

9. Méthodes en immunologie

par Claudine Neyen et Bruno Lemaitre,
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

Web: <http://ghi.epfl.ch>

Sommaire

9.1 L'anticorps: un outil versatile

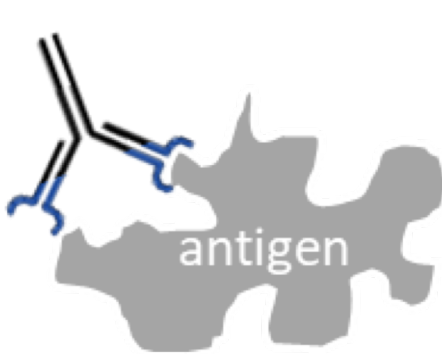
9.2 Identification et quantification d'antigènes: **ELISA et Western Blot**

9.3 Essais cellulaires pour quantifier les réactions immunitaires: **cytotoxicité et prolifération**

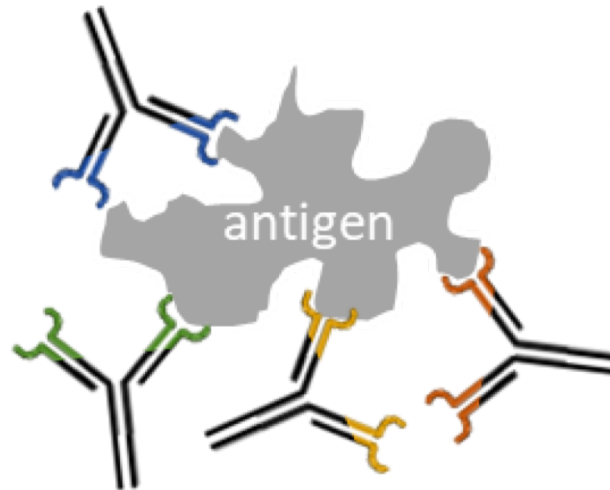
9.4 Identification, caractérisation et purification de types cellulaires: **cytométrie en flux et FACS**

Identification de molécules à l'aide d'anticorps

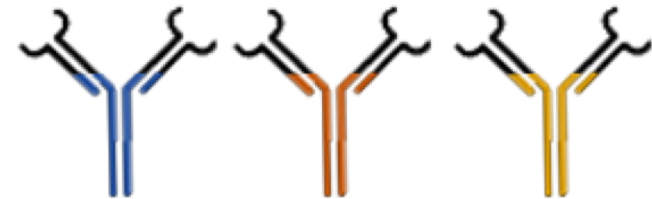
- Les anticorps (particulièrement les **IgGs**) ont de nombreuses applications thérapeutiques, en recherche et dans le diagnostic.
- On distingue les anticorps **polyclonaux** (sérum reconnaissant plusieurs épitopes d'un même antigène) ou **monoclonaux** (reconnaissant un seul épitope du même antigène)
- Les anticorps peuvent être produits dans **différentes espèces** (p. ex. souris, lapin, âne, poule ou chèvre)



Anticorps monoclonal



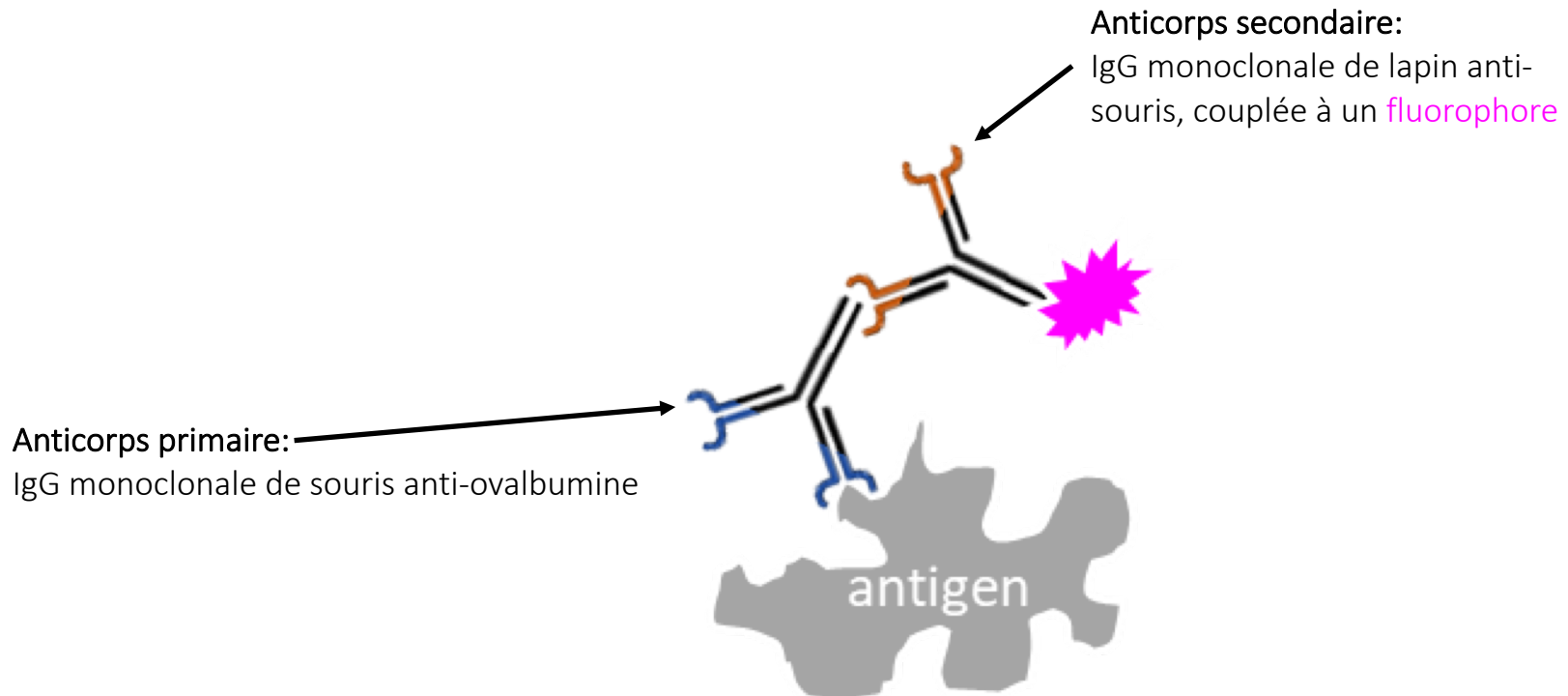
Anticorps polyclonal



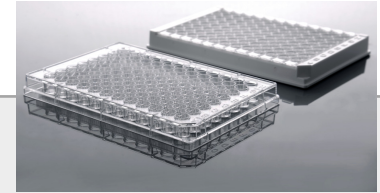
Des anticorps issus d'espèces différentes diffèrent dans leur portion Fc

Identification de molécules à l'aide d'anticorps

- **Les anticorps primaires** reconnaissent un antigène quelconque (p.ex. IgG murine anti-ovalbumine)
- **Les anticorps secondaires** reconnaissent la portion Fc d'un anticorps d'une espèce différente (p.ex. IgG de chèvre anti-souris)
- Les anticorps peuvent être **couplés à des molécules fluorescentes** (p.ex. FITC, PE) ou **effectrices** (p.ex. des enzymes comme la peroxydase)



ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)



Qu'est-ce que c'est?

