

Mémoire de Maîtrise en médecine No 1841

Optimisation d'une approche pour l'analyse de l'expression de gènes au niveau unicellulaire chez des sous-populations spécialisées de lymphocytes T CD4+ humaines

Etudiante

Lauriane Dénéreaz

Tuteur

Prof. Pedro Romero
LICR@UNIL

Co-tuteur

Dr Camilla Jandus
LICR@UNIL

Expert

Dr Alexandre Harari
Dpt d'oncologie, CHUV

Lausanne, décembre 2014

Table des matières

<i>Abstract</i>	3
<i>Introduction</i>	4
Revue littéraire.....	4
<i>Méthodologie</i>	7
Facteurs testés	8
<i>Tri des cellules et génération de clones</i>	10
Résultats.....	10
Tableau 1: tableau récapitulatif des clones utilisés lors du test des amorces	11
<i>Protocole « single cell »</i>	12
Sélection d'aliquotes d'une cellule par clone	12
Synthèse de l'ADNc.....	12
Précipitation de l'ADNc.....	13
Amplification de l'ADNc	13
Contrôle de l'ADNc des cellules individuelles	14
Tests des amorces.....	14
<i>Résultats et analyse des résultats</i>	17
Cytokines	17
Récepteurs aux chimiokines	21
Facteurs de transcription	23
Marqueurs d'activation.....	25
<i>Discussion et conclusion</i>	26
Tableau 14: récapitulatif des amorces sélectionnées.....	27
<i>Bibliographie</i>	29

Optimization of a protocol for gene expression analysis in human CD4 T cells subsets at single cell level.

Abstract

Introduction :

Chez les patients cancéreux, les cellules malignes sont souvent reconnues et détruites par les cellules T cytotoxiques du patient. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, des recherches visent à produire des vaccins sensibilisant les cellules de l'immunité adaptative, afin de prévenir certains cancers.

Bien que les vaccins ciblant les cellules T CD8+ (cytotoxiques) ont une efficacité in-vitro élevée, un vaccin pouvant cibler les cellules T CD8+ et CD4+ aurait une plus grande efficacité (1–3). En effet, les cellules T helper (CD4+) favorisent la production et la maintenance des cellules T CD8+ mémoires à longue durée de vie.

Il existe un grand nombre de sous-types de cellules T CD4+ et leur action envers les cellules cancéreuses est différente. Par exemple, les lymphocytes Treg ont une activité pro-tumorale importante (4) et les lymphocytes Th1 ont une activité anti-tumorale (5). Cependant, le taux naturel des différents sous-types de cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes tumoraux est variable. De plus, une certaine flexibilité des différents sous-types de cellules T CD4+ a été récemment démontrée (6). Celle-ci pourrait être ciblée par des protocoles de vaccination avec des antigènes tumoraux administrés conjointement à des adjuvants définis. Pour cela, il faut approfondir les connaissances sur le rôle des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes dans l'immunité anti-tumorale et connaître précisément la proportion des sous-types de cellules T CD4+ activées avant et après la vaccination.

L'analyse des cellules T, par la cytométrie de flux, est très souvent limitée par le besoin d'un nombre très élevé de cellules pour l'analyse de l'expression protéique. Or dans l'analyse des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes tumoraux cette technique n'est souvent pas applicable, car ces cellules sont présentes en très faible quantité dans le sang et dans les tissus tumoraux. C'est pourquoi, une approche basée sur l'analyse de la cellule T individuelle a été mise en place afin d'étudier l'expression du profil génétique des cellules T CD8+ et CD4+. (7,8)

Méthode :

Ce nouveau protocole (« single cell ») a été élaboré à partir d'une modification du protocole PCR-RT, qui permet la détection spécifique de l'ADN complémentaire (ADNc) après la transcription globale de l'ARN messager (ARNm) exprimé par une cellule T individuelle. Dans ce travail, nous optimisons cette nouvelle technique d'analyse pour les cellules T CD4+, en sélectionnant les meilleures amorces.

Tout d'abord, des clones à profils fonctionnels connus sont générés par cytométrie de flux à partir de cellules T CD4+ d'un donneur sain. Pour cette étape d'optimisation des amorces, la spécificité des cellules T CD4+ n'est pas prise en considération. Il est, donc, possible d'étudier et de trier ces clones par cytométrie de flux.

Ensuite, grâce au protocole « single cell », nous testons par PCR les amorces des différents facteurs spécifiques de chaque sous-type des T CD4+ sur des aliquotes issus d'une cellule provenant des clones générés. Nous sélectionnons les amorces dont la sensibilité, la spécificité ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives des tests sont les meilleures. (9)

Conclusion :

Durant ce travail nous avons généré de l'ADNc de cellules T individuelles et sélectionné douze paires d'amorces pour l'identification des sous-types de cellules T CD4+ par la technique d'analyse PCR « single cell ».

Les facteurs spécifiques aux cellules Th2 : IL-4, IL-5, IL-13, CRTh2, GATA3 ; les facteurs spécifiques aux cellules Th1 : TNF α , IL-2 ; les facteurs spécifiques aux cellules Treg : FOXP3, IL-2RA ; les facteurs spécifiques aux cellules Th17 : RORC, CCR6 et un facteur spécifique aux cellules naïves : CCR7.

Ces amorces peuvent être utilisées dans le futur en combinaison avec des cellules antigènes-spécifiques triées par marquage des multimères pMHCII. Cette méthode permettra de comprendre le rôle ainsi que l'amplitude et la diversité fonctionnelle de la réponse de la cellule T CD4+ antigène-spécifique dans les cancers et dans d'autres maladies. Cela afin d'affiner les recherches en immunothérapie oncologique. (8)

Mots clés : « single cell » ; « cellule TCD4 », « RT-PCR », « immunothérapie oncologique » ;

Introduction

En tant que deuxième cause de décès dans certains pays développés comme la Suisse, le cancer est l'une des maladies les plus préoccupantes de notre époque (10). Depuis les années 1940, les recherches sur ce sujet ont permis une nette amélioration du diagnostic et de la prise en charge des patients cancéreux. (11)

Bien que la plupart des tumeurs non métastatiques soient curables, ce n'est de loin pas le cas de toutes les tumeurs malignes métastatiques. En plus de la chirurgie et de la radiothérapie, de nombreuses thérapies systémiques, ont vu le jour, telles que les chimiothérapies, l'hormonothérapie ou encore les thérapies ciblées. Malheureusement, on observe souvent des cas de rechute du cancer due à la résistance des cellules cancéreuses contre le traitement. (12)

Les recherches en oncologie se sont étendues à l'immunothérapie des cancers. Différents types d'immunothérapies ont été mis en place. Il existe, entre autres, les anticorps monoclonaux ciblant l'antigène tumoral ou des molécules inhibitrices (ex. CTLA-4, PD-1), la stimulation non spécifique du système immunitaire adaptatif du patient, la cellulothérapie visant un transfert des cellules de l'immunité et les vaccins spécifiques visant à sensibiliser les cellules de l'immunité innée et adaptative.(4)

Chez les patients cancéreux, les cellules malignes sont souvent reconnues et détruites par leurs propres cellules T spécifiques pour les antigènes tumoraux. Grâce à leur plasticité élevée, les cellules de l'immunité adaptative sont capables d'atteindre des cancers plus avancés, pour lesquels il n'existe, à ce jour, aucune thérapie efficace. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, des recherches visent à produire des vaccins sensibilisant les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T et lymphocytes B), afin de prévenir et combattre certains cancers.(6,13)

Revue littéraire

Le cancer de la peau de type mélanome métastatique se prête particulièrement bien pour les recherches en immunothérapie oncologique (6). Il est, d'une part, un des cancers les plus immunogéniques, c'est-à-dire qu'il est capable d'induire une grande réaction immunitaire. Et, d'autre part, ses cellules cancéreuses expriment un grand nombre d'antigènes tumoraux qui sont à la fois reconnus par les lymphocytes T CD4+ et par les lymphocytes T CD8+, ce qui multiplie la force de la réponse adaptative. (14)

Parmi les nombreux antigènes exprimés par le mélanome, le Melan-A/Mart1 est un des plus caractérisés pour la vaccination. En effet, il a été démontré que les patients atteints de mélanome métastatique possèdent naturellement un taux élevé de lymphocytes spécifiques pour certains épitopes connus de cet antigène (6). Après vaccination par un peptide avec des épitopes de Melan-A/Mart-1 dans de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA)¹, nous observons une réponse immunologique avec augmentation de la concentration sanguine de cellules spécifiques à l'antigène chez 100 % des patients, mais une réponse clinique est rarement observée (13).

Bien que le rôle des vaccins dans le cadre du traitement adjuvant du mélanome à haut risque reste actuellement peu clair, les progrès récents dans l'immunothérapie du mélanome ont montré des réponses significatives. La compréhension du rôle des cellules T CD8+ et de ses régulations est devenue très précise. Grâce à l'addition de co-adjuvants tel que CpG-ODN (agoniste à TLR9), nous obtenons d'occasionnelles réponses cliniques et une réponse immunologique chez 100% des patients HLA-A2+, après vaccination avec un peptide immunogénique de l'antigène Melan-A (15). Ces co-adjuvants visent à renforcer la maturation des cellules dendritiques. Ceci va contrer l'activité inhibitrice de la tumeur sur les lymphocytes T CD8+ par l'induction d'une polarisation Th1 anti-tumoral et favoriser une meilleure activation des lymphocytes T CD8+.

¹ Adjuvant d'émulsion d'eau dans l'huile développé par Jules Freund et ses collaborateurs.

