

Optimisation de PCR pour une nouvelle méthode de séquençage de TCR

Etudiant

Kewin Elias

Co-Tuteur

Dr.Raphael Genolet

Responsable de recherche, Ludwig Lausanne Branch

Tuteur

Dr.Alexandre Harari

Directeur adjoint scientifique, Centre de thérapies expérimentales

Département d'oncologie UNIL-CHUV

Responsable, Unité d'immunomonitorage et développement d'immunomonitorage

Team leader, Groupe d'immunité tumorale (Laboratoire du professeur George Coukos)

Expert

Prof.Lana E. Kandalaft

Directrice, Centre de Thérapies Expérimentales.

Département d'oncologie UNIL-CHUV

Remerciements :

J'aimerais remercier chaleureusement le Dr. Alexandre Harari de m'avoir accueilli au sein de son équipe le temps de mon travail de maîtrise, je le remercie également d'avoir choisi le Dr. Raphael Genolet et Mme. Lise Queiroz pour m'encadrer.

Je tiens également à remercier les collaborateurs susmentionnés le Dr. Raphael Genolet et Mme. Lise Queiroz qui ont été le long de mon travail extrêmement pédagogues et compétents, ils m'ont permis, grâce à leurs enseignements théorique et pratique d'avoir les outils pour mener à bien ce projet.

Et finalement j'aimerais remercier Mme la Prof. Lana E. Kandalaft pour le temps pris à lire et à juger mon travail.

Table des matières

Remerciements :	2
Abstract :	4
Objectif :	4
Méthodologie :	4
Résultats :	4
Introduction :	4
Matériel et méthode :	6
Extraction d'ADN :	6
PCR :	6
Purification exosap-IT :	7
Résultats :	7
Extraction d'ADN :	7
Optimisation de PCR :	7
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	16
Références bibliographiques :	19
Bibliographie :	21

Abstract :

Objectif : Dans le cadre de la création d'une nouvelle méthode de séquençage du TCR, mon objectif est d'optimiser l'amplification du TCR- β à partir d'ADN génomique.

Méthodologie : De l'ADN génomique a été extrait, puis le protocole de la PCR multiplexe avec des primers J et V du TCR- β a été optimisé en changeant les variables de celui-ci, l'amplikon obtenu suite à l'optimisation du protocole a été séquencé.

Résultats : En faisant varier les conditions PCR un fragment contenant l'ensemble des TCR a pu être obtenu. L'ensemble des primers fonctionnent, résultat du séquençage : une recombinaison V/J domine fortement autant dans l'échantillon PBMC que dans l'échantillon CD8 . Cela suggère que cette combinaison de primer fonctionne beaucoup mieux que les autres. Cela peut très bien venir d'un biais provenant de la méthode par PCR multiplex, ou d'un bien provenant de l'échantillon lui même

L'amplification est assez spécifique puisque entre 91 et 95% des séquences ont pu être identifiées comme TCR.

Mots clés : Cellule T, TCR, Polymerase chain reaction, électrophorese, séquençage, TCR rearrangement, primer, validation.

Introduction :

Dans le cadre de la création d'une nouvelle méthode de séquençage du TCR, mon objectif est d'optimiser l'amplification du TCR- β à partir d'ADN.

Travailler sur ce sujet me permet également de travailler dans un laboratoire et d'apprendre des procédures expérimentales qui seront une plus-value dans ma carrière.

La technologie actuelle en biologie moléculaire nous permet d'étudier les événements physiologiques et pathologiques à l'échelle du génome.

Le séquençage d'ADN a déjà différentes applications cliniques telles que la caractérisation de tumeur, la recherche de marqueurs spécifiques de susceptibilité à certaines pathologies ou la détection de séquences exogènes. La création d'une méthode de séquençage des TCR fiable et faiblement biaisée permettra l'ouverture de nombreuses nouvelles possibilités cliniques.

En effet le réarrangement V(D)J des récepteurs TCR est important dans la morphogenèse des cellules T et permet la reconnaissance spécifique d'antigène en créant une diversité de lymphocyte T, le séquençage des TCR a déjà montré son intérêt clinique notamment dans les maladies hématologiques [1], dans les maladies auto-immunes [2] et dans le monitoring de traitements de maladie de greffe contre hôte [3] et bien d'autres.

Selon l'office fédéral de la statistique {Quatre personnes sur dix développent un cancer au cours de leur vie. Le cancer est la première cause de mortalité prématurée. Une personne hospitalisée sur treize l'est pour un cancer} [4]. Dans ce contexte j'ai pu comme de nombreuses familles constater la morbidité et la mortalité du cancer.

Mon travail de maîtrise s'intègre dans l'approche personnalisée qu'offre l'immunothérapie. En effet ces dix dernières années il y'a eu de nombreux traitements d'immunothérapie validés et utilisés en clinique, la capacité de ses médicaments à moduler la réponse cellulaire T demande que l'on développe des outils fiables pour monitorer la réponse du patient et avoir un diagnostic pronostique pour orienter la prise en charge de ce dernier.

Les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) sont un des biomarqueur émergent [5]. La valeur pronostique du nombre et de la diversité des TIL a été démontré par de nombreuses études [6]. Pouvoir séquencer leur TCR efficacement permettrai de savoir si les traitements immunothérapeutiques agissent au sein de la tumeur. On pourrait par exemple en connaissant le répertoire TCR d'un patient, évaluer sa capacité à répondre à une vaccination. Le séquençage permet également l'identification des TCR qui reconnaissent la tumeur permettant la création de thérapies basée sur l'amplification de ces derniers

Les cellules T sont responsables de l'immunité cellulaire, elles possèdent un récepteur TCR qui est un hétéro-dimère composé de deux chaînes polypeptidiques ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) liées par un pont di-sulfure [8,9]. Les TCR $\gamma\delta$ sont rare dans le sang périphérique avec 15% de représentation versus 85% pour les TCR $\alpha\beta$ [10]. Leur activation dépend de la présentation antigénique par des cellules présentatrice d'antigène (CPA). L'antigène est lié à une molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le TCR se lie à la fois à l'antigène et au CMH, si l'avidité de la liaison est suffisamment élevée la cellule T est activée [15]. Afin de maintenir une diversité suffisante pour reconnaître les pathogène ou les protéines aberrantes, les cellules T sont capables de générer une grande variété de TCR grâce à un système de recombinaison de l'ADN [16].

Les chaînes extra-cellulaires du TCR ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) sont composées d'une région constante et de 3 régions variables: V (variable), D (diversity) et J (joining) [11]. Le locus du gène TCR- β contient 50 variables du segment (V), 2 variables du segment (D), et 13 variables du segment (J) [13]. La recombinaison V(D)J se passe de la manière suivante : un segment (D) et un segment (J) seront choisis aléatoirement et seront recombinaison, ce processus sera répété avec un segment (V) aléatoire qui sera recombinaison avec le segment (DJ). La jonction V(D)J génère une région hypervariable appelée CD3 qui est à l'origine de la grande diversité des TCR [17].