Essai sur microplaques

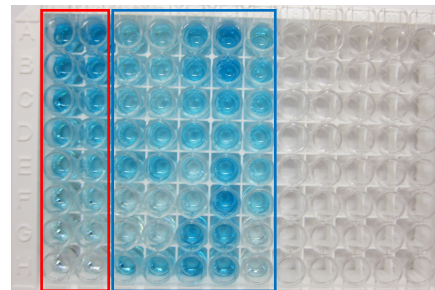
A quoi cela sert-il?

Détecter et quantifier des molécules (peptides, protéines, hormones,...) à partir de mélanges complexes (p.ex. sérum, surnageant de culture cellulaire)

Comment est-ce que ça marche?

1. L'antigène est immobilisé sur une surface solide
2. Un anticorps spécifique de l'antigène est ajouté afin de détecter l'antigène
3. L'enzyme couplée à l'anticorps catalyse une réaction colorée qui peut être quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre

A quoi ressemble un ELISA?

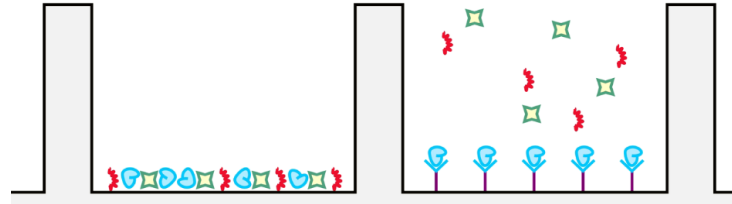


Dilution en série
pour établir la
courbe étalon

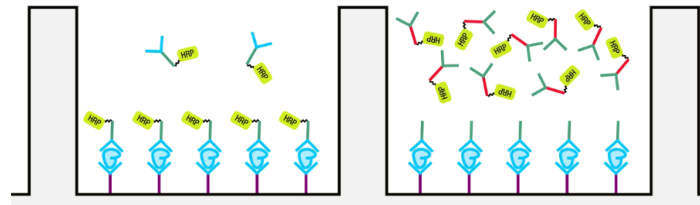
Echantillons avec quantité
inconnue d'antigène

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

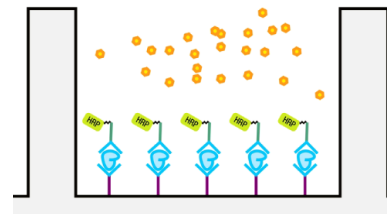
1. Capture directe versus indirecte ('sandwich ELISA')



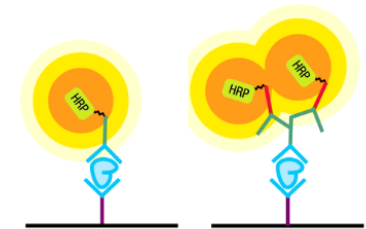
2. Détection directe versus indirecte



3. Réaction de substrat



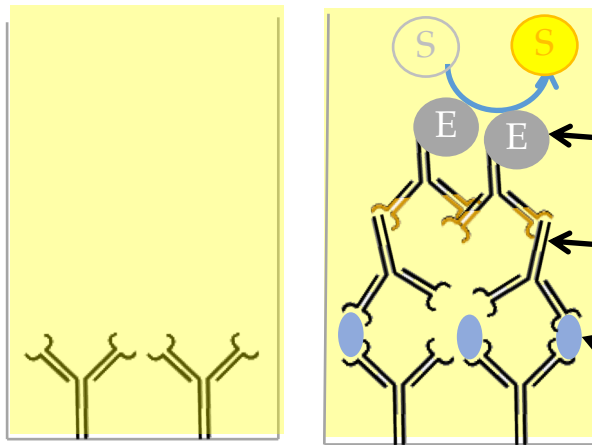
Signal amplification



Direct detection Indirect detection

Exemple: quantification d'une cytokine dans le sérum ou dans le surnageant de culture cellulaire

IL-2 sandwich ELISA

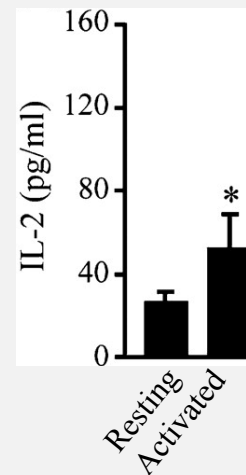
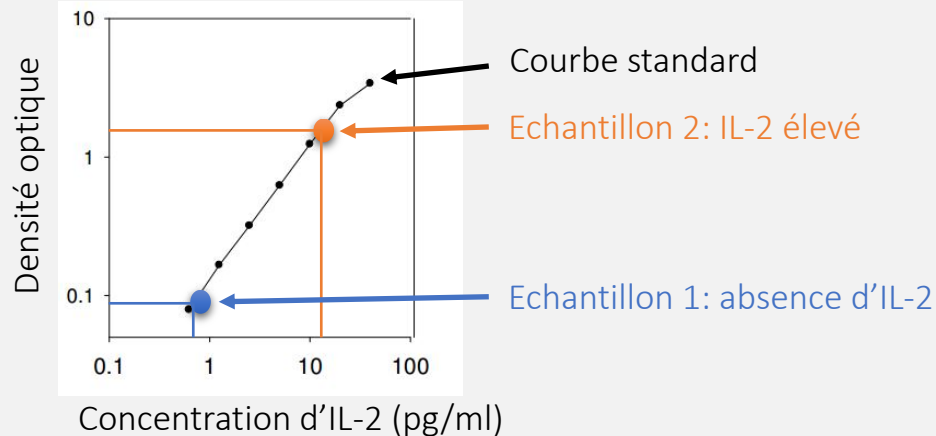