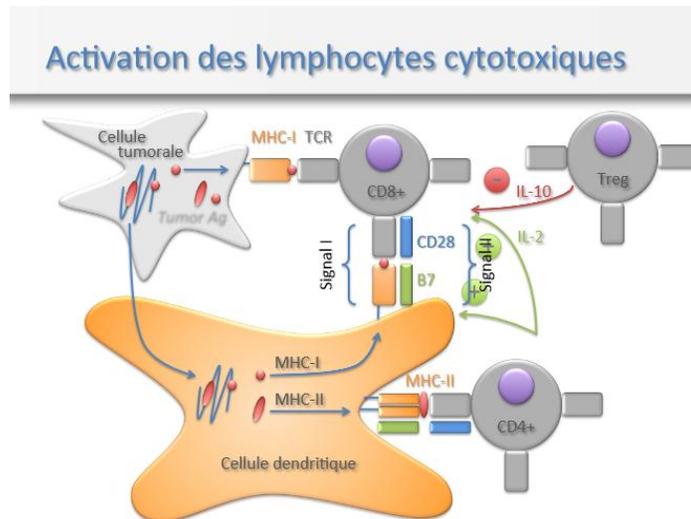


Figure 1: activation des lymphocytes cytotoxiques par les antigènes tumoraux. (4)

L'activation concomitante de cellules T helper (CD4+) et des cellules T cytotoxiques (CD8+) par des cellules dendritiques matures augmente la magnitude et la qualité de la réponse. Cette coactivation va aussi favoriser la génération et la maintenance de cellules T CD8+ mémoire à longue durée de vie (16). Un vaccin pouvant cibler à la fois les cellules T CD8+ et T CD4+ aurait un plus grand impact sur les cellules cancéreuses, car l'activation de ces deux classes de lymphocytes T assurerait une réponse plus efficace à l'antigène et donc un vaccin plus puissant à court et à long terme. (1-3)

Avec une étude plus approfondie se concentrant sur les mécanismes de régulation du système immunitaire, l'efficacité des vaccins en combinaison avec d'autres agents immunostimulants comme l'activation concomitante de cellule T helper, reste prometteuse. (6)

Pendant, cette hypothèse reste encore très théorique. Il faut approfondir les connaissances sur le rôle des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes dans l'immunité antitumorale et connaître précisément la proportion des sous-types de cellules T CD4+ activées, car leurs rôles sont différents.

Effectivement, il existe un grand nombre de sous-types de cellules T CD4+ pouvant conduire à la génération d'une grande diversité fonctionnelle parmi les cellules qui ont proliféré et différencié dans plusieurs sous types. Ces différents sous-types sont caractérisés par l'expression de facteurs de transcription spécifiques et par la sécrétion d'un pattern unique de cytokines. (17)

Chaque sous-type de cellule T CD4+ peut être défini par l'expression génétique typique, selon le type de récepteurs aux chimiokines, de facteurs de transcription et de cytokines synthétisés :

La différenciation des cellules T CD4+ Helper 1 est stimulée par l'IL-12 et requiert le facteur de transcription Tbet. La cellule TH1 différenciée exprime particulièrement les cytokines IL-2, l'IFN- γ et TNF α ainsi que les récepteurs chimiokines CCR5 et CXCR3. (18)

Ces cellules agissent dans la réponse anti tumorale et antivirale. (17)

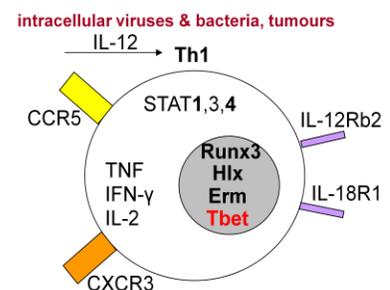


Figure 2: schéma de la cellule T CD4+ Helper 1

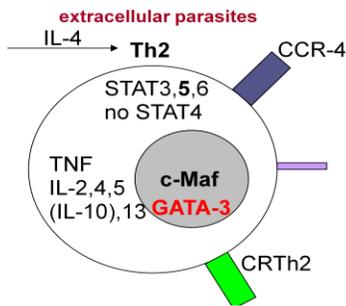


Figure 3: schéma de la cellule T CD4+ Helper 2

RORC. La cellule TH17 différenciée exprime particulièrement les cytokines IL-2, IL-17A/F, IL-21, IL-22 ainsi que les récepteurs aux chimiokines CCR-4 et CCR-6. (18)

Les cellules T helper 17 (Th17) agissent dans la réponse antifongique et proinflammatoire. (17)

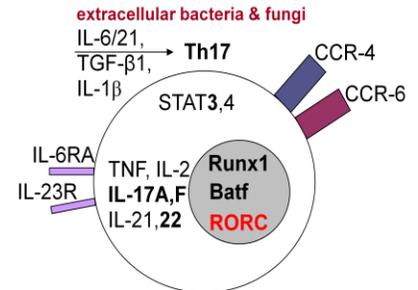


Figure 4: schéma de la cellule T CD4+ Helper 17

La différenciation des cellules T CD4+ Helper 17 dépend du facteur de transcription

La différenciation des cellules Treg semble dépendre du facteur de transcription FOXP3. Les cellules Treg différenciées expriment particulièrement les cytokines IL-10 et TGFβ. Comme récepteurs aux chimiokines, elles expriment CCR-6, CCR-7, CCR-8 et CXCR4 ainsi que le récepteur à haute affinité pour l'IL-2 CD25. (18)

Récemment, des sous-types de cellules Treg ont été caractérisés : Treg naïves, effectrices. Les cellules Treg effectrices sont enrichies dans les foyers tumoraux. Ces cellules sont négatives pour les récepteurs à IL-7 et expriment fortement le CTLA-4 ce qui va réduire l'activation des cellules anti-tumorale. (19)

Ces cellules T régulatrices (Tr1 ou Foxp3+ Treg) sont responsables de la médiation de la tolérance immunologique. (17)

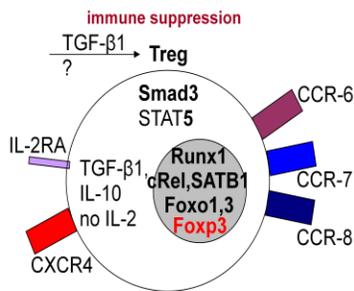


Figure 5: schéma de la cellule T CD4+ régulatrice

Grâce à des études centrées sur les réponses T CD4+, le rôle des différents sous-types des lymphocytes T CD4+ par rapport à la tumeur est petit à petit découvert. Les lymphocytes Treg ont une activité protumorale importante. En effet, ils sont stimulés indirectement par la tumeur et vont, par la suite, inhiber la réponse des lymphocytes T CD4+ effecteurs et T CD8+ cytotoxiques (4). Les lymphocytes Th1 jouent un rôle protecteur contre les cellules cancéreuses (5). L'IFN-γ, sécrété par ces lymphocytes, promeut l'immunogénicité de la tumeur en stimulant l'expression de CMH de classe I et II, ce qui va favoriser l'activation des lymphocytes spécifiques à l'antigène tumoral. De plus, IFN-γ perturbe la vascularisation tumorale par l'induction de IP-10 et promeut l'activité anti-tumorale des macrophages et d'autres cellules de l'immunité innée. Une polarisation Th2, par contre, a été associée à une promotion tumorale (5). L'IL-4 sécrété par ces cellules améliore les propriétés pro-tumorales des macrophages (20). Le rôle des cellules Th17 reste controversé. Un rôle protumoral a été démontré dans certains cancers, mais un rôle antitumoral a été démontré dans d'autres cancers lors d'un contexte de concentration élevée en Th1 et d'autres cellules antitumorales. (21)

Il a été démontré que certains vaccins induisent un shift du sous-type de cellules T spécifiques à l'antigène exprimé chez les patients (6,14). Une proportion élevée de cellules FOXP3+ (Treg) est retrouvée chez les patients atteints de mélanome métastatique avant l'immunothérapie. Après la stimulation par immunisation avec un épitope de l'antigène Melan-A en combinaison avec un adjuvant puissant, une augmentation de la proportion de cellules FOXP3- (cellules non T reg) est observée et elle est accompagnée d'un surcroît de la prolifération des cellules T CD4+. (6)

Des protocoles de vaccination avec des antigènes tumoraux administrés conjointement à des adjuvants définis pourraient cibler cette flexibilité afin de promouvoir l'activation des cellules antitumorales et d'inhiber les cellules protumorales (14). Afin d'élaborer de tels protocoles, il faut pouvoir analyser précisément la population de cellules T CD4+ spécifiques aux Ag tumoraux chez les sujets cancéreux avant et après les vaccins. (6,8)

De nos jours, nous utilisons communément la cytométrie de flux pour analyser et trier les cellules selon leurs expressions protéiques. Cette technique peut être utilisée pour l'étude des sous types des lymphocytes T CD4+ en sélectionnant les cellules exprimant des protéines typiques avant et après vaccination. Grâce à l'utilisation de multimères CMHII fluorescents chargés avec des épitopes d'antigènes tumoraux, l'analyse et le tri des cellules T CD4+ peuvent aussi se faire au niveau de leurs spécificités à l'antigène. (6,8)

Cependant, le tri des cellules T, par cette technique, est très souvent limité par le besoin d'un nombre très élevé de cellules pour l'analyse de l'expression protéique. Or, dans le cas des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes tumoraux, cette technique n'est souvent pas applicable, car les cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes tumoraux sont présentes en très faible quantité dans le sang et dans les tissus tumoraux. Il est donc nécessaire de pouvoir analyser les particularités d'une cellule individuelle. C'est pourquoi de nouvelles techniques d'études ont été développées. (7,8)

Une de ces techniques étudie les cellules au niveau unicellulaire. Elle permet de connaître la nature d'une cellule en disséquant son expression génétique par PCR-RT (7). Dans ce projet, nous allons optimiser cette technique pour l'analyse des cellules T CD4+.

Ce protocole aidera à comprendre le rôle ainsi que l'amplitude et la diversité fonctionnelle de la réponse de la cellule T CD4+ antigène-spécifique dans les cancers et dans d'autres maladies. Ces connaissances seront d'une grande importance dans la recherche et l'optimisation de la vaccination antitumorale.

