

Techniques d'étude des réponses immunitaires

Techniques de phénotypage

Détection de marqueurs

Isolation de populations
cellulaires

Analyse des répertoires

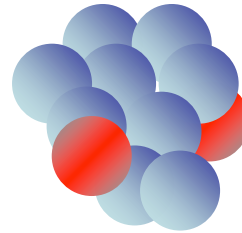
Analyse des voies de
signalisation

Analyse prolifération / cycle
cellulaire / Apoptose

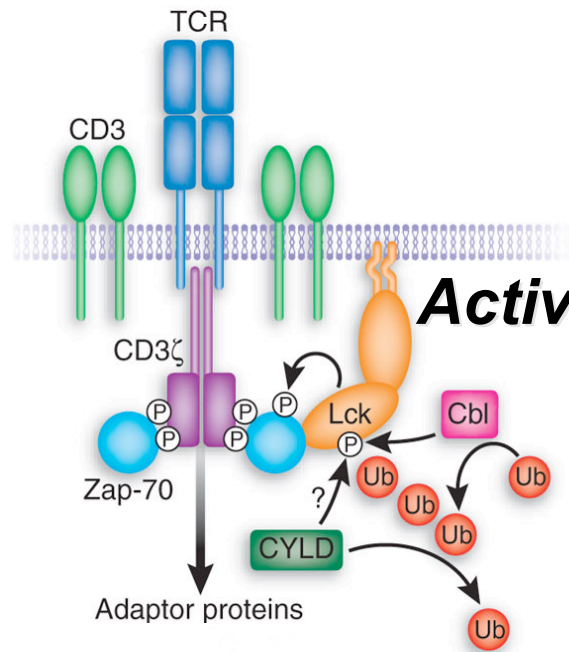
Production cytokines /
facteurs solubles

Analyse des fonctions
effectrices

Utilisation de modèles de
souris



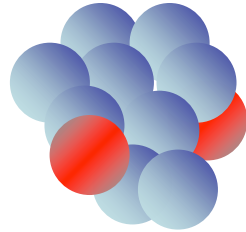
**Caractérisation /
Identification**



Activation / Fonction



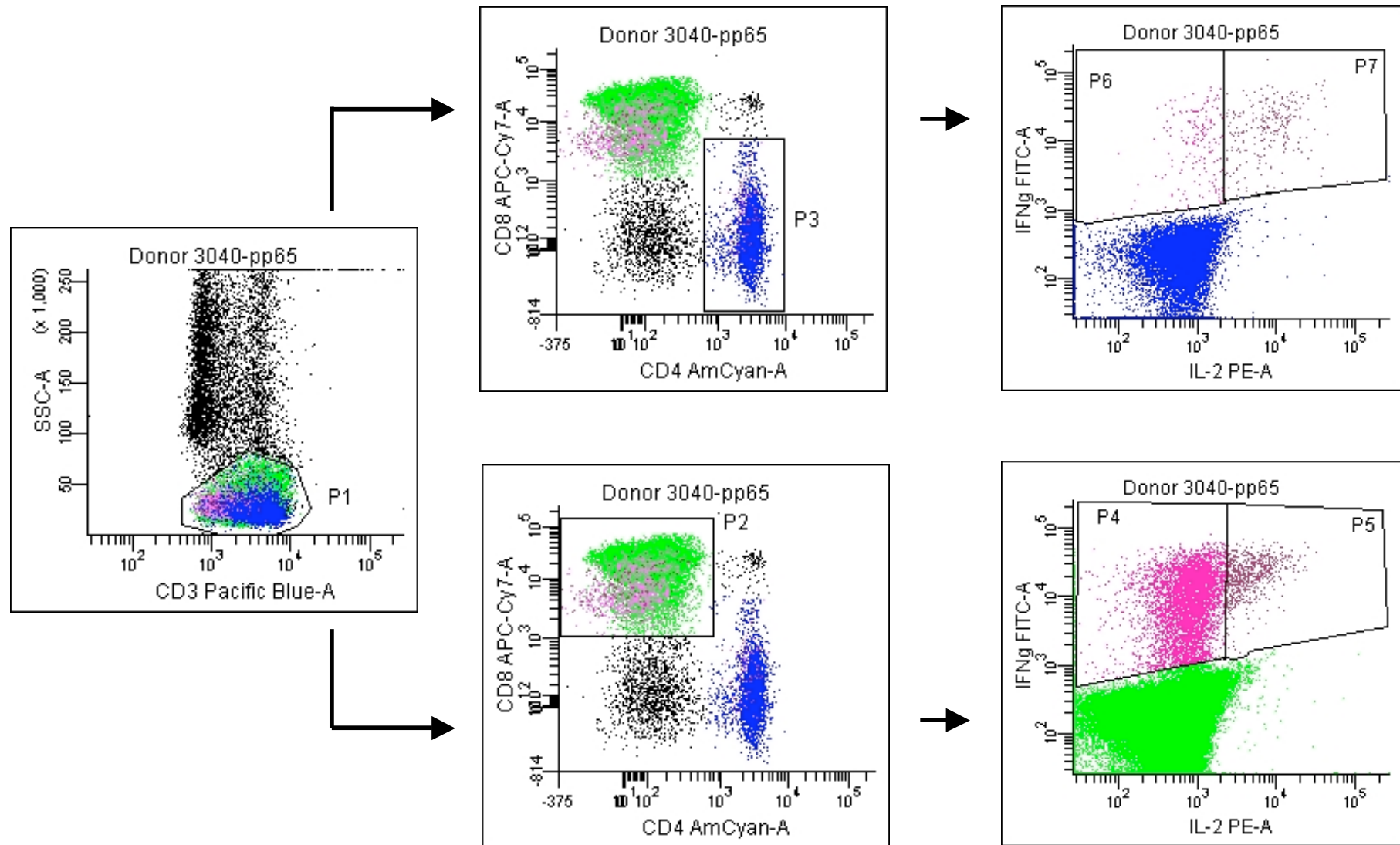
**Contexte
physiopathologique**



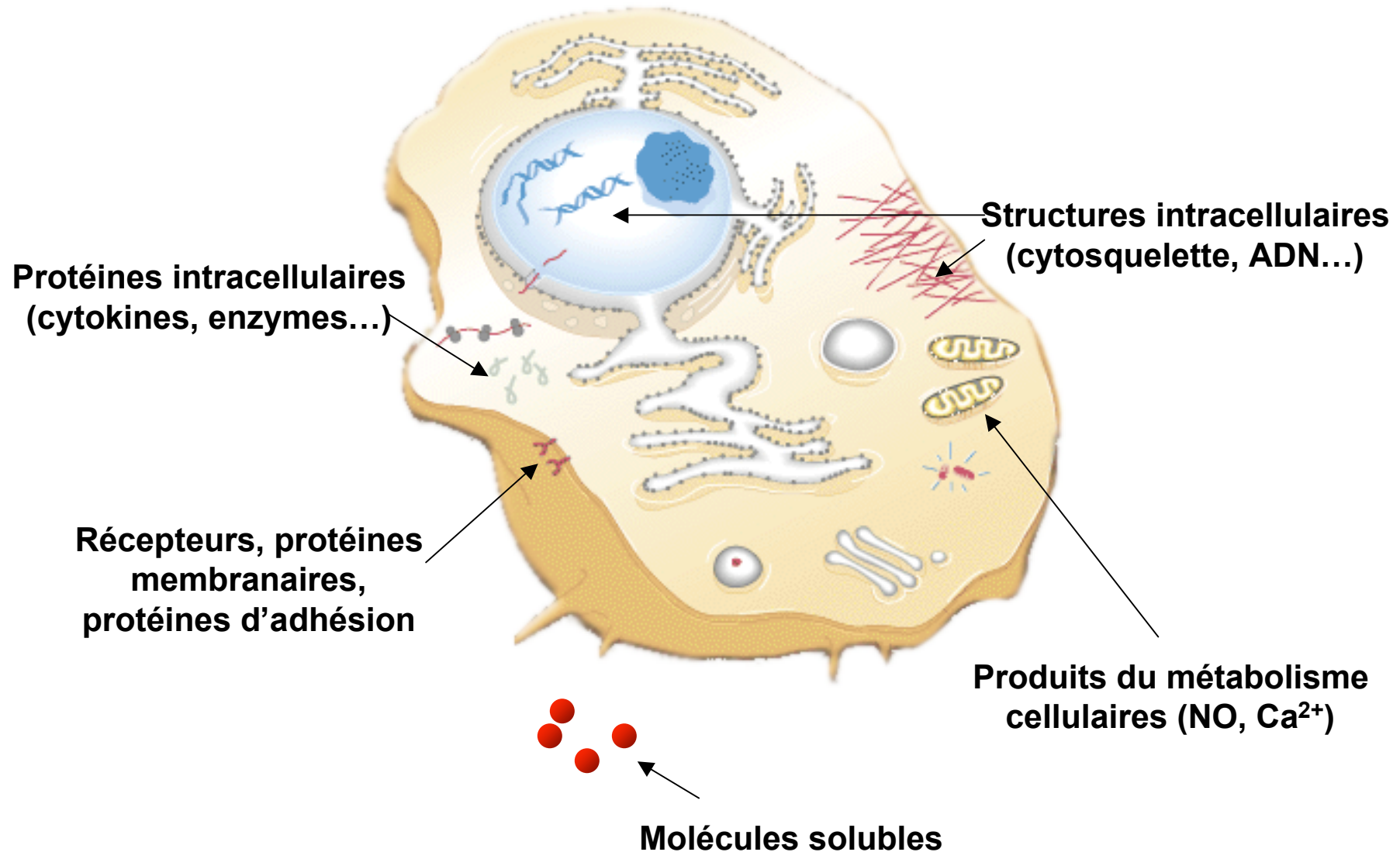
Caractérisation / Identification cellules et populations cellulaires

- 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

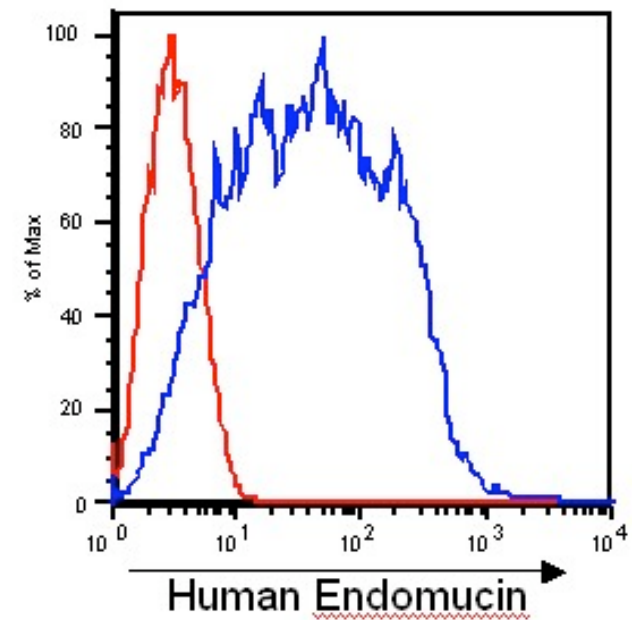
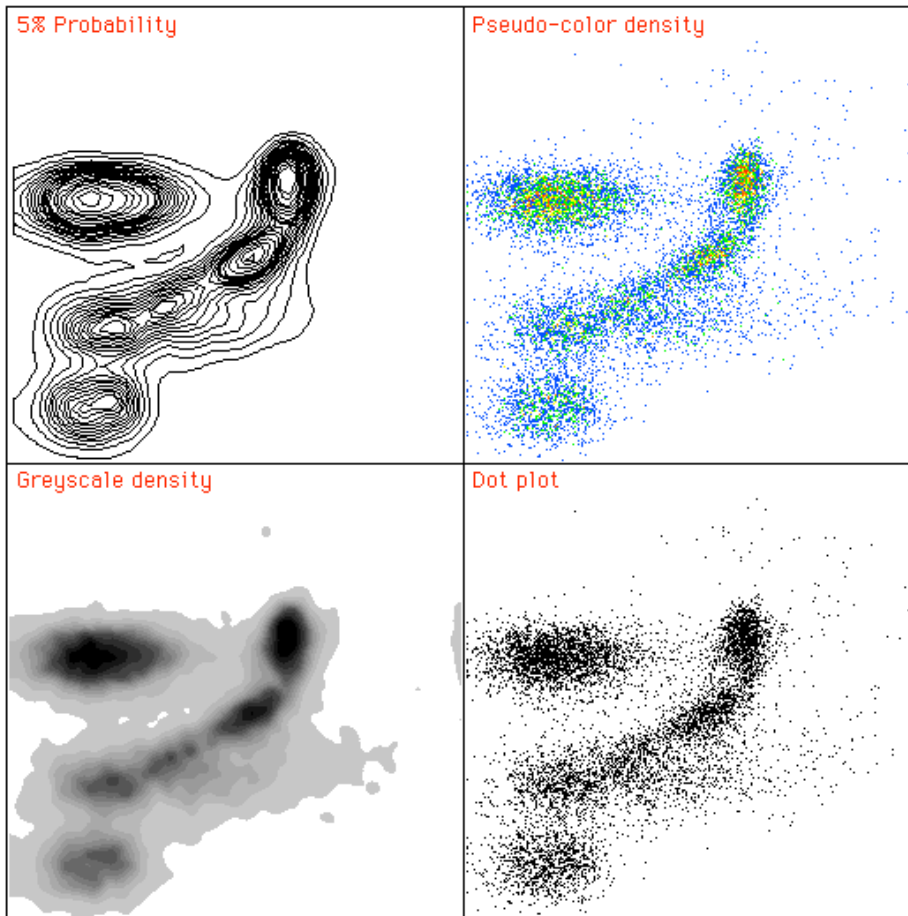


Cytométrie en flux : marquages extracellulaires et intracellulaires

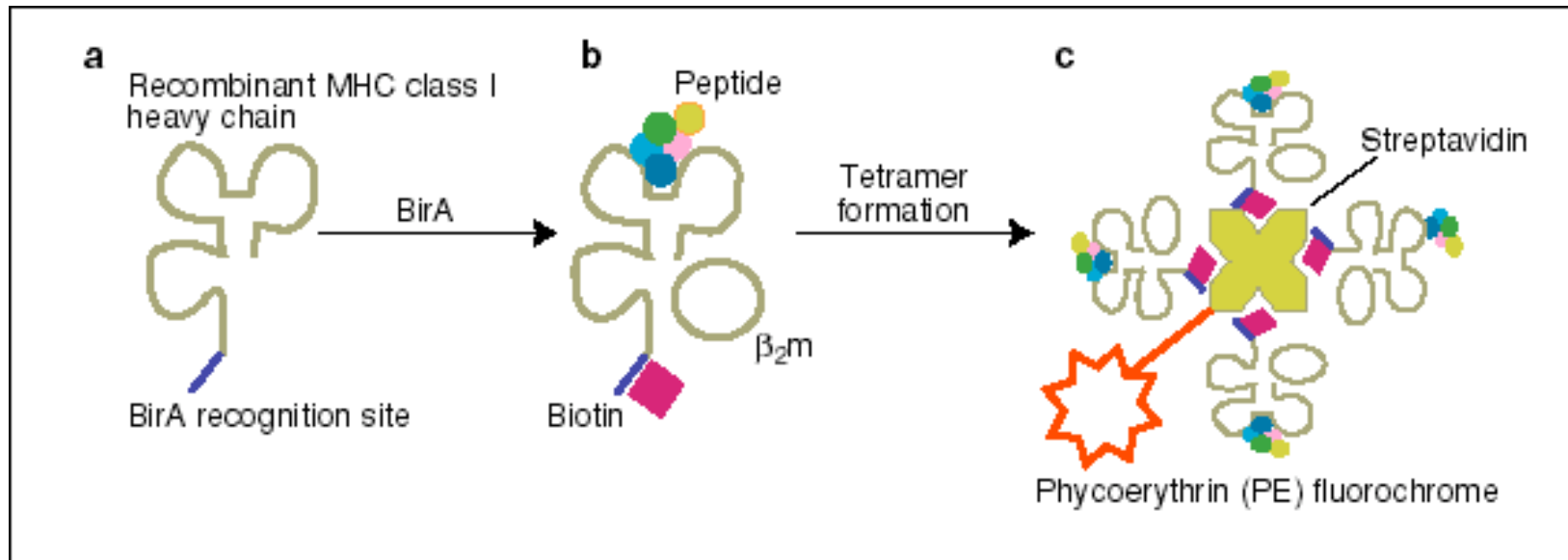


Cytométrie en flux : marquages extracellulaires et intracellulaires

Standard Plot Options

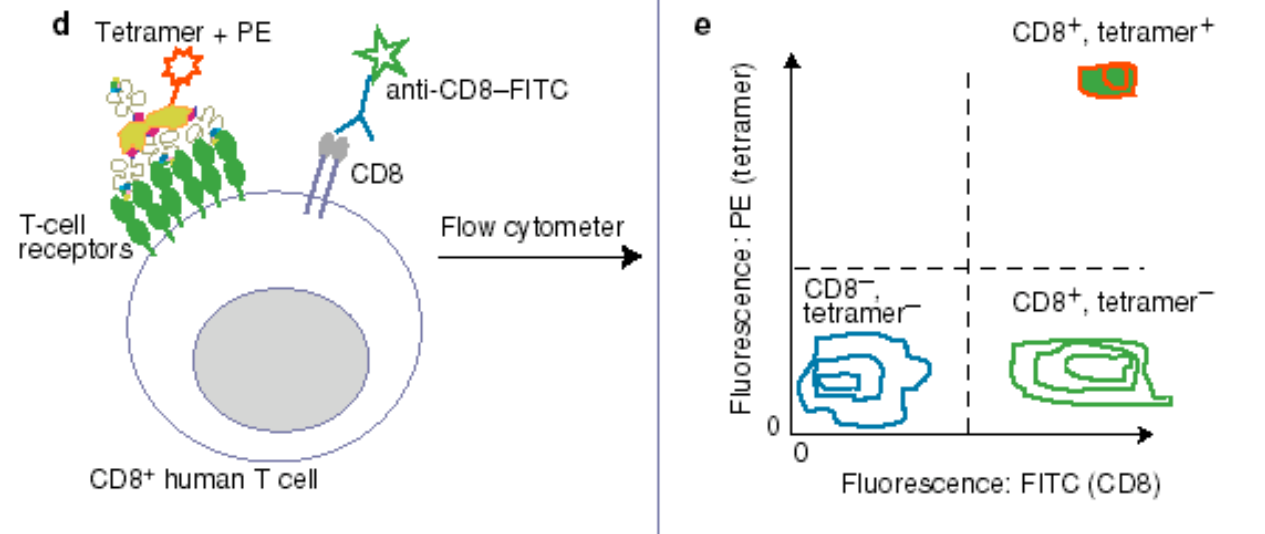


Cytométrie en flux : technique des tétramères



- Version soluble de la chaîne lourde du CMH I synthétisée dans E.Coli
- Addition de la chaîne légère β_2 microglobuline et du peptide synthétique → conformation appropriée
- Couplage avec la biotine par l'enzyme BirA (reconnaît un site spécifique introduit dans la partie C-term de la chaîne lourde)
- 4 complexes CMH I/biotine sont liés à la streptavidine
- La streptavidine est taggée à un fluorochrome

