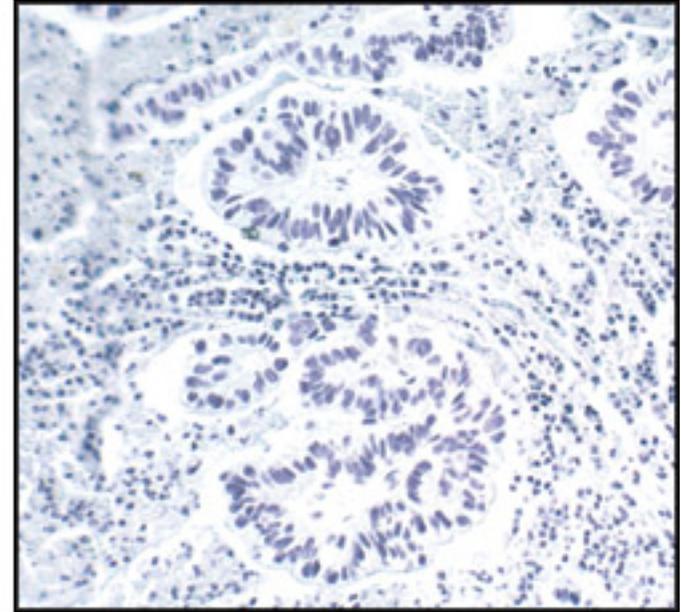
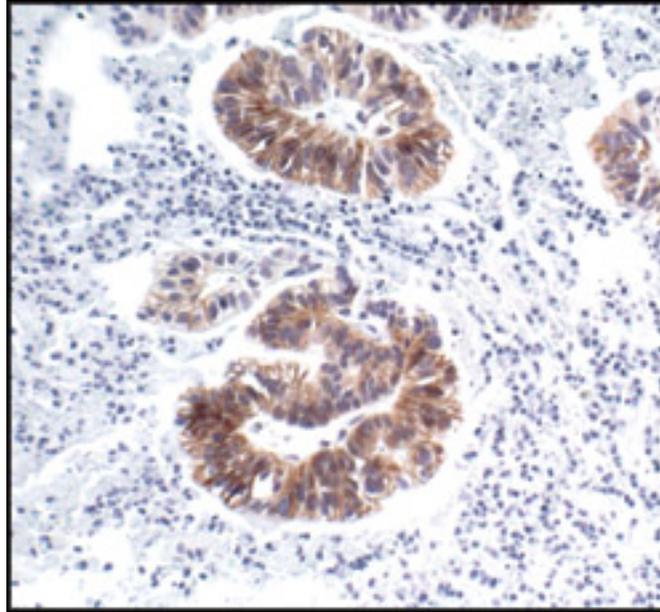
Immunohistochimie

Méthodes de conservation: avantages et inconvénients

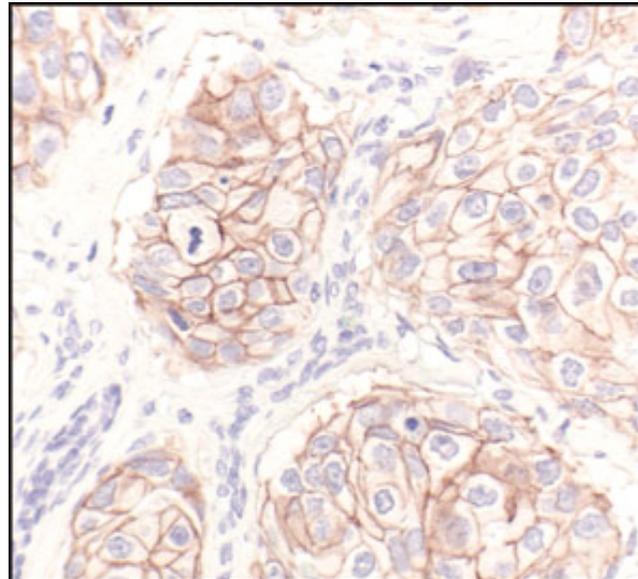
| | état du tissu | morphologie | système de stockage | antigènes | traitement du spécimen |
|-------------------|--|----------------------|---|---|------------------------|
| paraffine | fixation du tissu dans un agent fixateur | très bien conservée | à température pièce donc aucun équipement spécial | certains sont détruits et la majorité demande un démasquage | à température ambiante |
| Résine OCT | nécessite un tissu frais | moins bien conservée | à -80°C donc demande un équipement spécial | aucune destruction des antigènes | à -20°C (cryostat) |

Immunohistochimie

**Adenocarcinome
rénal**



**Carcinome sein
(anti-Her2/ErbB2)**

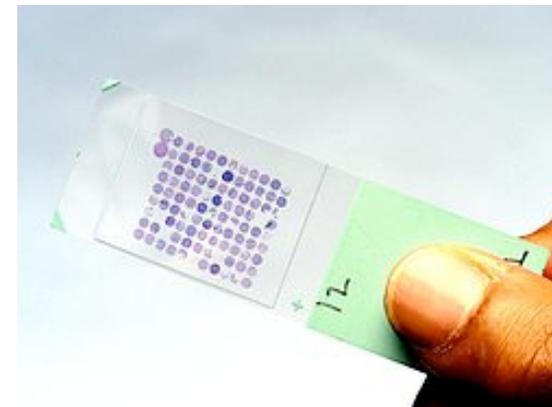
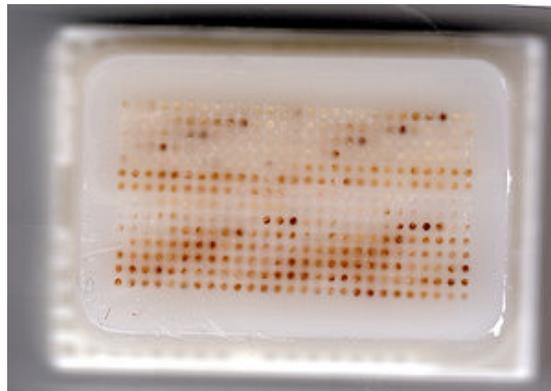


Immunohistochimie

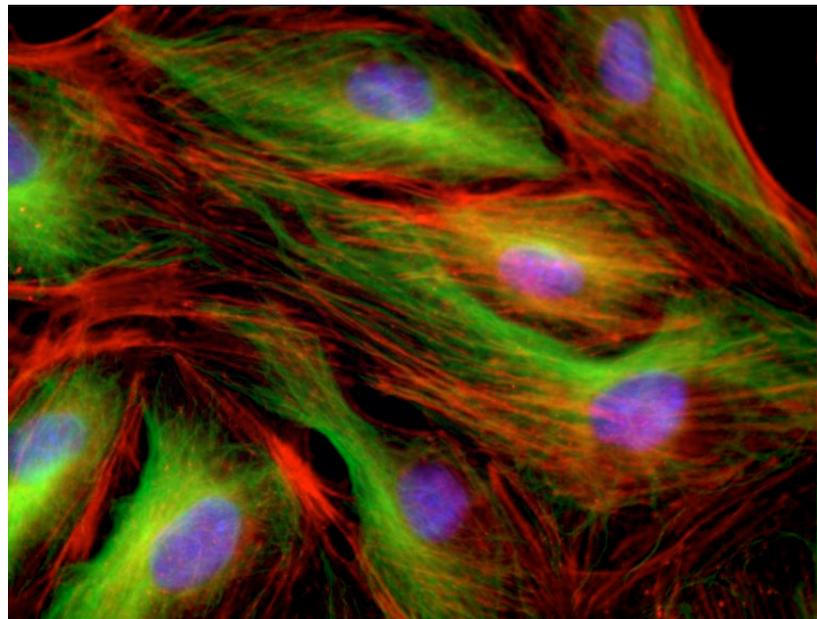
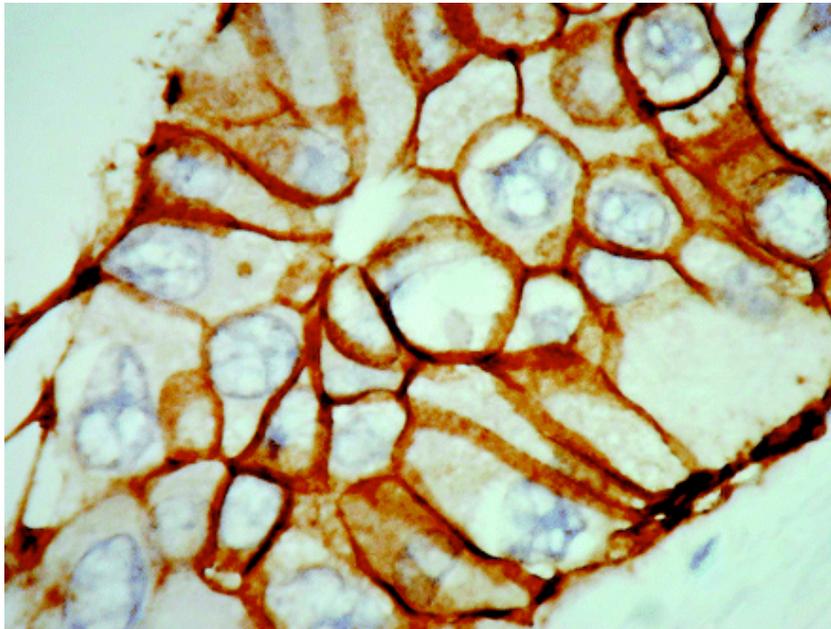
Immunohistochimie à « haut débit » : les Tissue Micro Array

Fragments de tissus d'environ 0,6 mm de diamètre obtenus de régions d'intérêt de tissus inclus en paraffine (biopsies, échantillons de tumeurs)

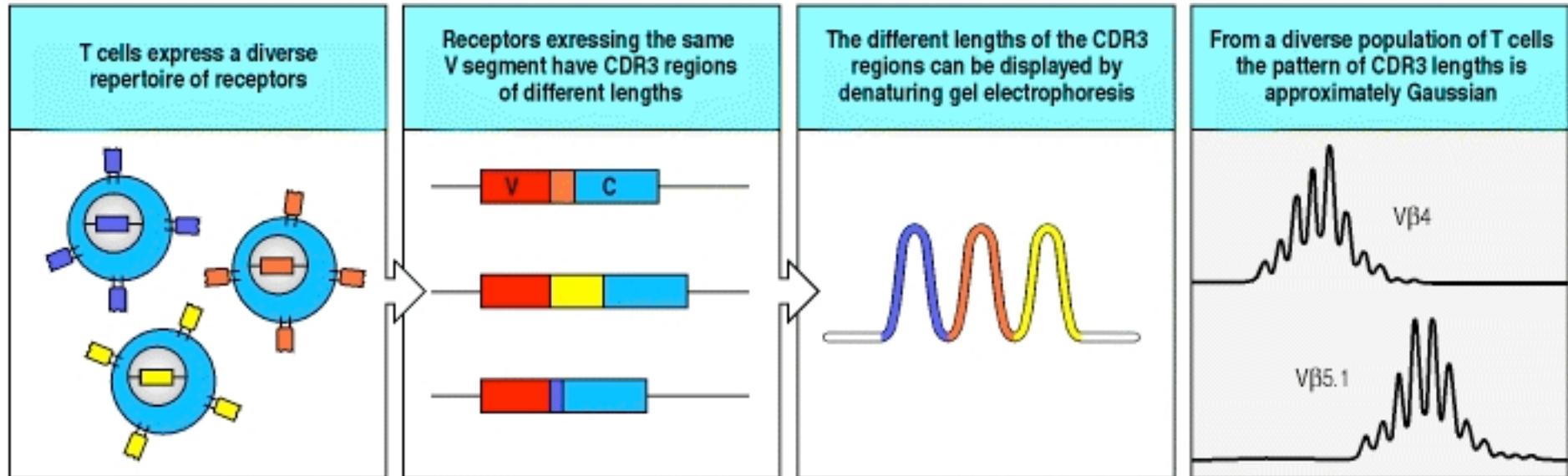
- Ces fragments sont insérés et espacés de façon précise dans un bloc de paraffine selon un pattern de spots particulier
- Des sections de ce bloc sont coupées grâce à un microtome puis montées sur lame pour analyse