Echantillon 1:
cellules T au repos

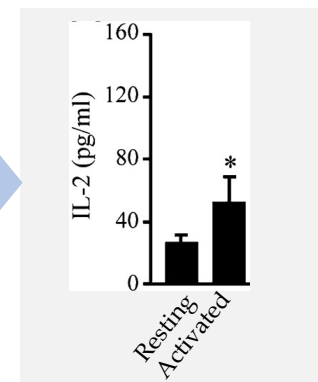
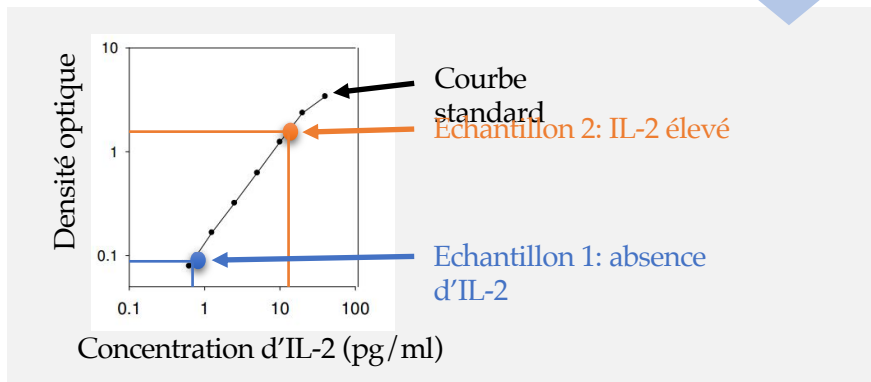
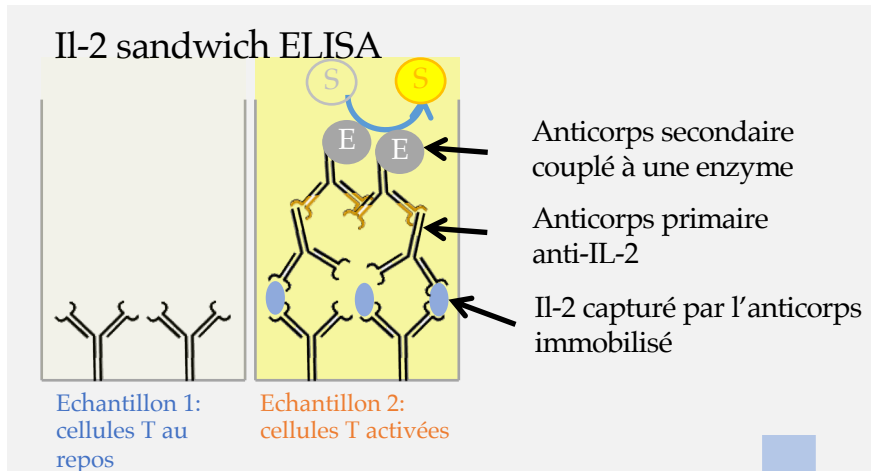
Echantillon 2:
cellules T activées

Anticorps secondaire
couplé à une enzyme

IL-2 capturé par l'anticorps
immobilisé



Exemple : quantification d'une cytokine dans le sérum ou dans le surnageant de culture cellulaire



Western Blot

Qu'est-ce que c'est?

Essai de détection de protéines en phase solide

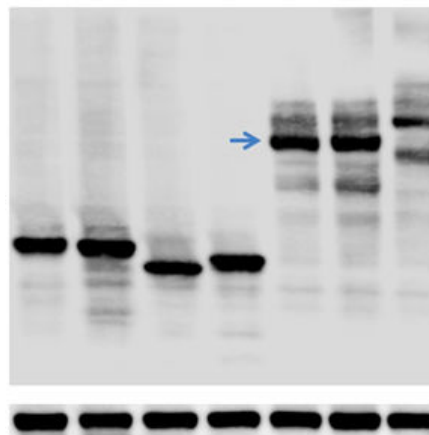
A quoi cela sert-il?

Détecter, quantifier et caractériser des protéines et leurs modifications post-traductionnelles (p.ex. phosphorylation)

Comment est-ce que ça marche?

1. Un mélange de protéines est séparé par électrophorèse de gel et transféré sur une membrane de nitrocellulose (blot)
2. Un anticorps spécifique de l'antigène recherché est ajouté afin de détecter l'antigène
3. L'enzyme couplée à l'anticorps catalyse une réaction luminescente qui peut être visualisée sur film

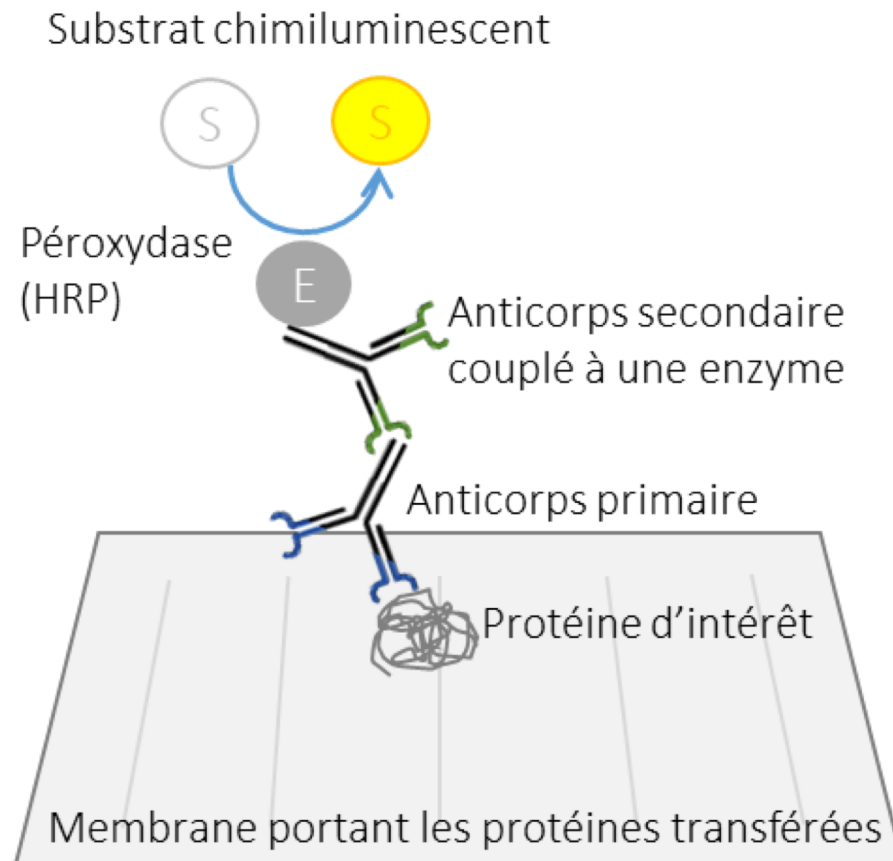
A quoi ressemble un Western?