Cytométrie en flux : technique des tétramères

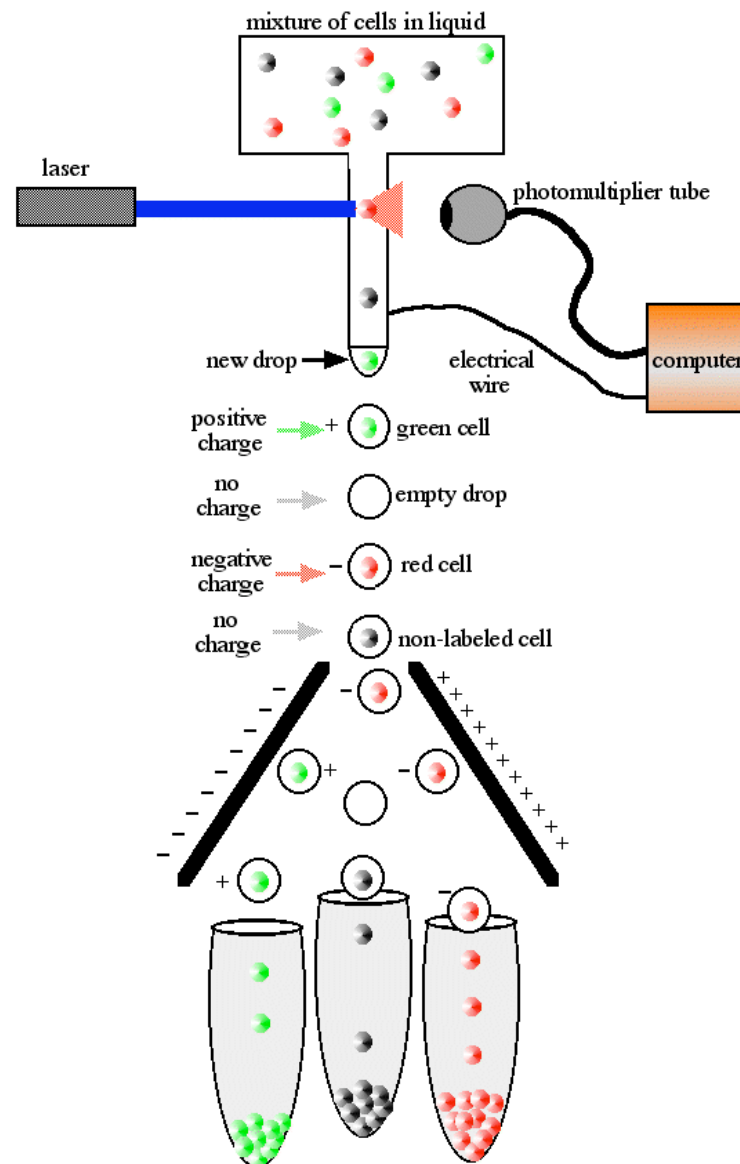


Tetramer analysis to detect T lymphocytes (T cells) that have specific T-cell receptors on their cell surface
Expert Reviews in Molecular Medicine

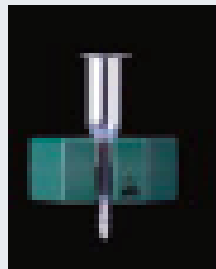
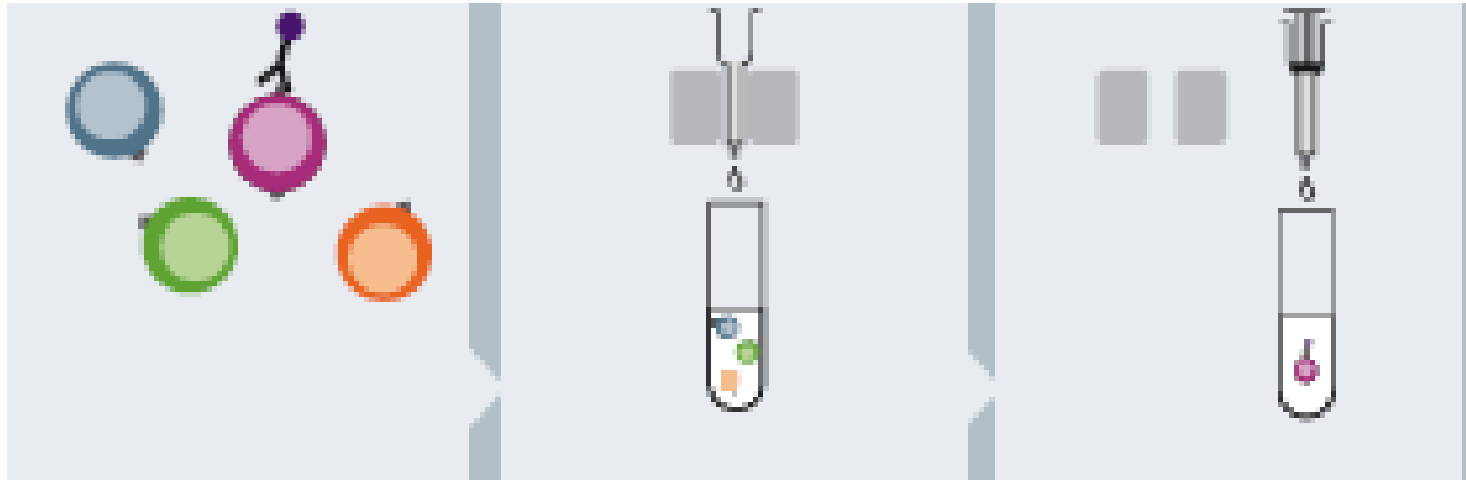
Pro5® MHC Pentamers ProImmune



Cytométrie en flux : Tri cellulaire



Tri cellulaire par tri magnétique



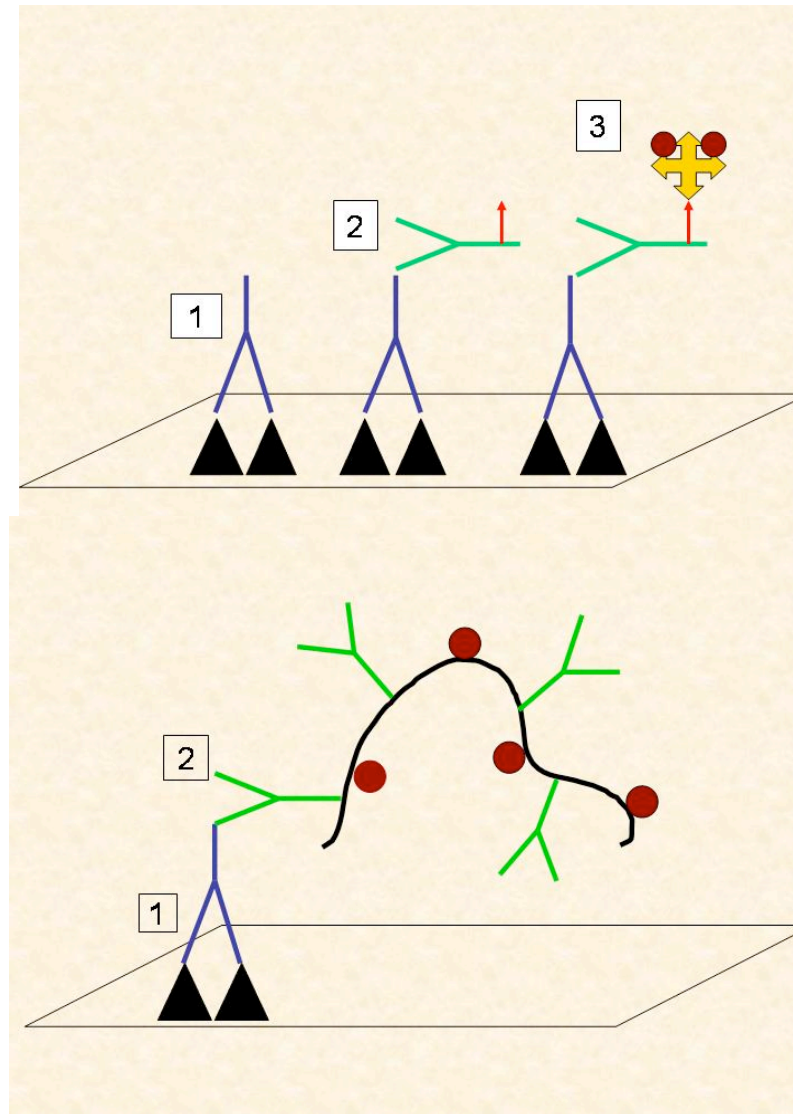
A MiniMACS™ Separation Unit holds one MS Column.



A MiniMACS™ Separation Unit shown with an LD Column.



Immunohistochimie



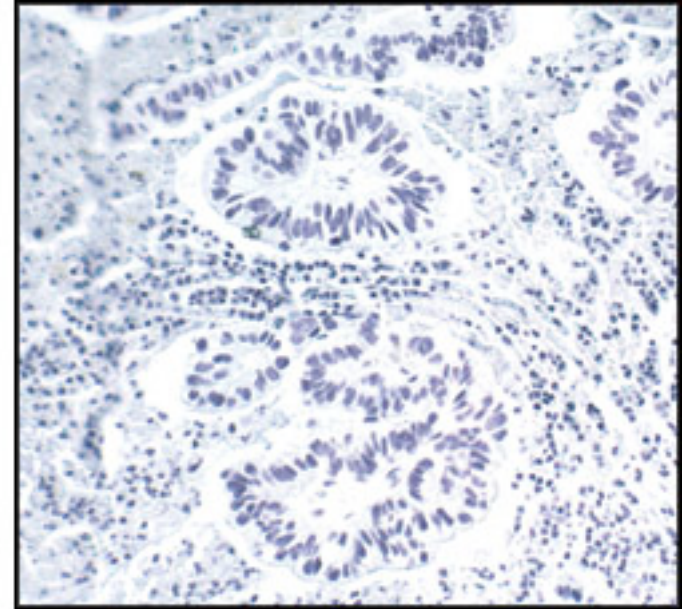
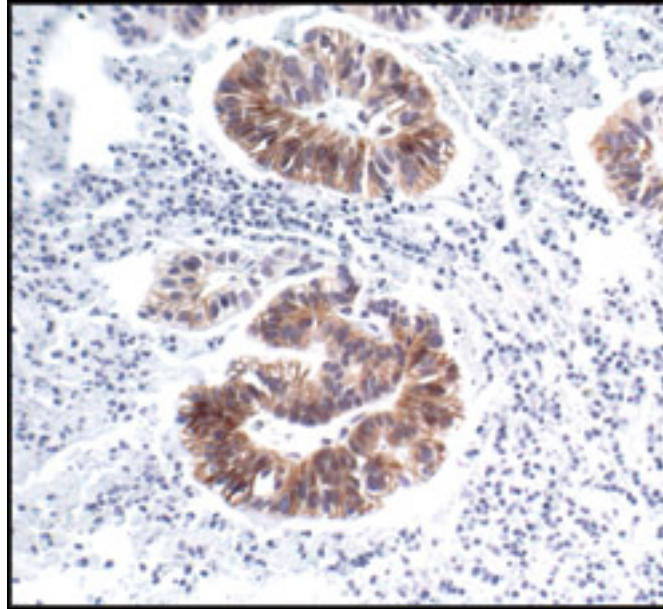
Immunohistochimie

Méthodes de conservation: avantages et inconvénients

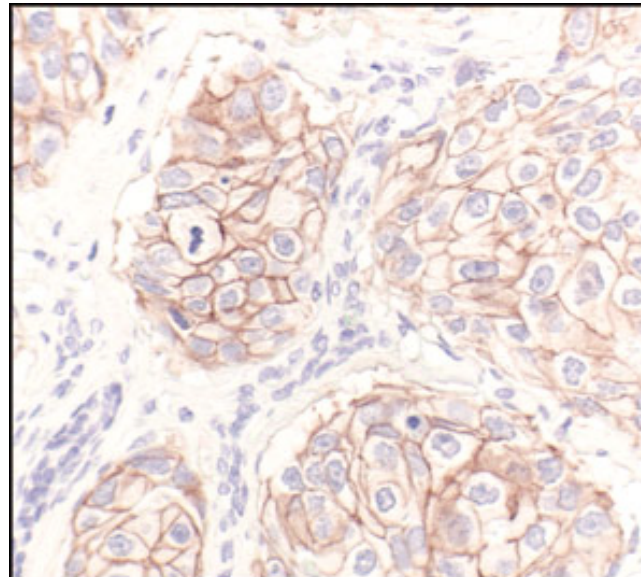
	état du tissu	morphologie	système de stockage	antigènes	traitement du spécimen
paraffine	fixation du tissu dans un agent fixateur	très bien conservée	à température pièce donc aucun équipement spécial	certaines sont détruits et la majorité demande un démasquage	à température ambiante
Résine OCT	nécessite 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)**

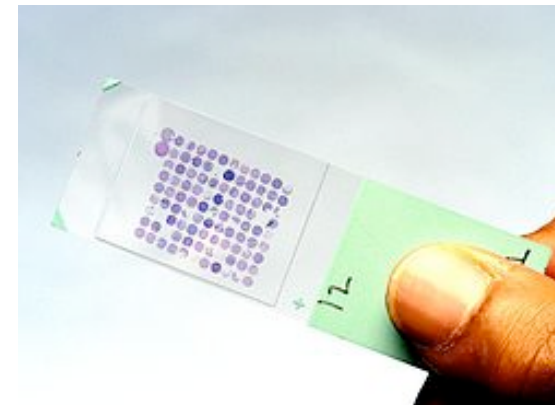
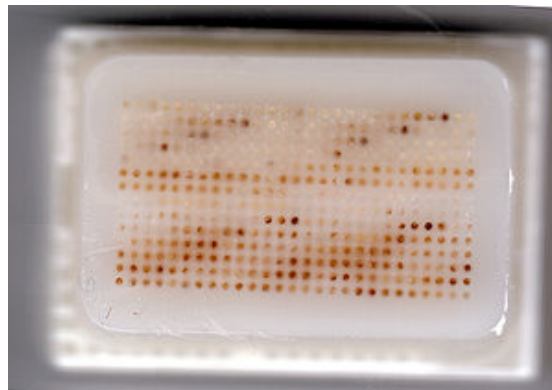


Immunohistochimie

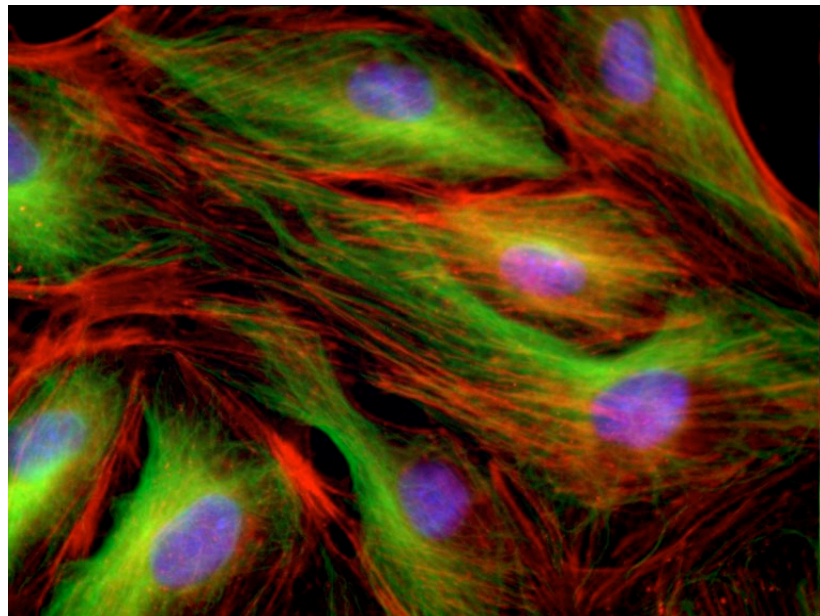
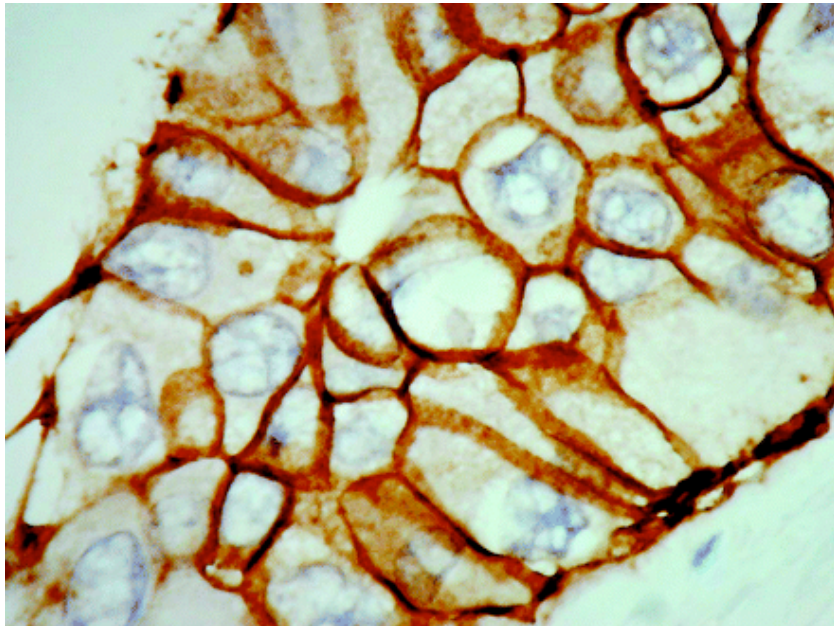
Immunohistochimie à « haut débit » : les Tissue Micro Array

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

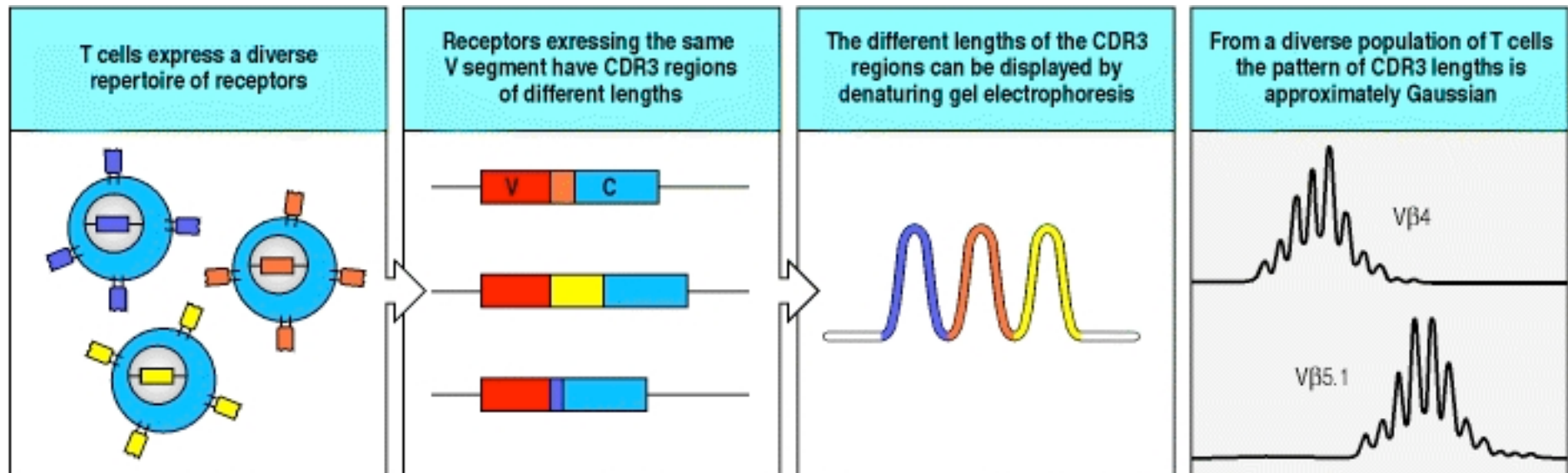
- Ces fragments sont insérés et espacés de façon précise dans un bloc de paraffine selon un pattern de spots particulier
- Des sections de ce bloc sont coupées grâce à un microtome puis montées sur lame pour analyse