Immunohistochimie et immunofluorescence



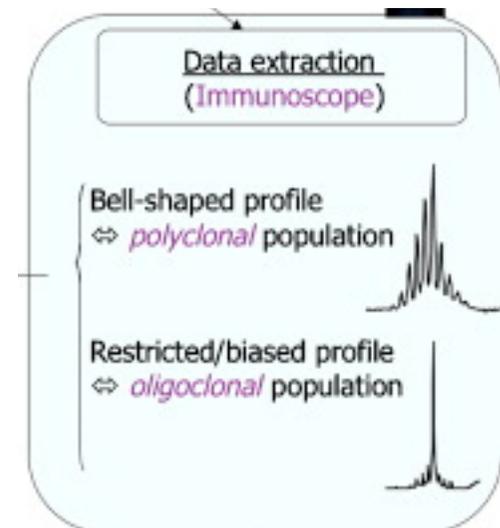
Analyse des répertoires: Immunoscope



BV CDR3 BJ BC

 PCR serials

Electrophoresis → Size profiles
 (Sequencing automat)



Pannetier et coll., 1995 Trends Immunol

Analyse des voies de signalisation

- Cytométrie / Imagerie
- Electrophorèse/ Western blot (immunoprécipitations)
- Génomique / Protéomique

Activation / Fonction

Production de cytokines

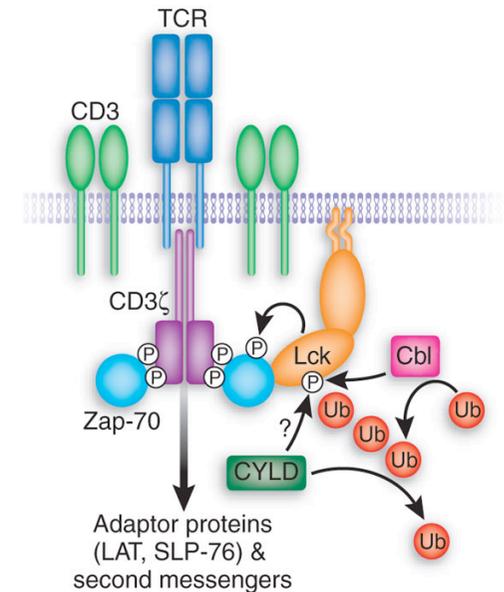
- Détection de cytokines grâce à l'analyse de la prolifération cellulaire
- ELISA / RIA
- ELISPOT
- Facs intracellulaire

Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

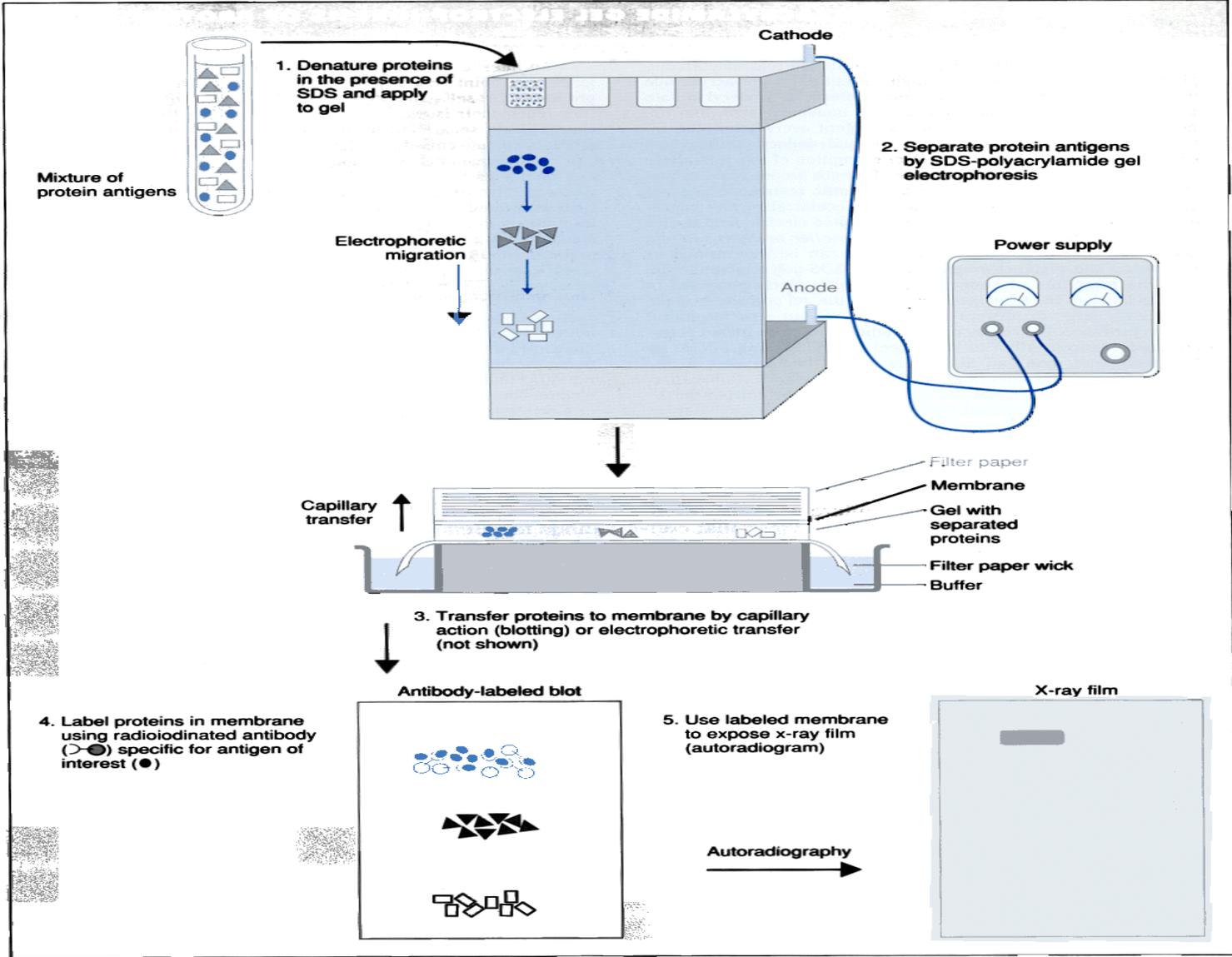
- Cytométrie de flux : BrdU, EdU, CFSE, Annexin V
- Imagerie : DAPI
- Thymidine tritiée

Fonctions effectrices

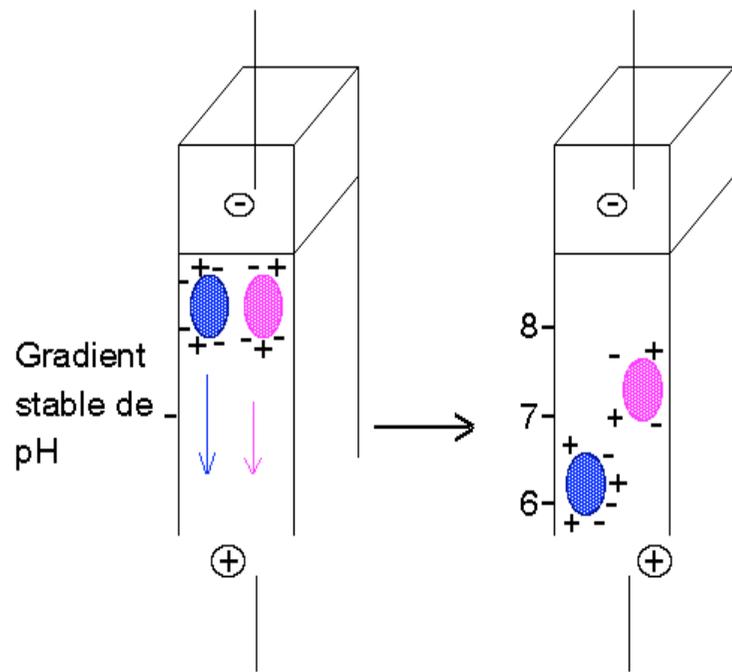
- Cytotoxicité: 51Cr, FACS, LDH
- Réponse anticorps: ELISPOT B, ELISA immunoglobulines sériques, tests hémataglutination