← Protéine d'intérêt

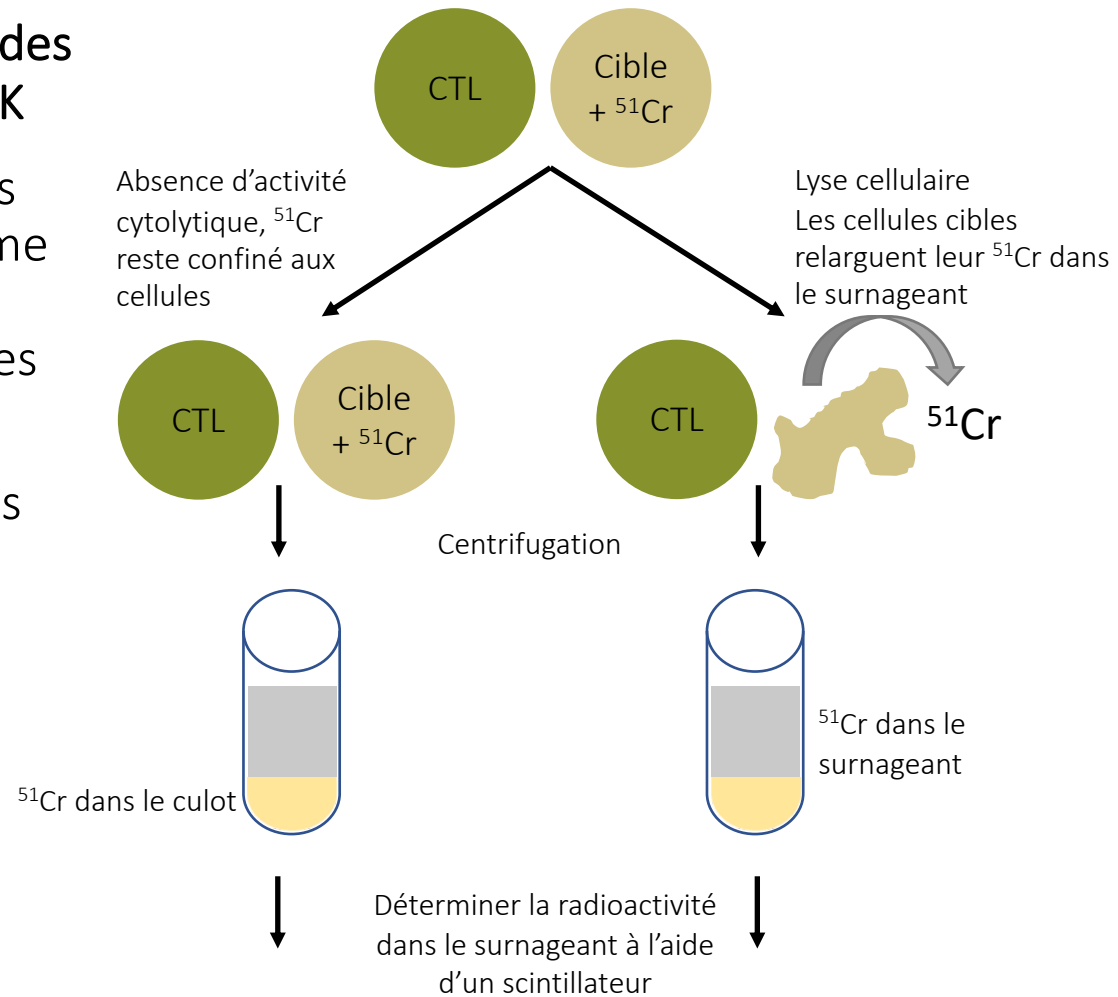
Témoins de charge pour
normaliser le signal

Western Blot



Essais cellulaires : essai de relargage de Chrome51 (Cr51) pour quantifier la cytotoxicité

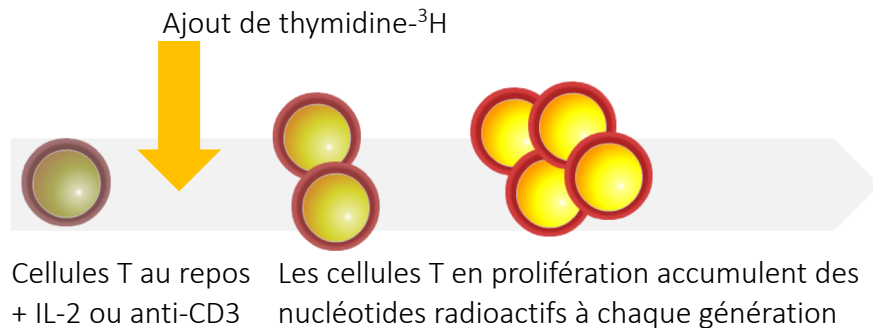
- Utile pour mesurer la **fonction des cellules T CTL ou des cellules NK**
- Les cellules T CTL ou les cellules NK tuent en relarguant granzyme et perforine, qui détruisent la membrane cellulaire des cellules cibles
- Les cellules cibles sont chargées de chrome radioactif



Essais cellulaires: prolifération

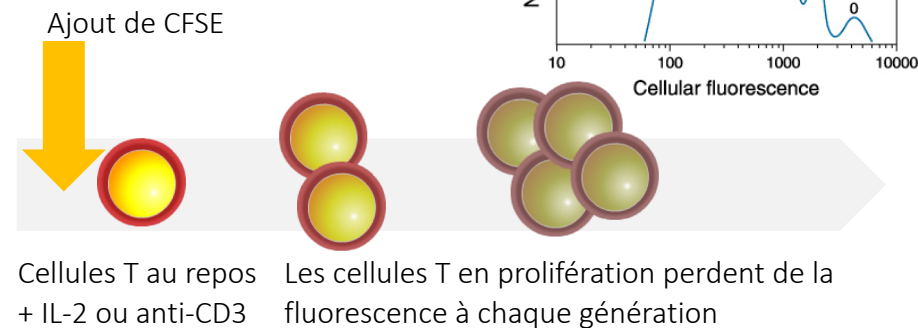
Marquage radioactif

- Les cellules sont induites à proliférer
- Des nucléotides radioactifs sont ajoutés au milieu de culture
- Les cellules incorporent la thymidine tritiée dans leur ADN à chaque cycle de réplication
- Après plusieurs jours, les cellules sont collectées et lysées, et la radioactivité est quantifiée.