Immunohistochimie et immunofluorescence



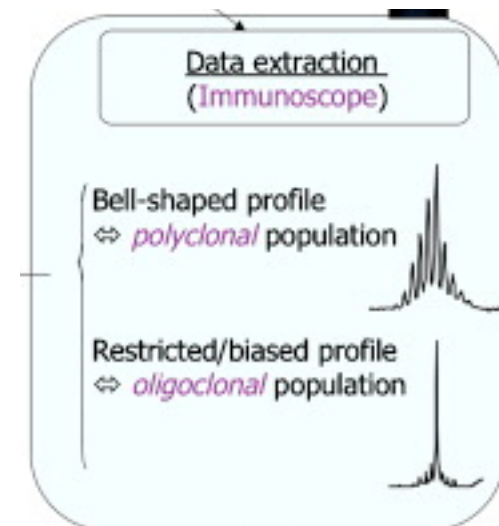
Analyse des répertoires: Immunoscope



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

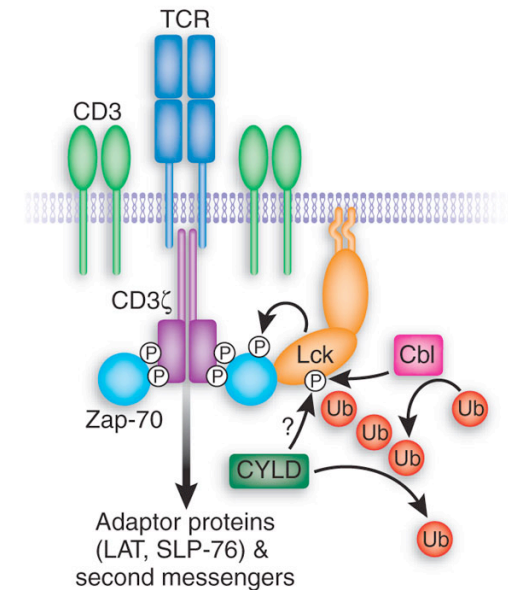
- Détection de cytokines grâce à l'analyse de la prolifération cellulaire
- ELISA / RIA
- ELISPOT
- Facs intracellulaire

Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

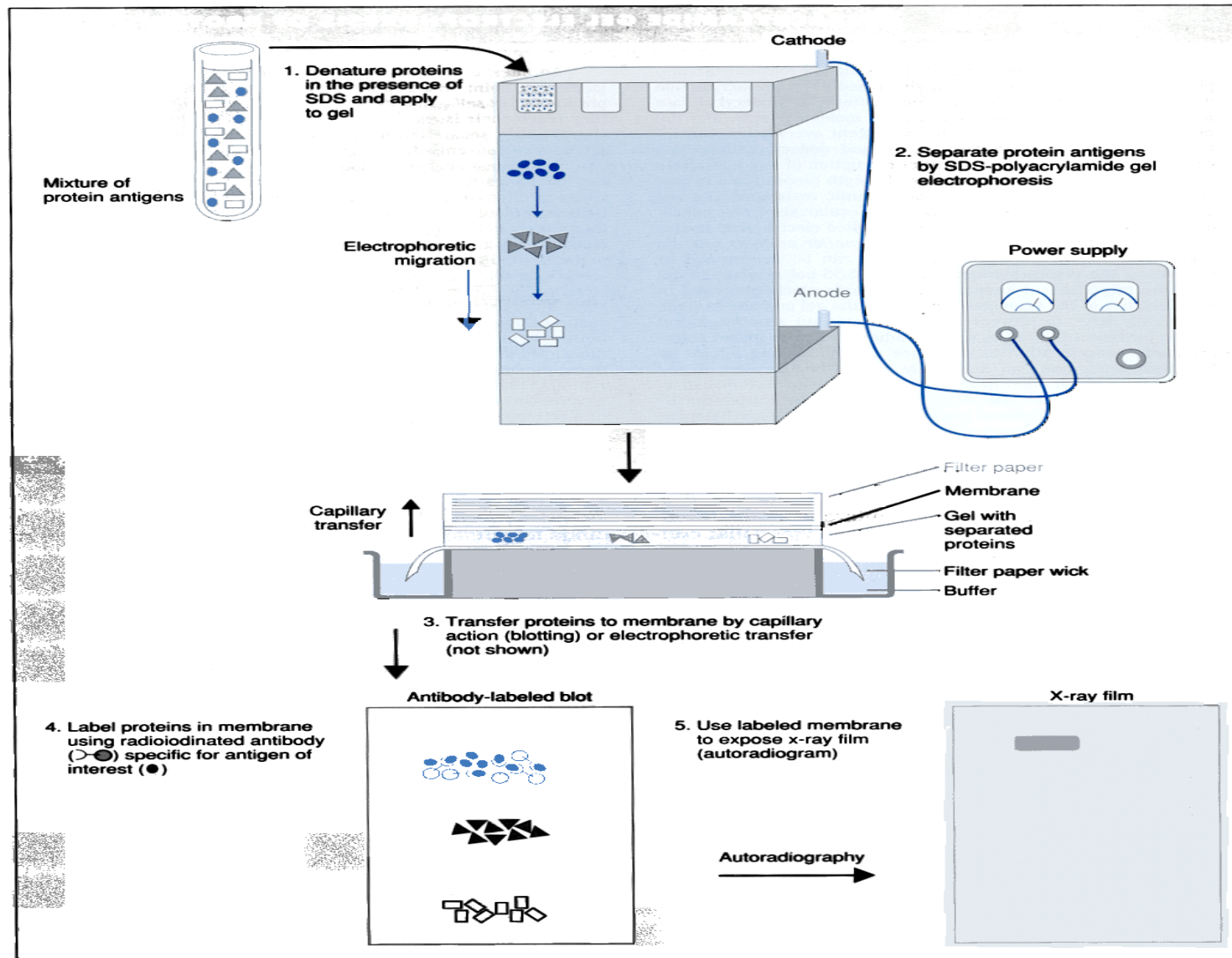
- Cytométrie de flux : BrdU, EdU, CFSE, Annexin V
- Imagerie : DAPI
- Thymidine tritiée

Fonctions effectrices

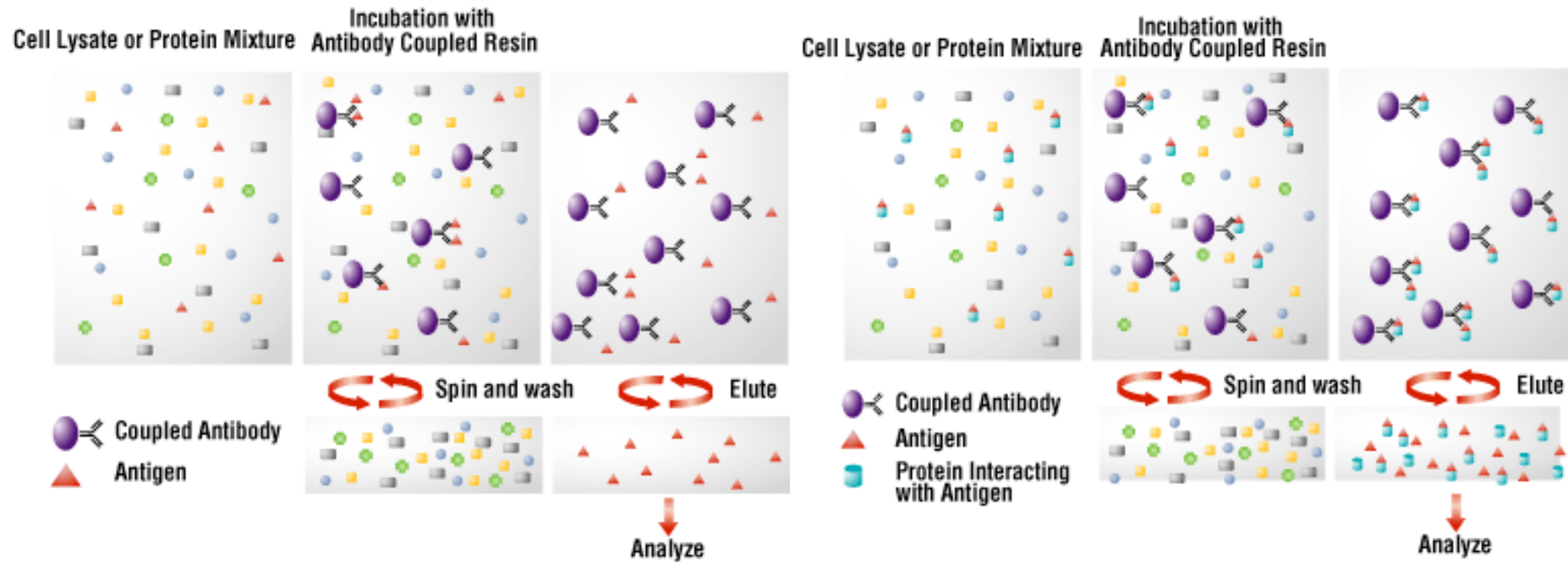
- Cytotoxicité: 51Cr, FACS, LDH
- Réponse anticorps: ELISPOT B, ELISA immunoglobulines sériques, tests hématagglutination



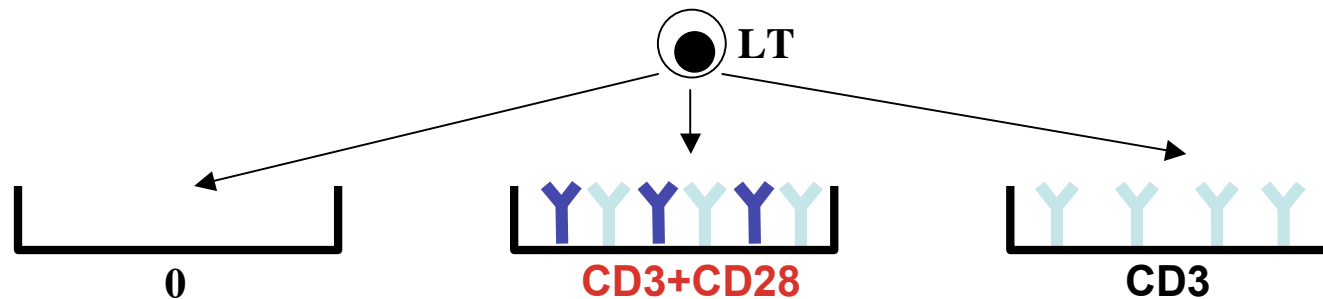
Le Western Blot



L'immunoprécipitation

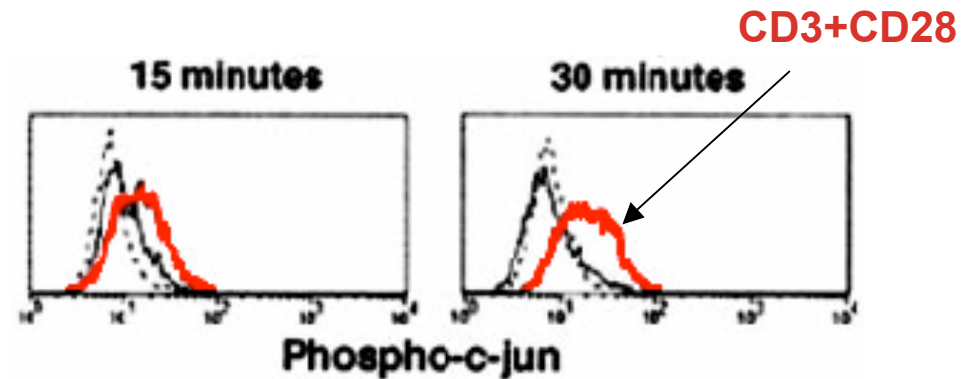
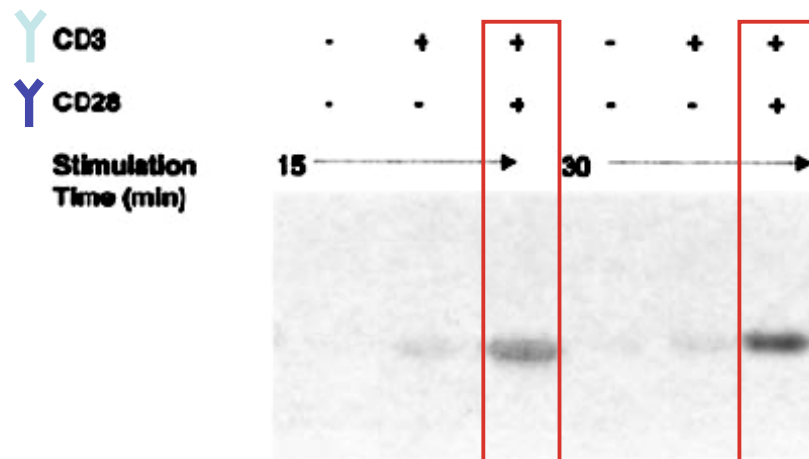


Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux



Lysat cellulaire + billes GST-cjun
=> activité JNK

Marquage intracellulaire avec un
Ac α jun-phosphorylé



Possibilité de combiner le marquage
intracellulaire avec un marquage de surface

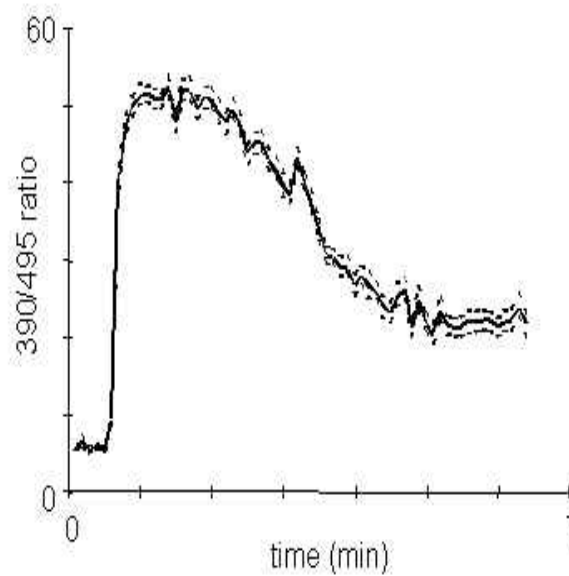
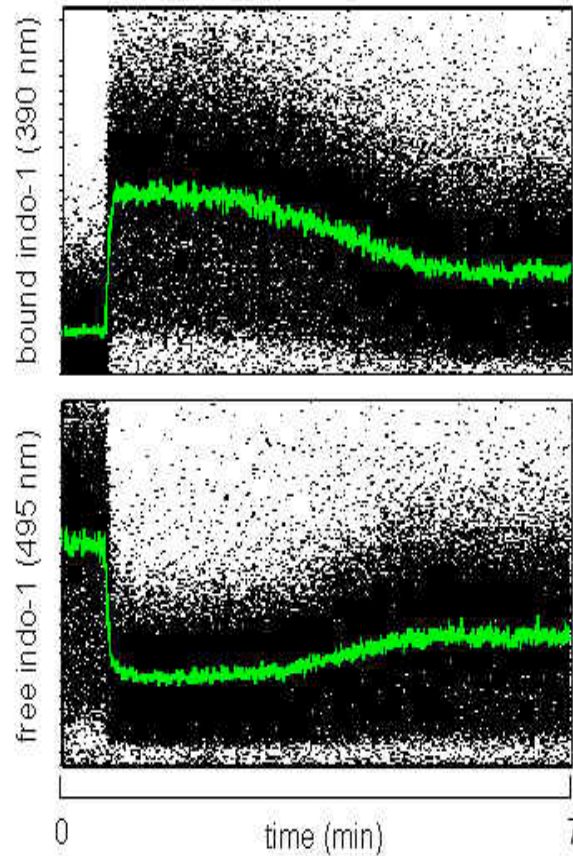
Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux

Variation du Ca^{2+} intracellulaire

- Mesure du Flux calcique : Sonde Fluo-3
- Mesure quantitative du Calcium : Sondes excitable dans l'UV
 - Indo-1 : modification du spectre d'émission
 - Fluorochrome libre : émission 475 nm
 - Fluorochrome lié : émission 400 nm
 - Mesure du ratio sonde liée / sonde libre

Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux

Variation du Ca^{2+} intracellulaire

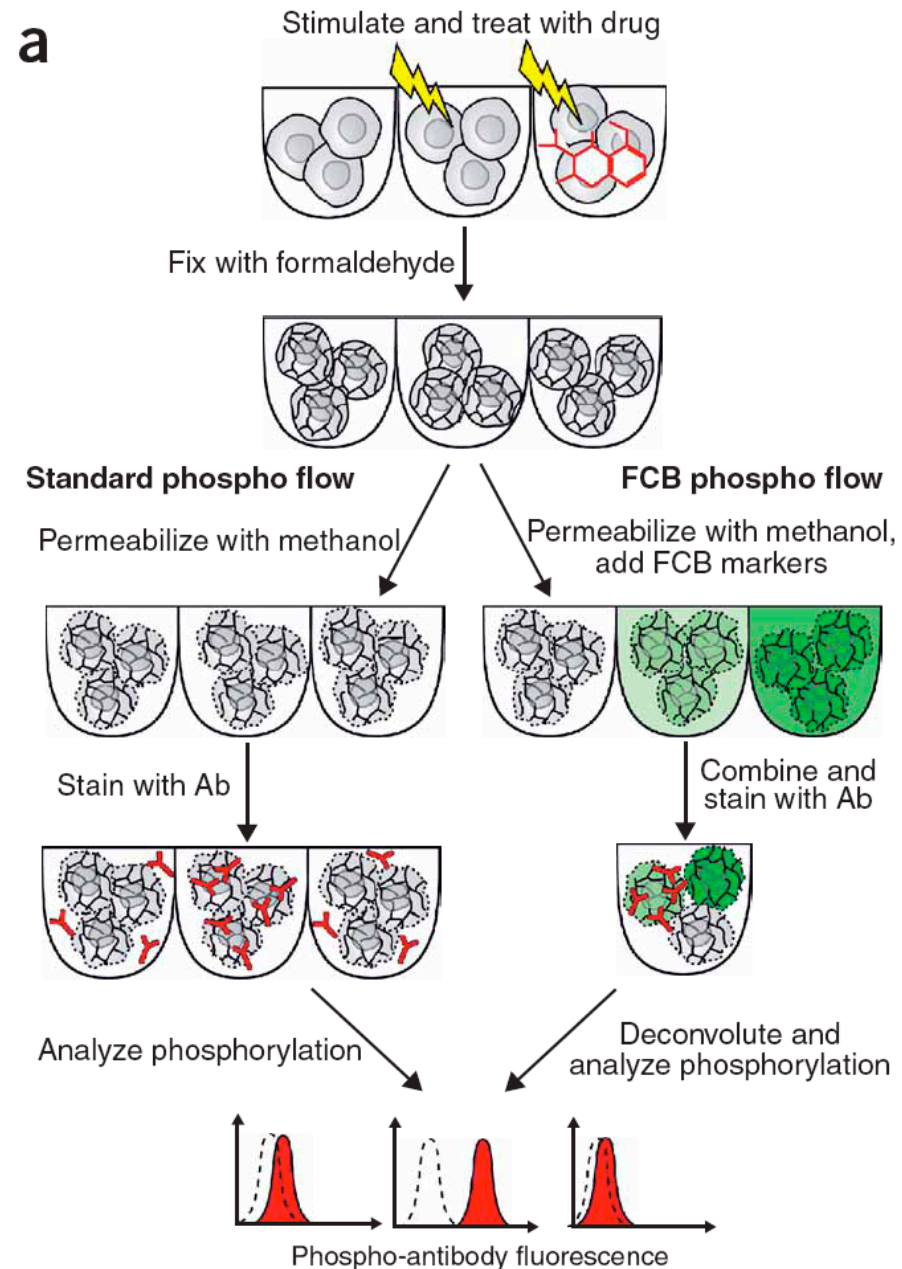


Ratio of Ca^{++} :
 $\frac{\text{Bound Indo-1 at 390 nm}}{\text{Free Indo-1 at 495 nm}}$