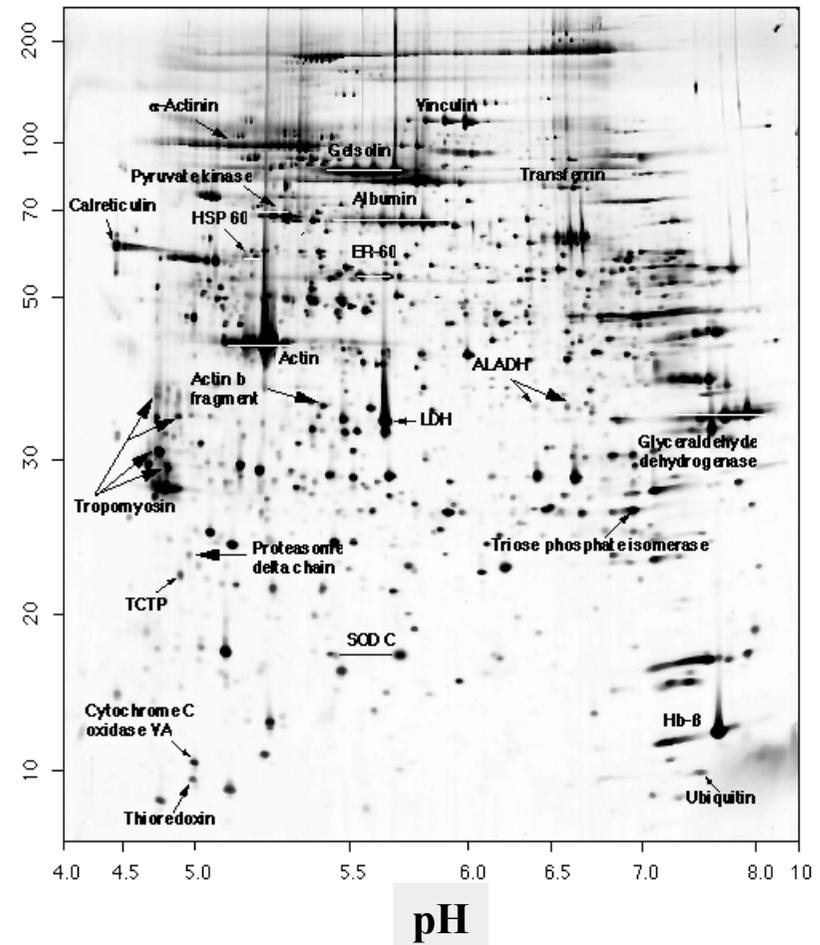
Le Western Blot



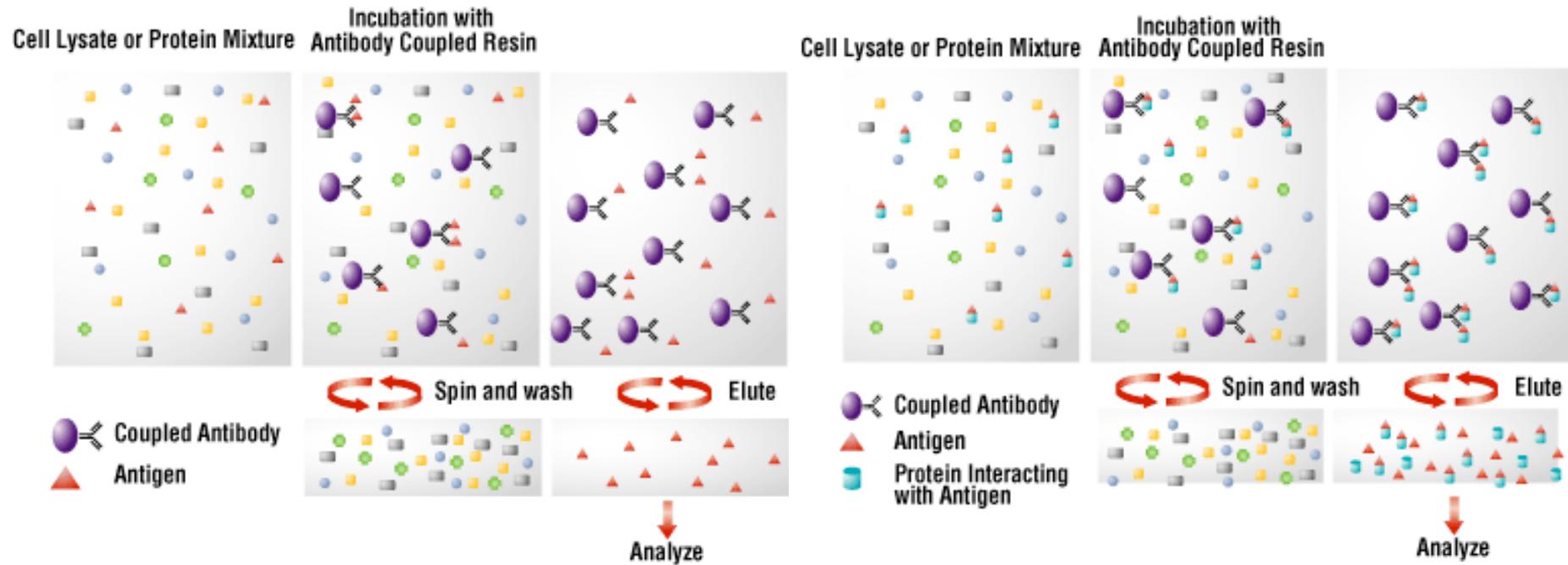
Electrophorèse à 2D



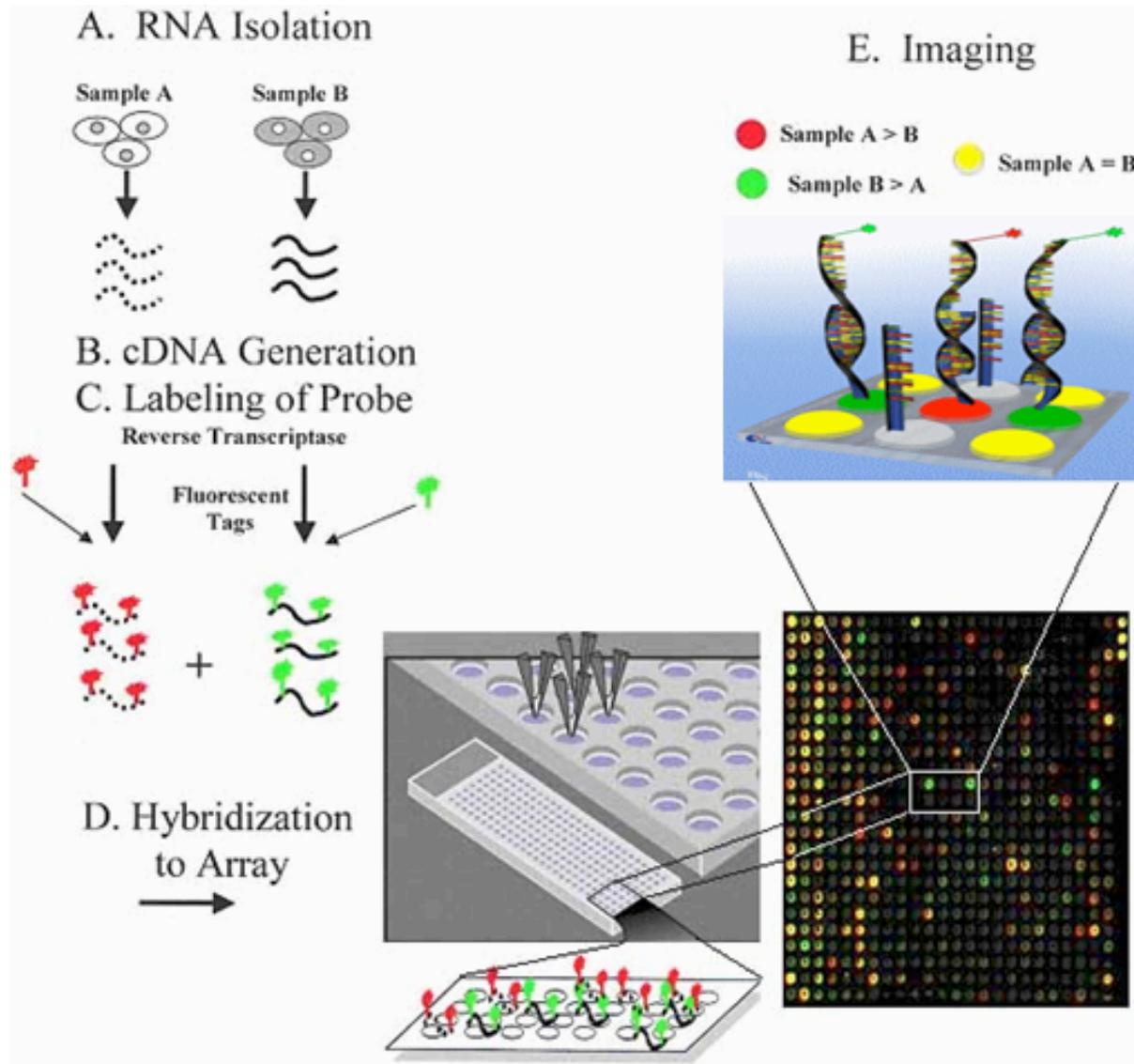
Molecular weight kDa



L'immunoprécipitation



Les Puces à ADN



Analyse des voies de signalisation

- Cytométrie / Imagerie
- Electrophorèse/ Western blot (immunoprécipitations)
- Protéomique
- Génomique

Production de cytokines

- ELISA / RIA
- ELISPOT
- Facs intracellulaire

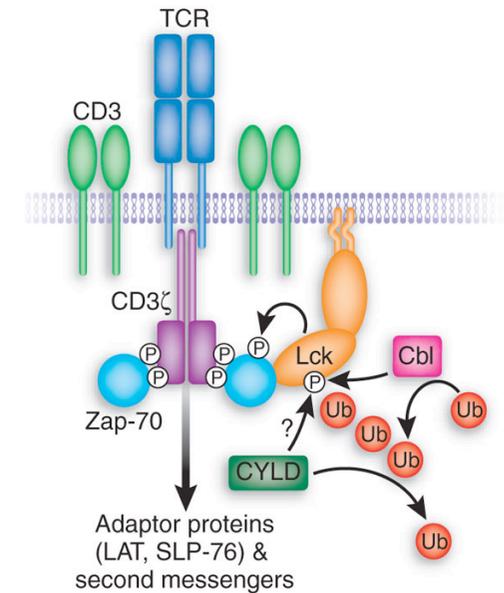
Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

- Cytométrie de flux : BrdU, EdU, CFSE, Annexin V
- Imagerie : DAPI
- Thymidine tritiée

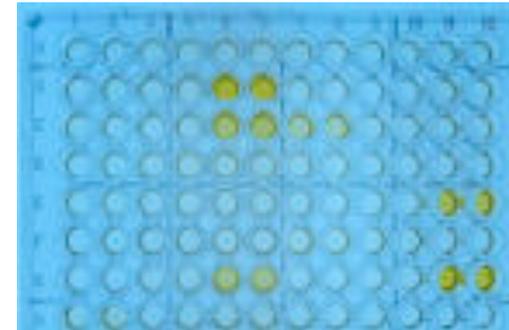
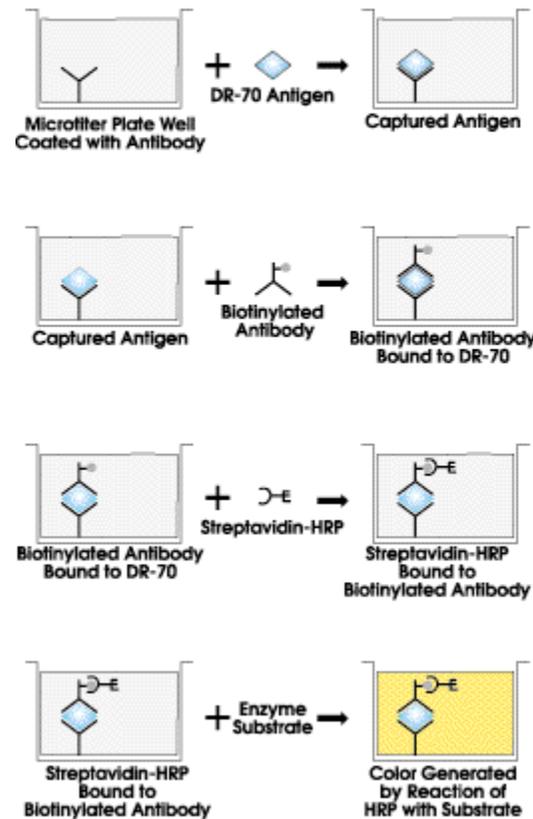
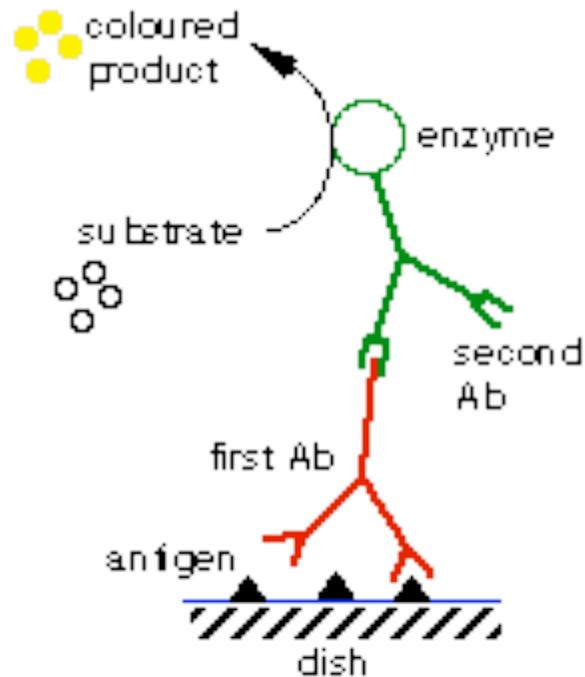
Fonctions effectrices

- Cytotoxicité: 51Cr, FACS, LDH
- Réponse anticorps: ELISPOT B, ELISA immunoglobulines sériques, tests hémaglutination