Méthodologie

Le nouveau protocole a été élaboré à partir d'une modification du protocole PCR-RT, qui permet la détection spécifique de l'ADN complémentaire (ADNc) après la transcription globale de l'ARN messager (ARNm) exprimé par une cellule T individuelle. Cette technique a déjà été optimisée dans le laboratoire d'accueil pour l'étude des cellules T CD8 spécifiques à la tumeur (7). Dans ce travail, nous allons optimiser cette nouvelle technique d'analyse pour les cellules T CD4+, en sélectionnant les meilleures amorces.

Tout d'abord, des clones à profils fonctionnels connus sont générés par cytométrie de flux à partir de cellules T CD4+ d'un donneur sain. Pour cette étape d'optimisation des amorces, la spécificité des cellules T CD4+ n'est pas prise en considération. Il est, donc, possible d'étudier et de trier ces clones par cytométrie de flux.

Ensuite, grâce au protocole « single cell », nous testons par PCR les amorces des différents facteurs spécifiques de chaque sous-type des T CD4+ sur des aliquotes d'une cellule des clones générés. Nous sélectionnons les amorces dont la sensibilité, la spécificité ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives des tests sont les meilleures. (9)

À travers l'analyse PCR des cellules à profils connus, nous comptons valider la précision et l'applicabilité du protocole « single cell » dans l'étude de la réponse des cellules T CD4+ spécifiques à l'antigène chez l'humain. Après son optimisation ce protocole pourra être utilisé dans l'étude des cellules T CD4+ spécifiques aux antigènes tumoraux dans le contexte de la réponse des lymphocytes T CD4+ lors de la progression tumorale ou après vaccination thérapeutique. Les amorces retenues pourront être utilisées pour l'analyse du profil immunitaire des patients avant et après vaccinations, après tri de cellules T CD4+ individuelles, marquées avec des multimères CMHII fluorescents chargés avec des épitopes d'antigènes tumoraux. (8)

Facteurs testés

Cytokines

Les cytokines sont exprimées en grande quantité par les cellules stimulées par un antigène. Physiologiquement, la stimulation des cellules T se fait via le récepteur T grâce au complexe peptide CMH s'y liant. Dans notre cas, nous travaillons avec des clones sans spécificité antigénique connue. Nous stimulons, donc, in vitro, les cellules T par du PMA et de l'ionomycine pendant 4h. Ce mélange stimule fortement toutes les cellules indépendamment de leur spécificité.

Lorsque la technique des cellules individuelles sera utilisée pour l'étude de cellules spécifiques, on pourra utiliser les cellules spécifiques au repos ou les stimuler in vitro par leur antigène spécifique.

IL-4 (Interleukine 4, B-cell stimulatory factor 1)

IL-4 est une cytokine anti-inflammatoire Th2 qui est sécrétée par les cellules Th2 actives et les cellules T-NK. Cette cytokine est requise pour la différenciation et le priming des cellules Th2. Elle est sécrétée de manière autocrine par les cellules Th2 durant leur maturation. Cette cytokine a un rôle de régulateur négatif de la réponse Th1 en inhibant la prolifération et la différenciation des cellules Th1. De plus, Elle joue un grand rôle dans la réponse des cellules B. D'une part, en stimulant leur prolifération et leur maturation, et d'autre part en régulant les différentes classes d'anticorps (augmentation de la production d'IgE et IgG1). En outre, l'interleukine 4 stimule la survie, la croissance et la différenciation des lymphocytes T, des mastocytes et des cellules endothéliales. Dans les macrophages, IL-4 inhibe la production de TNF, IL-1 et IL-6 (cytokines pro-inflammatoires). (18)

IL-5 (Interleukine 5, T-cell replacing factor)

IL-5 est une cytokine de la cellule Th2 qui agit en tant que facteur de croissance hématopoïétique. Elle favorise la prolifération, l'activation et la différenciation de l'éosinophile à partir des cellules souches de la moelle osseuse. De plus, cette interleukine soutient la génération des cellules T cytotoxiques. (18)

IL13 (Interleukine 13, NC3)

IL-13 est une cytokine Th2 pléiotrope exprimée par les cellules T helper activées, les cellules T CD8 activées et les cellules NK. Elle supprime l'activité cytotoxique des macrophages, augmente l'expression des IL1-RA et supprime l'expression des cytokines inflammatoires. Cette cytokine favorise la prolifération des cellules B et stimule la sécrétion d'IgE et d'IgG4. En outre, elle prolonge la survie des monocytes et induit la production d'IFN γ par les cellules NK. De plus, elle inhibe la production d'une série de cytokines comme IL-1, IL-6, IL-8... (18)

IL-2 (Interleukine-2)

IL-2 est une cytokine Th1. Elle joue un rôle central dans l'activation et la prolifération des lymphocytes qui ont été amorcés par un antigène. IL-2 est très importante pour l'expansion de la plupart des cellules T, des cellules NK et des cellules B pendant les différentes phases de leur réponse. Cette cytokine est produite pendant l'activation des cellules T et alimente la croissance des cellules T activées. En outre, IL-2 module l'expression d'IFN γ et des antigènes MHC, stimule la prolifération et la différenciation des cellules B activées, augmente l'activité des cellules NK, et inhibe la formation de colonies de macrophages. IL-2 est un puissant facteur de croissance des cellules T, un inducteur de l'activité « killer » des lymphocytes activées et un facteur essentiel du développement des cellules Treg. (18)

TNF α (tumor necrosis factor α)

Le TNF α est une cytokine pléiotrope qui joue un rôle clé dans l'immunité innée et adaptative. TNF α est le plus souvent associé avec la régulation de la survie des cellules et de leurs propriétés pro-inflammatoires. Il est connu pour induire la prolifération/différenciation cellulaire, la tumorigénèse, la mort cellulaire apoptotique ou nécrotique (incluant la mort des cellules tumorales), l'immunorégulation, le métabolisme lipidique, la coagulation et la fonction endothéliale. Il est principalement exprimé par les macrophages et les monocytes, mais aussi par les neutrophiles, les cellules-NK, les cellules endothéliales, les lymphocytes activés, et d'autres tissus incluant certaines cellules tumorales. (18)

Récepteurs aux chimiokines

La fonction des cellules T effectrices et mémoires ne dépend pas seulement de l'expression des cytokines, mais aussi de leur capacité à migrer vers des sites contenant les antigènes. La migration des cellules T dépend de l'expression particulière des sélectines, des récepteurs aux chimiokines et des intégrines qui déterminent les étapes de l'extravasation. Chaque sous-type de cellules T exprime des récepteurs d'adhésion et des chimiokines différents. Cela permet une discrimination des sites d'extravasation des cellules T et offre ainsi une surveillance immunitaire variable selon les tissus (22). Les récepteurs aux chimiokines sont présents dans les cellules non-stimulées, mais peuvent aussi être up-régulées lors de l'activation cellulaire. Nous utiliserons, donc les cellules non-stimulées pour tester ces facteurs.

CRTh2 (PGD2 Receptor expressed by Th2 cells)

CRTh2 est un récepteur à la prostaglandine D2 exprimé par les cellules Th2, les éosinophiles et les basophiles. Il joue un rôle dans la chimiotaxie et l'activation des cellules lors de réactions allergiques. (23)

CCR7 (C-C Chemokine receptor type 7)

CCR7 est un récepteur aux chimiokines CCL21 et CCL19 qui est exprimé seulement par les cellules naïves et cellules mémoires centrales. Son activation sert de médiateur de la migration des cellules naïves et cellules mémoires centrales vers les organes lymphoïdes secondaires. (24)

CCR6 (C-C Chemokine receptor type 6)

L'expression du CCR6 par les cellules Th17 et Treg est induite par le TGF β et inhibée par l'IL-2. Récepteur à la chimiokine CCL20, le CCR6 semble jouer un rôle dans la migration des cellules vers l'intestin (les plaques de Peyer et GALT), la cavité péritonéale, les tissus enflammés et le système nerveux central. (25)

Facteurs de transcription

La différenciation des cellules T dans les différents sous-types de cellules s'accompagne du changement de profil d'expression des facteurs de transcription. Ces facteurs vont déterminer le profil d'expression protéique de la cellule et donc son sous-type. Les facteurs de transcription sont présents dans les cellules non-stimulées. Nous utiliserons donc les cellules non-stimulées pour tester ces facteurs.

GATA-3

GATA-3 est peu abondant dans les cellules T CD4⁺ naïves. Lors de la polarisation de la cellule, l'activation partielle de MAP kinase Erk va augmenter sa concentration dans la cellule. Ce qui va lui permettre de se lier aux sites régulateurs d'un groupe de gène codant pour de nombreuses cytokines dont l'IL-3, IL-13 et l'IL-15. De plus, GATA-3 est un médiateur de changement de la chromatine. Cela augmente l'expression des cytokines et autres facteurs de transcription typiques de Th2. (24)

RORC

RORC est le facteur de transcription des cellules Th17. RORC joue un rôle important de régulateur dans la thymopoïèse en réduisant l'apoptose des lymphocytes T. Il est requis pour la différenciation des cellules T naïves en cellules Th17. Il est aussi requis pour le développement de ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer. (26)

FOXP3

FOXP3 est le facteur de transcription des cellules Treg. Il est induit par le TGF β . Il induit la différenciation des cellules T en cellules Treg en modifiant la chromatine des cellules. Ce qui augmente l'expression des cytokines et autres facteurs de transcription typique de Treg. Il joue aussi le rôle de répresseur de transcription pour l'IL-2 par exemple. (24)

Marqueurs d'activation

CD25 ou IL-2Ra

CD25 est la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Ce récepteur est produit et exprimé par toutes les cellules effectrices lors d'activation et par les Treg déjà à l'état repos. Son expression augmente en cas de stress cellulaire afin de répondre à une augmentation d'IL-2 dans le milieu (24).