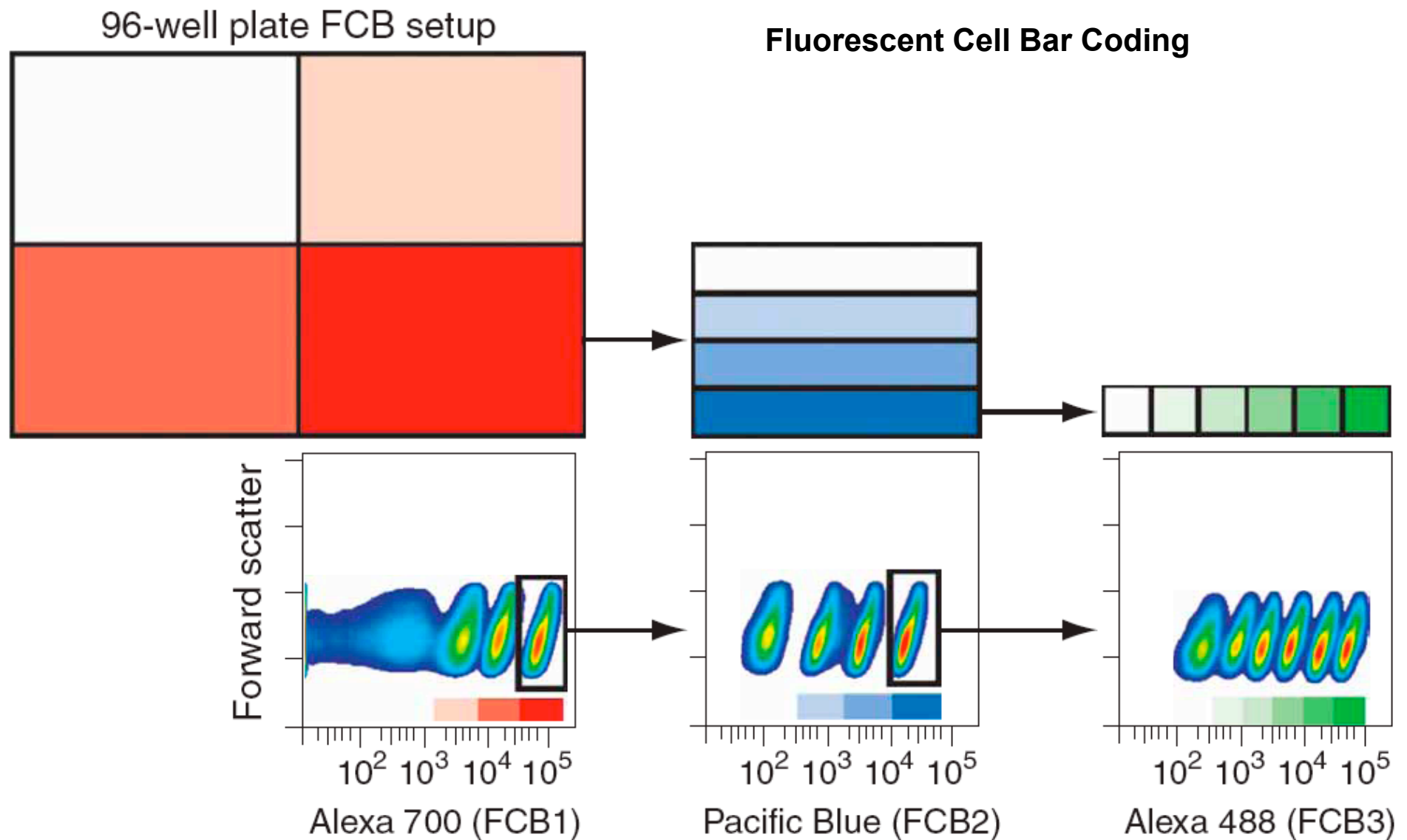
Molecule-probe	Excitation	Emission
Calcium - Indo-1	351 nm	405, >460 nm
Calcium- Fluo-3	488 nm	525 nm
Calcium - Fura-2	363 nm	>500 nm
Calcium - Calcium Green	488 nm	515 nm
Magnesium - Mag-Indo-1	351 nm	405, >460 nm
Phospholipase A- Acyl Pyrene	351 nm	405, >460 nm

Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux

Fluorescent Cell Bar Coding

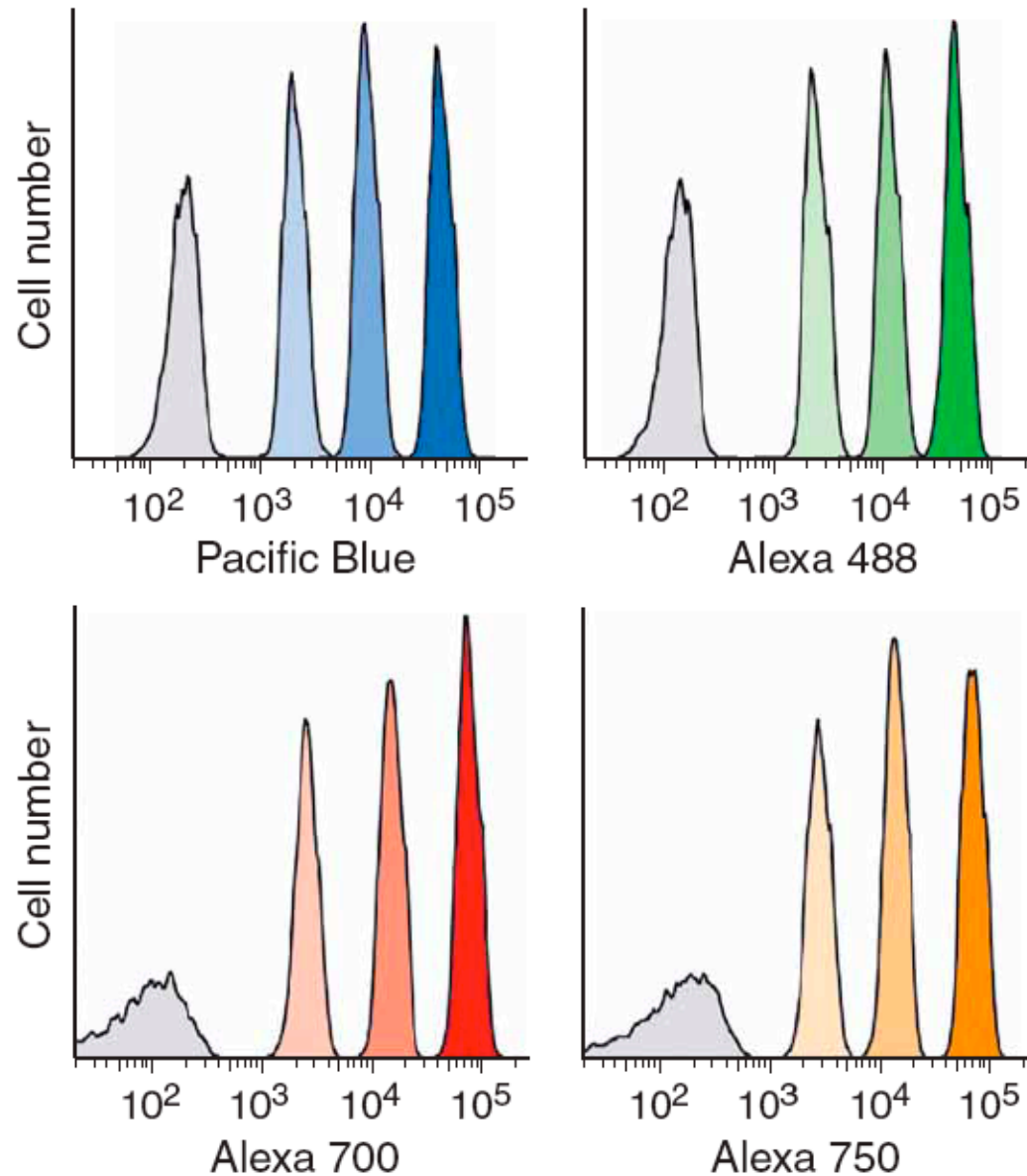


Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux

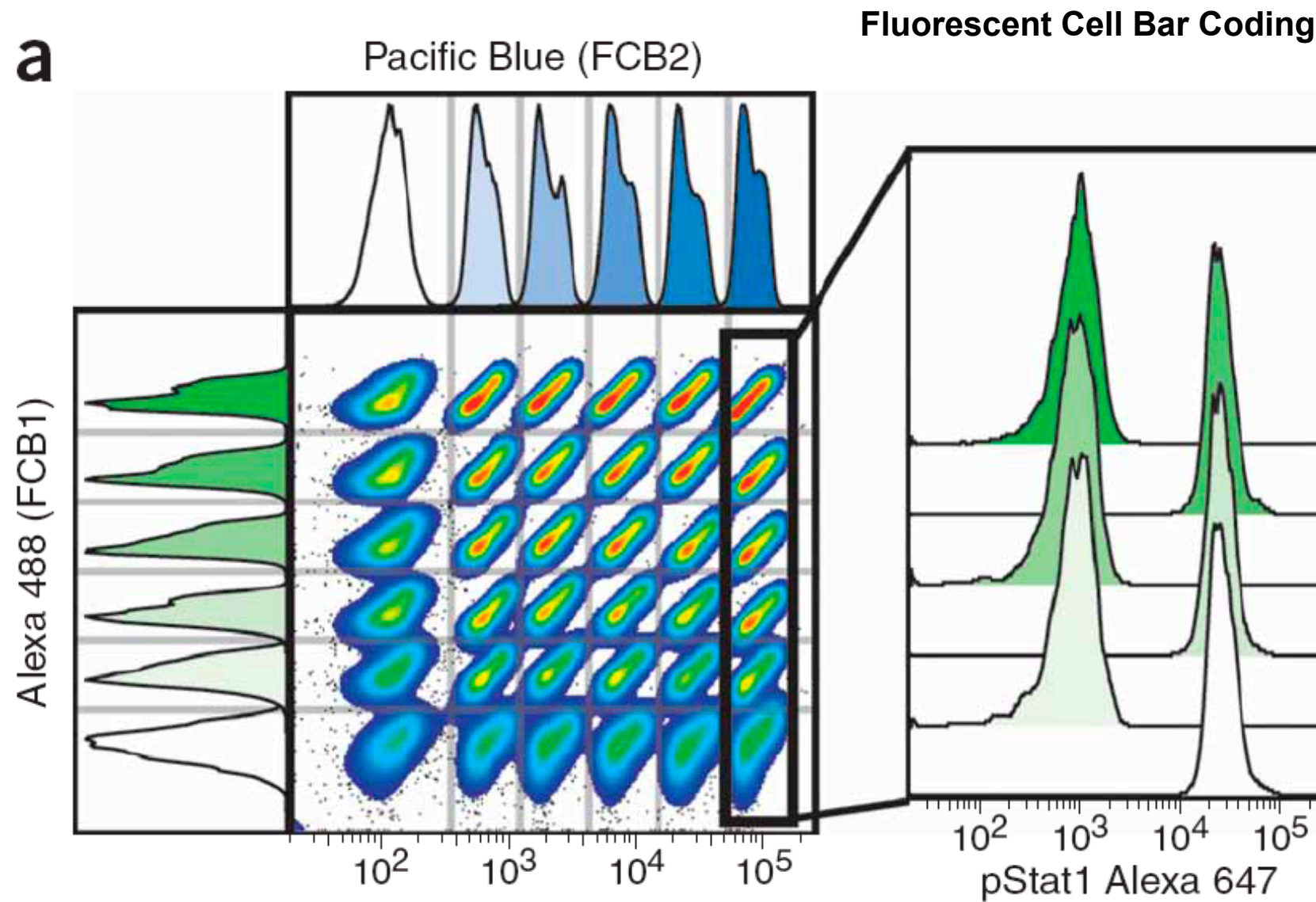


Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux

Fluorescent Cell Bar Coding

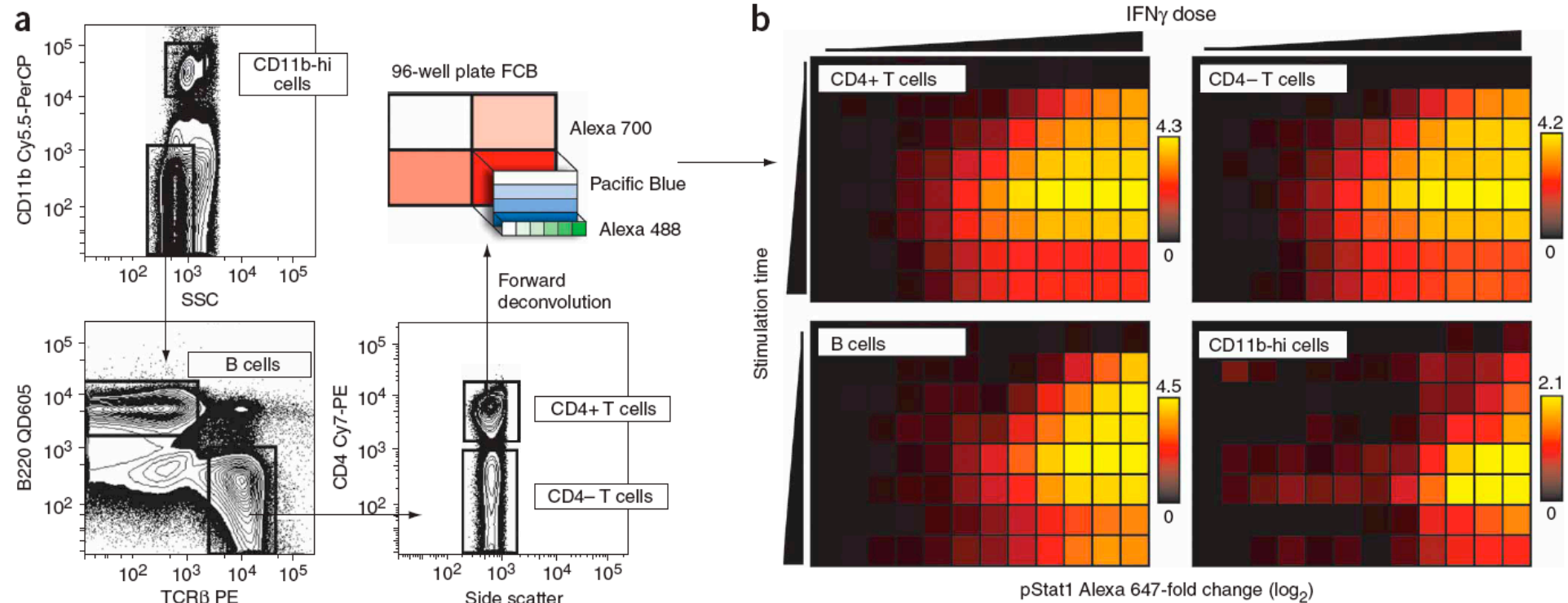


Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux



Analyse de la transduction du signal par cytométrie en flux

Fluorescent Cell Bar Coding

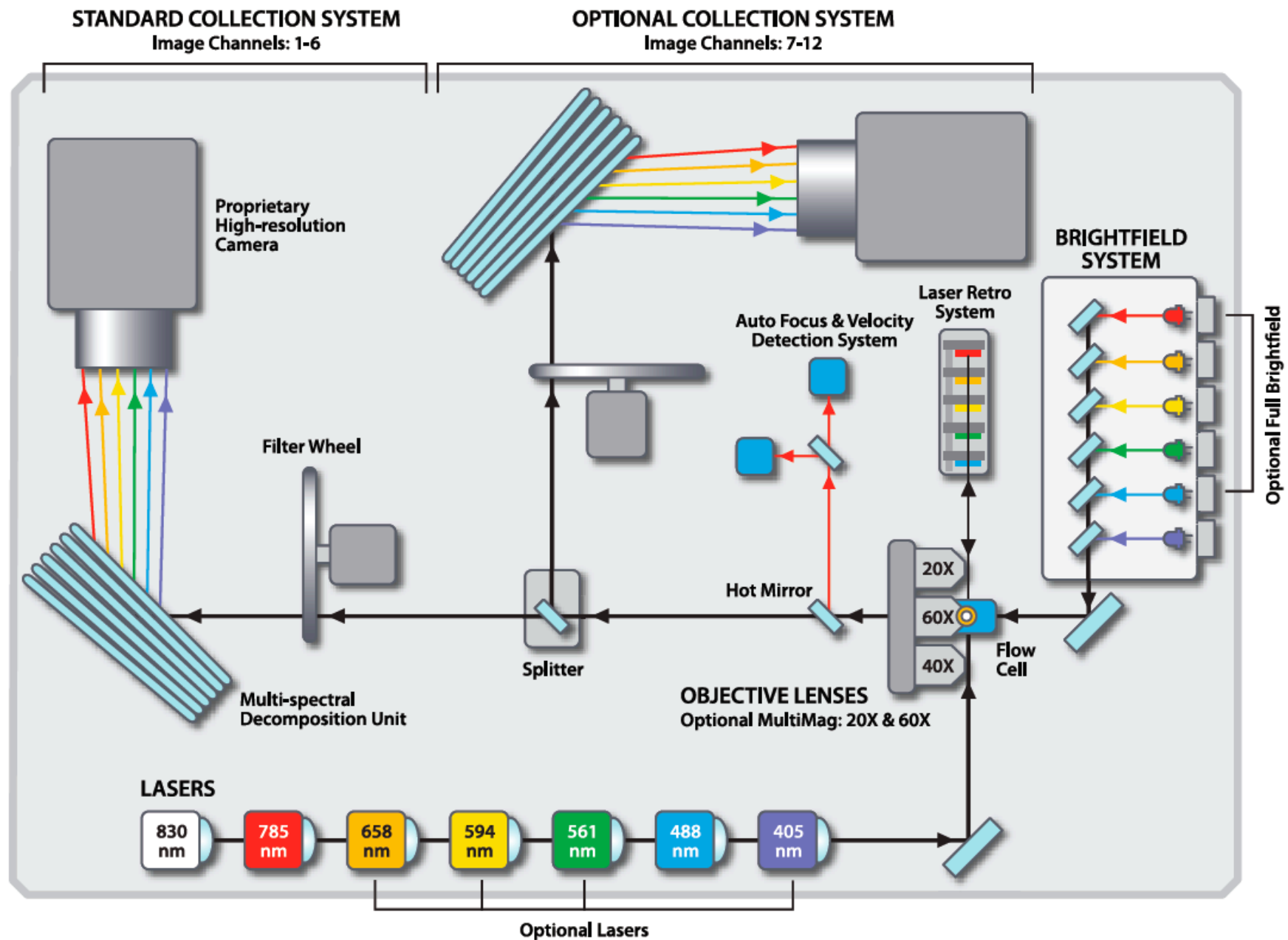


Imaging des cellules en flux

Amnis ImageStream^x



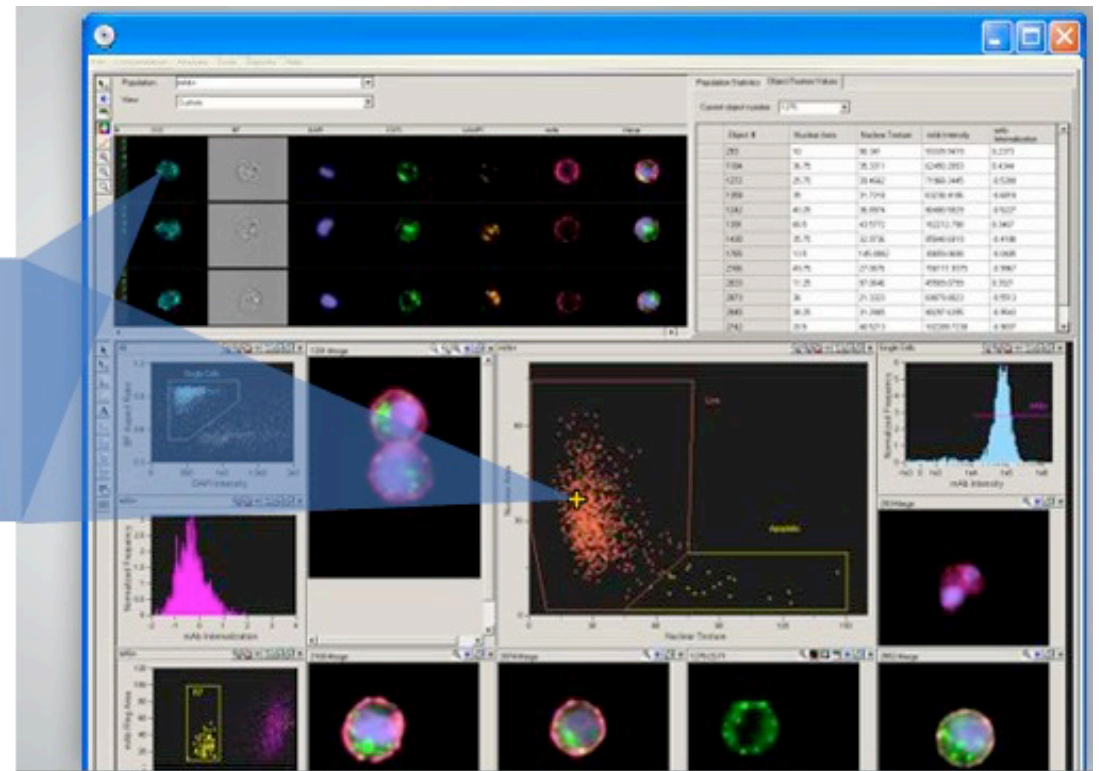
Imaging des cellules en flux



Imaging des cellules en flux

Amnis IDEAS Software

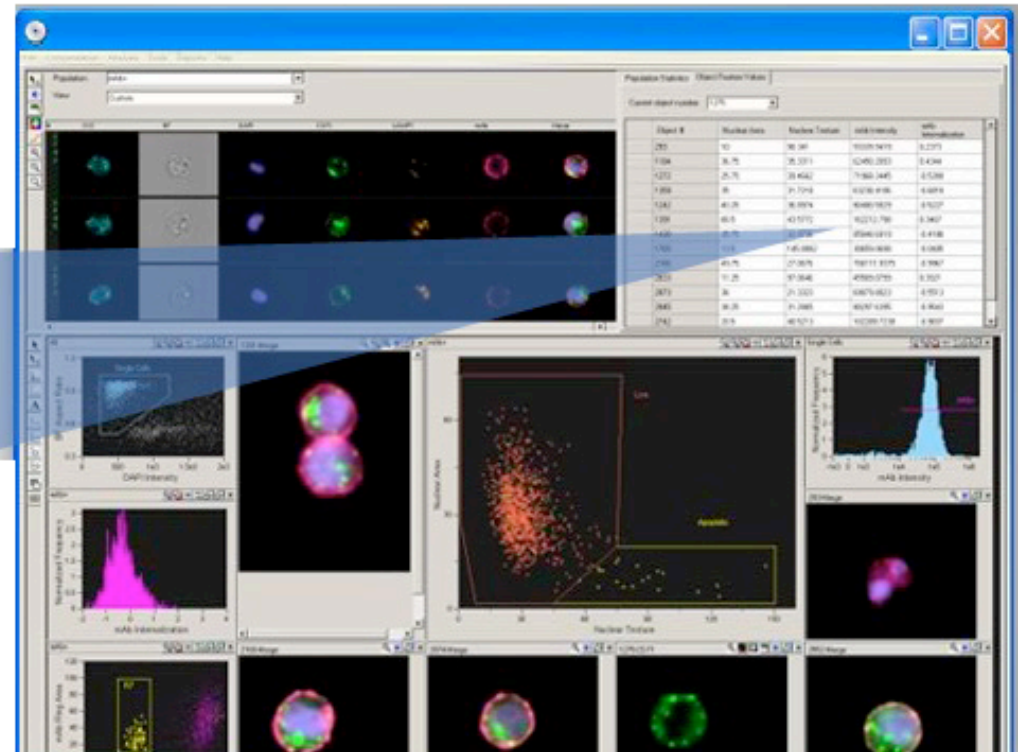
Every dot in a scatter plot is linked to the corresponding cell image. Click on the dot to see the cell, or click on a cell's image to locate it in all scatter plots.



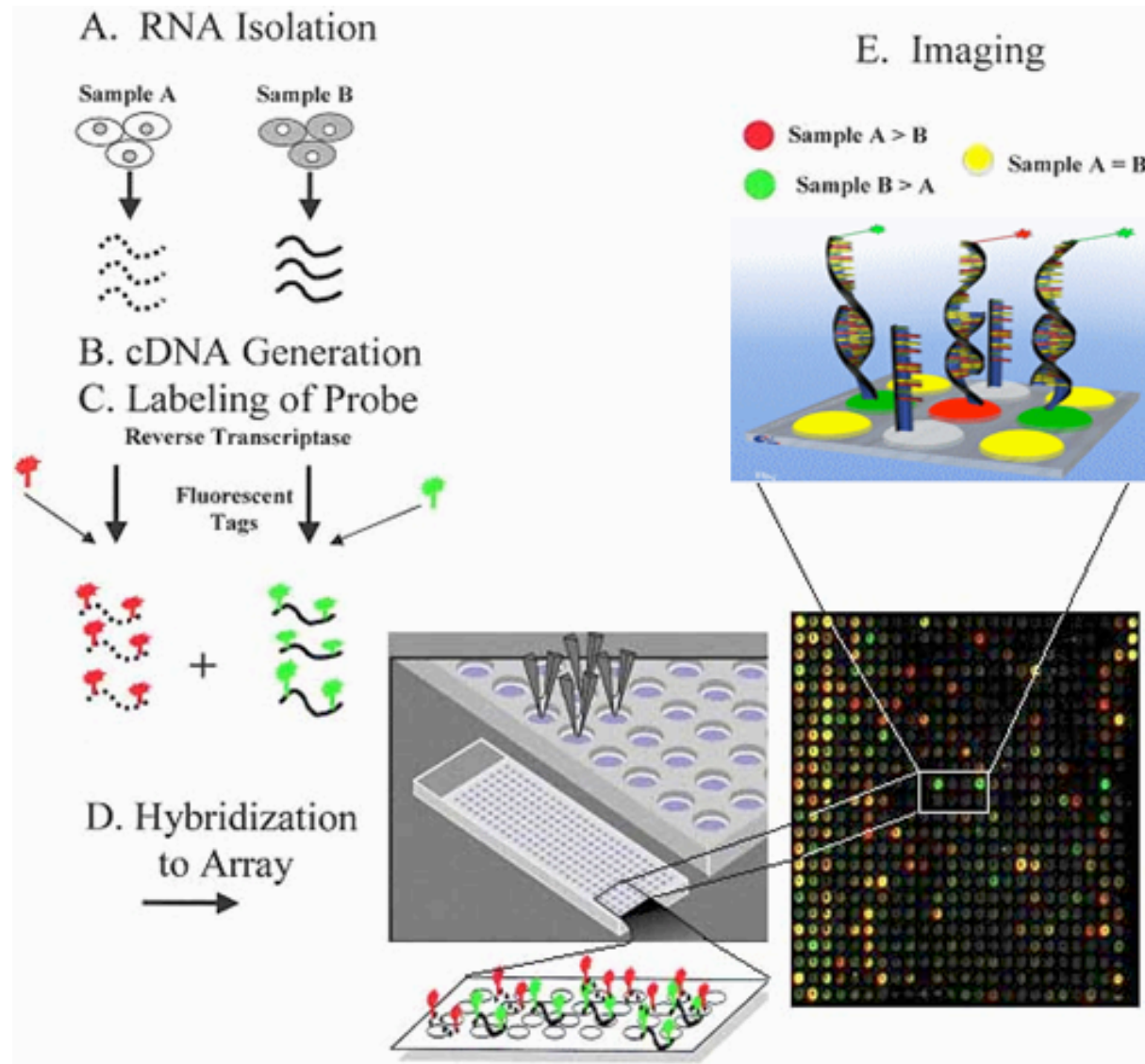
Imaging des cellules en flux

Amnis IDEAS Software

Numerical scores for parameters like size, shape, texture, fluorescence location, co-location and intensity let you quantify visual data.



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

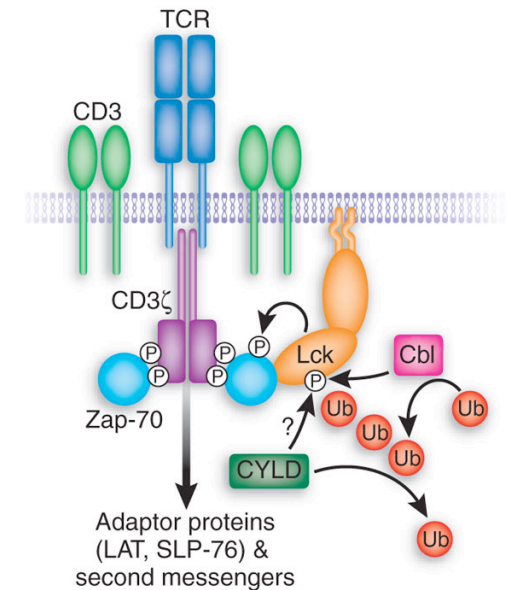
Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

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

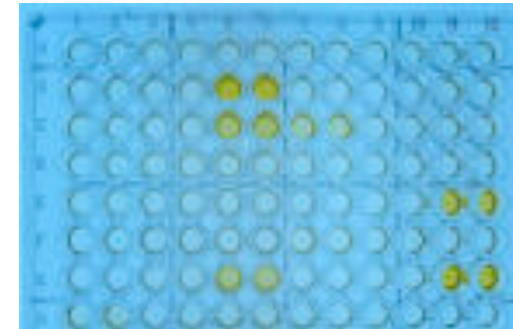
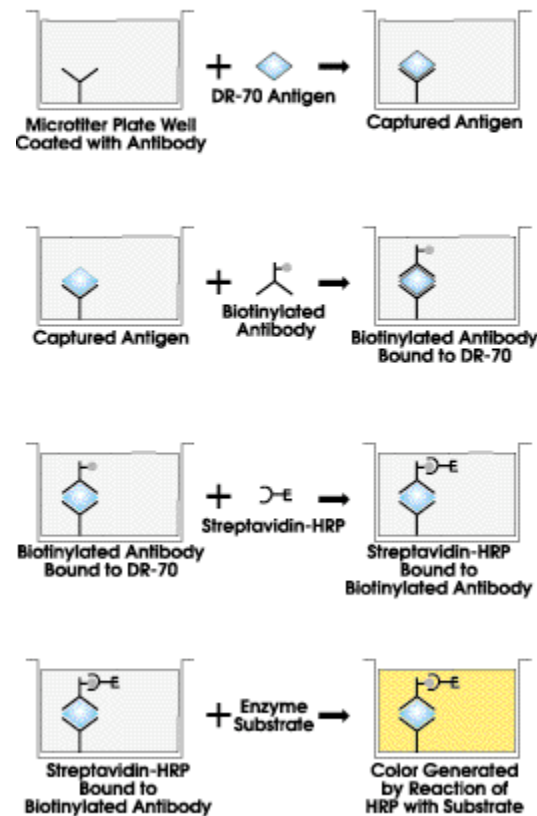
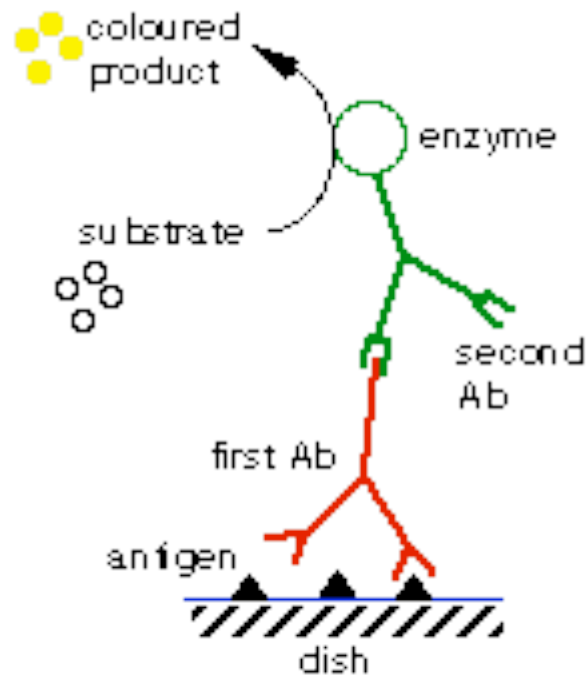
Fonctions effectrices