Activation / Fonction

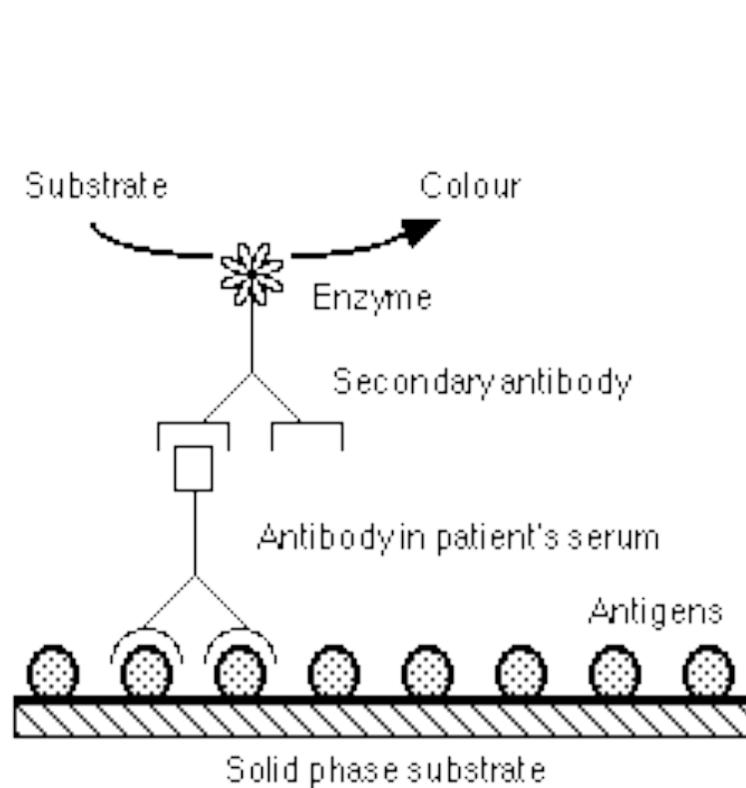


Elisa: Enzyme-linked immunosorbent assay

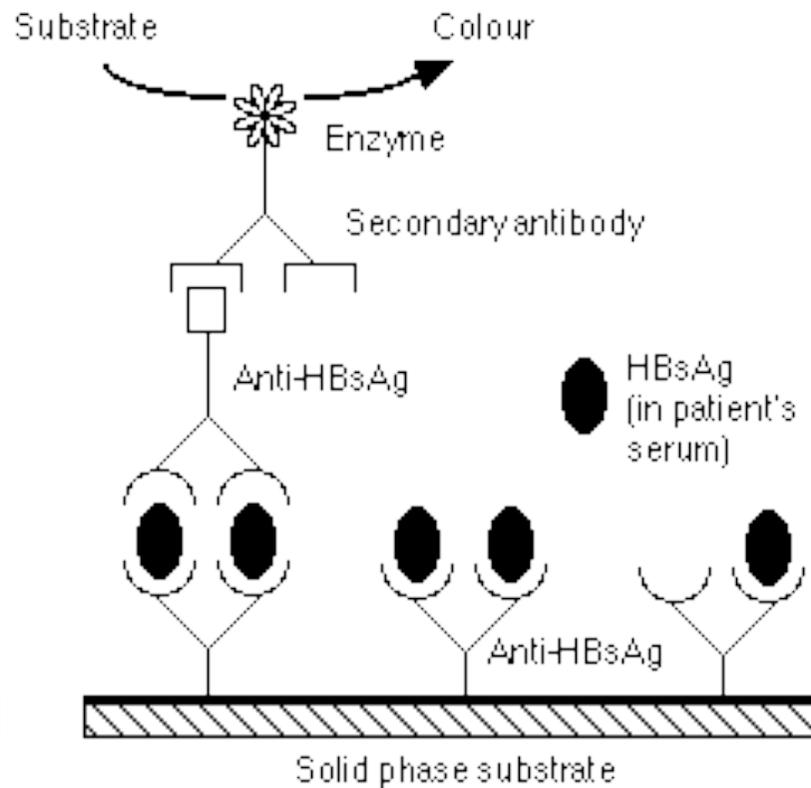


Elisa Sandwich

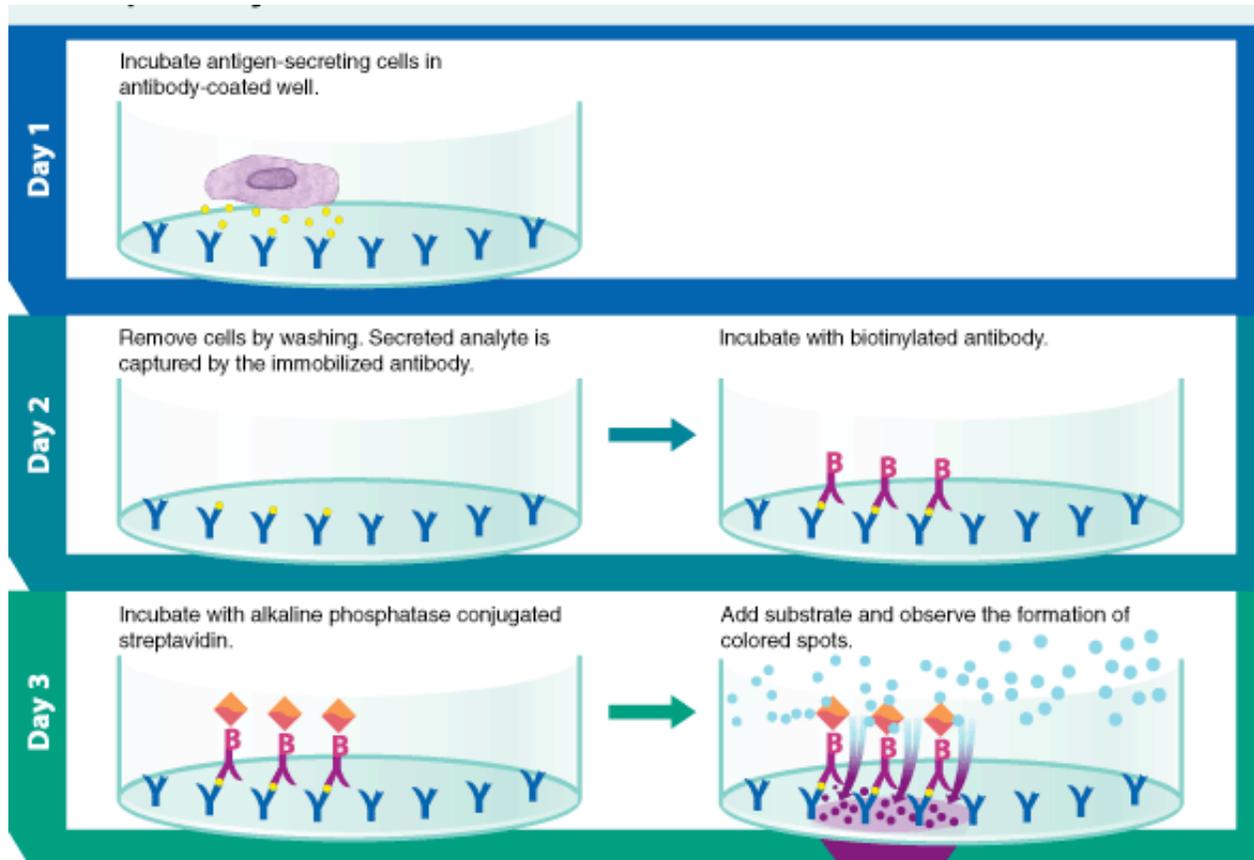
Direct ELISA



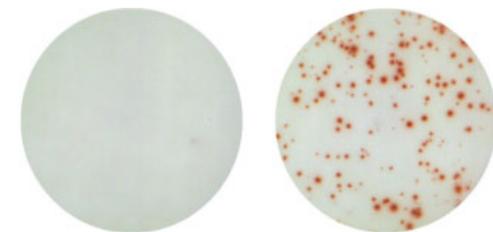
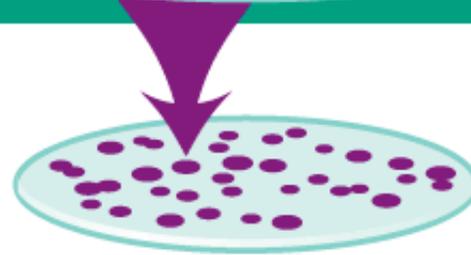
Sandwich ELISA