Tri des cellules et génération de clones

Lors d'expériences précédentes, des clones T CD4+ « contrôles » ont été générés à partir de cellules T CD4+ d'un donneur sain. Des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées par centrifugation de densité au-dessus d'un gradient de Ficoll-Paque (Lymphoprep™) à partir du sang périphérique d'un donneur sain humain. Les cellules T CD4+ ont ensuite été purifiées par billes magnétiques et un dispositif MiniMACS. Et les différents sous-types voulus ont été isolés grâce à un triage par cytométrie de flux.

À partir des cellules purifiées, des clones ont été générés par « limiting dilution² » en présence de « allogenic feeders cells³ », PHA (phytohemagglutinine), et 100 U/ml d'IL-2 recombinant humain.

- Sélection des cellules CD4+ et CCR6+ : Clone 11 (type Th17)
- Sélection des cellules CD4+ et CD25+ : Clone 4 (type Th1-Treg) et Clone 6 (type Th1)
- Sélection des cellules CD4+ et CRTh2+ : Clone 7 (type Th2)
- Sélection des cellules CD4+, CD45RA+ et CCR7+ : Cellules naïves

Une fois qu'assez de cellules par clones ont été obtenues par expansion, les clones ont été testés par cytométrie de flux. En effet, l'expression des cytokines est extrêmement flexible. Bien que les cellules expriment plus fréquemment certaines cytokines typiques de leur sous-type, elles peuvent différer de profil de sécrétion selon leur stimulation. Avant l'analyse par cytométrie de flux, les clones ont été stimulés avec de la PMA/ionomycine, en présence de Brefeldin A, afin de connaître le taux de production de cytokine par les clones générés lorsqu'ils sont stimulés pendant 4 heures. Ceci afin de choisir quel clone utiliser en tant que contrôle négatif et positif pour le protocole « single cell ».

Résultats

Les clones dont plus de 50% des cellules expriment une certaine protéine peuvent être utilisés comme contrôles positifs lors des tests des amorces de ce facteur ; les clones dont moins de 1% des cellules expriment cette protéine peuvent être utilisés comme contrôles négatifs.

Quatre clones ont été sélectionnés comme contrôles des différents sous-types de cellules T CD4+ et un clone pour les cellules naïves.

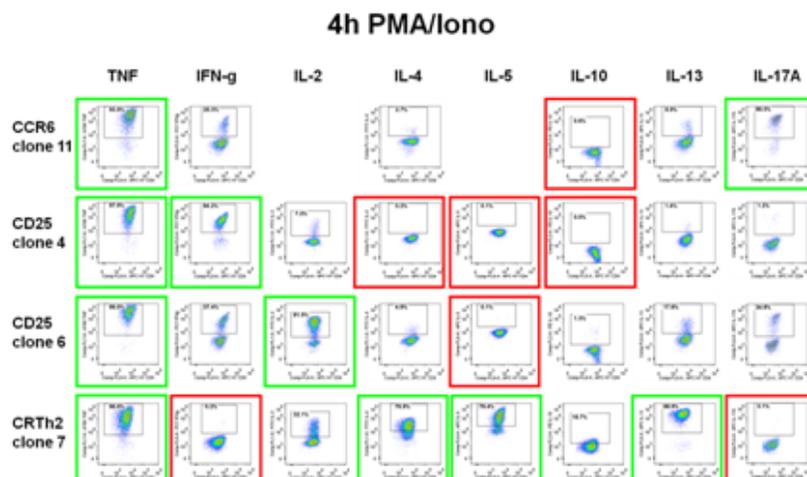


Figure 6: résumé des résultats de la cytométrie de flux

²Les cellules T CD4+ triées sont déposées à raison de 1/2 cellule par puits. Si les cellules se multiplient dans le puits, elles représenteront un clone généré à partir d'une première cellule unique.

³Lymphocytes sanguins périphériques irradiés

Clone 11 (type Th17)

Le clone 11 a été généré à partir des cellules CCR6+ et CD4+ triées. La cytométrie de flux a démontré qu'une grande partie des cellules de ce clone sécrète IL-17A (86%) et TNF α (93.9%) et qu'une petite partie sécrète IL-10 (0.6%). Ce clone est donc un bon représentatif des cellules Th17. Nous utiliserons, donc, le clone 11 non stimulé comme contrôle positif pour tester le récepteur chimiokine **CCR6** et le facteur de transcription **RORC** et comme contrôle négatif pour tester le facteur de transcription **FOXP3** qu'il ne devrait pas exprimer.

Clone 4 (type mi Th1-Treg)

Le clone 4 a été généré à partir des cellules CD25+ (IL-2RA) et CD4+ triées. Le clone 4 exprime en grande quantité les facteurs des cellules Th1 ainsi que Treg et en très faible quantité les facteurs des cellules Th2. Par cytométrie de flux, il a été démontré qu'une petite partie des cellules de ce clone sécrète IL-4 (0.2 %), IL-5 (0.1 %) et IL-13 (0%) et qu'une grande partie sécrète TNF α (97.9%) et IFN γ (94.2%). Ce clone pourra par conséquent être utilisé comme contrôle positif pour les facteurs des cellules Th1 (TNF α , IFN γ) et Treg (**FOXP3**, **IL-2RA** et **CTLA4**) et comme contrôle négatif pour les facteurs des cellules Th2 (**IL-4**, **IL-5**, **IL-13**, **CRTh2**). Nous utiliserons, donc, le clone stimulé pendant 4h pour le test des cytokines et le clone non-stimulé pour tester les facteurs de transcription et les récepteurs aux chimiokines.

Clone 6 (Th1)

Le clone 6 a été généré à partir des cellules CD25+ (IL-2RA) et CD4+ triées. Par cytométrie de flux, il a été démontré qu'une grande partie des cellules de ce clone sécrète TNF α (99%) et IL-2 (81.5%) après stimulation mais seulement 1.6% des cellules expriment IL-2 avant stimulation. Nous utiliserons donc le clone 6 non stimulé comme contrôle négatif et stimulé comme contrôle positif pour la cytokine **IL-2**.

Clone 7 (clone Th2)

Le clone 7 a été généré à partir des cellules CRTh2+ et CD4+ triées. Il représente donc les cellules Th2. Par cytométrie de flux, nous observons qu'une grande quantité de cellules sécrète TNF α (96.6%) IL-4 (76.9%), IL-5 (79.4%) et IL-13 (98.9%) et qu'une petite quantité sécrète IFN γ (0.2%) et IL-17A (0.1%). Nous allons donc utiliser ce clone comme contrôle positif pour les protéines typiques de Th2 : le facteur de transcription **GATA3**, les cytokines **IL-4**, **IL-5** et **IL-13** ainsi que le récepteur à la prostaglandine D2, **CRTh2**. **CCR6** et **CCR7** ne sont pas exprimés par les cellules Th2. Nous utiliserons, donc, ce clone comme contrôle négatif lors du test de ces récepteurs aux chimiokines.

Cellules naïves

Les cellules naïves ont été triées en sélectionnant les cellules CD45RA+, CCR7+ et CD4+. Certains facteurs de transcription comme TNF α , **GATA3** et **IL-2RA** sont exprimés seulement par les cellules effectrices, nous utiliserons les cellules naïves comme contrôle négatif. D'autres comme **CCR7** sont exprimés seulement par les cellules naïves et les cellules mémoires centrales, nous pouvons donc utiliser n'importe quel clone de cellules effectrices comme contrôle négatif. Nous utiliserons le clone 7 comme contrôle négatif et les cellules naïves comme contrôles positifs.

Tableau 1: tableau récapitulatif des clones utilisés lors du test des amorces

	Facteurs	Contrôle négatif	Contrôle positif
cytokines	IL-4	Clone 4, 4h (0.2%)	Clone 7, 4h (76.9%)
	IL-5	Clone 4, 4h (0.1%)	Clone 7, 4h (79.4%)
	IL-13	Clone 4, 4h (0%)	Clone 7, 4h (98.9%)
	IL-2	Clone 6, 0h (1.6%)	Clone 6, 4h (81.5%)
	TNFα	Cellule naïve	Clone 4, 4h (98.1%)

Récepteurs aux chimiokines	CRTh2	Clone 4, 0h	Clone 7, 0h
	CCR7	Clone 7, 4h	Cellule naïve
	CCR6	Clone 7, 0h	Clone 11, 0h
Facteurs de transcription	GATA3	Cellules naïves	Clone 7, 4h
	RORC	Clone 7, 0h	Clone 11, 0h
	FOXP3	Clone 11, 0h	Clone 4, 0h
Marqueurs d'activation	CD25/ IL-2RA	Cellule naïve	Clone 4, 4h

Protocole « single cell »

La technique utilisée lors de cette étude est une approche établie sur l'analyse de l'expression du profil génétique d'une cellule T CD4+ individuelle. Elle se base sur la modification du protocole PCR-RT, qui permet la détection de l'ADN complémentaire (ADNc) spécifique après la transcription globale de l'ARN messager (ARNm) exprimé par une cellule T individuelle. Cette technique a déjà été optimisée dans le laboratoire d'accueil pour l'étude des cellules T CD8 spécifique à la tumeur. (7)

Les amorces des différents facteurs spécifiques sont testées par PCR sur l'ADNc isolé et amplifié d'aliquotes d'une cellule des clones générés précédemment.

Sélection d'aliquotes d'une cellule par clone

Nous allons tester les amorces sur des aliquotes d'une cellule grâce à la méthode d'analyse PCR de cellules individuelles. Pour cela, il nous faut premièrement sélectionner des aliquotes d'une cellule par clone.

Nous utilisons la même méthode que pour le tri de cellules T CD4+ lors de la génération des clones. Tout d'abord, nous marquons les cellules par immuno-marquage grâce à des anticorps dirigés contre les protéines de surfaces choisies (le même que pour la génération des clones), couplés à une molécule fluorescente.

Les cellules sont d'abord lavées avec un tampon spécial pour le tri des cellules (PBS (BSA/EDTA)). Après une centrifugation de 5 min à 1500 tours par minute, nous ajoutons les anticorps spécifiques aux protéines de surface. Puis, nous incubons pendant 20 min à 4°C. Les échantillons sont ensuite lavés et mélangés à du DAPI dilué à 1 :1000, ce qui va identifier les cellules mortes.