Le répertoire de cellule T est dynamique, il est continuellement modifié par l'ajout de nouvelles cellules T en réponse à des pathogènes ou protéines mutées.

La validation et l'optimisation de ces primers J est essentiels afin de s'assurer de la sensibilité et de la spécificité du nouveau protocole et procurent ainsi les données nécessaires permettant son utilisation tant en clinique qu'en en recherche [7].

Matériel et méthode :

Afin de couvrir l'ensemble des TCR l'amplification avec 50 primers V et 13 primers J par PCR multiplexe est nécessaire. Dans le cadre de l'amplification des TCR basée sur l'ARN les 50 primers V ont déjà été validé, il faut par conséquent valider des conditions ou le mix des 50 primers V et 13 primers J fonctionnent.

Extraction d'ADN :

L'ADN a été extrait à l'aide du DNeasy Blood & Tissue Kit (250) Cat.No.69506 de Qiagen en suivant le protocole fourni par le fabricant, deux modifications ont tout de même été apportées au protocole.

En effet 4 µl de RNase A à 500 µg/ml ont été substitués aux 4 µl RNase A à 100 µg/ml proposés par le protocole et l'élution finale a été faite dans 25 µl d'eau dépourvue de RNase à la place des 200 µl de Tampon AE.

La pureté des échantillons a ensuite été mesuré avec un spectrophotomètre (Nanodrop).

PCR :

Le matériel de PCR utilisé et le protocole à optimiser proviennent du Kit Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.

Instruction de pipetage dans l'ordre d'ajout :

- Eau ajoutée jusqu'à volume de 25 µl
- 5X Phusion HF Buffer 5 µl
- 20 mM dNTPs 0.5 µl
- 2µM HTRBJ-J.X 0.5 µl
- 2µM HTRBV_T7 0.5 µl
- 5ng/µl Template DNA 1 µl
- Phusion DNA Polymerase 0.2 µl

Instruction de cycle du thermocycleur :

- Dénaturation initiale 98°C 30secondes

- Dénaturation 98°C 10 secondes
- Hybridation 55°C 30secondes
- Élongation 72°C 2 minutes
- 35 cycles

Purification exosap-IT :

Les amplicons ont été purifiés à l'aide d'exosap-iT selon le protocole ci-dessous :

- Ajouter 2 µl d'exosap-IT pour chaque 10 µl de solution d'ADN.
- Mettre le Mix dans un thermocycleur 15minutes à 37°C puis 15minutes à 80°C.

Résultats :

Extraction d'ADN :

L'échantillon d'ADN extrait du culot de CD8 a été analysé au Nanodrop. On peut le considérer pure au vu du ratio 260/280 de 1.93 du ratio 260/230 de 2.08, une concentration de 85.7 ng/µl d'ADN est obtenu.

L'échantillon d'ADN extrait du culot de PBMC a été analysé au Nanodrop et on peut le considérer pure au vu du ratio 260/280 de 1.95 du ratio 260/230 de 2.013, une concentration de 313.5 ng/µl d'ADN est obtenu.

Optimisation de PCR :

La première variable testée a été la température d'hybridation car c'est un des éléments principaux influençant l'efficacité d'une PCR. Les primers HTRBJ_1.1, HTRBJ_1.2 et HTRBJ_1.3 ont été pris à une concentration finale de 0.04µM (pour obtenir la même concentration finale que les primers HTRBV individuels). Les températures de 55, 57 et 60 °C ont été testées. Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose et le résultat montre que la température de 57°C apporte des bandes d'amplifications spécifique plus forte que les 2 autres températures.

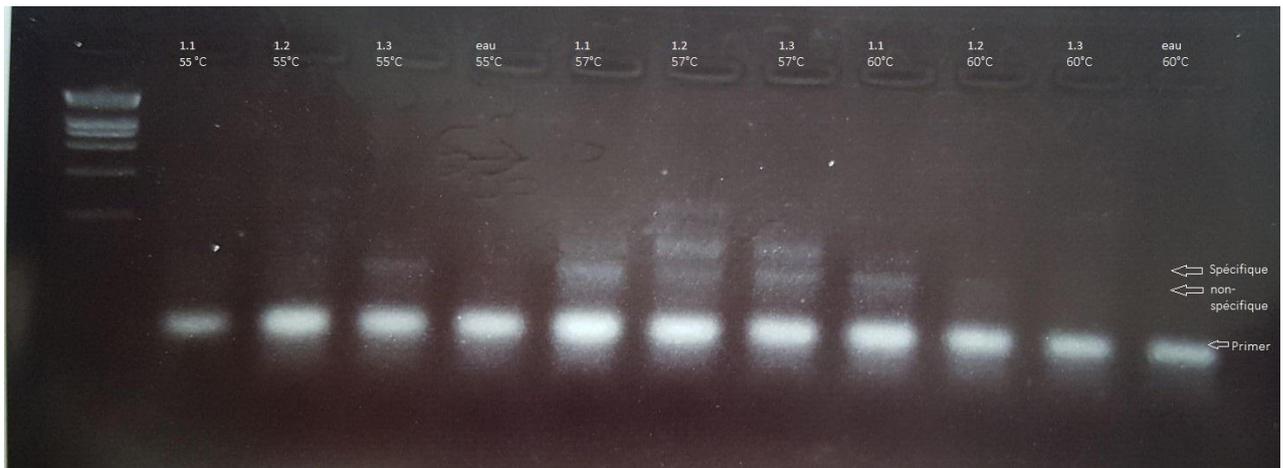


Figure 1: L'ADN extrait de cellules CD8 a été utilisé pour tester les primers HTRBJ_1.1, HTRBJ_1.2 et HTRBJ_1.3 à une concentration 0.04 μ M avec mix HTRBV_T7 avec différente température d'annealing. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose.

Les bandes spécifiques ne semblaient pas assez intenses, les primers HTRBJ_1.1, HTRBJ_1.2 et HTRBJ_1.3 sont donc repris mais à une concentration finale individuelle de 4 μ M (comme la concentration totale finale des primers V du mix HTRBV).

Comme le montre la figure 2, augmenter la concentration des primers diminue la qualité du résultat puisque seul des bandes non spécifiques sont visible sur le gel.