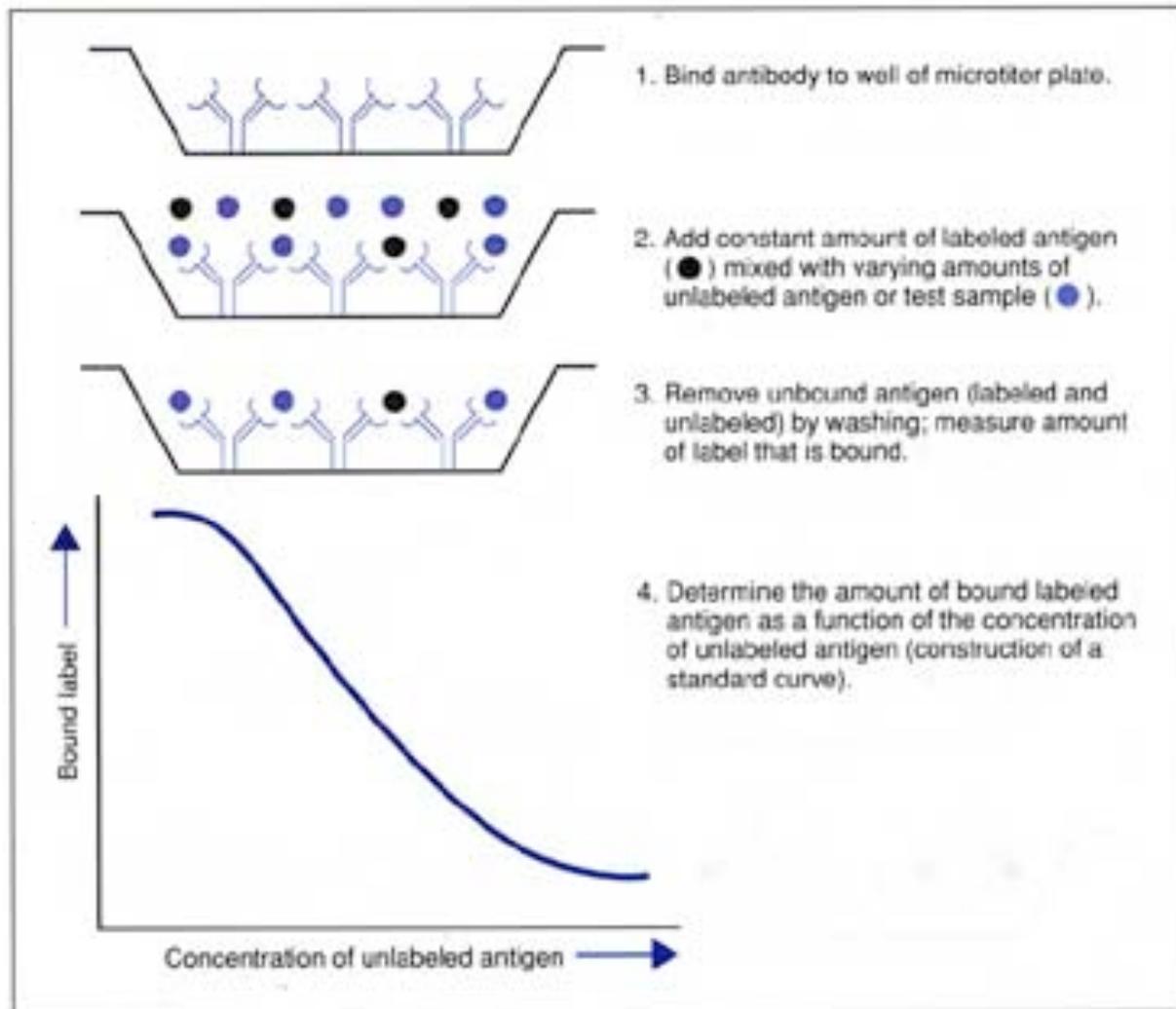
ELISPOT



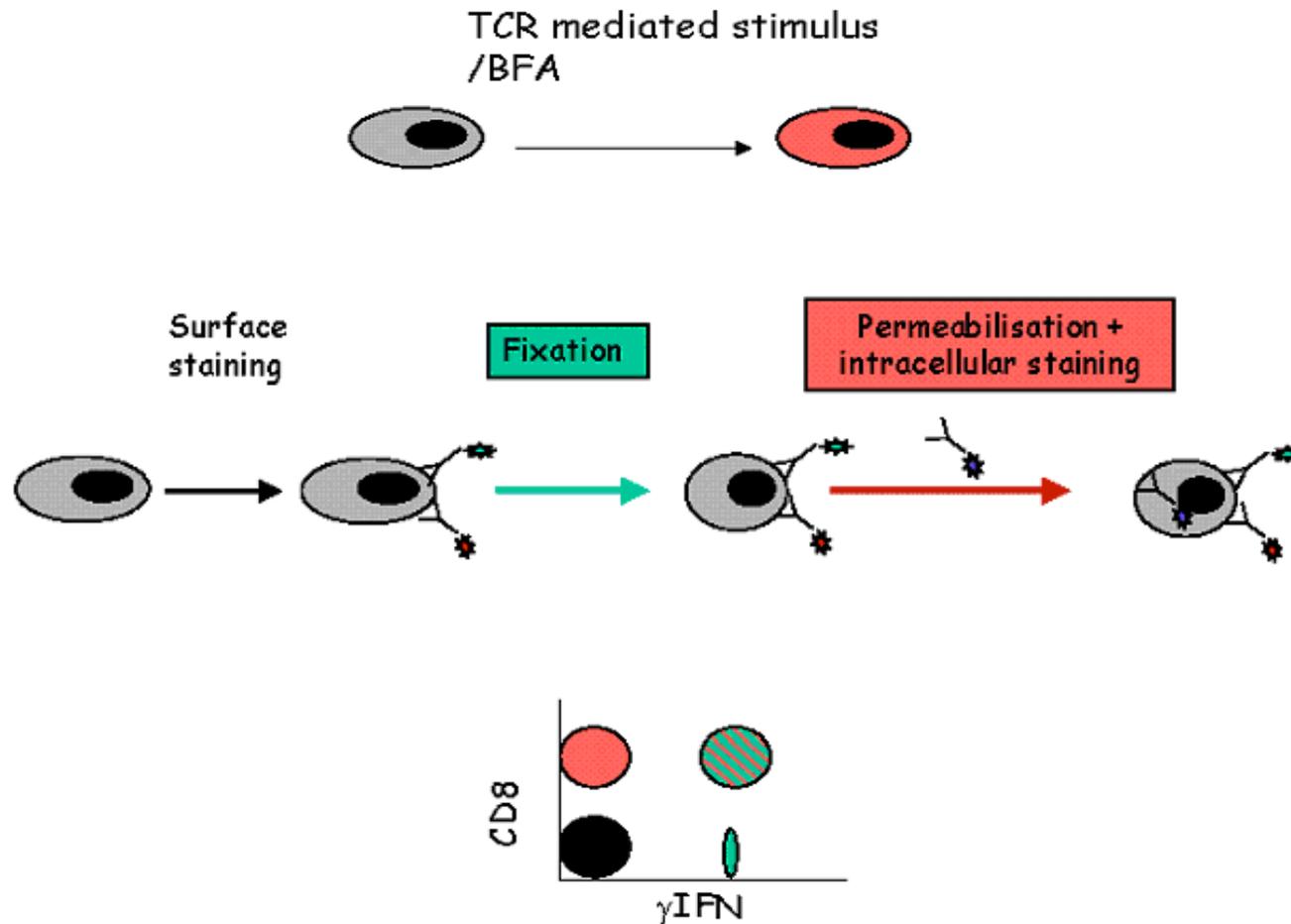
- Legend**
- Antibody
 - Secreted Analyte
 - Biotinylated Antibody
 - Alkaline phosphatase Conjugated Streptavidin
 - Color Product
 - BCIP/NBT



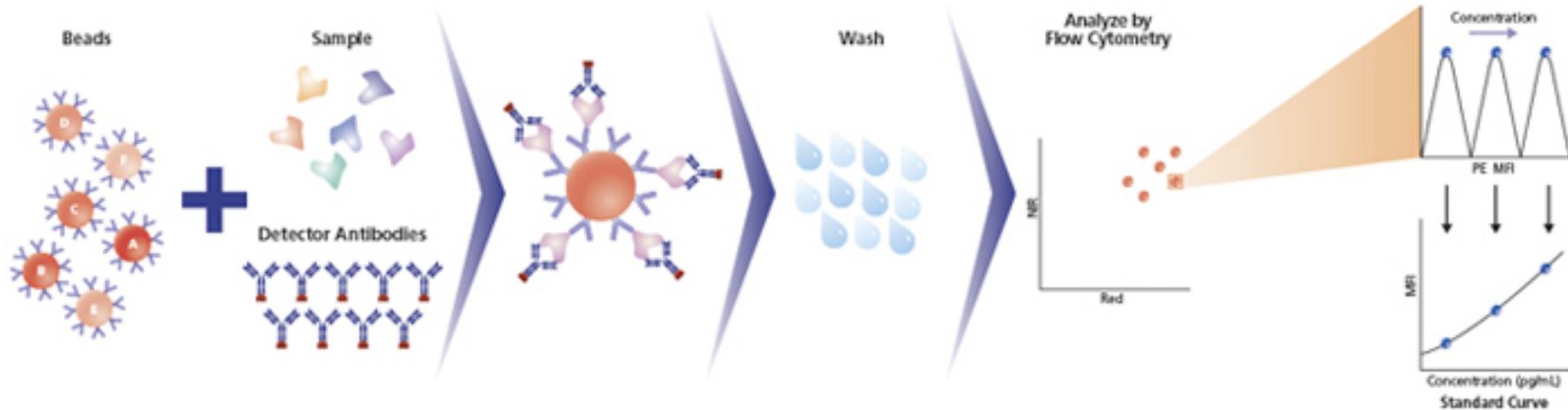
RIA (Radio Immunoassay)



Cytométrie en flux pour la détection de cytokines intracellulaires



Cytométrie en flux pour la détection de cytokines dans le surnageant (Cytometric Beads Array)



Each capture bead in the array has a unique fluorescence intensity and is coated with a capture antibody specific for a single analyte. A combination of different beads is mixed with a sample or standard and a mixture of detection antibodies that are conjugated to a reporter molecule (PE). Following incubation and subsequent washing, the samples are acquired on a flow cytometer. The FCAP Array analysis software gates on each individual bead population and determines the median fluorescence intensity (MFI) for each analyte in the array. It generates a standard curve and performs interpolation of sample concentrations compared to the standard curve and generates an analysis report in tabular format.

Cytométrie en flux pour la détection de cytokines dans le surnageant (Cytometric Beads Array)

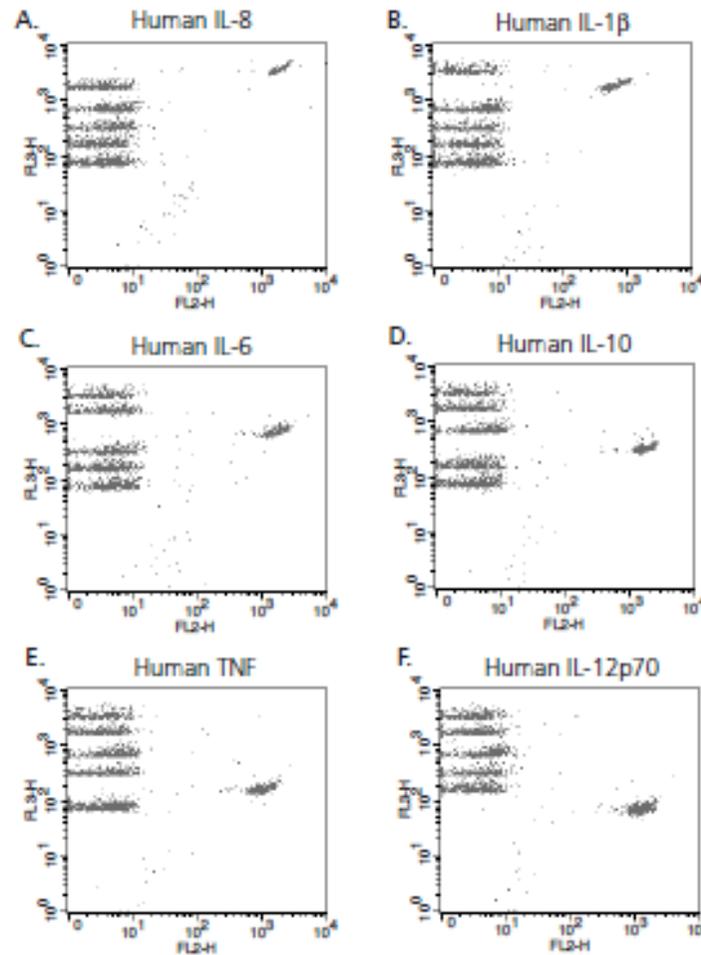


Figure 8. BD CellQuest™ Data for Detection of Individual Cytokines

Analyse des voies de signalisation

- Cytométrie / Imagerie
- Electrophorèse/ Western blot (immunoprécipitations)
- Protéomique
- Génomique

Production de cytokines

- ELISA / RIA
- ELISPOT
- Facs intracellulaire

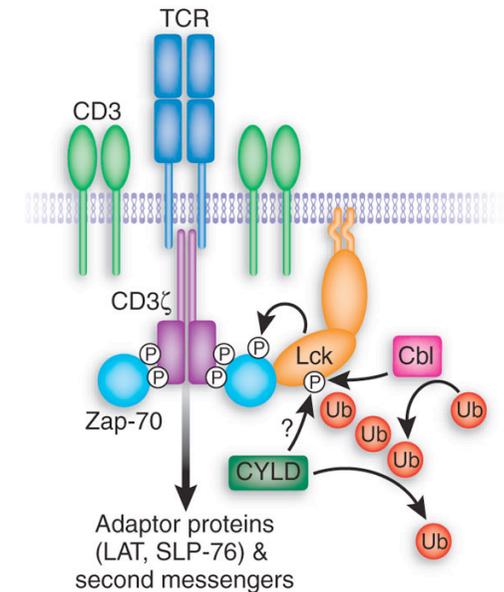
Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

- Cytométrie en flux : BrdU, EdU, CFSE, Annexin V
- Thymidine tritiée

Fonctions effectrices

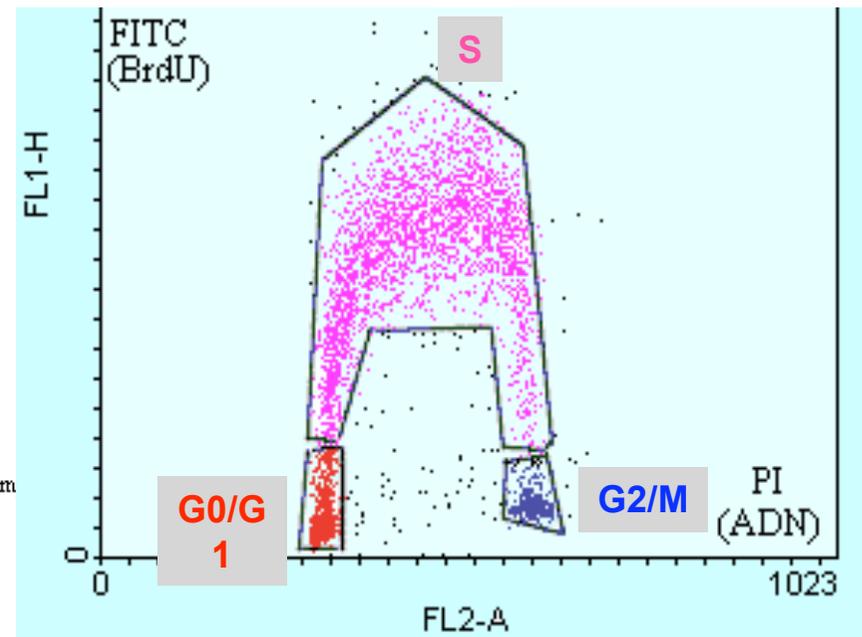
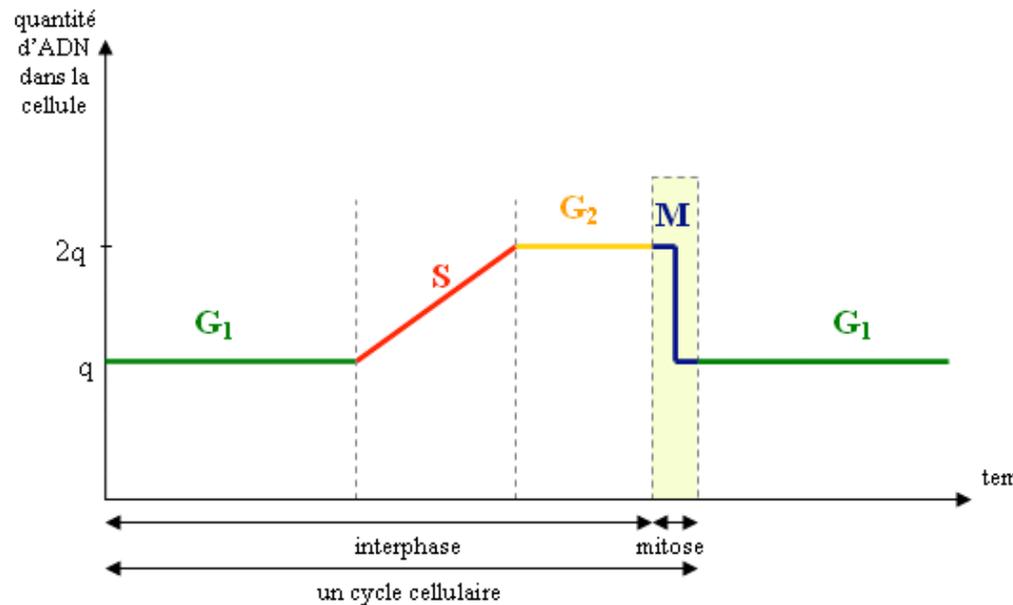
- Cytotoxicité: 51Cr
- Réponse anticorps: ELISPOT B, ELISA immunoglobulines sériques