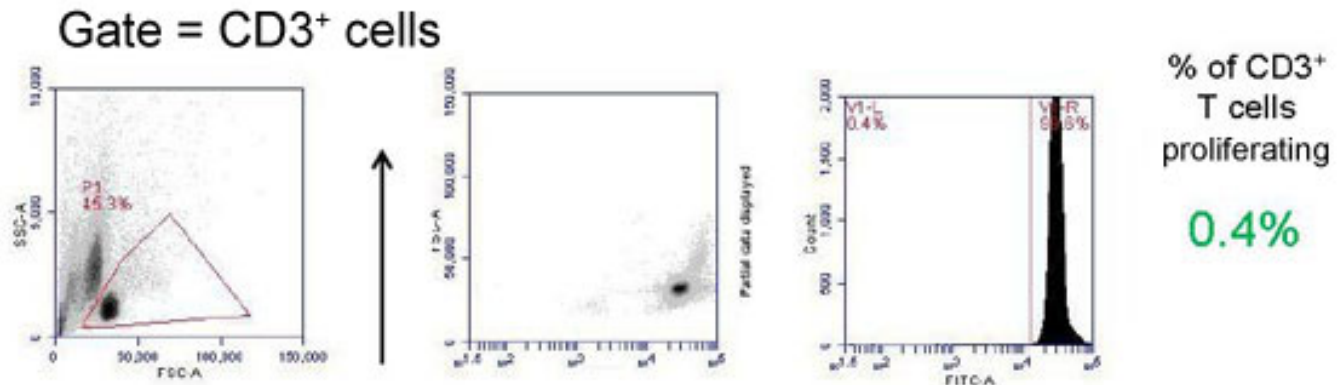
Marquage fluorescent

- Les cellules sont marquées avec un fluorophore cytoplasmique (p.ex. CFSE)
- Les cellules sont induites à proliférer
- Lors de chaque division, chaque cellule-fille retient la moitié du fluorophore
- Après plusieurs jours, les cellules sont collectées, fixées et analysées par cytométrie en flux.

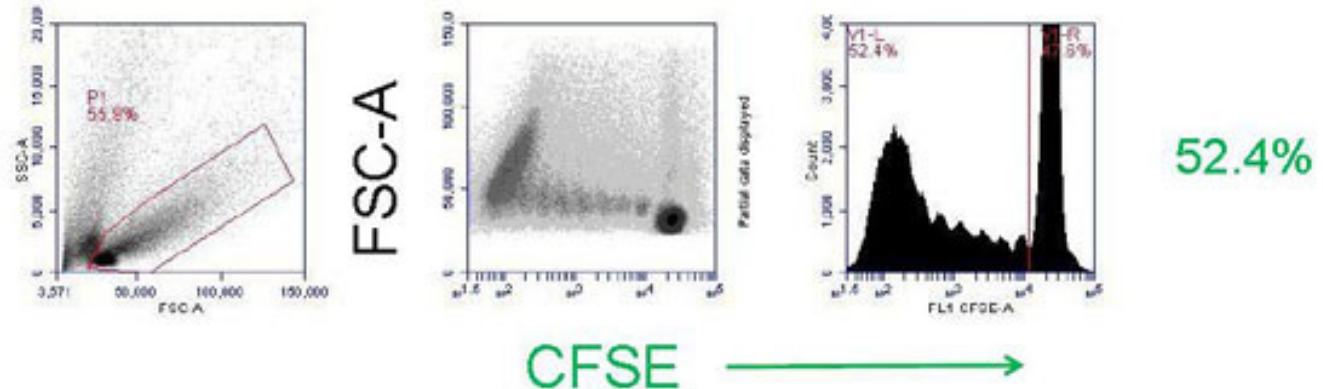


Exemple: Essai de prolifération des cellules T

T cells only



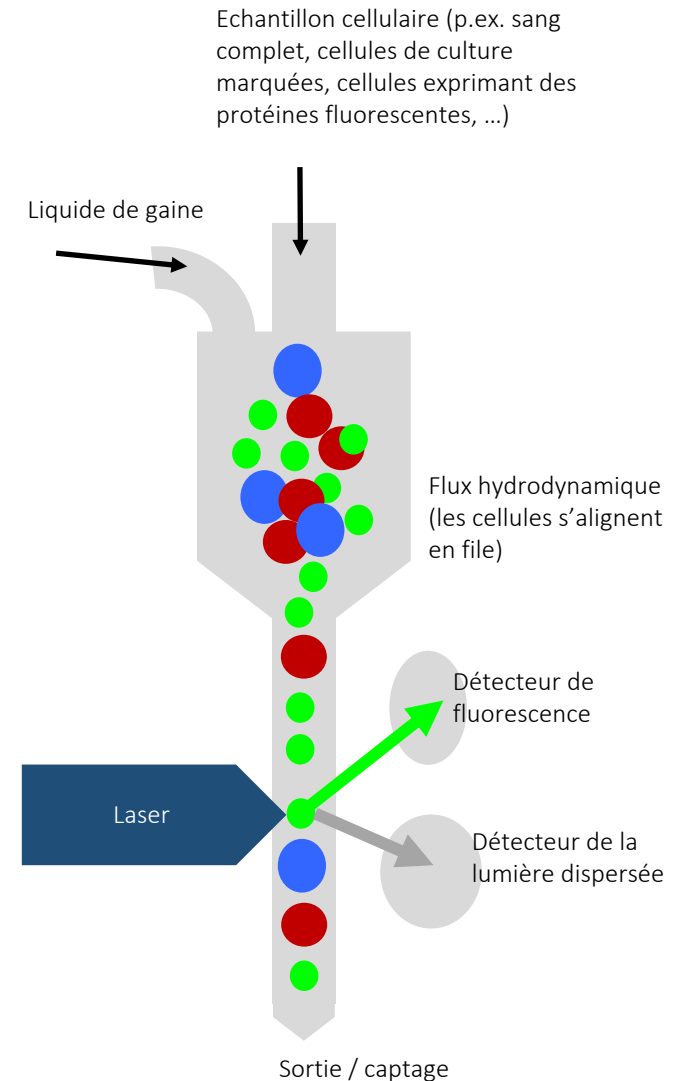
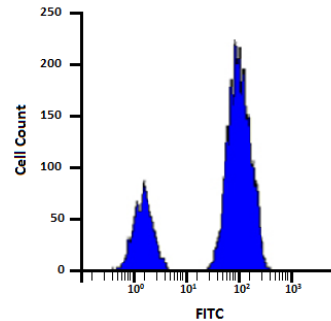
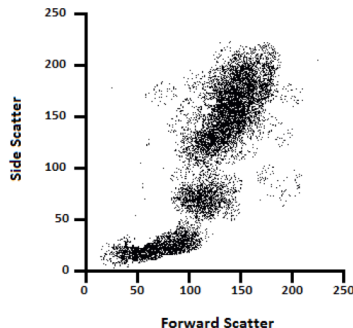
Dendritic cells
plus T cells
1 : 8