Pour finir nous utilisons l'appareil à cytométrie de flux : le trieur sélectionne les cellules voulues (fluorescentes grâce aux marquages susmentionnés) et les trie une par une dans des plaques à PCR (puits en V). Nous obtenons alors les cellules individuelles triées.

Pour chaque clone, nous trions 30 aliquotes de 1 cellule à l'état de repos, et 30 aliquotes de 1 cellule activée pendant 4h avec de la PMA/Ionomycine. Nous trions aussi 30 aliquotes de cellules naïves individuelles, identifiées par l'expression de CD45RA et CCR7.

Synthèse de l'ADNc

La méthode RT-PCR teste les amorces sur de l'ADNc. Cet ADN est obtenu à partir d'ARN messager exprimé par les cellules. Pour l'obtenir, il faut, premièrement, lyser la cellule et ensuite synthétiser de l'ADNc à partir de l'ARNm.

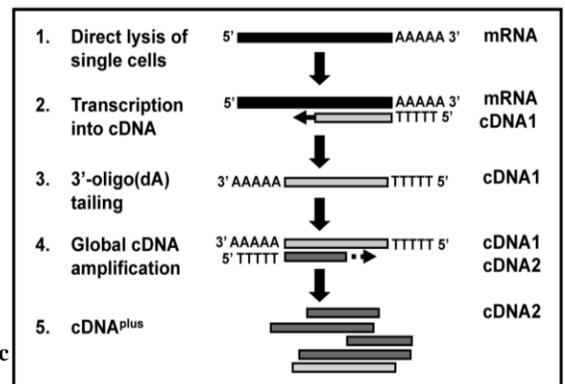


Figure 7: synthèse, précipitation et amplification de l'ADNc

Lors du tri des cellules individuelles par « fluorescence-activated cell sorting » les cellules sont déposées dans des puits en V contenant la solution de lyse et de transcription inverse : 3µl 5xRT Buffer, 1.5µl DTT 1M, 0.47µl dNTP 10mM, 0.25µl oligodT 100ng/µl, 2.6µl d'eau, 0.2µl RNAsin et 0.4µl M-MLV reverse transcriptase. Puis, ils sont recouverts avec un plastic adhésif. Pour permettre la transcription totale de l'ARNm en ADNc, les plaques sont incubées 60 min à 37°C, puis centrifugées. Le contenu de chaque puits est alors transféré dans des minitubes et la M-MLV reverse transcriptase est inactivée à 70°C pendant 10 min. Pour finir, les tubes sont placés sur de la glace durant quelques minutes, centrifugés et stockés à -80°C.

Précipitation de l'ADNc

Afin d'isoler l'ADNc du reste de la cellule, nous ajoutons dans chaque tube : 7.5µl NH₄ Acétate (7.5M), 3.0µl de glycogène (10mg/ml) et 45µl d'éthanol (100%). Le tout est mélangé avec un Vortex. Les tubes sont, ensuite, incubés à -80°C durant la nuit. Puis, ils sont centrifugés dans une chambre froide à vitesse maximale pendant 20min. La solution se sépare : l'ADN précipite en bas et l'éthanol reste en haut. Nous ôtons l'éthanol afin d'avoir des échantillons les plus purs possible. Puis, nous effectuons un nouveau lavage à l'éthanol : nous ajoutons 150µl d'éthanol 70% à -20°C. Les tubes sont à nouveau centrifugés à vitesse maximale en chambre froide pendant 15min et le liquide qui se sépare sur le dessus du contenu sera enlevé. Pour finir, afin de bien sécher les échantillons d'ADN, nous les laissons découverts à l'air sec pendant une heure.

Amplification de l'ADNc

3'oligo (dA) tailing

Lors du test de l'ADNc directement après sa précipitation: une baisse du signal obtenu avec l'amorce de GAPDH est observée, après quelques dilutions seulement.



Figure 8: Produit PCR de l'amorce GAPDH sur des aliquots de 10 cellules dilués à 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷ (de gauche à droite)

Pour contrer cela, nous procédons à une amplification de l'ADNc par l'extension homopolymérique 3'-Oligo (dA) (illustré dans la Figure 8 aux numéros 3 à 6).

Il nous faut, premièrement, ajouter les 3'-Oligo(dA) au bout des séquences ADN à amplifier. 5µl de mixte (de 1µl de 5Xtailing buffer, 0.250µl d'ATP et 3.683µl d'H₂O et 0.067 TdT) est ajouté à chaque tube. Sans mélanger, les tubes sont incubés pendant 30min à 37°C au bain marie. Afin de désactiver l'enzyme les tubes sont placés à 70°C pendant 15min. Puis nous plaçons les tubes sur la glace pendant 3min et les centrifugeons.

PCR d'amplification globale

Suite à l'ajout des 3'oligo (dA) au bout des séquences ADN à amplifier, nous procédons à une PCR afin d'amplifier l'ADN. Dans chaque tube, nous ajoutons 35 µL de solution (8µL PCR buffer 2mM, 2.5µL Triton X-100 10%, 1µL dNTP 10mM, 1µL OligoT-iscove 1µg/µL, 22.5µL H₂O), puis deux gouttes d'huile. Nous faisons subir 3 minutes à 90°C aux produits afin de le dénaturer (séparation des deux brins d'ADN).

Ensuite nous ajoutons 10 µL de solution (7µL H₂O, 1µL enzyme (Taq), 2µL PCR buffer 2mM) dans chaque tube. Nous initions, alors, le programme de la PCR pour l'amplification de l'ADNc : 1 min à 94°C, 5 cycles de 50 secondes à 94°C, 2 minutes à 37°C et 9 minutes à 72°C, ensuite une autre série de 40 cycles de 50 secondes à 94°C 90 secondes à 60°C et 8 minutes à 72°C et pour finir 8 minutes à 72°C. À la fin, la température se stabilise à 4°C.

Contrôle de l'ADNc des cellules individuelles

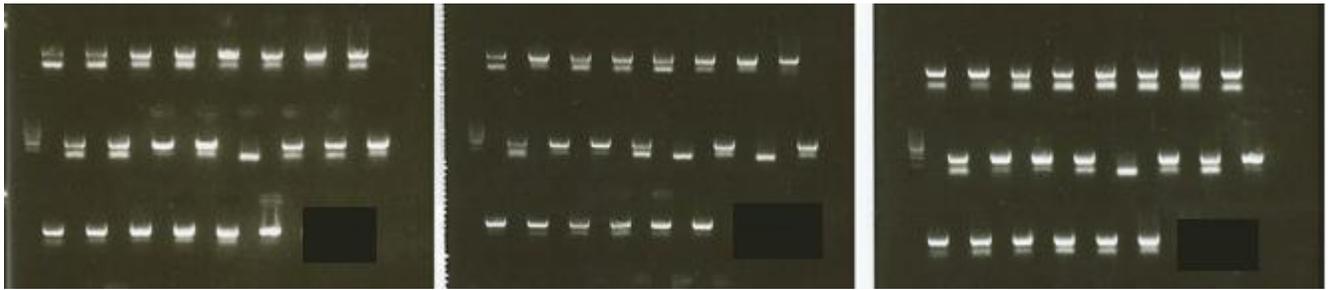


Figure 9: photo de l'électrophorèse des produits PCR obtenus avec, de gauche à droite, les amorces GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), β 2MG (beta2 microglobuline) et RPL13A (60S ribosomal protein L13a) sur l'ARN du clone 6.

Les protéines GAPDH, β 2MG et RPL13A sont exprimées en grande quantité et de manière stable par toutes les cellules T. Ce sont des « housekeeping genes ». Nous les utilisons pour tester la qualité de l'ADNc amplifié. Par PCR nous testons la présence d'ADNc codant ces protéines pour chaque échantillon de cellules individuelles triées. Seuls les échantillons positifs sur aux moins 2 de ces tests sont retenus pour notre recherche. En général, nous avons eu une réussite de 85-90% dans la génération d'ADNc des cellules individuelles triées.

Tests des amorces

Les techniques PCR consistent à mettre en évidence l'ADNc codant pour une protéine voulue afin de mettre en évidence l'expression d'ARNm de cette protéine par la cellule testée. Premièrement, une partie spécifique de l'ADNc codant est multipliée grâce à des amorces sélectionnées. Puis, les produits obtenus sont alors soumis à l'électrophorèse, et mis en évidence par une photo UV.

Le but de notre étude est de sélectionner les amorces qui donnent les meilleurs résultats PCR afin de choisir les amorces les plus adaptées pour les futures recherches.

Nous testons, donc, les amorces commandées sur les clones contrôles. Pour avoir des résultats utilisables, nous testons 7 à 10 aliquotes d'ADNc issus de cellules individuelles triées de chaque clone.

Certaines amorces ont déjà été testées sur des aliquotes issus de dix cellules. Par ce premier test, nous éliminons les amorces ayant de mauvais résultats et testons les meilleures sur l'ADNc des aliquotes issus de cellules individuelles. Pour certains facteurs, nous avons d'abord testé les amorces sur 3 aliquotes issus de cellules individuelles contrôles négatifs et 3 aliquotes issus de cellules individuelles contrôles positifs. Puis, la ou les amorces avec les meilleurs résultats seront testées sur 7 autres aliquotes issus d'une cellule.