Activation / Fonction



Détection des acides nucléiques et analyse du cycle cellulaire

- **Iodure de propidium** : agent intercalent fluorescent de l'ADN (ex: 305 nm ou 538 nm/ em: 617 nm)
- **DAPI** (4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole) : liaison a l'ADN
- **BrdU** analogue de la thymidine, s'incorpore dans les cellules en division

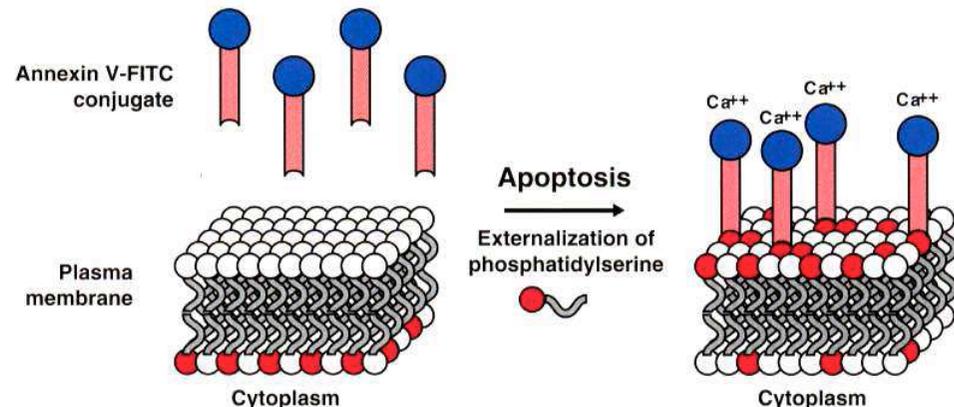
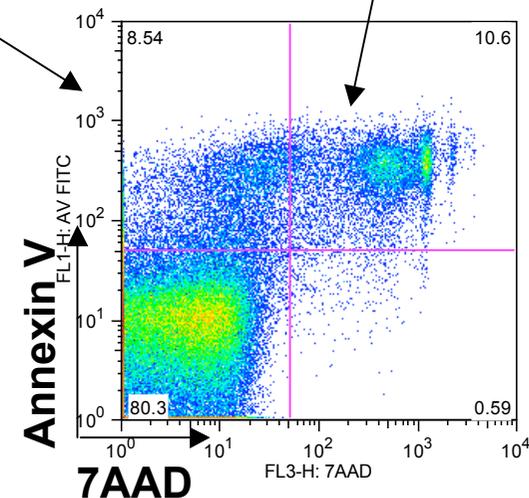


Analyse de la viabilité / apoptose/ nécrose

- **Iodure de propidium** : agent intercalent fluorescent de l'ADN, marque le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (nécrose)
- **Annexin V** : protéine cellulaire conjuguée à un fluorochrome, marque les phosphatidyl serine (PS) transloquées à la mb lors des événement précoce de l'apoptose
- **7-AAD** (7-Amino-actinomycin D) agent intercalent fluorescent de l'ADN, pénètre la membrane de cellules mortes ou mourantes.
- **Hoechst**, agent intercalant fluorescent de l'ADN pénètre la membrane de cellules mortes ou mourantes
- **Tunel** (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) : ADN fragmenté, détecté par réaction de la TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) pour transférer des biotin-dUTP à l'ADN clivé

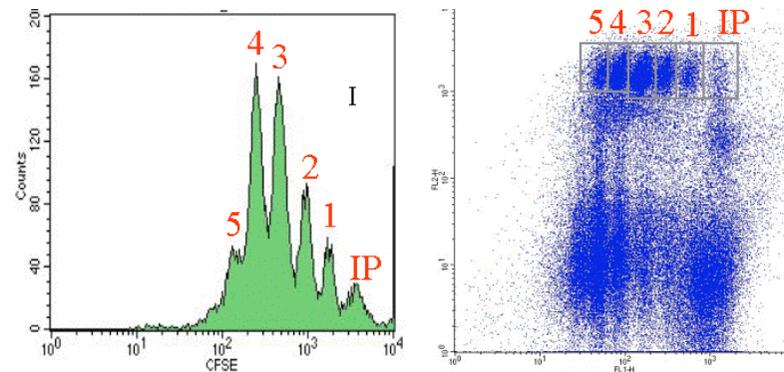
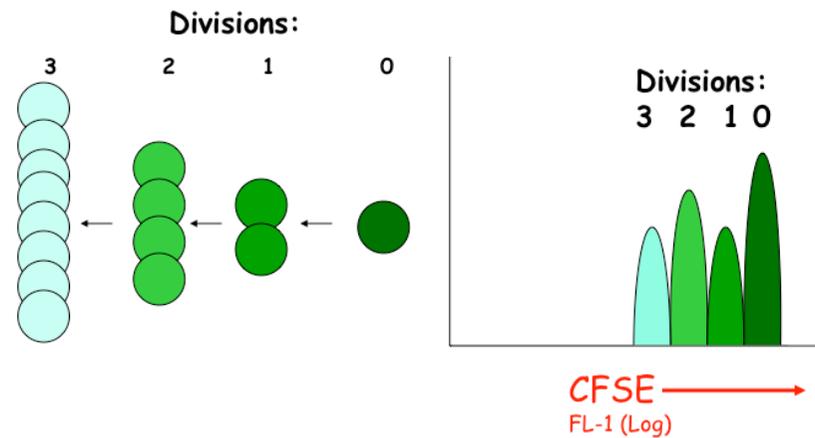
*Apoptose tardive
et/ou nécrose*

Apoptose précoce

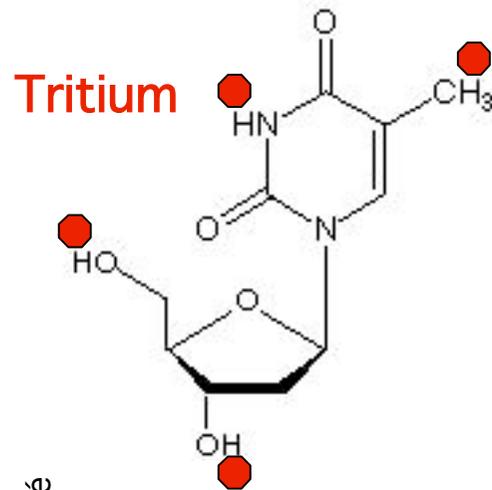


Analyse de la prolifération cellulaire par la cytométrie en flux

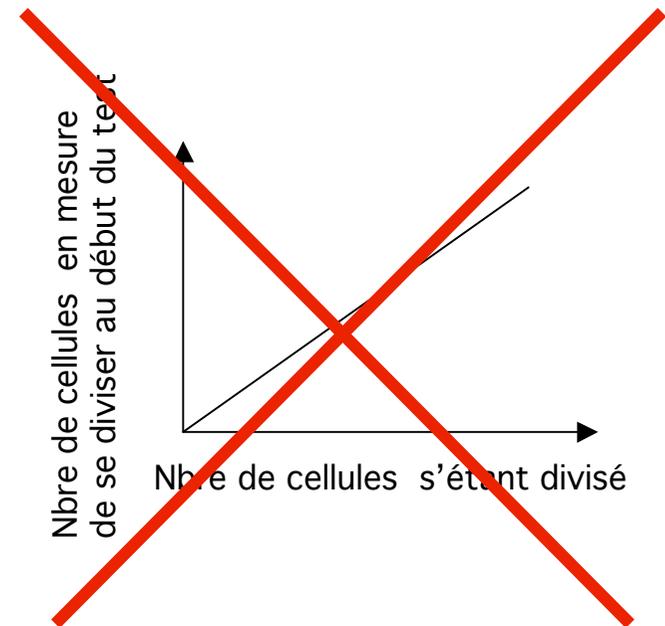
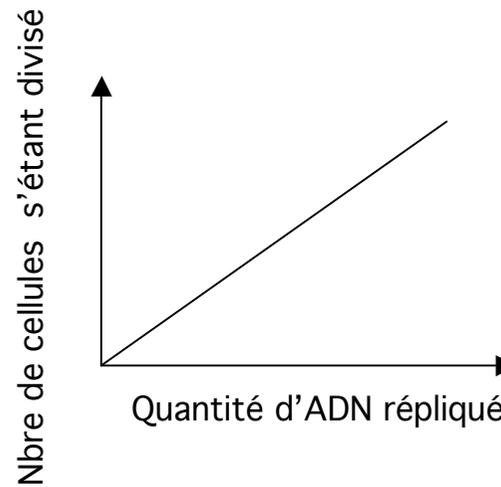
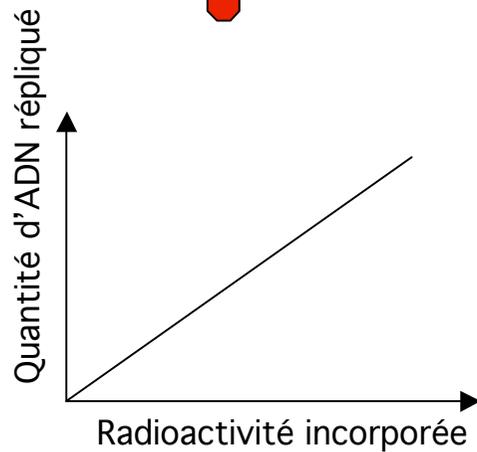
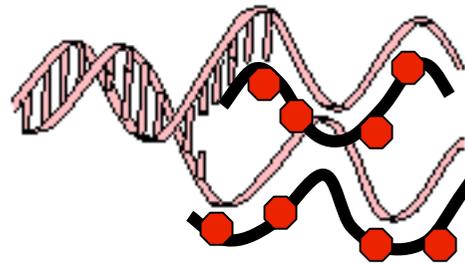
- CFSE or CFDA-SE: carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester.
- Succinimidyl ester binds to free amines, resulting in long lived fluorescent adducts.