Principe de la cytométrie en flux

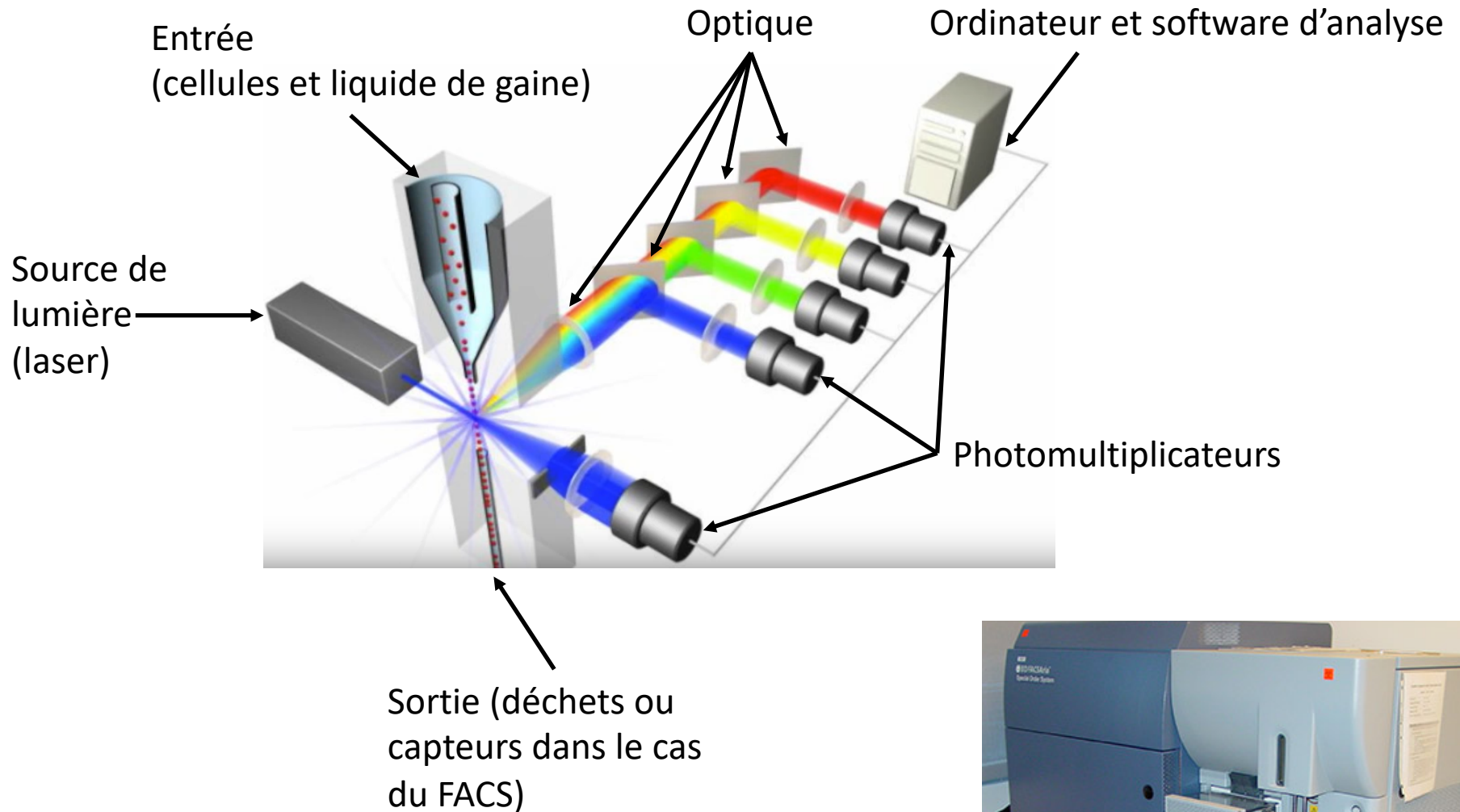
Qu'est-ce que c'est?	Technologie à base de laser permettant l'analyse de cellules isolées en suspension liquide
A quoi cela sert-il?	Caractériser et compter des cellules ou des particules
Comment est-ce que ça marche?	<ol style="list-style-type: none">1. Une suspension de cellules isolées passe devant un laser2. Des photomultiplicateurs détectent, pour chaque cellule:<ul style="list-style-type: none">• la lumière dispersée• la fluorescence émise

A quoi ressemble un résultat de cytométrie de flux?



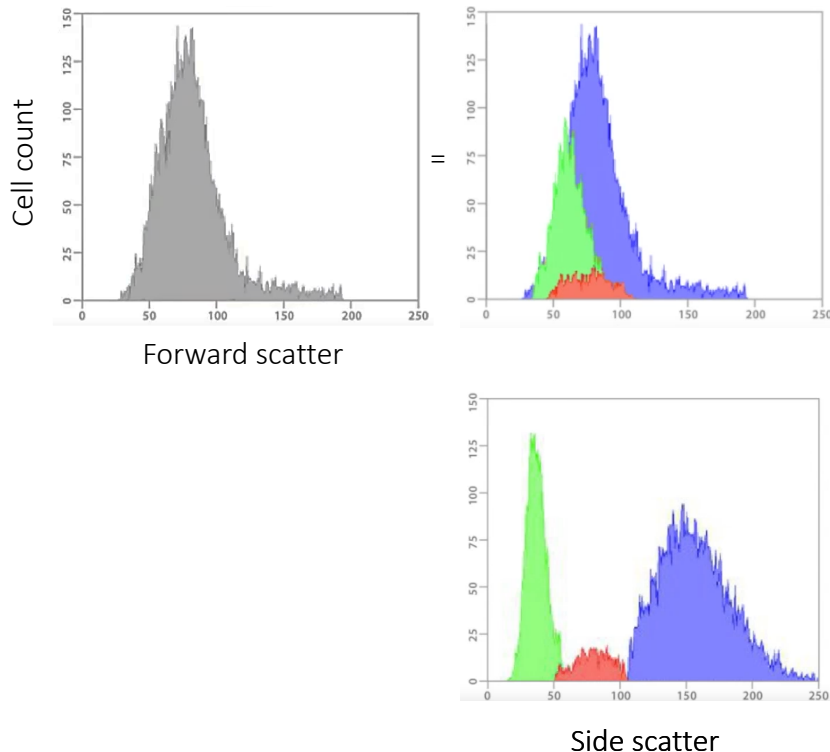
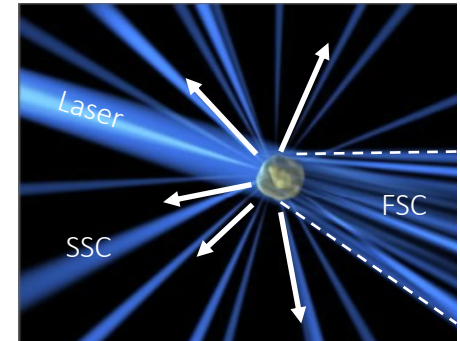
[Vidéo](#) sur le principe de la cytométrie en flux