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

Activation / Fonction

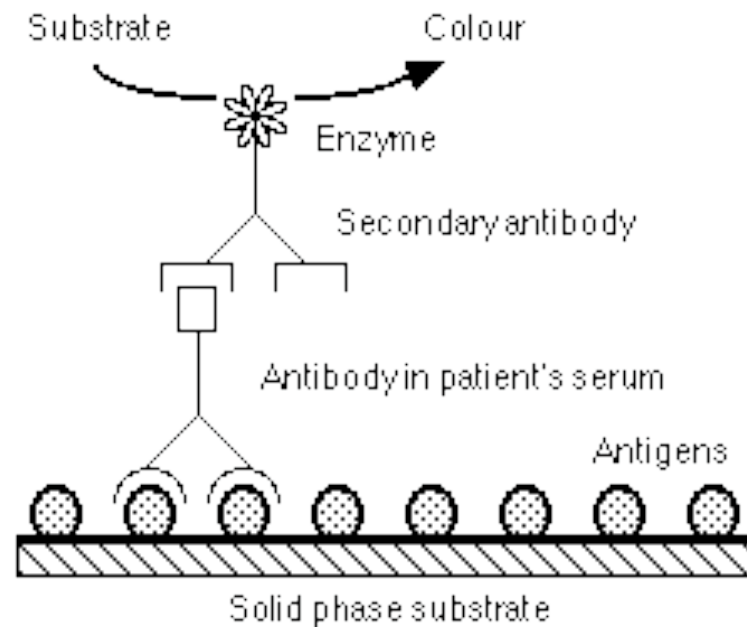


Elisa: Enzyme-linked immunosorbent assay

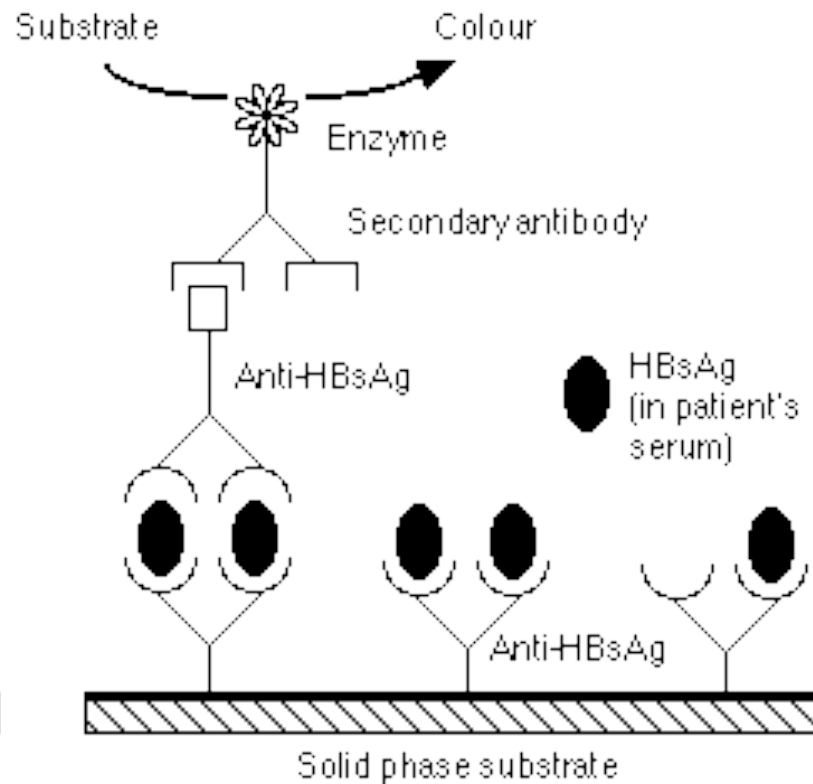


Elisa Sandwich

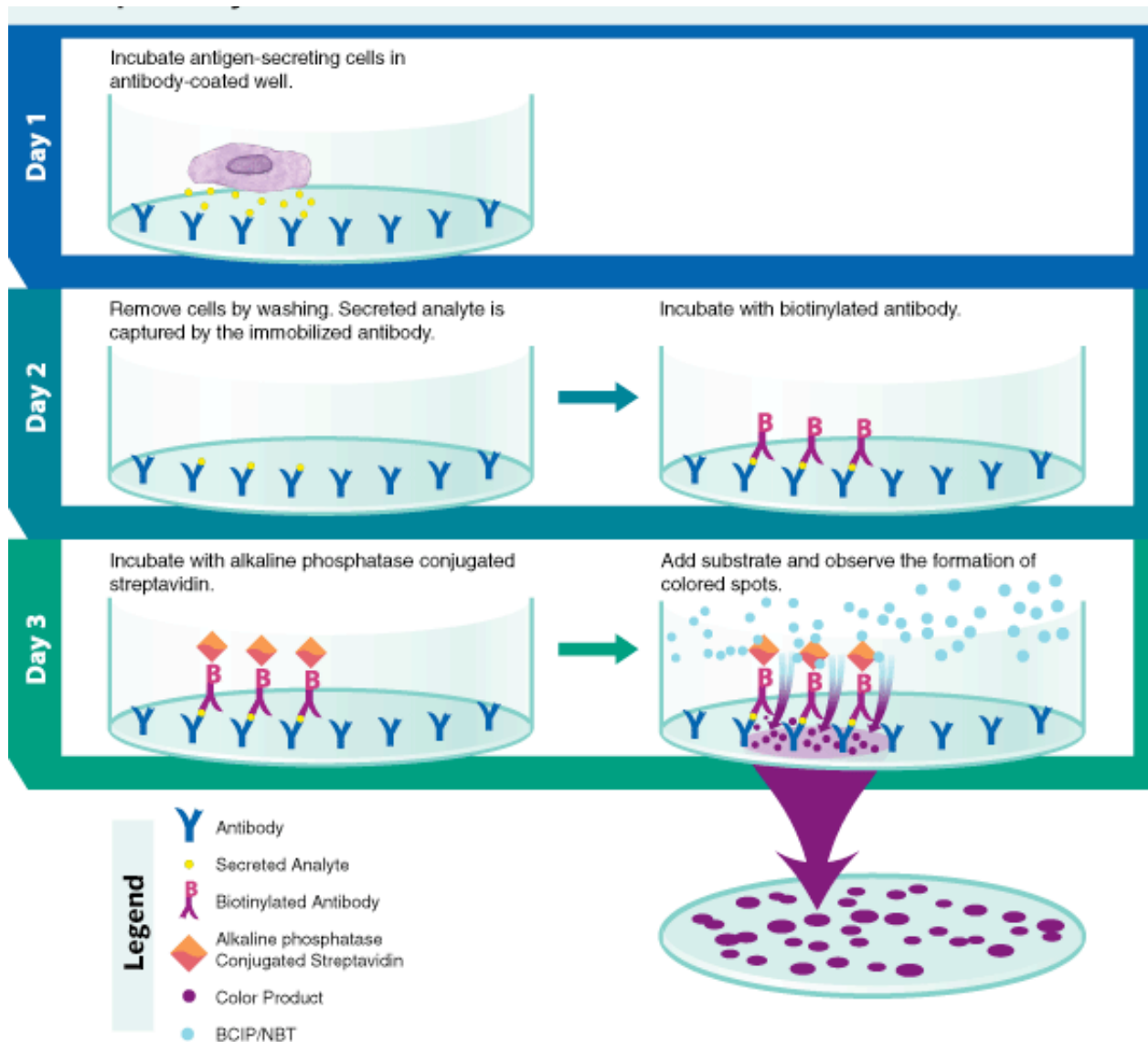
Direct ELISA



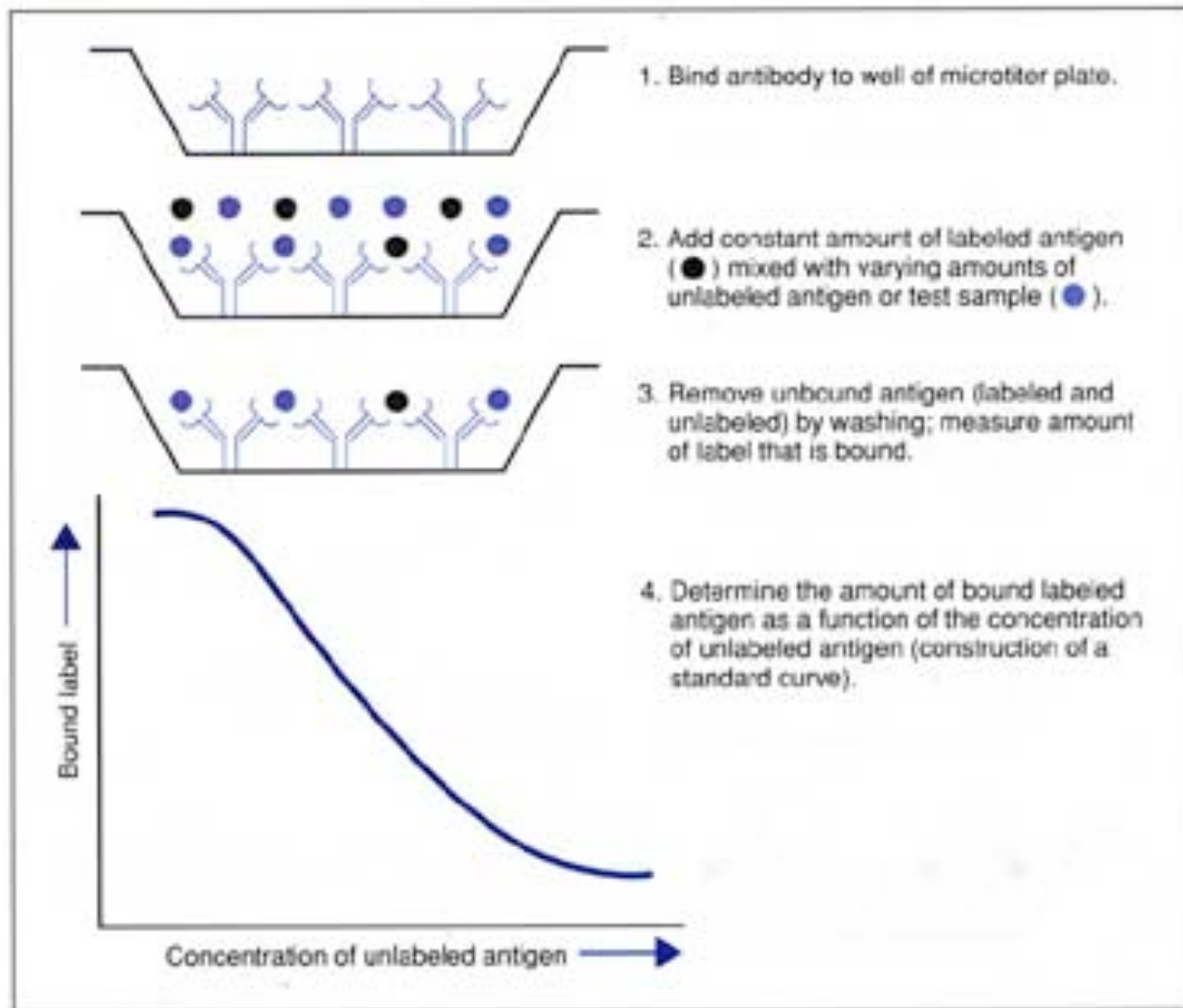
Sandwich ELISA



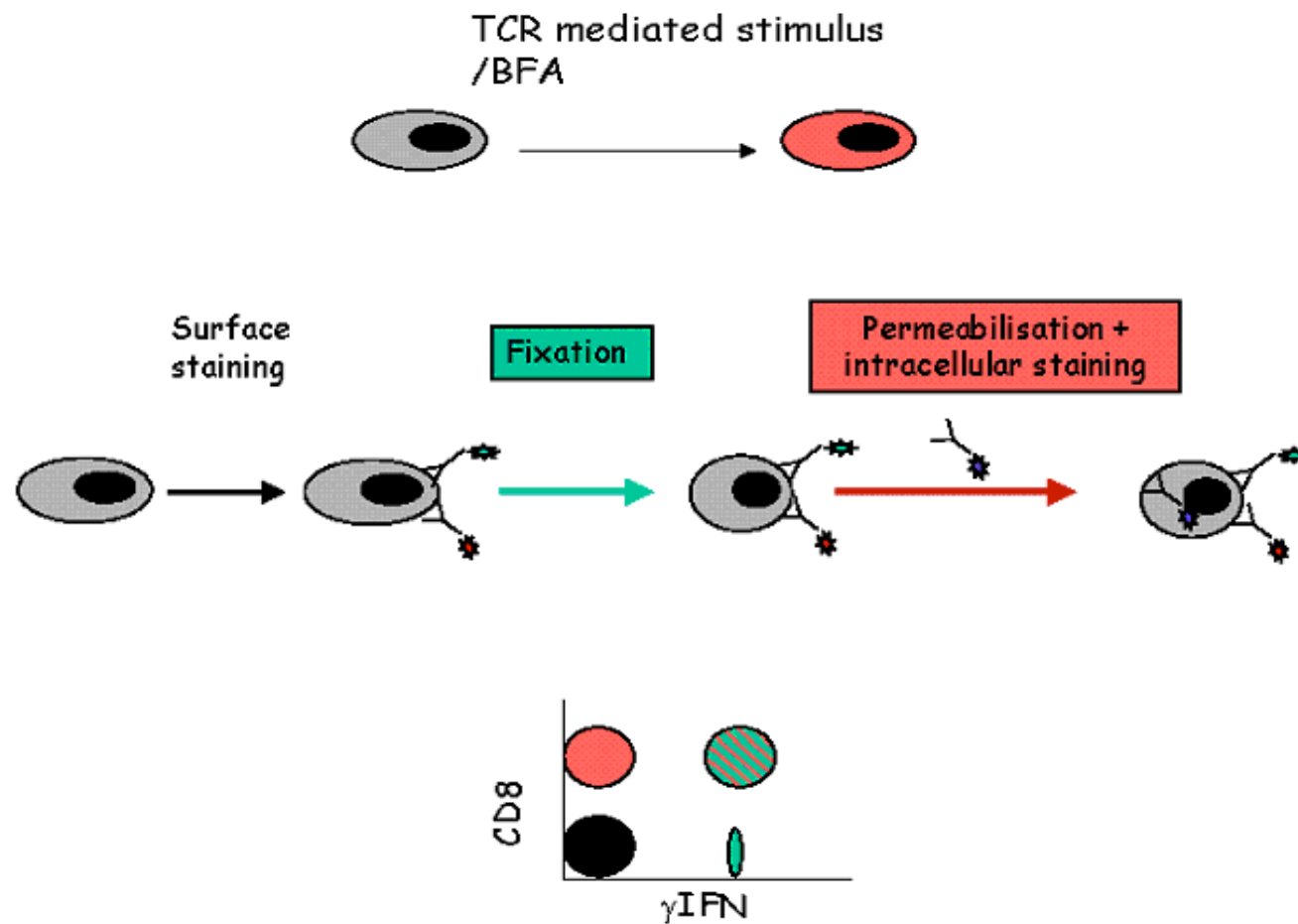
ELISPOT



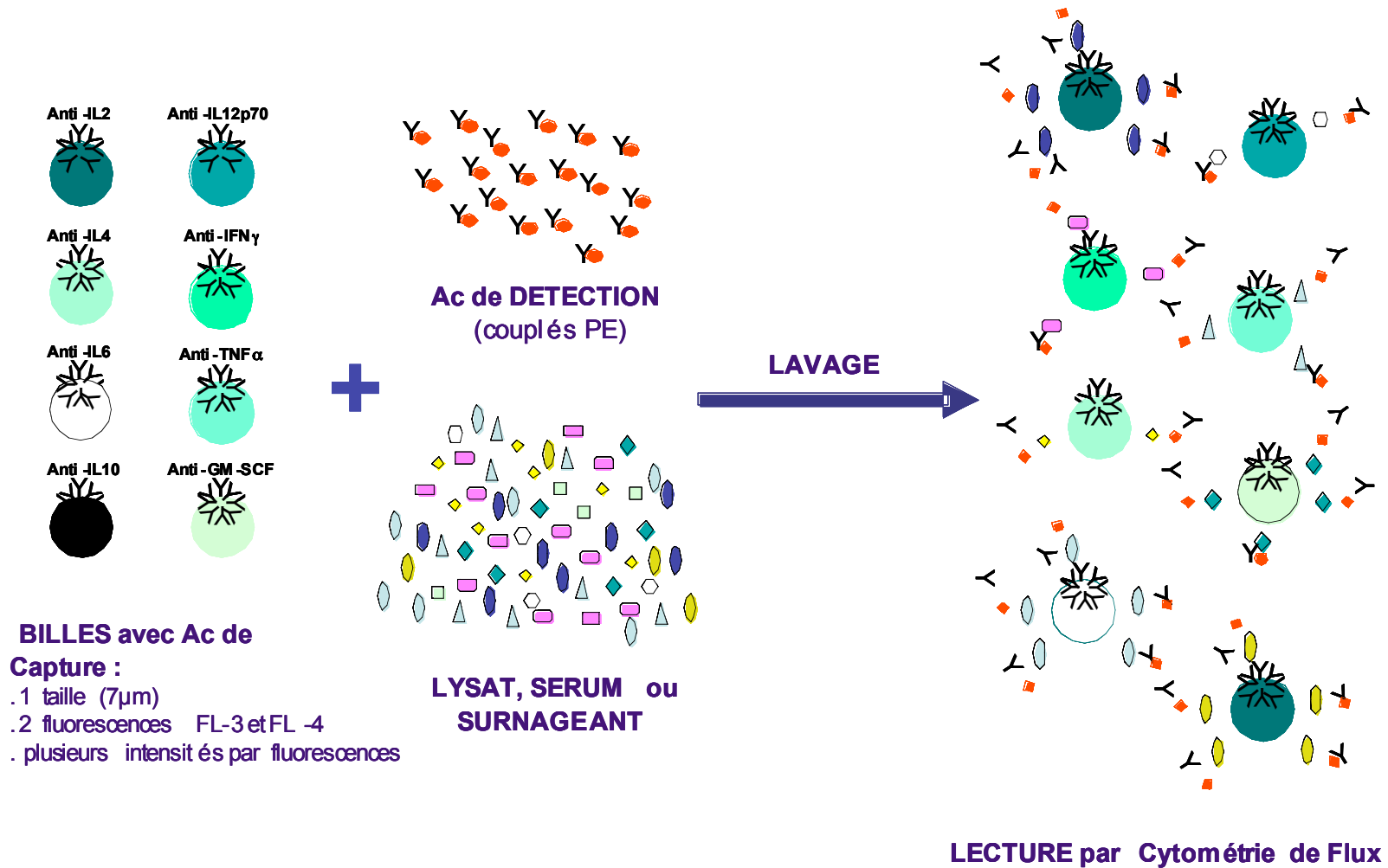
RIA (Radio Immunoassay)



Cytométrie en flux pour la détection de cytokines intracellulaires



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



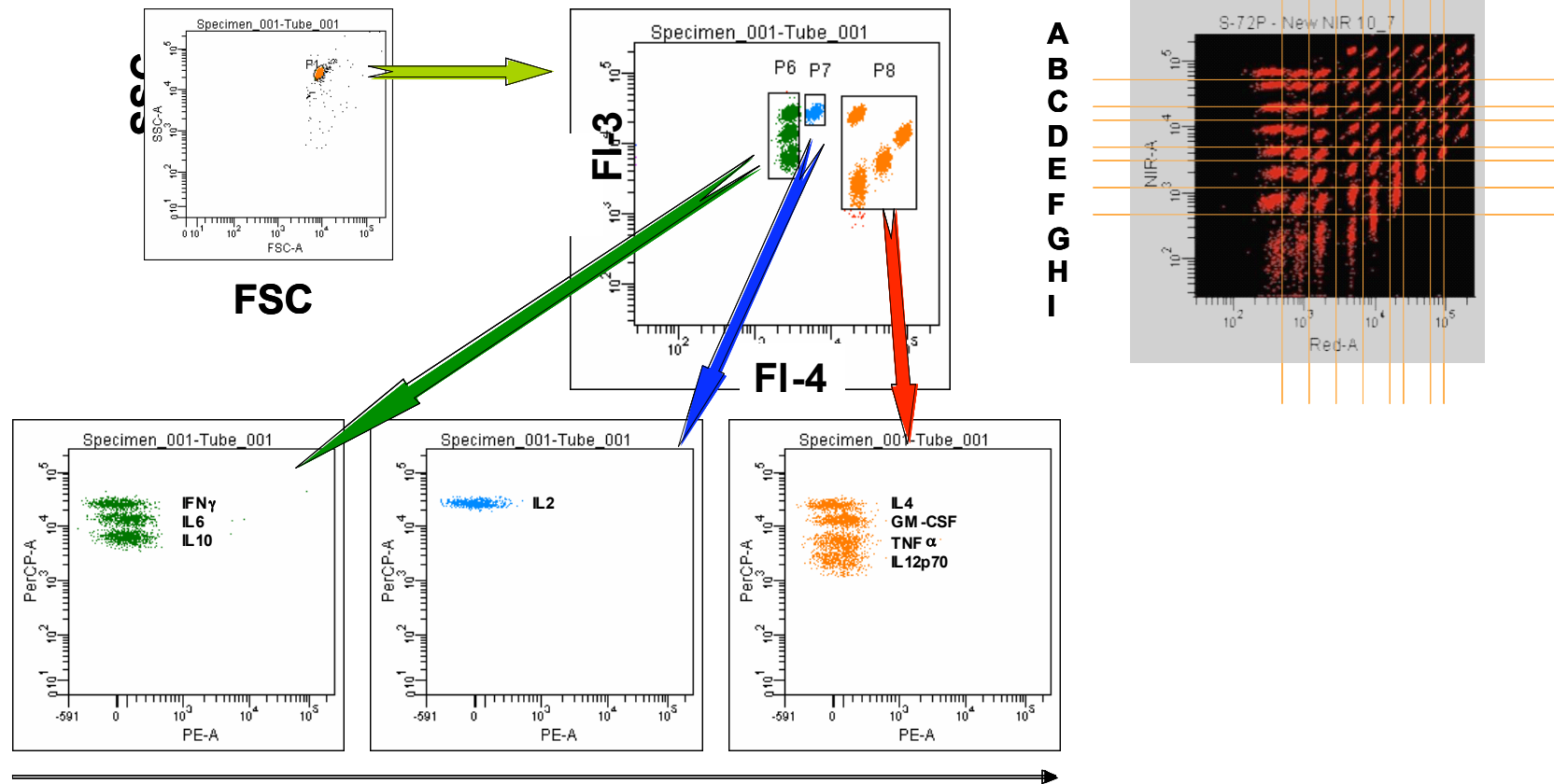
Cytométrie en flux pour la détection de cytokines dans le surnageant (Cytometric Beads Array)

Codification des billes par clustering :

Une seule taille de billes (7µm)
99% de singlets

2 "couleurs" de billes
♂ Matrice de billes

1 à 9



Détection de la positivité en PE

Cytometric Bead Array (FCAP)

Gammes étalons (cytokines humaines) : IL2, IL4, IL6, IL10, TNF α , IFN γ

**0
pg/ml**

**20
pg/ml**

**40
pg/ml**

**80
pg/ml**

**156
pg/ml**

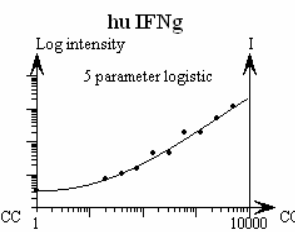
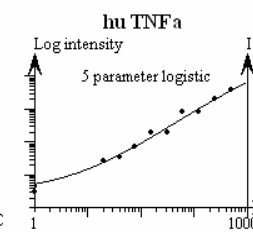
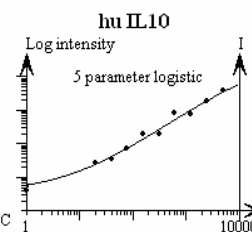
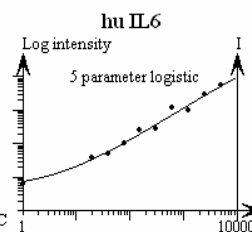
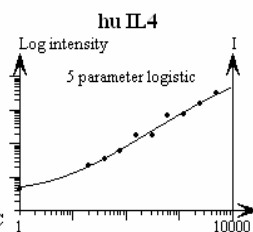
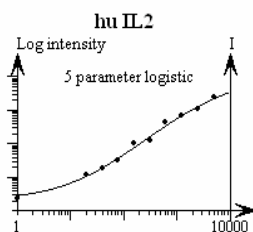
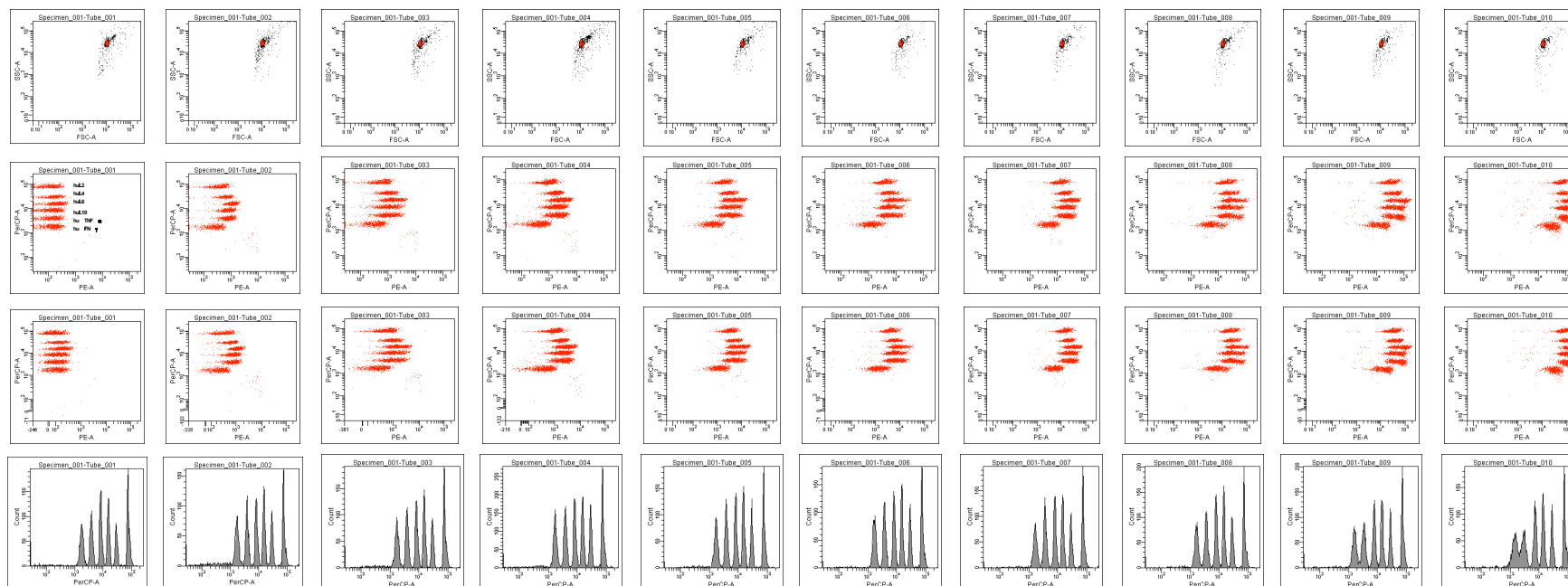
**312,5
pg/ml**