Analyse de la prolifération cellulaire : thymidine tritiée



Incorporation de thymidine radiomarquée



Analyse des voies de signalisation

- Cytométrie / Imagerie
- Electrophorèse/ Western blot (immunoprécipitations)
- Protéomique
- Génomique

Production de cytokines

- ELISA / RIA
- ELISPOT
- Facs intracellulaire

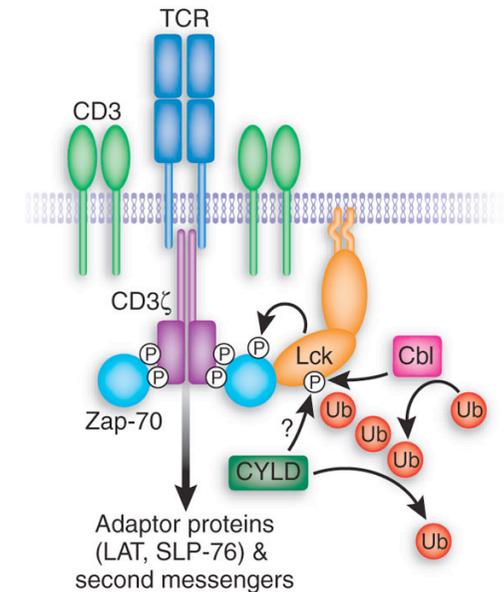
Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

- Cytométrie en flux : BrdU, EdU, CFSE, Annexin V
- Thymidine tritiée

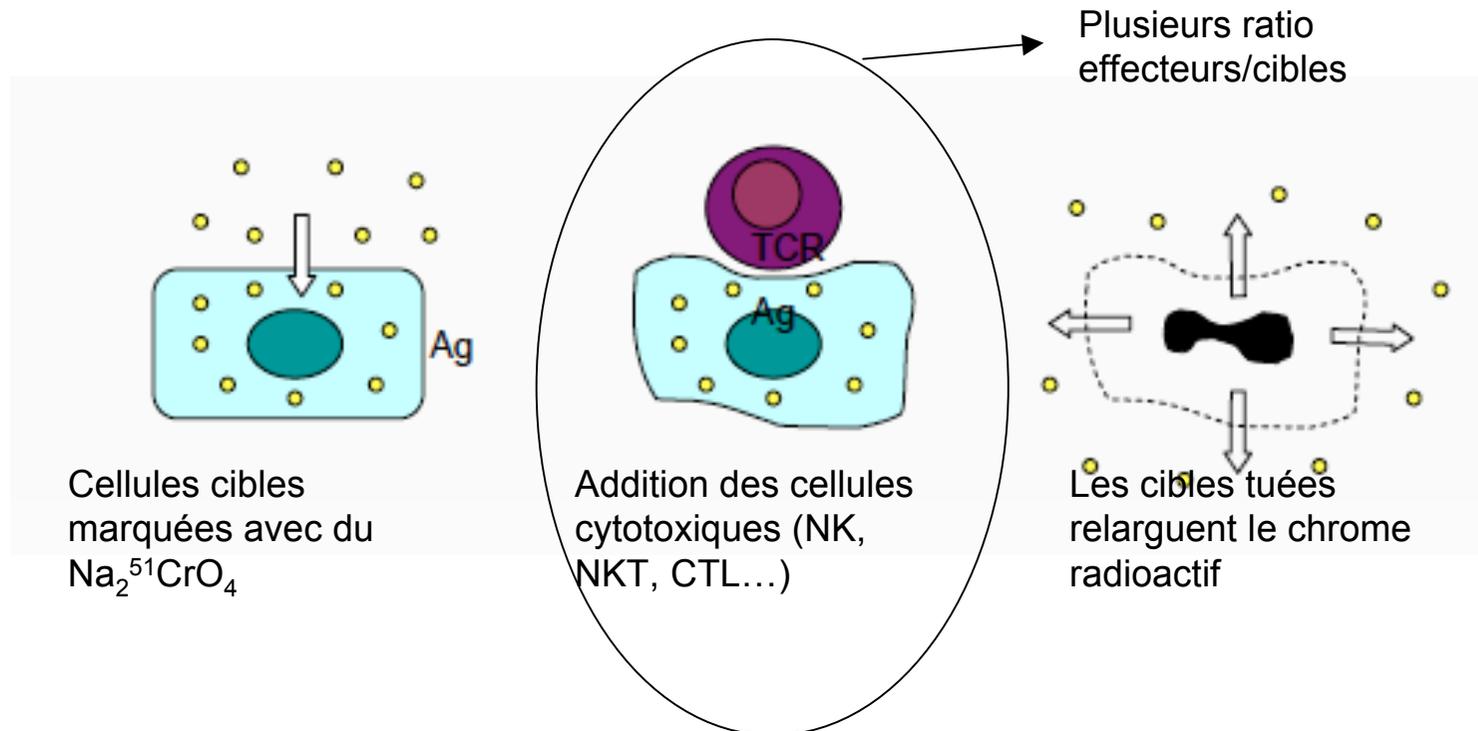
Fonctions effectrices

- Cytotoxicité
- Réponse anticorps: ELISPOT B, ELISA immunoglobulines sériques

Activation / Fonction



Analyse de la cytotoxicité



Autres techniques de l'analyse de la cytotoxicité:

- Cytométrie en flux: CD107 / Granzyme / Perforine / marquage cellules cible au CFSE + AV + 7AAD
- ELISPOT: Perforine / Granzyme



Contexte physiopathologique

Modèles de souris

- Les lignées de souris consanguines
- Les souris immunodéficientes
- Les transferts adoptifs
- Les souris humanisées
- Les souris transgéniques
- Les souris « knock-out »

Les lignées de souris consanguines

- Obtenues par > 20 croisements frère-sœur (croisements consanguins)
- Le génome devient peu à peu entièrement homozygote
- Populations génétiquement homogènes et (assez) stables dans le temps
- Tous les individus sont identiques (un couple suffit à définir la lignée)
- Pas de variance phénotypique entre individus d'origine génétique (important pour la mise en évidence de l'effet d'un traitement)
- Plusieurs centaines de lignées consanguines disponibles
- Certaines lignées de souris consanguines ont des propriétés particulières (exemple les souris NOD)

Les lignées de souris consanguines

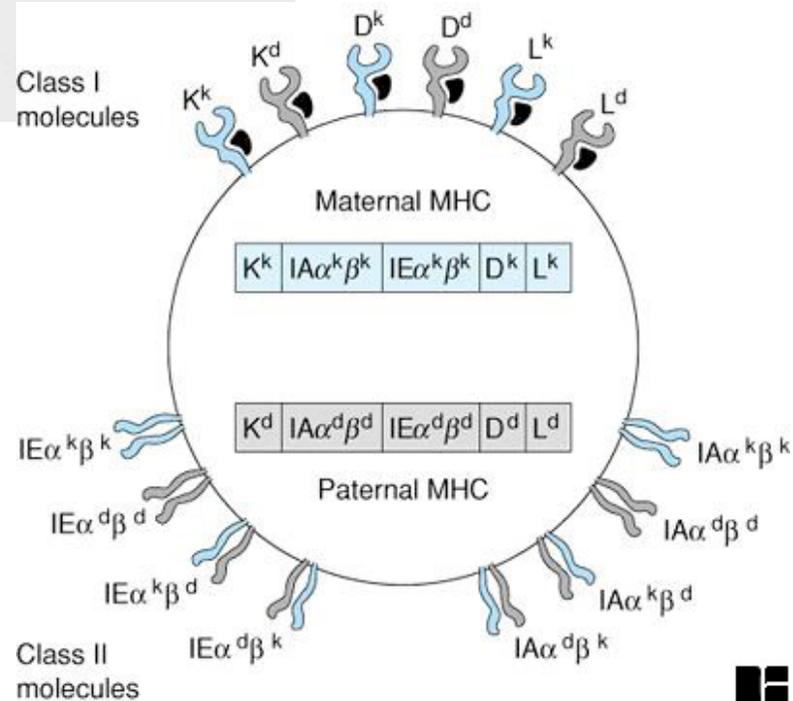
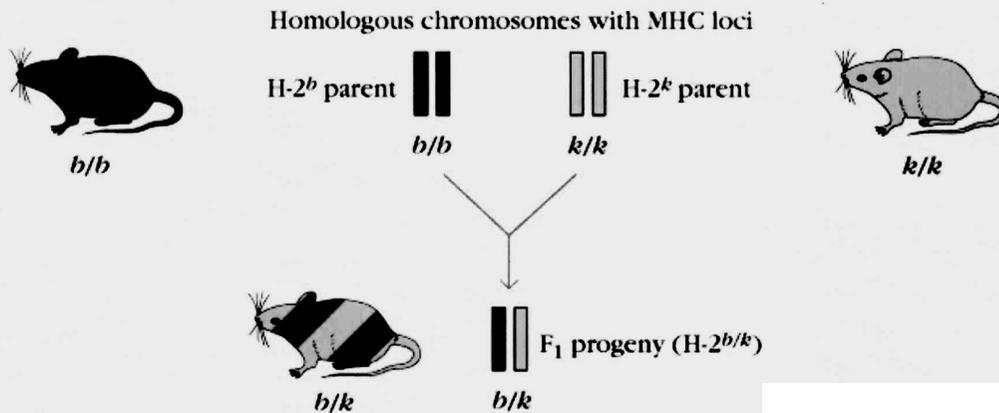
Mouse H-2 complex

| Complex | H-2 | | | | | | |
|---------------|------|---------------------|---------------------|-------------|--|-------------------------------|--------------|
| MHC class | I | II | | III | | I | |
| Region | K | IA | IE | S | | D | |
| Gene products | H-2K | IA $\alpha\beta$ | IE $\alpha\beta$ | C' proteins | | TNF- α TNF- β | H-2D H-2L |

| Souche prototype | Autres souches avec le même haplotype | Haplotype | Allèles H-2 | | | |
|------------------|---------------------------------------|-----------|-------------|----|----|---|
| | | | K | IA | IE | D |
| CBA | AKR, C3H, B10.BR, C57BR | k | k | k | k | k |
| DBA/2 | BALB/c, NZB, SEA, YBR | d | d | d | d | d |
| C57BL/10 (B10) | C57BL/6, C57L, C3H.SW, LP, 129 | b | b | b | b | b |
| A | A/He, A/Sn, A/Wy, B10.A | a | k | k | k | d |
| A.SW | B10.S, SJL | s | s | s | s | s |
| A.TL | | tl | s | k | k | d |
| DBA/1 | STOLI, B10.Q, BDP | q | q | q | q | q |

Les lignées de souris consanguines

(a) Mating of inbred mouse strains with different MHC haplotypes



Les lignées de souris immunodéficientes

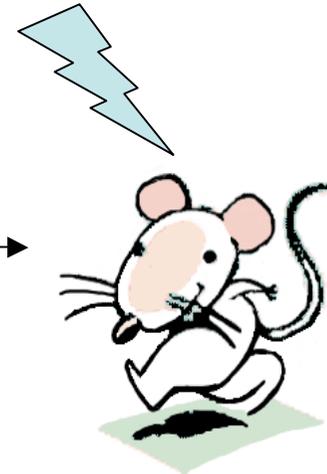
- Souris Nude: absence de thymus, absence de LT thymo-dépendants
- Souris SCID (« Severe Combined Immunodeficiency »): absence de LT et LB matures
- Souris NOD: diabète, anomalie IFN, anomalie activité NK
- Souris Beige (bg) : anomalie des macrophages et neutrophiles, anomalie NK et CTL
- Souris RAG^{-/-}: absence de LT et LB matures
- Souris NOD-SCID-IL2R γ ^{-/-}: absence LB, LT, NK

Les transferts adoptifs



Cellules spléniques ou moelle osseuse
souris donneuse (souris transgénique,
souris knock out, souris traitée...)

Irradiation



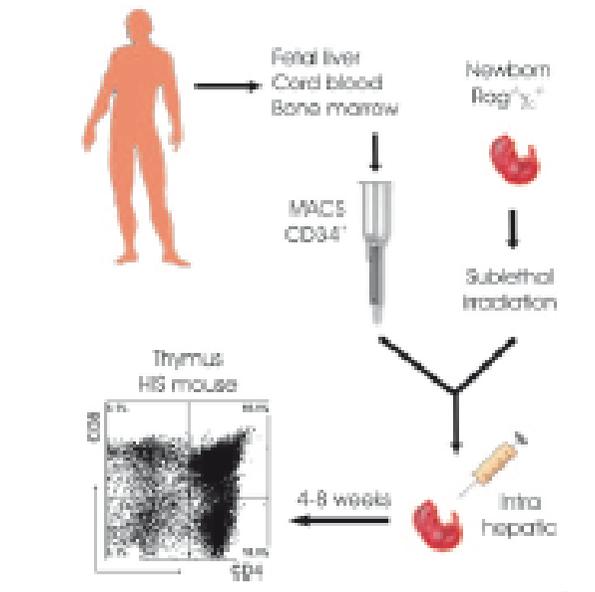
Souris receveuse

Analyse de la réponse immunitaire,
des fonctions des cellules
transférées...