Cytométrie en flux: équipement

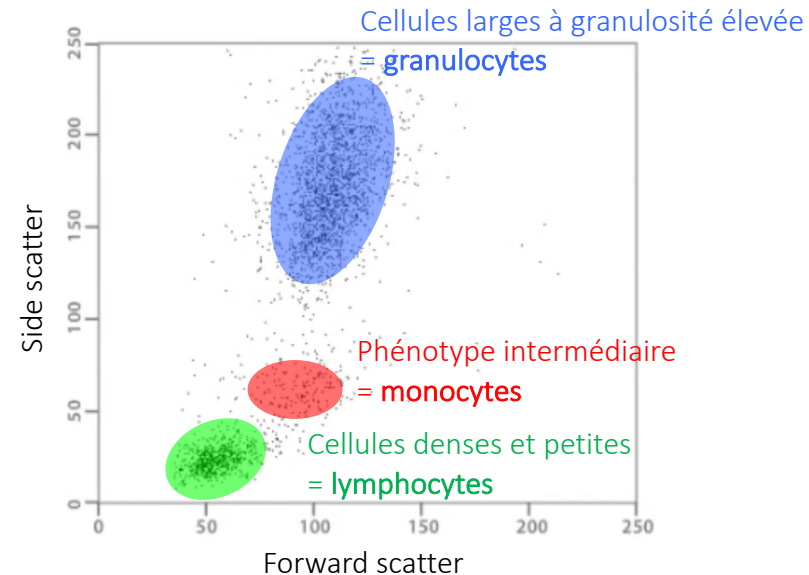


Cytométrie en flux sur cellules non-marquées

- En passant devant le laser, une cellule diffracte le faisceau lumineux:
 - en fonction de sa taille: **Forward scatter (FSC)**
 - en fonction de sa granularité: **Side scatter (SSC)**
- Chaque événement (cellule) est compté et représenté sur un **histogramme de distribution de fréquence**
 - Les **histogrammes monoparamétriques** représentent une seule caractéristique d'une population de cellules
 - Les **scatter plots** représentent des **données multiparamétriques**

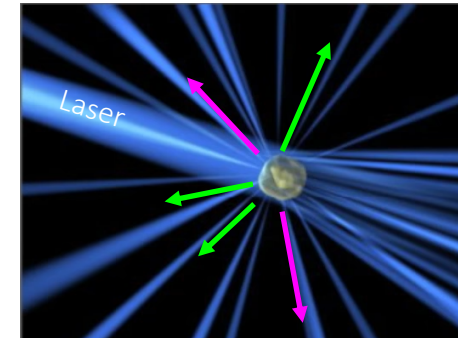
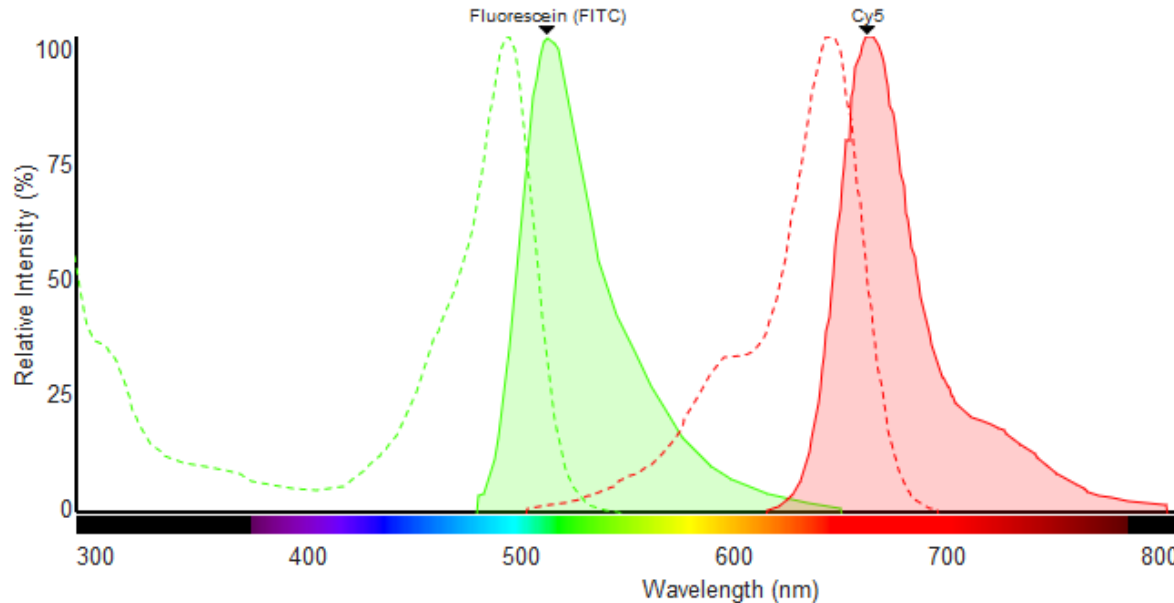


Scatter plot du sang complet



Cytométrie en flux sur cellules marquées (fluorescence)

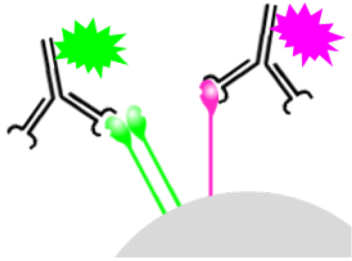
- Les cellules peuvent être **marquées par des anticorps couplés à des fluorophores**
- Un choix judicieux de fluorophores permet d'avoir des **spectres d'émission distincts** (p.ex. lumière verte et rouge, comme FITC et Cy5)
- Une **cellule portant l'antigène recherché** fixera le complexe anticorps-fluorophore et **émettra la fluorescence correspondante** lors de son passage dans le faisceau laser.