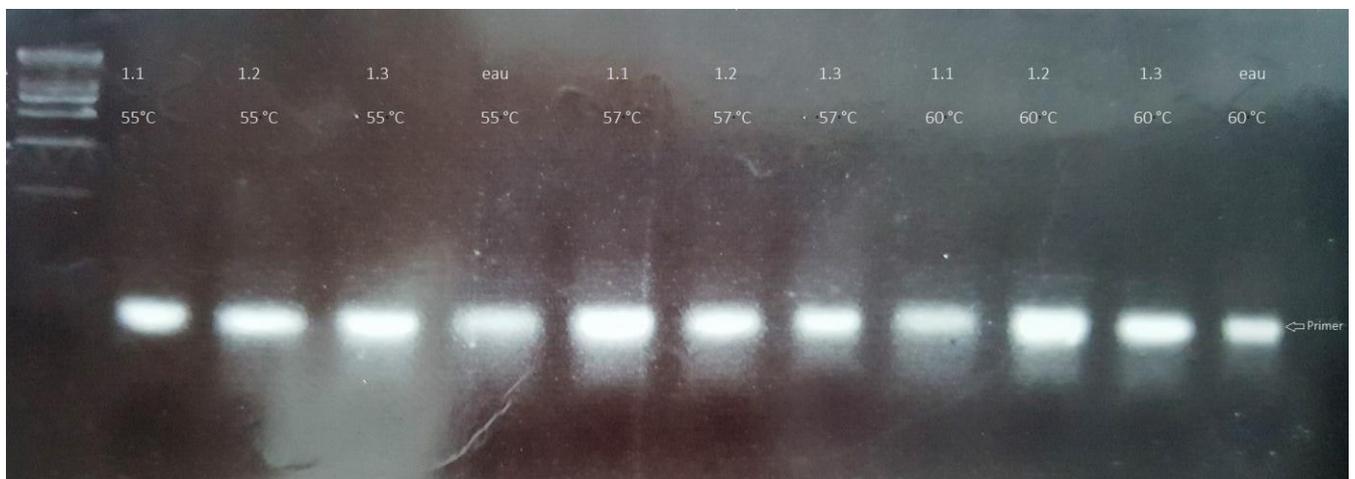


Figure 2: L'ADN extrait de cellules CD8 a été utilisé pour tester les primers HTRBJ_1.1, HTRBJ_1.2 et HTRBJ_1.3 à une concentration 4 μ M avec mix HTRBV_T7 avec différente température d'annealing. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose.

Le HTRBJ_1.2 qui produit une bande d'amplification spécifique plus forte (Figure 1) a été sélectionné pour poursuivre l'optimisation. Afin d'augmenter l'amplification de la bande spécifique, le nombre cycle des PCR est testé à la hausse (35 et 40 cycles). La concentration finale de 0.04 mM et les températures d'hybridation de 55° à 60°C sont utilisées pour la PCR. La figure 3 nous montre qu'une PCR de 40 cycle semble être plus efficace.

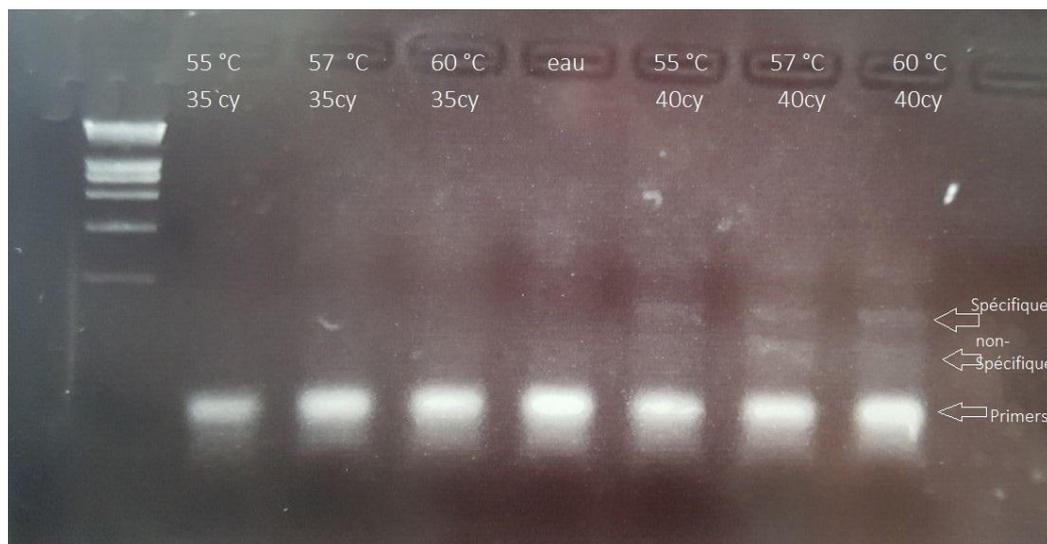


Figure 3 : L'ADN extrait de cellules CD8 a été utilisé pour tester le primer HTRBJ_1.2 à une concentration $0.04\mu\text{M}$ avec mix HTRBV_T7 avec différente température d'annealing et différents nombres de cycles. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose.

Etant donné la présence d'un smear suggérant une amplification aspécifique due à une trop grand quantité d'ADN au départ, les conditions de l'expérience précédente sont reprise et l'ADN de CD8 ($85.7\text{ng}/\mu\text{l}$) a été testé aux dilutions suivantes (1/2/5/10/20). La figure 4 nous montre que jusqu'à une dilution de 10X soit environ $10\text{ng}/\mu\text{l}$ nous avons une bonne amplification spécifique.

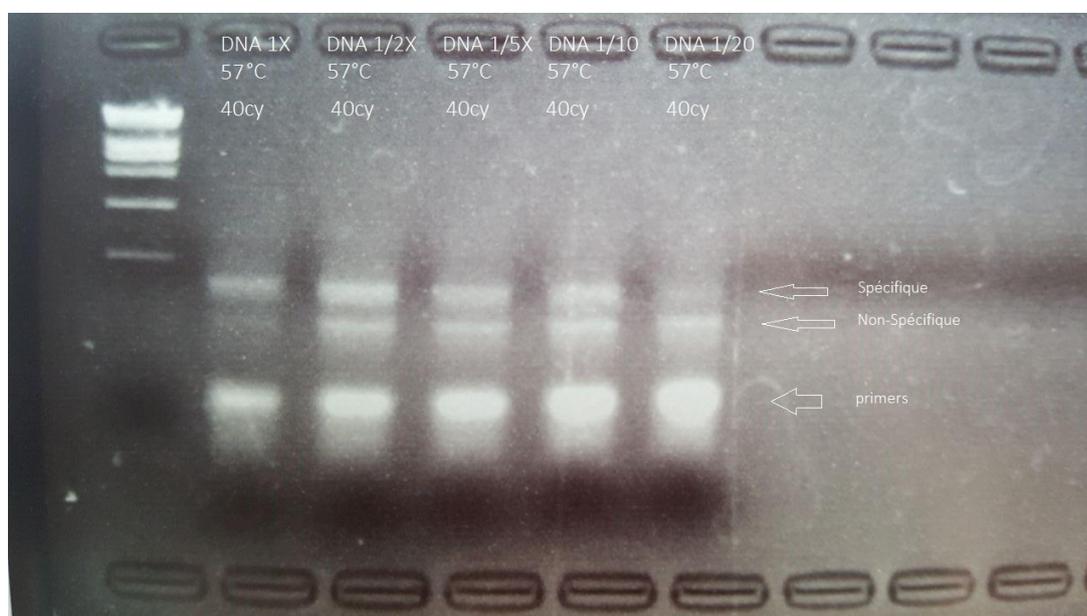


Figure 4 : Différentes dilutions de l'ADN extrait de cellules CD8 ont été utilisé pour tester le primer HTRBJ_1.2 à une concentration $0.04\mu\text{M}$ avec mix HTRBV_T7. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose

Afin de tester les conditions de l'expérience précédente sur un autre primer, les mêmes dilutions et le même protocole ont été utilisés mais en présence du primer

HTBRJ 2.7. La figure 5 ,montre une bande d'amplification spécifique plus forte à concentration d'ADN proche de 15ng/ μ l et un amplification spécifique est présente jusqu'à 10 ng/ μ l d'ADN.

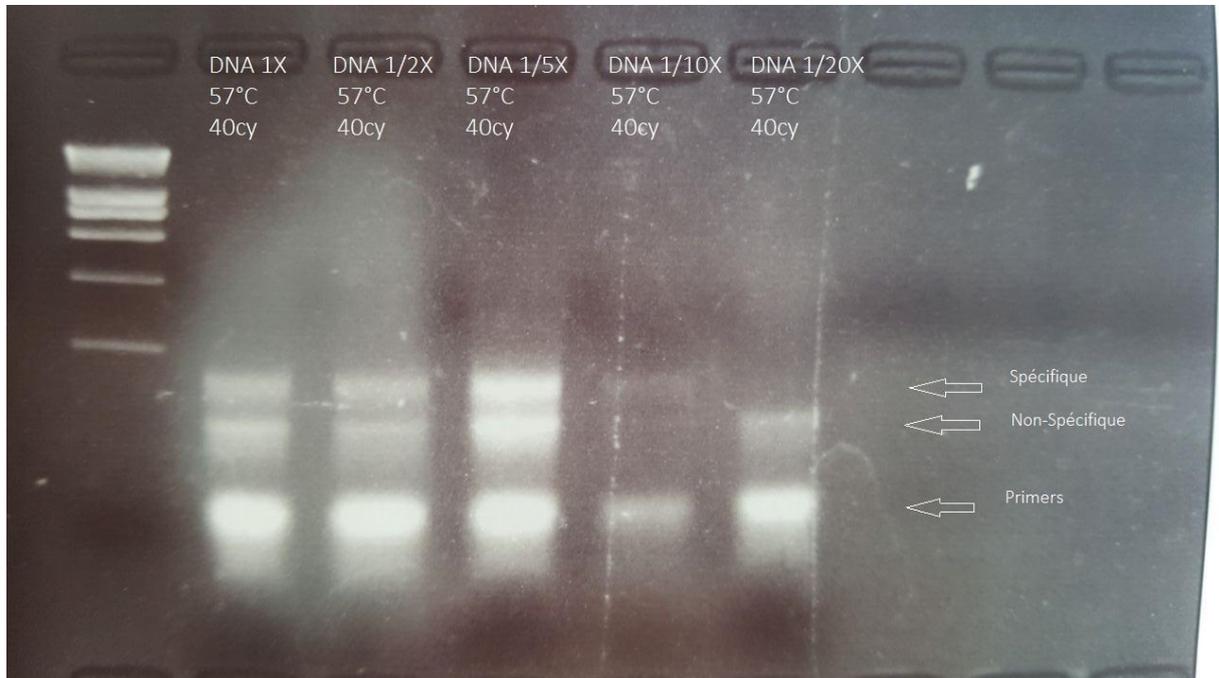


Figure 5: Différentes dilutions de l'ADN extrait de cellules CD8 ont été utilisé pour tester le primer HTRBJ_2.7 à une concentration 0.04 μ M avec mix HTRBV_T7. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose

A ce stade le protocole fonctionne pour au moins 2/13 des primers HTBRJ-X. Par conséquent, un test est effectué avec l'ensemble des 13 primer HTBRJ (HTBRJ_T7) à une concentration de 2 μ M par primer. Un échantillon ne contenant pas d'ADN est utilisé comme contrôle pour la PCR. Le protocole suivant est appliqué :

Instruction de pipetage dans l'ordre d'ajout :

- Eau ajoutée jusqu'à volume de 25 μ l
- 5X Phusion HF Buffer 5 μ l
- 20 mM dNTPs 0.5 μ l
- 2 μ M HTRBJ_T7 0.5 μ l
- 2 μ M HTRBV_T7 0.5 μ l
- 15ng/ μ l Template DNA 1 μ l
- Phusion DNA Polymerase 0.2 μ l

Instruction de cycle du thermocycleur :

- Dénaturation initiale 98°C 30secondes
- Dénaturation 98°C 10 secondes
- Hybridation 57°C 30secondes

- Élongation 72°C 2 minutes
- 40 cycles

A l'aide du protocole optimisé nous obtenons une bande d'amplification spécifique visible alors qu'aucune bande n'est amplifiée avec l'eau (figure 6).

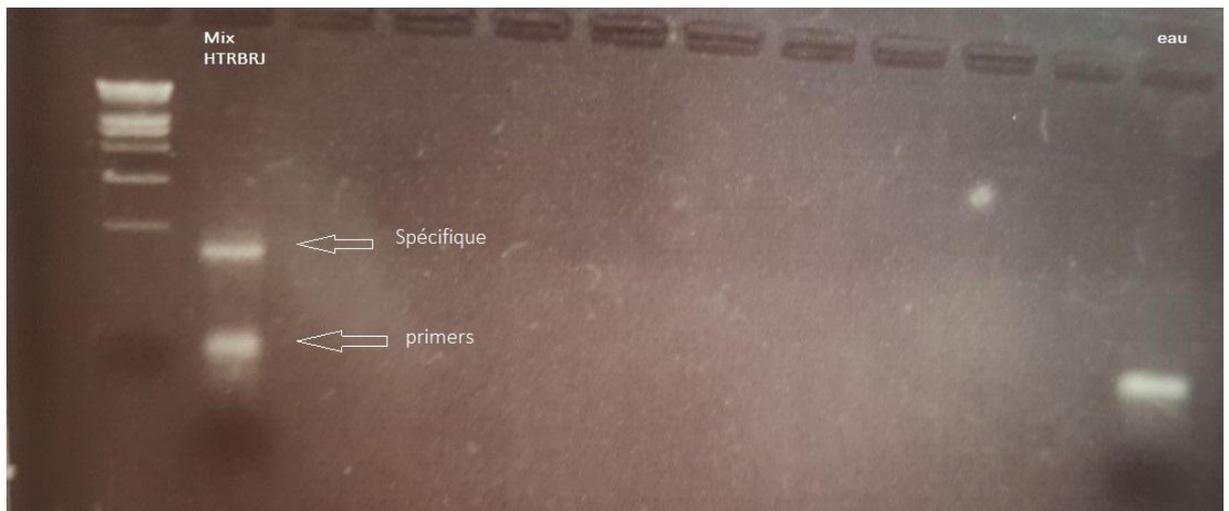


Figure 6 De l'ADN extrait de cellules CD8 a été utilisé pour tester le mix HTRBJ_T7 à une concentration 0.04µM avec mix HTRBV_T7. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose.