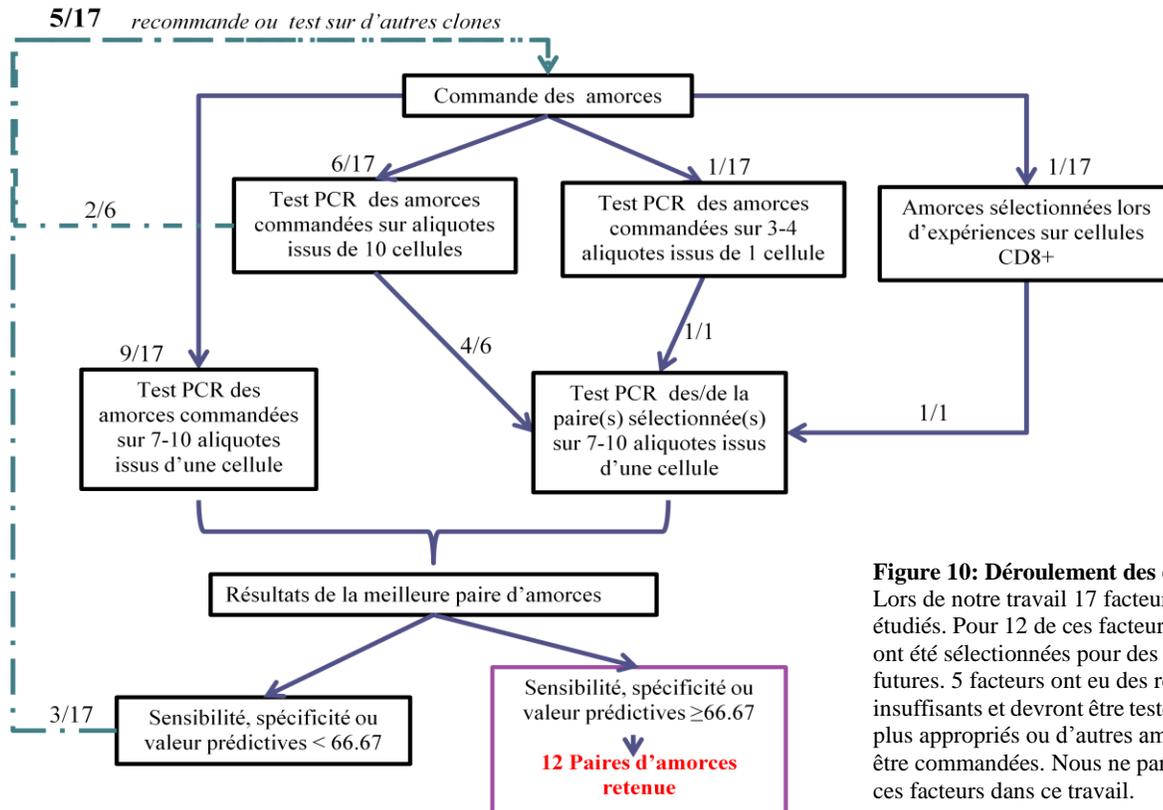


Figure 10: Déroulement des expériences
Lors de notre travail 17 facteurs ont été étudiés. Pour 12 de ces facteurs des amorces ont été sélectionnées pour des recherches futures. 5 facteurs ont eu des résultats insuffisants et devront être testés sur des clones plus appropriés ou d'autres amorces devront être commandées. Nous ne parlerons pas de ces facteurs dans ce travail.

Commande des amorces

En parallèle à la génération des différents clones T CD4+ contrôles, un grand nombre d'amorces spécifiques aux facteurs à tester a été sélectionné. Ces amorces vont être testées par analyse PCR sur l'ADNc des cellules individuelles triées.

Les amorces sont trouvées dans une banque de donnée de la NCBI (National Center for Biothechnology Information). Ce site-web nous permet à la fois de connaître la séquence ARNm de la protéine voulue et de tester virtuellement les amorces proposées.

Nous sélectionnons des amorces (au moins 3 paires d'amorces par gène d'intérêt) de taille d'environ 20pb qui forment des produits PCR d'environ 150pb. De plus, il faut que les amorces comprennent au moins 55-60 % de bases CG et 100% de base correspondante à la séquence génomique, car cela assure une meilleure liaison des amorces sur l'ADNc.

Les amorces se liant aussi à d'autres séquences génétiques exprimées par les cellules testées seront mises de côté. Nous les accepterons cependant si les bases ne sont pas 100% correspondantes à cette autre séquence et si le produit PCR obtenu avec l'autre séquence est plus lourd que celui obtenu par la séquence voulue (au moins 150-200pb de plus). Ces conditions nous permettent donc de bien différencier les bandes formées par le produit PCR voulu et les bandes formées par les « parasites ».

Les amorces sont plus fiables si l'amorce « allé » et l'amorce « retour » correspondent à des exons différents. Car si elles se lient à des séquences de l'ADN génomique au lieu de l'ADNc les introns compris entre les amorces rendront la séquence à dupliquer tellement longue que la duplication ne pourra pas être terminée lors des PCR que nous effectuons. Ce qui n'est pas le cas lors de la multiplication de l'ADNc car les introns y sont exclus. Ainsi nous garantissons que seul l'ADNc sera répliqué et que seul l'ARNm exprimé par les cellules sera mis en évidence.

Analyse PCR

Pendant la préparation de la solution PCR, nous devons préchauffer la machine à PCR. Pour cela, nous enclenchons le programme et la machine va automatiquement stabiliser sa température à 94°C.

Nous devons, alors, préparer le Master Mix, pour chaque puits : 13.70µl ddH₂O, 4.00µl 1.5xPCR buffer (catalyseur), 0.40µl dNTP, 0.40µl d'amorces-aller (1 : 10⁷000) et 0.40µl d'amorces-retour (1 : 10⁷000) et à la fin 0.10µl de Platinum Taq (enzyme transcriptase reverse). Nous prélevons, ensuite, 19µl de Master Mix que nous disposons dans chaque puits et y ajoutons 1µl d'ADNc de la cellule T CD4+ individuelle. Il faut bien faire attention à pipeter au fond des tubes d'ADNc, car celui-ci est recouvert d'huile. Si l'on pipette trop en surface, nous risquons de ne prendre que de l'huile et les résultats seront complètement faussés.

Une fois les solutions PCR préparées et disposées dans les puits, les plaques sont placées dans la machine et nous enclenchons la deuxième étape du programme. Les échantillons vont alors subir pendant 2 minutes une température de 94°C suivie de 40 cycles de 30 secondes à 94°C, 45 secondes à 58°C et 60 secondes à 72°C, à la fin de ces cycles, puis la température atteindra 72°C pendant 10 min et, pour finir, se stabilisera à 15°C jusqu'à qu'on les sorte de la machine.

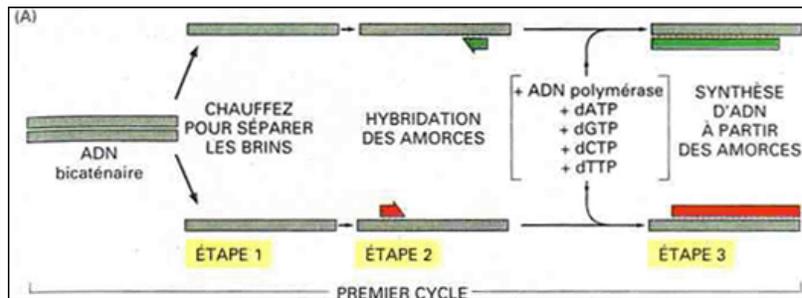


Figure 11: schéma explicatif du premier cycle de la PCR. Lors de ce protocole, l'ADNc subit 40 cycles.

La Figure 11 illustre les différentes étapes des cycles de la PCR :

1. Séparation des brins (dénaturation) grâce à une température de 94°C.
2. Hybridation des amorces sur l'ADNc correspondant.
3. Synthèse des produits PCR à partir des amorces.

Après 40 cycles, nous obtiendrons 2⁴⁰ fois la partie de l'ADNc voulu. À l'électrophorèse, il sera donc beaucoup plus visible que le reste de l'ADNc.

Electrophorèse

Afin de mettre en évidence les produits PCR générés grâce aux différentes paires d'amorces testées, nous faisons migrer les échantillons sur des plaques de gel d'Agarose (2,5%). Premièrement, il nous faut préparer le gel : nous mélangeons 2.5g d'Agarose avec 100ml TBE 1X après avoir secoué la bouteille, nous disposons la solution 2 minutes au micro-onde puis nous y ajoutons 6µl de teinte (Gel Red Nucleic Acid Stain). Nous disposons, ensuite, le gel dans les moules en prenant garde à ne pas y laisser de bulle d'air (une pointe à pipette peut être utilisée pour déplacer les bulles vers les bords). Nous laissons reposer le gel pendant environ 30 minutes dans une chambre froide.

Pendant ce temps, nous préparons les solutions PCR que nous allons faire migrer en ajoutant 10µl de marqueur au sucrose 40% dans chaque puits en V des plaques à PCR. Une fois le gel prêt, nous le démoulons et le plaçons dans les cuves en le recouvrant de TBE

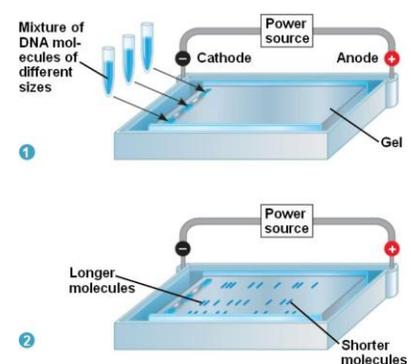


Figure 12: Schéma de l'électrophorèse

1X. Enfin, nous disposons 12.5µl de la solution à faire migrer dans les puits du Gel d'Agarose. Pour finir, le Gel est mis sous tension (100-120V) pendant 30 minutes. Les produits PCR vont migrer, sur le Gel, selon leur taille. Plus le produit est lourd, plus il migra lentement.

Lecture des gels

Après la migration des produits PCR, nous prenons une photo du gel grâce à un appareil photo UV. Cette technique fait ressortir les bandes des produits PCR que nous pourrions analyser.

Il arrive que les amorces allé et les amorces retour se lient entre elles (par exemple amorce-dimère) ou avec d'autres séquences de l'ADNc exprimées par la cellule et forment, alors, une autre bande visible sur le gel. Pour différencier ces bandes des bandes du produit PCR recherché, nous corrélons les bandes du marqueur de poids aux produits PCR recherchés. Le marqueur que nous utilisons se partage en lignes marquant chaque 100pb. Nous pouvons, donc, mettre en évidence les lignes correspondantes aux produits PCR amplifiés spécifiquement grâce aux amorces.