**625
pg/ml**

**1250
pg/ml**

**2500
pg/ml**

**5000
pg/ml**



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

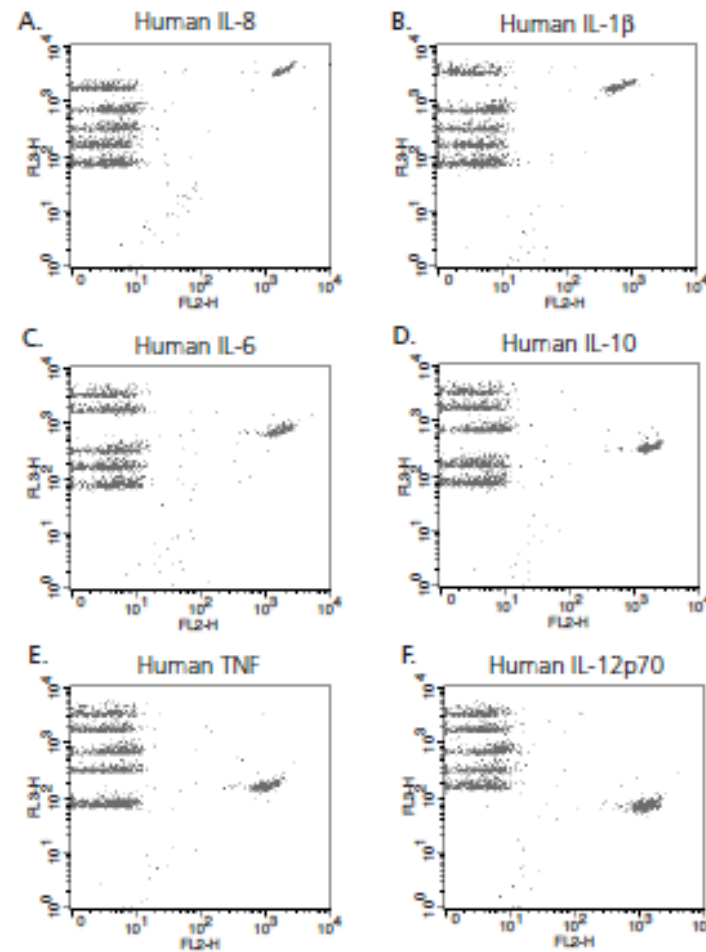


Figure 8. BD CellQuest™ Data for Detection of Individual Cytokines

Analyse des voies de signalisation

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

Production de cytokines

- ELISA / RIA
- ELISPOT
- Facs intracellulaire

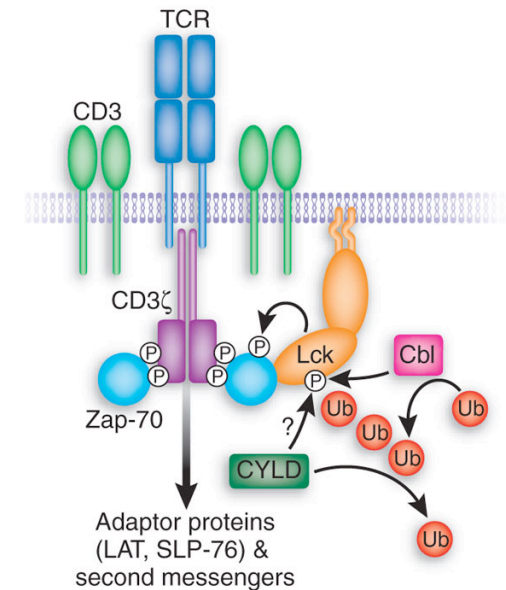
Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

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

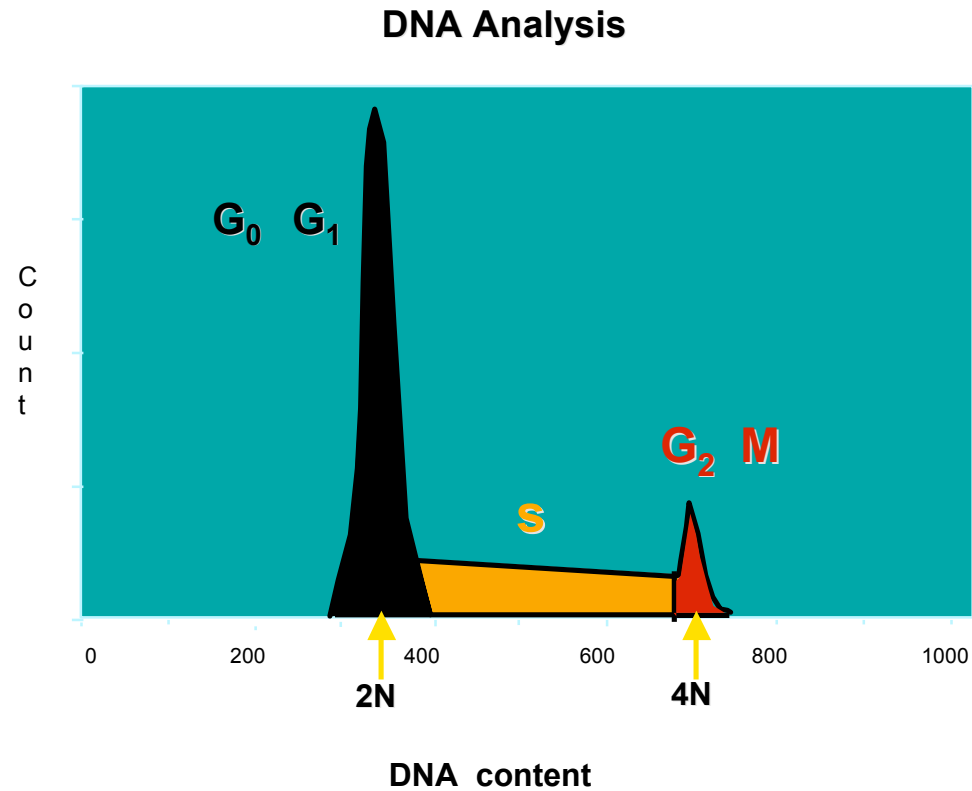
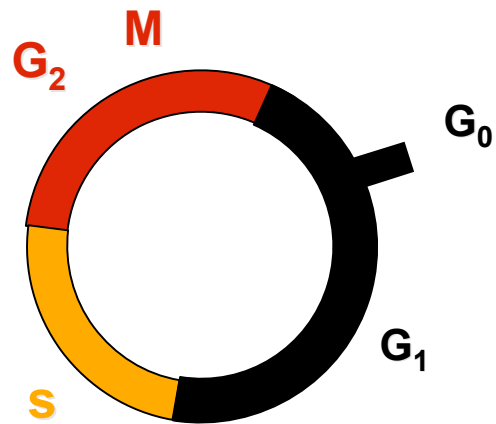
Fonctions effectrices

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

Activation / Fonction

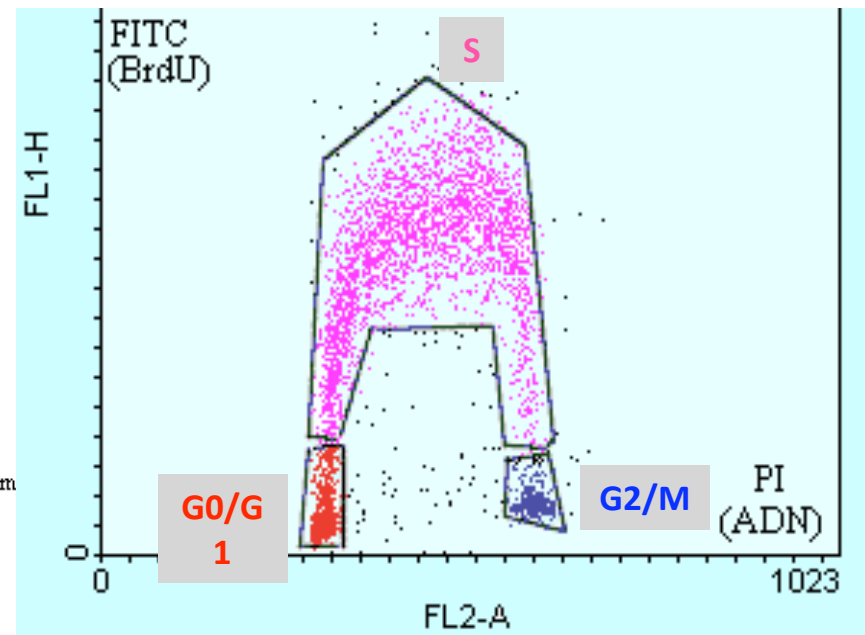
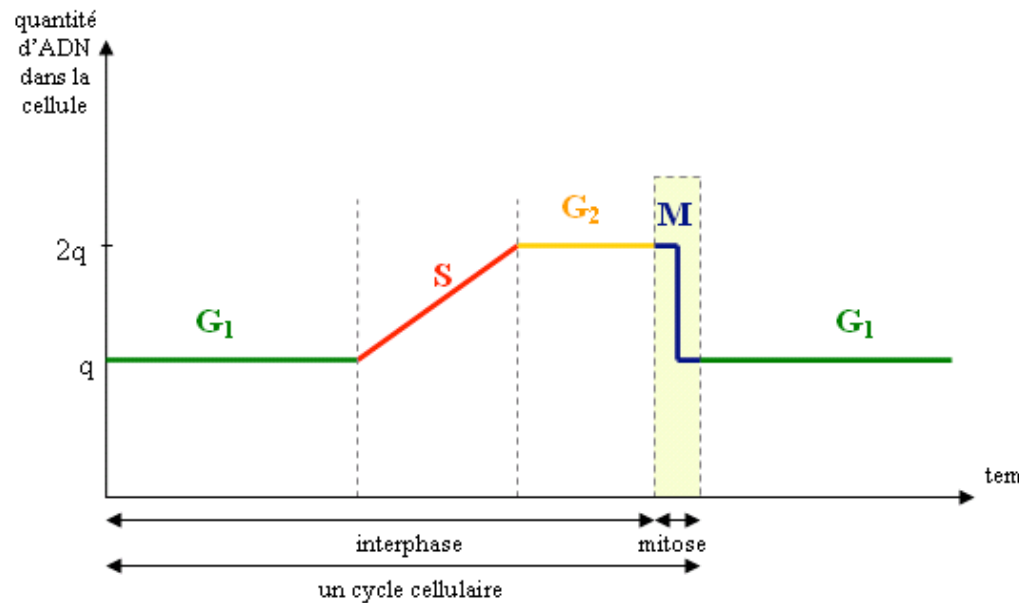


Etude du cycle cellulaire Iodure de propidium ou Hoestch 33342



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

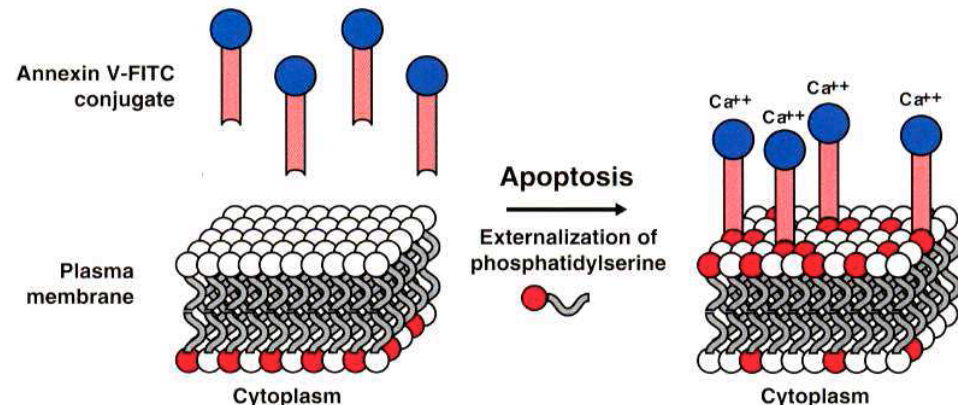
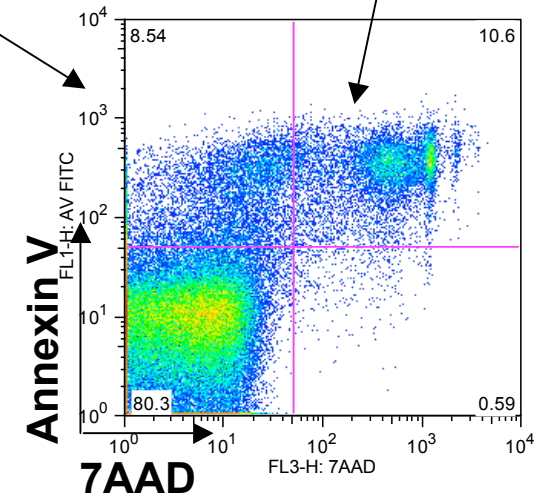


Analyse de la viabilité / apoptose/ nécrose

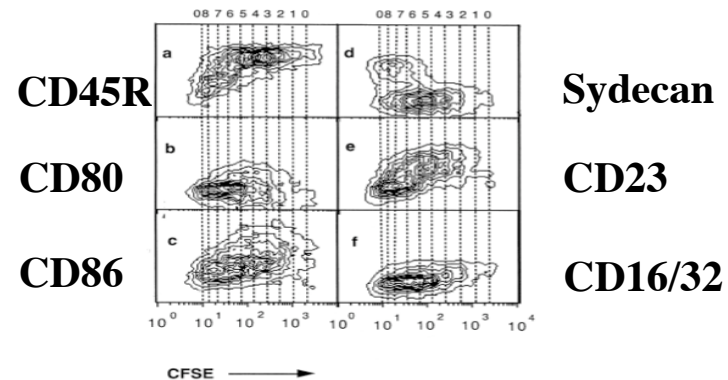
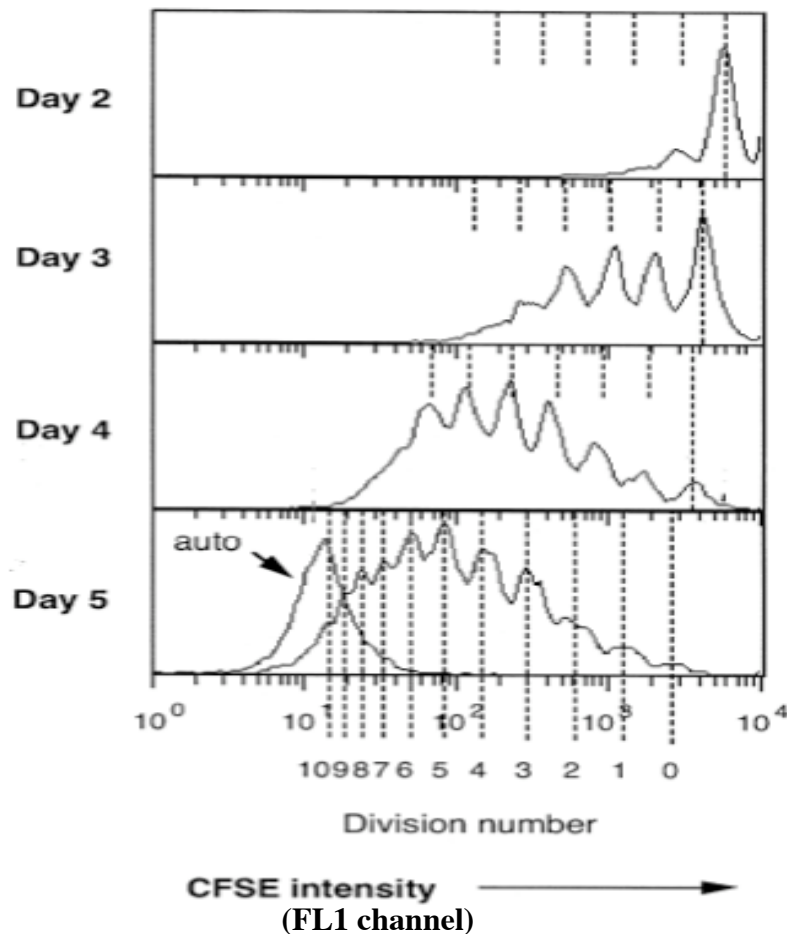
- **Iodure de propidium** : agent intercalent fluorescent de l'ADN, marque le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (nécrose)
- **Annexin V** : protéine cellulaire conjuguée à un fluorochrome, marque les phosphatidyl serine (PS) transloquées à la mb lors des événement précoce de l'apoptose
- **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



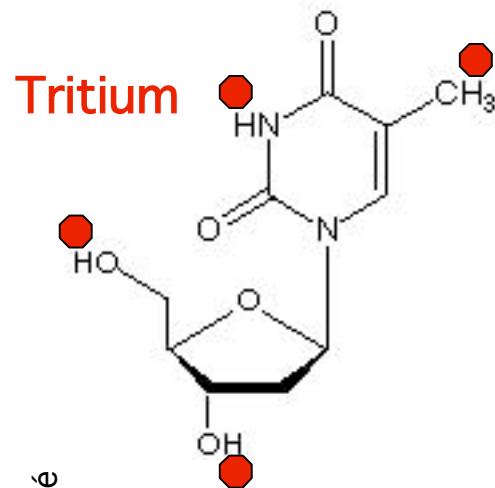
Etude de la prolifération CFSE ou CFDA-SE Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester



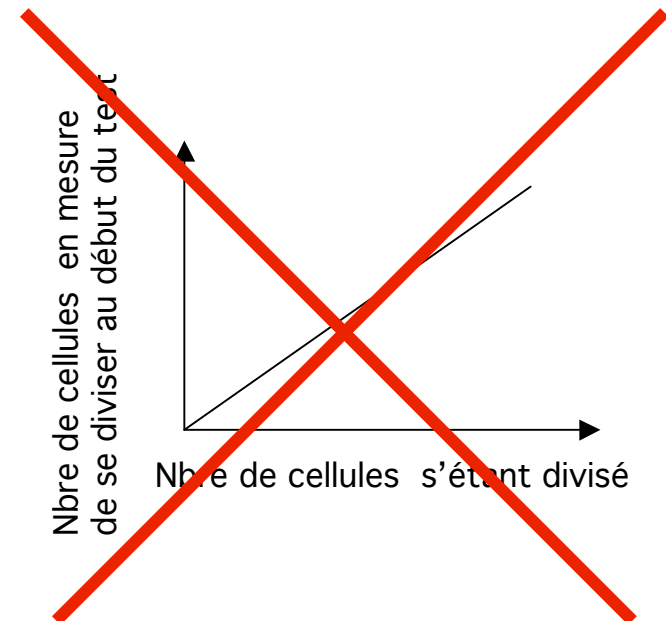
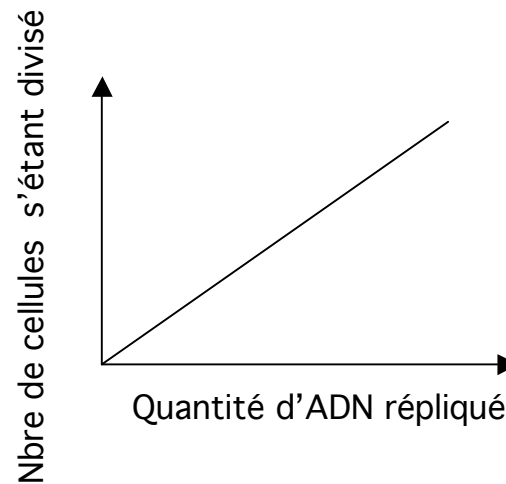
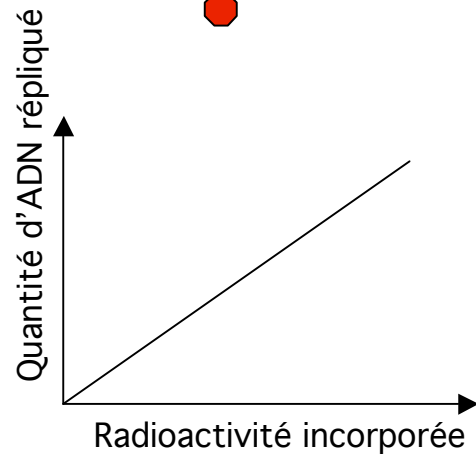
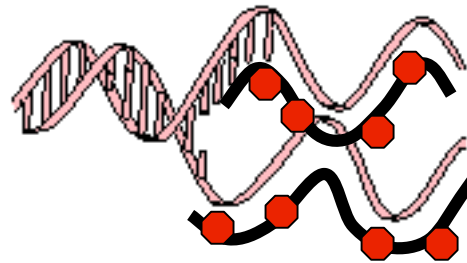
Le CFSE devient fluorescent après diffusion dans la cellule où les esterase endogènes libèrent les groupements acétate. Il devient alors fluorescent et ne diffuse plus à travers la membrane. A chaque division cellulaire, le CFSE se répartit équitablement entre les cellules filles, jusqu'à 10 générations discriminables

Infos sur la cinétique de prolifération et de différenciation cellulaire

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

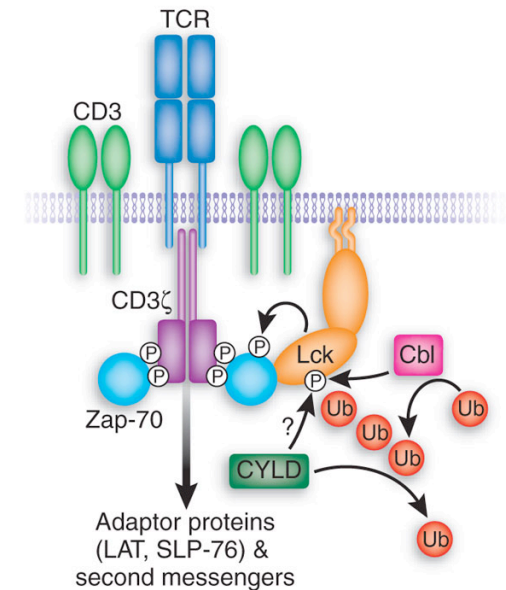
Prolifération/Division cellulaire/Apoptose

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

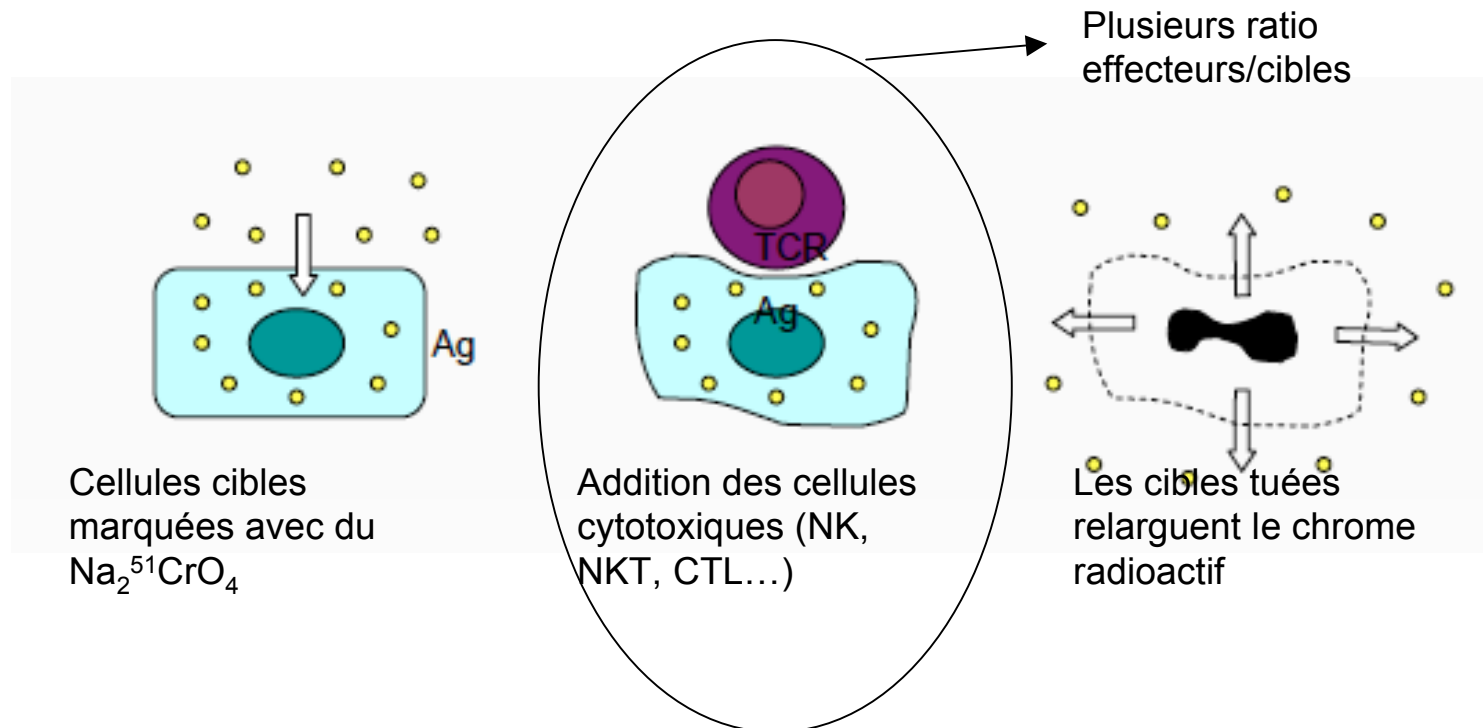
Fonctions effectrices

- 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

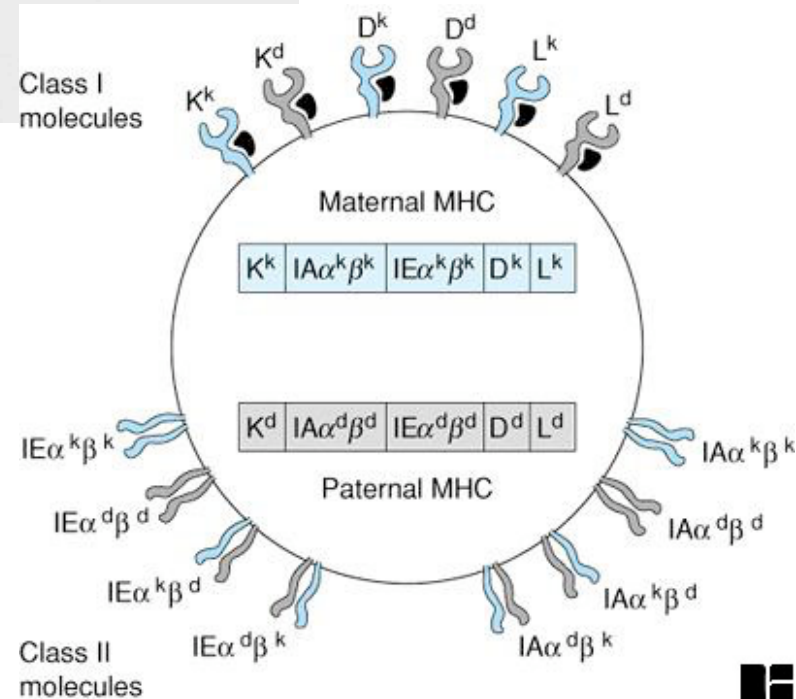
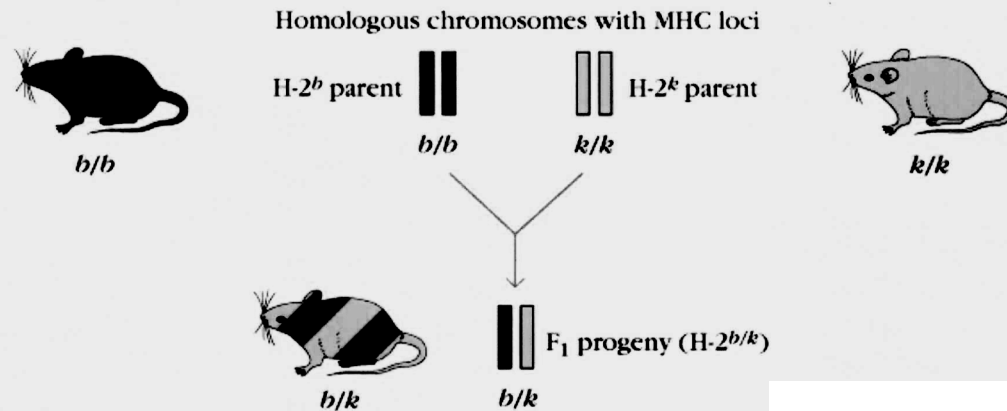
Mouse H-2 complex

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

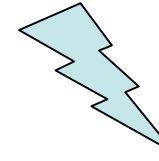
- Souris Nude: absence de thymus, absence de LT thymo-dépendants
- Souris SCID (« Severe Combined Immunodeficiency »): absence de LT et LB matures
- Souris NOD: diabète, anomalie IFN, anomalie activité NK
- Souris Beige (bg) : anomalie des macrophages et neutrophiles, anomalie NK et CTL
- Souris RAG^{-/-}: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



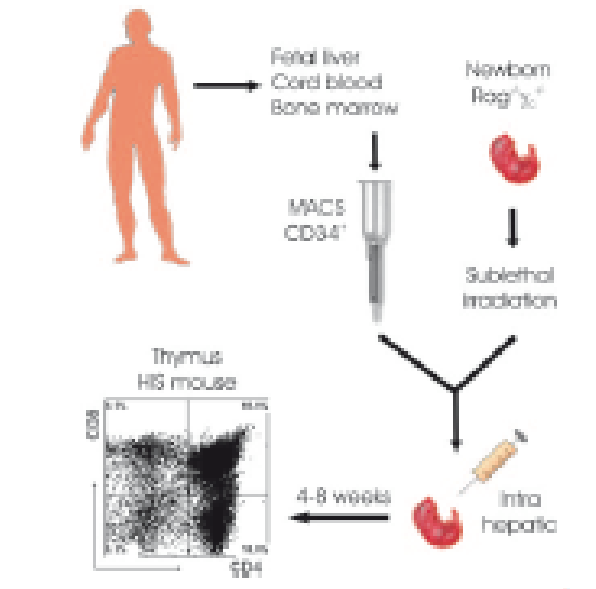
Souris receveuse

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 germinale est également modifié: il est transmis à la progénie selon les lois de Mendel

Les souris transgéniques

Pre-implantation

1 cell

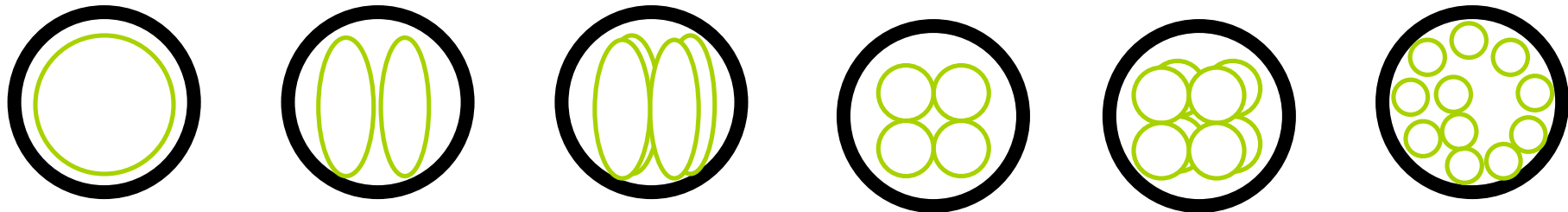
2 cells

4 cells

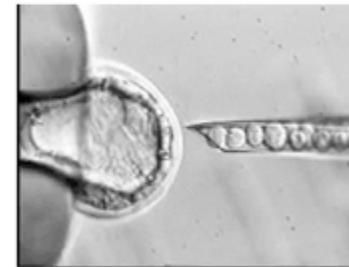
8 cells

16 cells

32 cells



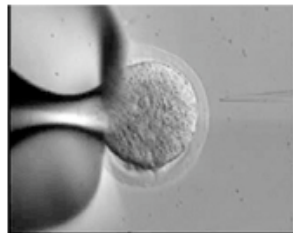
MITOTIC DIVISIONS



Pronuclear Injection

Blastocyst injection

Recombinant DNA constructs

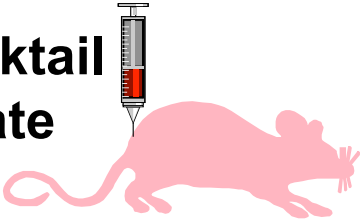


Genetically modified embryonic stem cells (ES cells)

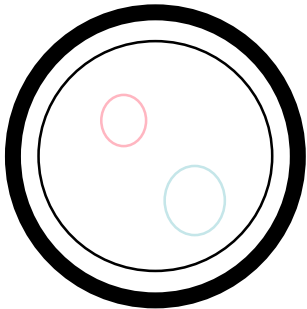
Injection dans le pronucleus

- **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**

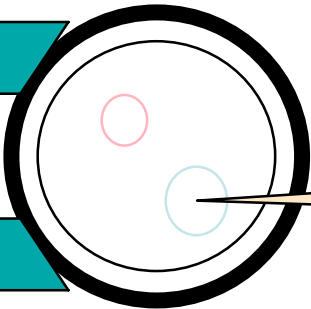
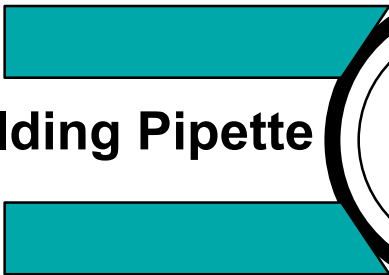


X

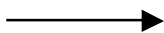


**1-cell pronuclear stage
mouse embryo.**

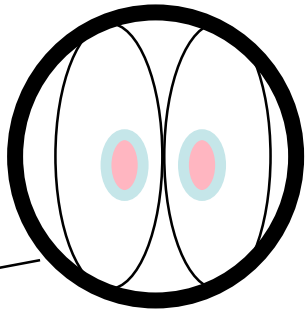
Holding Pipette



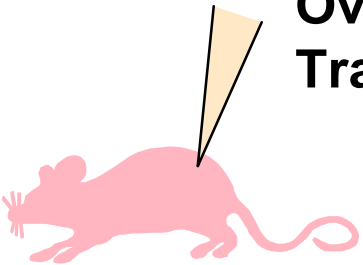
Injection Pipette



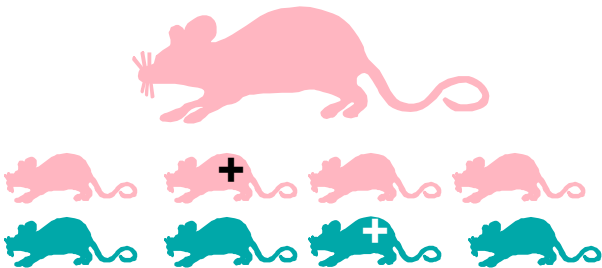
2-cell stage embryo



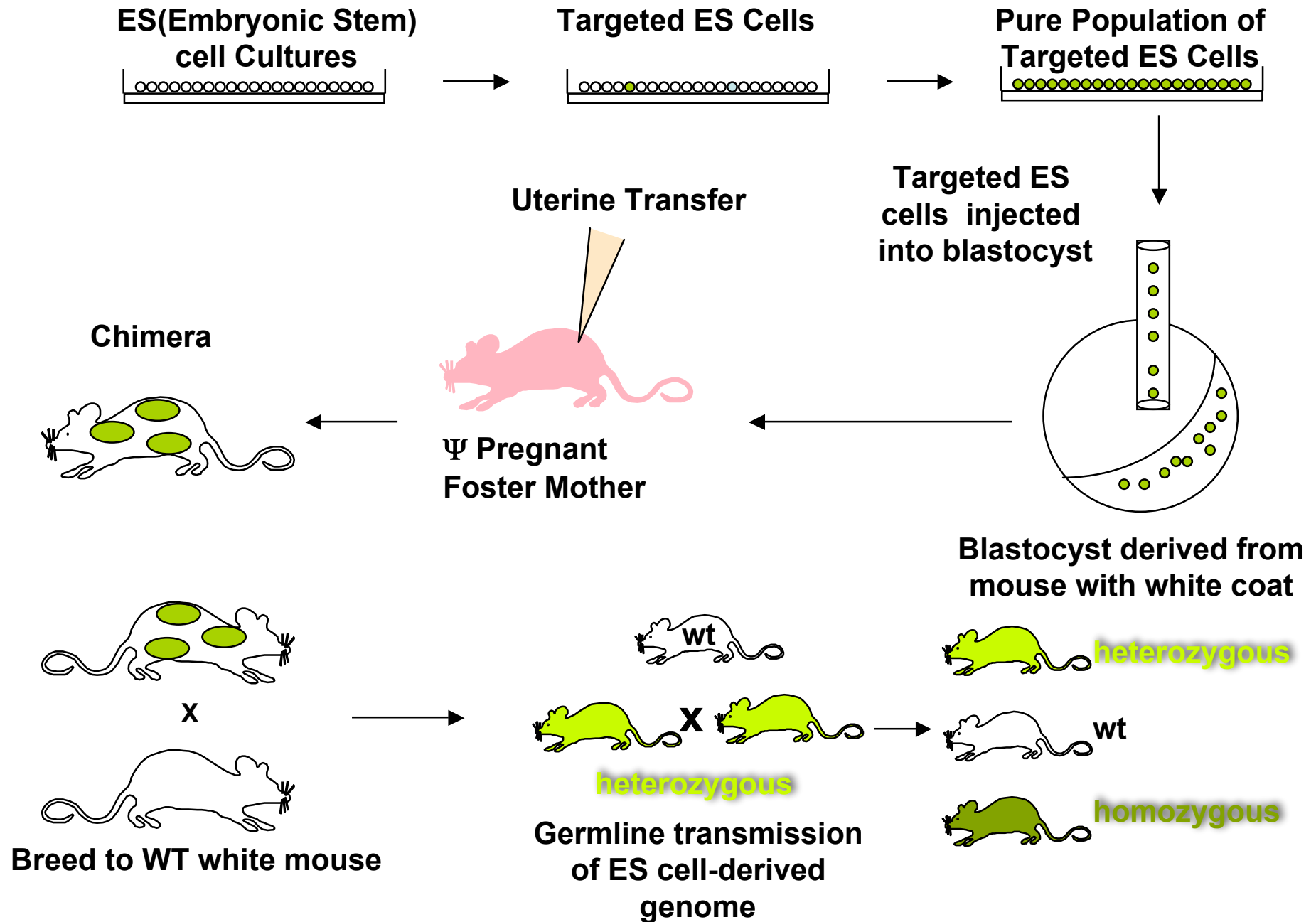
**Oviduct
Transfer**



**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