Afin de savoir si chaque primer fonctionne dans les nouvelles conditions de PCR, l'amplicon de l'expérience précédente est repris (dilué 2X) et chaque primer HTBR_J est testé individuellement. Seul les primers pour lesquels une amplification à déjà eu lieu seront amplifiés lors de cette seconde PCR. A l'exception du primer 2.1, tous les autre primers donnent une bande spécifique après l'amplification (Figure 7). Même si l'amplification avec les primer 2.6 et 2.7 est moins efficace, une faible bande est visible sur le gel.

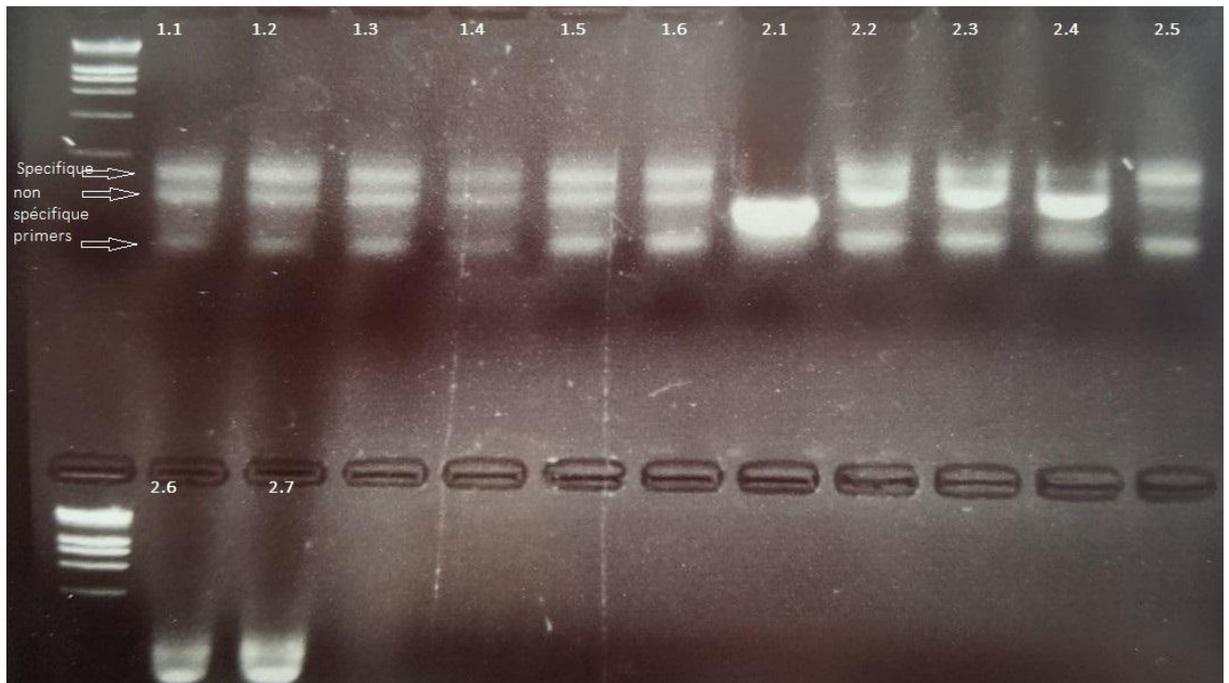


Figure 7: l'amplicon de l'expérience précédente (6) a été utilisé pour tester chaque primer HTRBI à une concentration $0.04\mu\text{M}$ avec mix HTRBV_T7. La figure montre le résultat de l'amplification résolu sur gel d'agarose.

Chaque primer semble avoir fonctionné mais un doute réside pour le HTBRJ_2.1, il y'a probablement trop d'amplification non spécifique provoquant une mauvaise migration. L'expérience est donc répétée pour les HTBRJ_2.X en diminuant à 25 cycles et 30 cycles la PCR. La présence d'un smear suggère qu'il y'avait trop de matériel dans le mix de PCR (Figure 8).

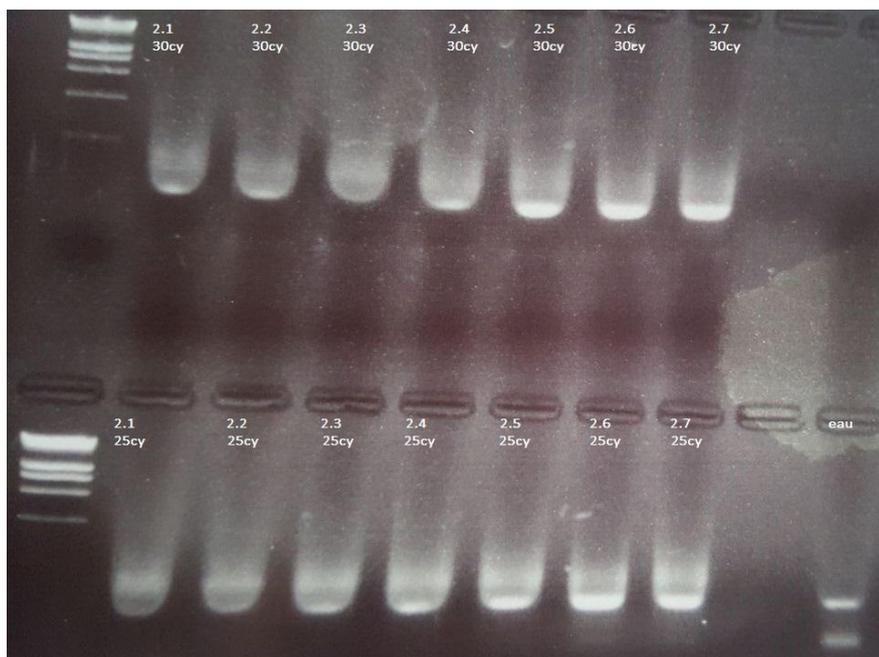


Figure 8 : l'amplicon de l'expérience (6) a été utilisé pour tester les HTRBJ_2.x à une concentration 0.04μM avec mix HTRBV_T7. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose

Par conséquent, la PCR est refait en diluant le matériel de départ (5/10/25/50/100 fois) et le primer HTRBJ_2.1 a été retesté. Même si le smear persiste, une bande spécifique est visible, confirmant que le primer 2.1 fonctionne également lorsqu'il est mixé avec l'ensemble des primer HTRBJ (Figure 9).