Exemple: IL-13 (4): le produit de PCR cherché pour mettre en évidence l'ADNc de la cytokine IL-13 a une longueur de 232pb. La bande du haut est alignée un peu en dessus de la deuxième bande du marqueur de poids. Nous pouvons donc conclure que c'est la bande du produit cherché.

La barre du bas est présente dans tout les puits y compris l'eau (première piste à gauche), nous pouvons donc savoir que ce sont les amorces qui se lient entre elles.



Figure 13: Photo des produits PCR obtenus avec la paire d'amorce IL-13 (4)

Lorsque les différentes amorces testées pour un facteur engendrent les mêmes sensibilités, spécificités et valeurs prédictives, l'amorce dont le produit PCR est le plus lisible est retenue.

Résultats et analyse des résultats

Cytokines

IL-4

Tableau 2: résultats de la PCR des amorces d'IL-4 (1, 3, 4, 5) sur les clones 4 et 7 stimulés 4h ⁴

Amorces	Contrôle – clone 4 stimulé 4h	Contrôle + clone 7 stimulé 4h
IL-4 (1)	Red	Green
IL-4 (3)	Red	Green
IL-4 (4)	Red	Green
IL-4 (5)	Red	Green

⁴ Pour chaque tableaux de résultats, nous utilisons le même code couleur : en vert les résultats positifs, en rouge les résultats négatifs et en orange les résultats peu ou difficilement lisibles.

Amorces	Sensibilité ⁵	Spécificité ⁶	Valeur prédictive positive ⁷	Valeur prédictive négative ⁸
IL-4 (1)	33.33%	100.00%	100.00%	66.67%
IL-4 (3)	66.67%	100.00%	100.00%	75.00%
IL-4 (4)	33.33%	100.00%	100.00%	66.67%
IL-4 (5)	11.00%	100.00%	100.00%	52.94%

La paire d'amorces IL-4 (3) (entourée en jaune) donne un résultat nettement plus satisfaisant que les autres amorces. Avec une sensibilité de 66.67%, une spécificité de 100% car elle ne donne aucun faux positif mais trois faux négatifs. Elle a donc une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 75%.

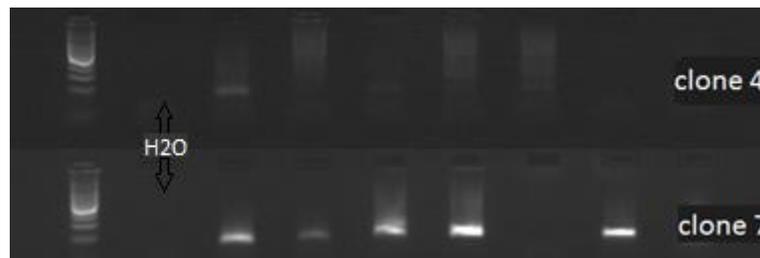


Figure 14: photo des produits PCR obtenus avec la paire d'amorces IL-4 (3)
Sur cette image, seulement 7 des 10 aliquote sont présentés.

IL-5

Lors d'un premier test sur trois aliquotes de chaque contrôle, les résultats pour les paires d'amorces IL-5 (3), (4) et (5) sont moins lisibles que pour la paire d'amorces (2). Nous testons, donc, cette paire sur un plus grand nombre d'aliquote contrôles.

Tableau 3: résultats de la PCR des amorces d'IL-5 (2, 3, 4 et 5) sur les clones 4 et 7 stimulés pendant 4h

Amorces	Contrôle – clone 4 stimulé 4h					Contrôle + clone 7 stimulé 4h				
IL-5 (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-5 (3)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-5 (4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-5 (5)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Calculs utilisés lors de l'analyse des résultats de ce travail :

⁵ Sensibilité = $\frac{\text{vrais positifs}}{\text{nombre totale de cellules contrôles + testées}}$ Capacité du test à être positif si la cellule exprime le facteur.

⁶ Spécificité = $\frac{\text{vrais négatifs}}{\text{nombre totale de cellules contrôles – testées}}$ Capacité du test à être négatif si la cellule n'exprime pas le facteur.

⁷ Valeur prédictive positive = $\frac{\text{vrais positifs}}{\text{total des résultats positifs}}$ C'est la probabilité que la cellule exprime le facteur si le test est positif.

⁸ Valeur prédictive négative = $\frac{\text{vrais négatifs}}{\text{total des résultats négatifs}}$ C'est la probabilité que la cellule n'exprime pas le facteur si le test est négatif.

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
IL-5 (2)	100.00%	87.50%	87.50%	100.00%
IL-5 (3)	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
IL-5 (4)	75.00%	100.00%	100.00%	75.00%
IL-5 (5)	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

La paire d'amorces IL-5 (2) (entourée en jaune) choisie lors des premiers tests sur 3 aliquotes donne de bons résultats sur les aliquotes supplémentaires. Sur 7 aliquotes de chaque contrôle, elle ne donne aucun faux positifs et aucun faux négatifs. Nous observons donc, une sensibilité de 100%, une spécificité de 87.50%, une valeur prédictive positive de 87.50% et une valeur prédictive négative de 100%. Les photos UV des produits PCR avec la paire d'amorce IL-5 (2) sont plus facilement lisibles que celles obtenues avec les autres amorces. Nous retenons cette paire d'amorces afin d'éviter une mauvaise lecture lors des recherches futures.

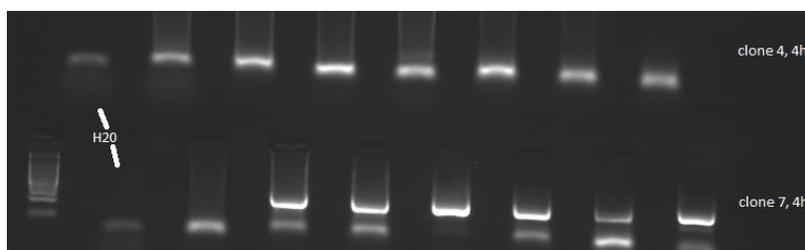


Figure 15: photo du produit PCR obtenu avec la paire d'amorces IL-5 (2)

IL-13

Tableau 4: résultats de la PCR des amorces d'IL-13 (2, 3 et 4) sur les clones 4 et 7 stimulés pendant 4h

Amorces	Contrôle – clone 4 stimulé 4h	Contrôle + clone 7 stimulé 4h
IL-13 (2)	██	██
IL-13 (3)	██	██
IL-13 (4)	██	██

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
IL-13 (2)	60.00%	100.00%	100.00%	71.43%
IL-13 (3)	90.00%	90.00%	90.00%	90.00%
IL-13 (4)	80.00%	100.00%	100.00%	83.33%

La paire d'amorces IL-13 (3) (entourée en jaune) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 90%, une spécificité de 90%, une valeur prédictive positive de 90% et une valeur prédictive négative de 90%. Bien que les spécificités des autres paires d'amorces soient plus élevées, la sensibilité de la paire IL-13 (3) est meilleure et sa valeur prédictive négative est donc plus élevée. Nous la sélectionnons comme paire d'amorces de choix pour les tests futurs.

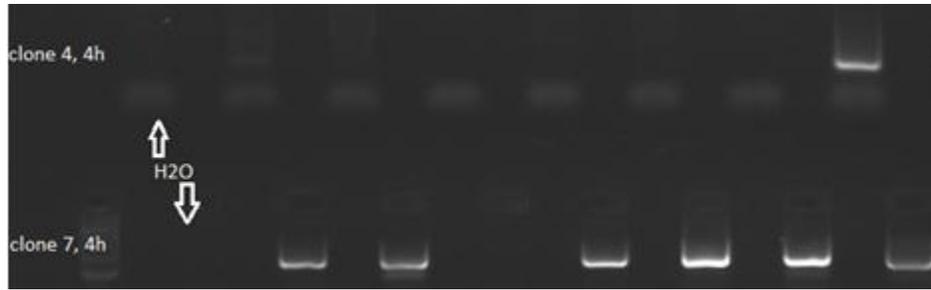


Figure 16: photo des produits PCR obtenus avec la paire d'amorce IL-13 (3)
Sur cette image, seulement 7 des 10 aliquotes sont présentés.

IL-2

Les amorces d'IL-2 ont déjà été sélectionnées lors de l'optimisation du protocole « single cell » pour les cellules T CD8+. Nous testons, donc, deux paires d'amorces sélectionnées sur les cellules T CD4+.

Tableau 5: résultats de la PCR des amorces d'IL-2 (2, et lab) sur le clone 6 stimulés pendant 4h et le clone 6 non stimulé

Amorces	Contrôle – clone 6 non stimulé	Contrôle + clone 6 stimulé
IL-2 (2)	Red bands	Green bands
IL-2 (lab)	Red bands	Green bands

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
IL-2 (2)	85.71%	100.00%	100.00%	87.5%
IL-2 (lab)	57.14%	100.00%	100.00%	70.00%

La paire d'amorces IL-2 (2) (entourée en jaune) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 85.71%, une spécificité de 100%. Elle a donc une valeur prédictive positive de 87.5% et une valeur prédictive négative de 100%. Cette paire d'amorces est donc retenue.