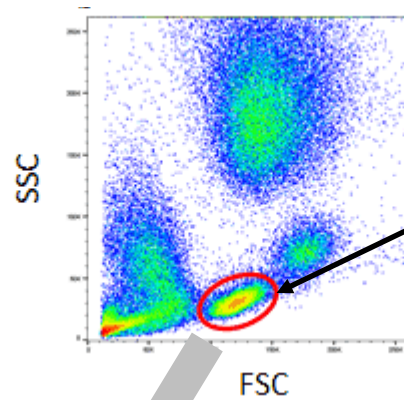
Exemple: caractérisation de populations de cellules T

Marquage des
cellules par anticorps

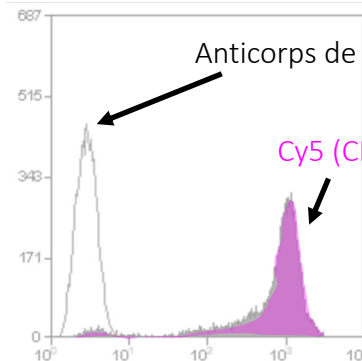
Anticorps anti-CD8 couplé au FITC Anticorps anti-CD4 couplé au Cy5



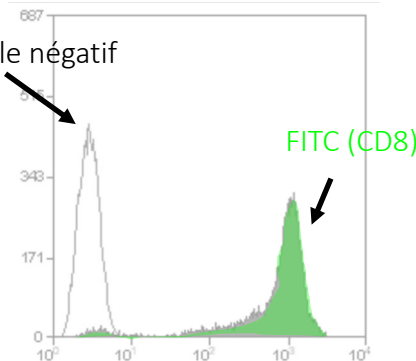
Quantification de la fluorescence



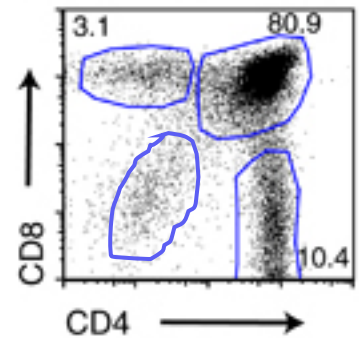
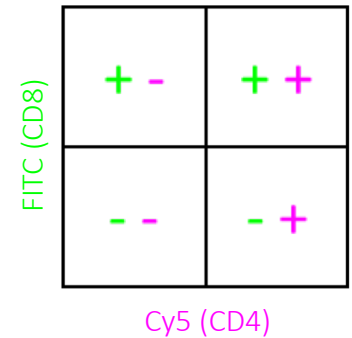
Sélection de la population
d'intérêt (cellules T)



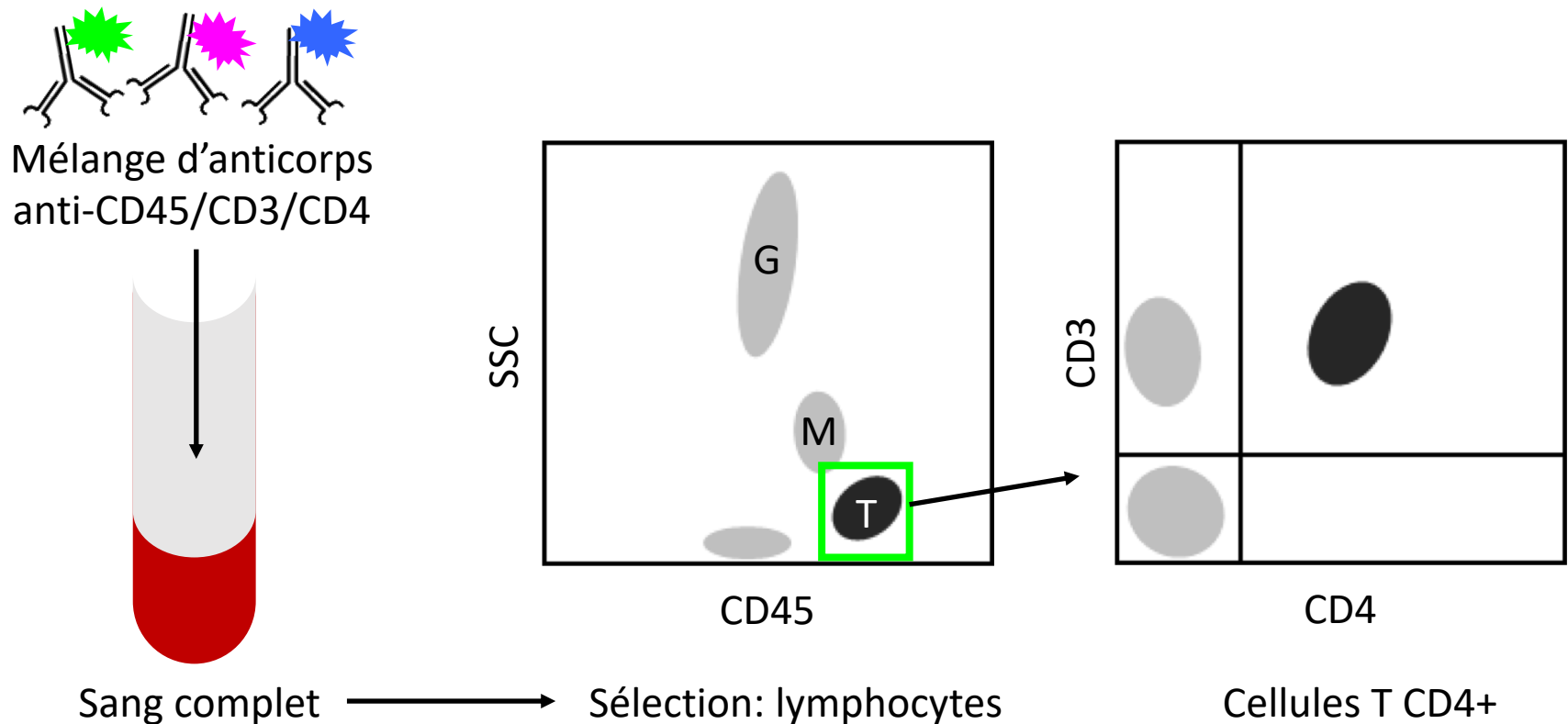
Anticorps de contrôle négatif



Représentation
graphique



Exemple: énumération des cellules T CD4+ chez un patient infecté par le VIH



FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

- Lors du passage des cellules devant le faisceau laser, leurs caractéristiques sont analysées
- Les cellules sont chargées en fonction de leur profil fluorescent
- Les cellules ayant reçu une charge sont déviées entre les plaques déflectrices
- Le FACS permet de générer des populations de cellules hautement purifiées
- Applications:
 - Purification de cellules exprimant une protéine transgénique fusionnée à la GFP
 - Purifier des sous-populations de lymphocytes à partir du sang
 - Purifier des cellules souches à partir de moëlle osseuse en vue de leur transplantation
 - ...