Figure 9: différentes dilutions de l'amplicon de l'expérience (7) ont été utilisé pour tester le HTRBJ_2.1 à une concentration $0.04\mu\text{M}$ avec mix HTRBV_T7. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose

Afin de séquencer l'amplicon CD8 et PBMC, les adaptateurs illumina doivent être ajoutés aux extrémités du produit PCR. Pour ce faire, une seconde amplification PCR est effectuée avec des primers contenant les adaptateurs (Illumina_T7-Index_2 et Illumina_T7-index_4). Les deux index (index 2 et index 4 TrueSeq) sont utilisés afin de différencier les séquences de chaque échantillon. Les produits issus de la PCR multiplex sont purifiés avec l'ExoSAP-IT puis utilisés pour la seconde amplification selon le protocole ci-dessous :

Instruction de pipetage dans l'ordre d'ajout :

- Eau ajoutée jusqu'à volume de 25 μl
- 5X Phusion HF Buffer 5 μl
- 20 mM dNTPs 0.5 μl
- Illumina_T7 0.5 μl 0.5 μl
- Index_X 0.5 μl 0.5 μl
- amplicon_X 1 μl
- Phusion DNA Polymerase 0.2 μl

Instruction de cycle du thermocycleur :

- Dénaturation initiale 98°C 30secondes
- Dénaturation 98°C 10 secondes
- Hybridation 57°C 30secondes
- Élongation 72°C 2 minutes
- 25 cycles

Les amplicons obtenus pour l'ADN provenant des CD8 (figure 10) ou des PBMC (figure 11) sont purifiés et utilisés pour le séquençage.



Figure 10: l'amplicon de l'ADN extrait de cellules CD8 a été amplifié en présence des amorces illumina_T7 et index_2 La figure montre le résultat de l'amplification résolu sur gel d'agarose.

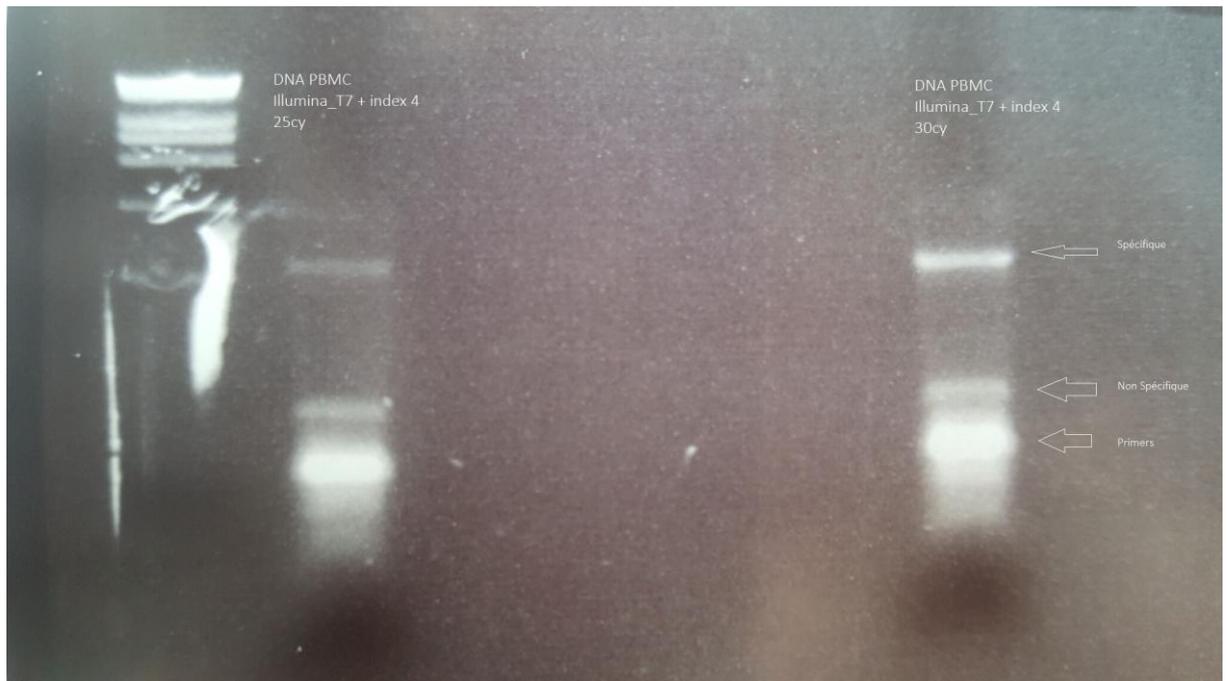


Figure 11: De l'ADN extrait de PBMC a été amplifié en présence des amorages illumina_T7 et index_2. La figure montre le résultat de l'amplification résolut sur gel d'agarose.

DISCUSSION ET CONCLUSION :

Afin de créer méthode séquençage de TCR fiable il est nécessaire d'avoir en amont une PCR optimisée. En effet une PCR effectuée dans des conditions sub-optimales peut mener à la génération d'amplicons aspécifiques et non voulus.

Il est également possible que la séquence que l'on vise à optimiser ne soit pas produite du tout.

La meilleure solution lorsqu'une PCR ne fonctionne pas de manière correctement est de varier un ou plusieurs paramètres, ce que j'ai fait lors de ce travail.

L'optimisation de la PCR durant ce travail a reposé sur le changement de la température d'hybridation, du nombre de cycles de PCR et de la concentration d'ADN initial, les autres paramètres de la PCR n'ont pas requis d'ajustement.

En effet le protocole une fois optimisé est le suivant :

Instruction de pipetage dans l'ordre d'ajout :

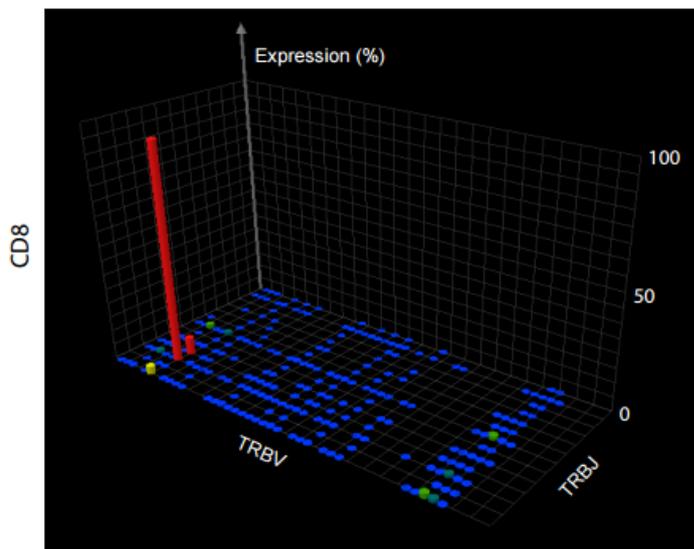
- Eau ajoutée jusqu'à volume de 25 μ l

- 5X Phusion HF Buffer 5 μ l
- 20 mM dNTPs 0.5 μ l
- 2 μ M HTRBJ_T7 0.5 μ l
- 2 μ M HTRBV_T7 0.5 μ l
- 15ng/ μ l Template DNA 1 μ l
- Phusion DNA Polymerase 0.2 μ l