Les souris humanisées

Table 2: Defining Characteristics of Humanized Mouse Models

| Model | Human Cells Engrafted | Irradiation | Demonstrated Human Cells | Humanized Tissues | Length of Detection |
|---|---|-------------|---|--|-----------------------|
| SCID-hu Thy/Liv | Fetal thymus and liver | No | D4/CD8 DP, SP, DN, T cells in peripheral blood | Peripheral blood, fused thy/liv organ | 6 to \geq 12 months |
| hu-PBL SCID | IP PBMCs | No | CD4/CD8 SP T cells, CD3+ T cells, monocytes, NK cells, and B cells | Lymph nodes, spleen, liver, bone marrow | 6 months |
| NOD SCID BLT | Fetal thymus and liver, fetal liver tissue-derived CD34+ stem cells | Yes | Mature T and B lymphocytes, monocytes, macrophages, and dendritic cells | Peripheral blood, liver, lung, vagina, rectum, and GALT | 22 weeks |
| NOD SCID IL2 γ ^{-/-} | CD34+ human cord blood | Yes/No | Myelomonocytes, dendritic cells, erythrocytes, platelets, and lymphocytes | Peripheral blood, spleen, and bone marrow | > 300 days |
| Rag2 ^{-/-} γ c ^{-/-} | CD34+ human cord blood | Yes | Dendritic, T, and B cells | Peripheral blood, liver, spleen, bone marrow, vagina, GALT | 190 days |
| NOD SCID β 2m | Transformed HTLV-I cell lines, PBMCs from HTLV-I infected patients | Yes/No | CD45+, CD3+, T cells | Peripheral blood, spleen, lymph node, bone marrow | 4 to 12 weeks |
| NOD SCID IL2 γ null ("NOG") | Transformed HTLV-I cell lines, PBMCs from HTLV-I infected patients | No | CD4+, CD8+ T cells | Liver, spleen, lung, kidney | N/A |



Les souris transgéniques

- Animaux chez lesquels une partie de l'ADN a été modifié physiquement (pas par élevage)
- Le génome de toutes les cellules de l'organisme est modifié
- L'ADN germlinal est également modifié: il est transmis à la progénie selon les lois de Mendel

Les souris transgéniques

Pre-implantation

1 cell

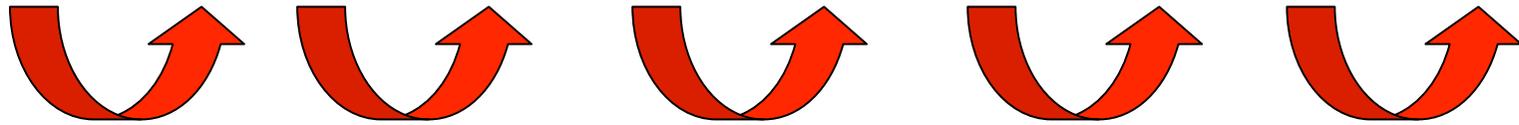
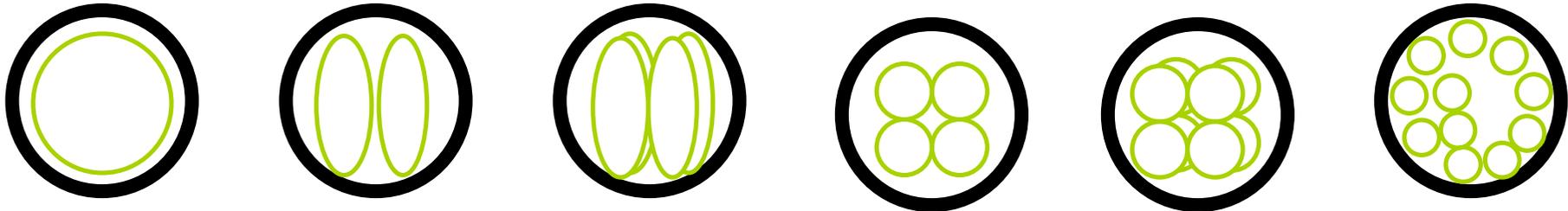
2 cells

4 cells

8 cells

16 cells

32 cells

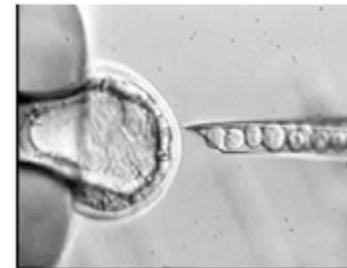
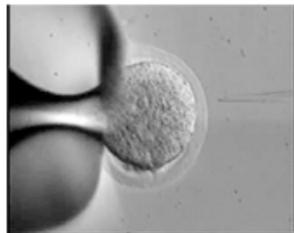


MITOTIC DIVISIONS



Pronuclear Injection

Recombinant DNA constructs



Blastocyst injection

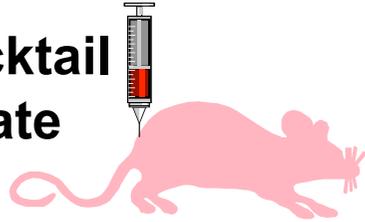
Genetically modified embryonic stem cells (ES cells)



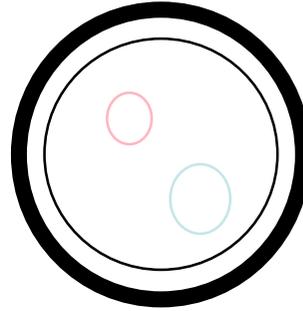
Injection dans le pronucleus

- **Utilisée pour ajouter un nouvel ADN**
- **Pas de contrôle du site d'insertion ni du nb de copies insérées**
- **Suffisamment efficace pour être utilisée sur les embryons**
- **Peut être réalisée dans n'importe quelle espèce mammifère**

**Hormone cocktail
to superovulate**



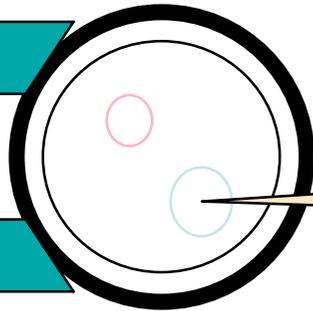
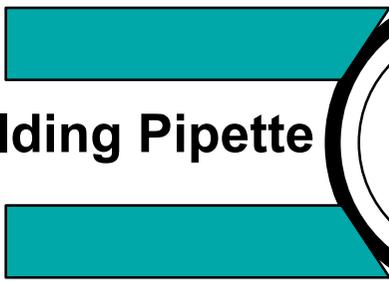
X



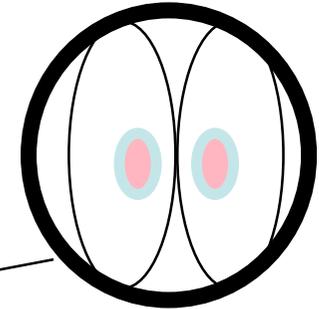
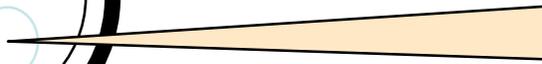
**1-cell pronuclear stage
mouse embryo.**

2-cell stage embryo

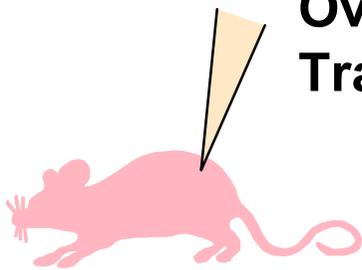
Holding Pipette



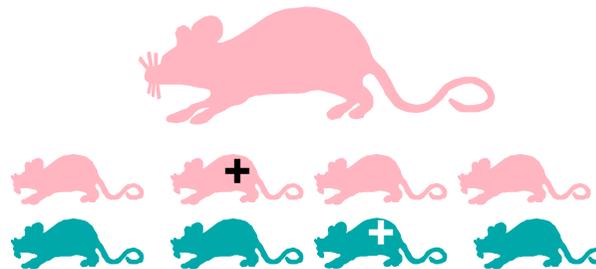
Injection Pipette



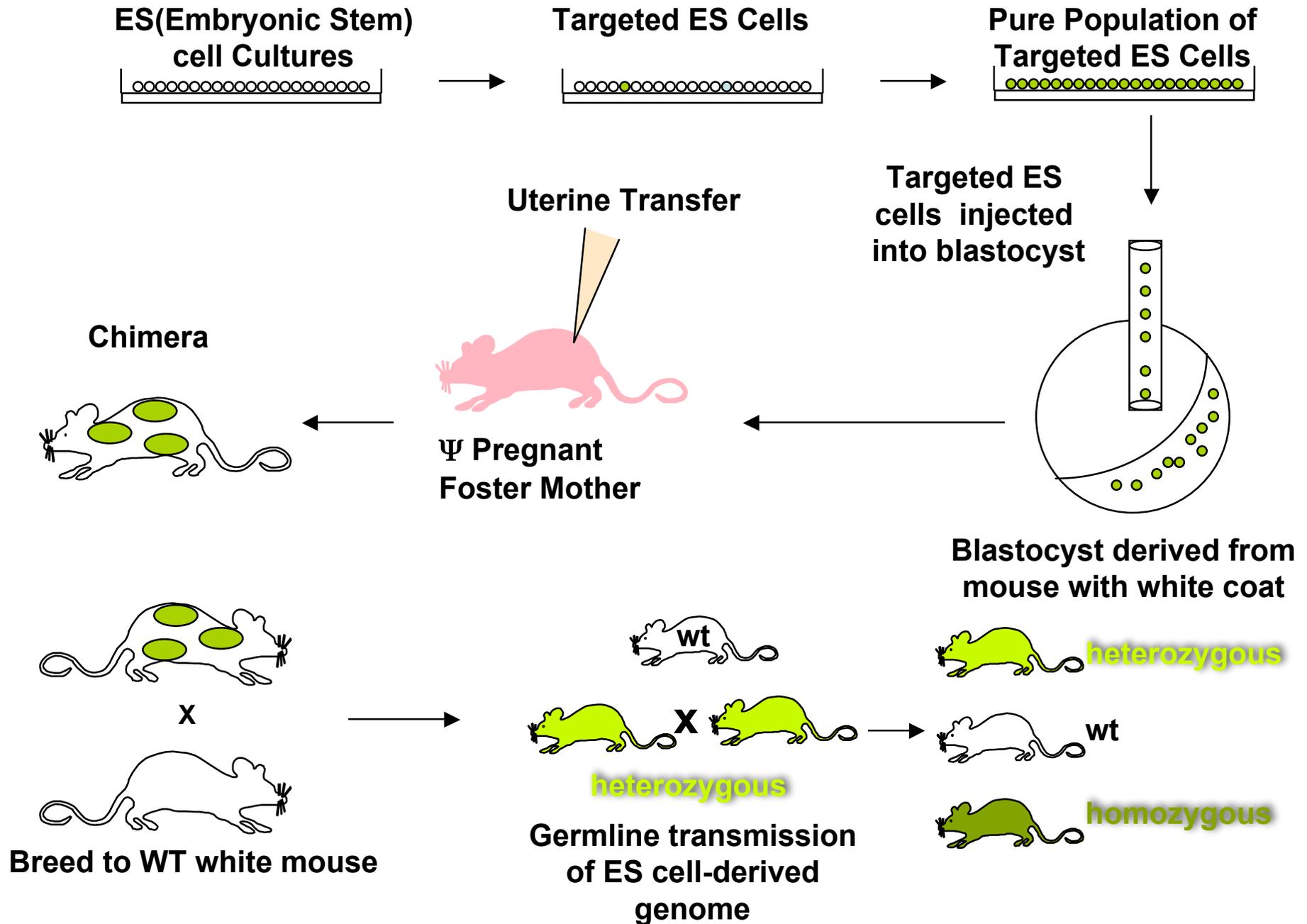
**Oviduct
Transfer**



**Y Pregnant
Foster Mother**



Homologous Recombination in ES Cells



Les souris « Knock out »

Gene knockout by homologous recombination using an “W” or “Replacement” type construct