Instruction de cycle du thermocycleur :

- Dénaturation initiale 98°C 30secondes
- Dénaturation 98°C 10 secondes
- Hybridation 57°C 30secondes
- Élongation 72°C 2 minutes
- 40 cycles

les résultats du séquençage sont représenté dans les histogrammes ci-dessous, chaque histogramme représente un des différents réarrangement V/J. Sur l'axe des x, il y a les différents V; sur l'axe des y, il y a les différents J et l'axe des z il y a la fréquence de chaque recombinaison.



TCRb STATISTIC	
Total reads:	6635493
Match sequences:	6348161 (95.6697716356569%)
No match sequences:	287332 (4.33022836434309%)
Identified TCR:	6227884 (98.1053253060217%)
In-frame:	6057122 (97.2581056423016%)
Unique TCRb (-single):	11804
Out-frame:	123491 (1.98287251336088%)
STOP-codon:	47271(0.759021844337499%)
Unknown TRBV:	5491 (0.0864974911631888%)
Undefined TRBV:	1050 (0.0165402232237021%)
Unknown TRBJ:	103012(1.6227061664%)
Single count:	29104(0.45846348257393%)

Figure 12 fréquences de recombinaisons V/J dans l'amplicon CD8

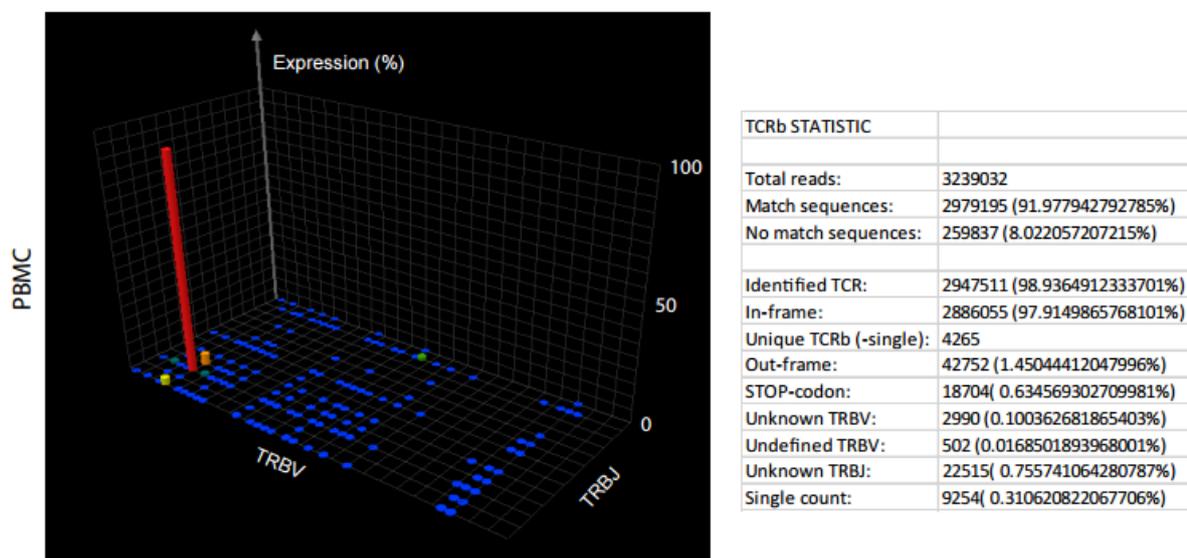


Figure 13 fréquences de recombinaisons V/J dans l'amplicon CD8

une recombinaison V/J domine fortement autant dans l'échantillon PBMC que dans l'échantillon CD8 . Cela suggère que cette combinaison de primer fonctionne beaucoup mieux que les autres. Cela peut très bien venir d'un biais provenant de la méthode par PCR multiplex, ou d'un bien provenant de l'échantillon lui même

L'amplification est assez spécifique puisque entre 91 et 95% des séquences ont put être identifiées comme TCR.

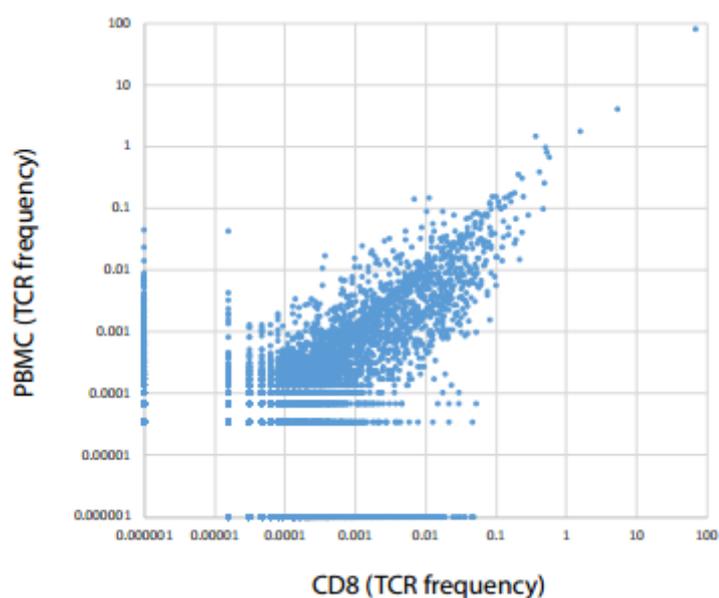


Figure 14 Distribution CD8 et PBMC

la distribution des CD8 et des PBMC sont quasiment identique. La fréquence de chaque TCR a été calculée et comparée sur la figure 14, cette dernière montre une forte corrélation entre les deux. Ceci suggère que les deux répertoires proviennent du même échantillon.

Le séquençage des TCR contient une source de biais méthodologique et humains important de plus il permettra de répertorier les TCR de manière qualitative et non quantitative vu que chaque primer faisant partie du mix ne fonctionne pas avec exactement la même efficacité.

De plus cette méthode utilise de l'ADN génomique et non de l'ARNm l'avantage d'une facilité d'utilisation et de manipulation. Cependant l'ARNm de TCR est présent en plus grande quantité dans les cellules T que la séquence ADN et donc logiquement une méthode basée sur l'ARN serait plus sensible et permettrait sûrement de détecter des variations du TCR représentés en plus faible quantité.

Un autre problème d'un séquençage sur ADN est le fait que cette méthode ne prend pas en compte les processus post transcriptionnels et donc cette méthode risque d'identifier des séquences qui ne mèneront pas à un TCR fonctionnel.

Les perspectives de recherches dans le domaine du séquençage du TCR sont multiples et variées, je pense que la recherche devrait se diriger vers l'amélioration des méthodes aujourd'hui disponibles. En effet développer une méthodologie sensible et spécifique permettant de séquencer de manière quantitative les TCR devrait être une motivation pour beaucoup de chercheurs.

De plus les répertoires de TCR étant différents d'un individu à l'autre les approches et méthodes seront personnalisées, cette personnalisation à un coût je pense donc que faire de la recherche dans le but de simplifier et de rendre les protocoles moins coûteux en temps et en ressources devrait être un autre axe pouvant motiver les chercheurs.

Références bibliographiques :

1. **Van Heijst JWJ**, Ceberio I, Lipuma LB, Samilo DW, Wasilewski GD, Gonzales AMR, Nieves JL, van den Brink MRM, Perales MA, Pamer EG. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med.* 2013;5:372–377. doi: 10.1038/nm.3100
2. **Meyer EH**, Hsu AR, Liliental J, Löhr A, Florek M, Zehnder JL, Strober S, Lavori P, Miklos DB, Johnson DS, Negrin RS. A distinct evolution of the T cell repertoire categorizes treatment refractory gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2013;5:. doi: 10.1182/blood-2013-03-489757.
3. **Klarenbeek PL**, De Hair MJH, Doorenspleet ME, van Schaik BDC, Esveldt REE, van de Sande MGH, Cantaert T, Gerlag DM, Baeten D, van Kampen AHC, Baas F, Tak PP, de Vries N. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human

autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 2012;5:1088–1093. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200612.

4. **Office fédéral de la statistique** Sections Services de santé, www.bfs.admin.ch [en ligne] Neuchâtel, [mis à jour le 27.09.2016 cité le 02.11.2016]. Disponible : <https://www.bfs.admin.ch/bfs/fr/home/statistiques/sante/etat-sante/maladies/cancer.html>

5. **Salgado**, C. Denkert, S. Demaria, N. Sirtaine, F. Klauschen, G. Pruneri, S. Wienert, G. Van den Eynden, F. L. Baehner, F. Penault-Llorca, E. A. Perez, E. A. Thompson, W. F. Symmans, A. L. Richardson, J. Brock, C. Criscitiello, H. Bailey, M. Ignatiadis, G. Floris, J. Sparano, Z. Kos, T. Nielsen, D. L. Rimm, K. H. Allison, J. S. Reis-Filho, S. Loibl, C. Sotiriou, G. Viale, S. Badve, S. Adams, K. Willard-Gallo, and S. Loi The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014 *Ann. Onc.* 2015 26: 259-271.

6. **Jia, Qingzhu**, Yi Yang, and Ying Wan. “Tumor-Infiltrating Memory T-Lymphocytes for Prognostic Prediction in Cancer Patients: A Meta-Analysis.” *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8.2 (2015): 1803–1813. Print.+652

7. **Bustin SA**, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. PubMed PMID: 19246619.

8. **Clevers H**, Alarcon B, Wileman T, et al. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988;6:629–62.

9. **Rudd CE**, Janssen O, Cai YC, et al. Two-step TCR zeta/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol* 1994;15:225

10 **Esin S**, Shigematsu M, Nagai S, *et al.* Different percentages of peripheral blood gamma delta + T cells in healthy individuals from different areas of the world. *Scand J Immunol*

11. **Janeway CA Jr**, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. T-cell receptor gene rearrangement. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27145/>

12. **Van Heijst JWJ**, Ceberio I, Lipuma LB, Samilo DW, Wasilewski GD, Gonzales AMR, Nieves JL, van den Brink MRM, Perales MA, Pamer EG. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med.* 2013;5:372–377. doi: 10.1038/nm.3100

13. **Freeman JD**, Warren RL, Webb JR, Nelson BH, Holt RA. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. *Genome Research.* 2009;19(10):1817-1824. doi:10.1101/gr.092924.109.

14. **Toyonaga B**, Mak TW. Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu Rev Immunol* 1987;5:585–620.

15. **Woodsworth DJ**, Castellarin M, Holt RA. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Medicine*. 2013;5(10):98. doi:10.1186/gm502.1996;43:593–6.

16. **Alt FW**, Oltz EM, Young F, Gorman J, Taccioli G, Chen J. VDJ recombination. *Immunol*. 1992 Aug;13(8):306-14. Review. PubMed PMID: 1510813.

17. **Nikolich-Zugich J**, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol*. 2004;5:123–132. doi: 10.1038/nri1292.

Bibliographie :

Dare R, Sykes PJ, Morley AA, Brisco MJ. Effect of age on the repertoire of cytotoxic memory (CD8+CD45RO+) T cells in peripheral blood: The use of rearranged T cell receptor gamma genes as clonal markers. *Journal of Immunological Methods*. 2006;308 (1–2): 1–12. doi:10.1016/j.jim.2005.08.016. PMID 16325196.

Hodges, E et al. “Diagnostic Role of Tests for T Cell Receptor (TCR) Genes.” *Journal of Clinical Pathology* 56.1 (2003): 1–11 disponible : <http://jcp.bmj.com/content/56/1/1.full.html>.

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62). pii: 3923. doi:10.3791/3923. PubMed PMID: 22546956; PubMed Central PMCID: PMC4846332.

Rosenberg SA, Dudley ME, Yang JC. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J Immunother*. 2010 Oct;33(8):840-7. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181f05b91. PubMed PMID: 20842052.

Six A, Mariotti-Ferrandiz ME, Chacara W, et al. The past, present, and future of immune repertoire biology – the rise of next-generation repertoire analysis. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:413. doi:10.3389/fimmu.2013.00413.

Voytas D. Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 10:Unit 10.4. doi: 10.1002/0471142735.im1004s02. Review. PubMed PMID: 18432695.

Weinberger J, Jimenez-Heredia R, Schaller S, et al. Immune repertoire profiling reveals that clonally expanded b and t cells infiltrating diseased human kidneys can also be tracked in blood. *PLoS ONE*. 2015;10(11): e0143125. doi:10.1371/journal.pone.0143125.

Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. 1997 Mar;22(3):474-6, 478-81. PubMed PMID: 9067025.

Wucherpfennig, Kai W. et al. "Structural Biology of the T-Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.4 (2010): a005140. *PMC*. Web. 2 Nov. 2016. Goff SL, Smith FO, Klapper JA, Sherry R, Wunderlich JR, Steinberg SM, White.