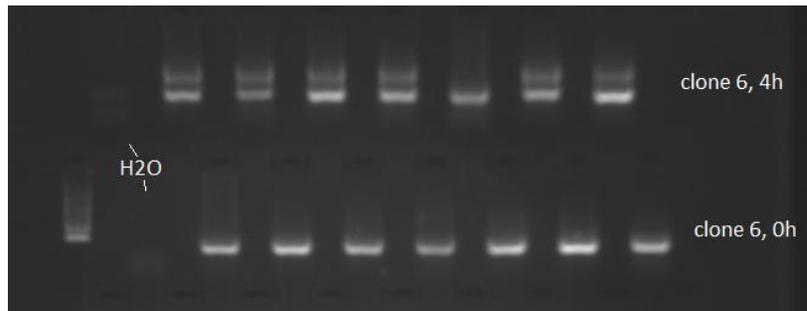


Figure 17: photo des produits PCR obtenus avec la paire d'amorces IL-2 (2)

TNF α

Les amorces TNF α ont déjà été testées lors de l'optimisation du protocole « single cell » pour les cellules T CD8+. Nous testons, donc, la paire d'amorces sélectionnée sur les cellules T CD4+.

Tableau 6: test de l'amorce TNF α sur le clone 4 stimulé et les cellules naïves.

Amorces	Contrôle – cellules naïves						Contrôle + clone 4 stimulé 4h					
TNF α	[Red]						[Green]					

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
TNFα	71.43%	100.00%	100.00%	77.78%

Avec aucun faux positif et deux faux négatifs, nous obtenons une sensibilité de 71.43%, une spécificité de 100%, une valeur prédictive positive de 77.78% et une valeur prédictive négative de 100%. La paire d'amorces sélectionnée lors du protocole pour les cellules T CD8+ peut aussi bien être utilisée pour le test des cellules T CD4+.



Figure 18: photo des produits PCR obtenus avec la paire d'amorces TNF α

Récepteurs aux chimiokines

CRTh2

Tableau 7: résultats de la PCR des amorces de CRTh2 (1, 2 et 3) sur les clones 4 et 7 non stimulés

Amorces	Contrôle – clone 4 non-stimulé						Contrôle + clone 7 non-stimulé					
CRTh2 (1)	[Red]						[Green]					
CRTh2 (2)	[Red]						[Red]					
CRTh2 (3)	[Red]						[Red]					

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
CRTh2 (1)	70.00%	100.00%	100.00%	76.92%
CRTh2 (2)	50.00%	100.00%	100.00%	66.67%
CRTh2 (3)	30.00%	100.00%	100.00%	58.82%

La paire d'amorces CRTh2(1) (entourée en jaune) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 70%, une spécificité de 100%, une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 76.92%. Elle sera retenue pour les recherches futures.

Tableau 9: résultats de la PCR des amorces de CCR6 (5) sur les clones 4 et 7 stimulés pendant 4h

Amorce	Contrôle – clone 7 non stimulé	Contrôle + clone 11 non stimulé
CCR6 (5)		

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
CCR6 (5)	70.00%	81.82%	77.78%	75.00%

La paire d'amorces CCR6 (5) (entourée en jaune) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 70%, une spécificité de 81.82%, une valeur prédictive positive de 77.78% et une valeur prédictive négative de 75%. Nous gardons cette paire d'amorces pour les tests futurs.

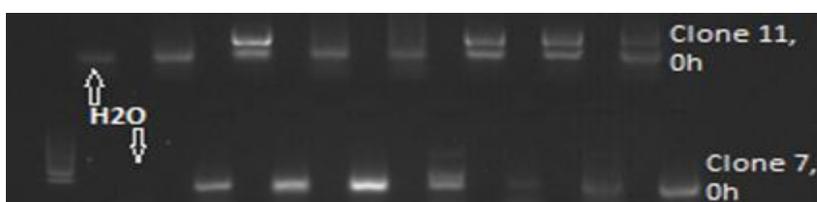


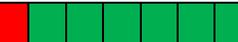
Figure 21: photo des produits PCR obtenus avec la paire d'amorces CCR6 (5). Sur cette image, seulement 7 des 10 aliquotes sont présentés.

Facteurs de transcription

GATA3

La paire d'amorce GATA3 (3) a donné de très bons résultats sur des aliquotes issus de dix cellules. Nous la sélectionnons pour nos tests sur les cellules individuelles.

Tableau 10: résultats de la PCR de l'amorce GATA3 (3) sur les cellules naïves et le clone 7 stimulé 4h

Amorces	Contrôle – cellules naïves	Contrôle + clone 7 stim 4h
GATA3 (3)		

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négatives
GATA3 (3)	85.71%	100.00%	100.00%	87.50%

La paire d'amorces GATA3 (3) (entourée en jaune) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 85.71%, une spécificité de 100%, une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 87.50%. Nous gardons cette paire d'amorces pour les tests futurs.

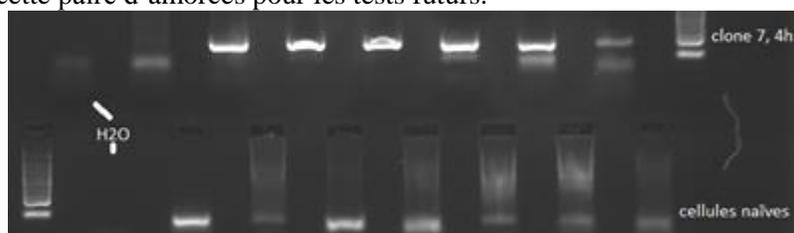


Figure 22: photo du produit PCR obtenu avec la paire d'amorces GATA3 (3)

RORC

Les paires d'amorce RORC (7) et (10) ont donné de très bons résultats sur des aliquotes issus de dix cellules. Nous les testons sur les cellules individuelles.

Tableau 11: résultats de la PCR des amorces de RORC (7 et 10) sur les clones 11 et 4 non stimulés

Amorces	Contrôle – clone 7 non stim	Contrôle + clone 11 non stim
RORC (7) short		
RORC (10) long		

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négatives
RORC (7) short	71.43%	57.14%	44.44%	60.00%
RORC (10) long	71.43%	100%	100%	77.78%

La paire d'amorces RORC (10) long (entourée en jaune) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 71.43%, une spécificité de 100%, une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 77.78%. Nous gardons cette paire d'amorces pour les tests futurs.

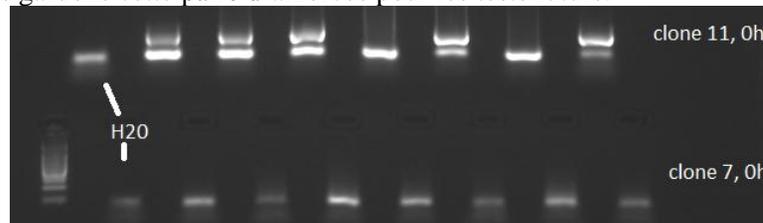


Figure 23: photo des produits PCR obtenus avec la paire d'amorces RORC (10) long

FOXP3

Dans les tests effectués sur des échantillons issus de cinq cellules, la paire d'amorces FOXP3 (2) donne des résultats nettement meilleurs que les autres paires d'amorces. Nous décidons, donc de tester cette paire d'amorces sur des aliquotes d'une cellule.

Tableau 12: résultats de la PCR de l'amorce FOXP3 (2) sur les clones 4 et 11 non stimulés

Amorces	Contrôle – clone 11 non stim	Contrôle + clone 4 non stim
FOXP3 (2)		

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négatives
FOXP3(2)	85.71%	85.71%	85.71%	85.71%

La paire d'amorces FOXP3 (2) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 85.71%, une spécificité de 85.71%, une valeur prédictive positive de 85.71% et une valeur prédictive négative de 85.71%. Nous gardons cette paire d'amorces pour les tests futurs.

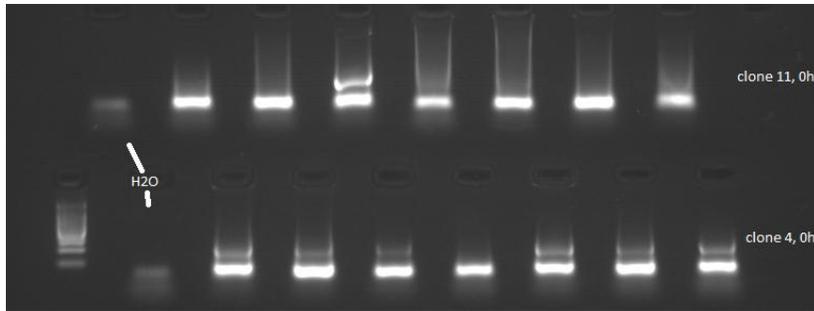


Figure 24: photo du produit PCR obtenu avec la paire d'amorces FOXP3 (2)

Marqueurs d'activation

CD25 ou IL-2Ra

Tableau 13: résultats de la PCR des amorces d'IL-2Ra (1, 2, 3) sur le clone 4 stimulé et les cellules naïves.

Amorces	Contrôle – cellules naïves	Contrôle + clone 4 stim 4h
IL-2RA (1)	Red Green Red Green Red Green Red Green	Red Green Red Green Red Green Red Green
IL-2RA (2)	Red Red Red Red Red Red Red Red	Red Red Red Red Green Red Green Red
IL-2RA (3)	Red Red Red Green Red Red Red Green	Red Red Red Green Red Red Red Green

Amorces	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
IL-2RA (1)	71.43%	71.43%	71.43%	71.43%
IL-2RA (2)	50%	100%	100%	63.64%
IL-2RA (3)	85.71%	71.43%	75%	83.33%

La paire d'amorces IL-2RA (3) (entourée en jaune) donne de bons résultats. Nous observons une sensibilité de 85.71%, une spécificité de 71.43%, une valeur prédictive positive de 75% et une valeur prédictive négative de 83.33%. Bien que la paire d'amorces IL-2RA (2) ait une meilleure spécificité, nous remarquons que sa sensibilité n'est pas suffisante. C'est pourquoi nous gardons la paire d'amorces IL-2RA (3) pour les tests futurs.



Figure 25: photo du produit PCR obtenu avec la paire d'amorces IL-2RA (3)

Certains facteurs testés dont les résultats n'étaient pas assez bons, ne sont pas présentés dans ce travail. Il s'agit d'ICOS, CTLA4, IFN γ , IL-10 et IL-17. Pour ces facteurs, de nouvelles amorces sont en cours de commande et des clones plus adaptés doivent encore être testés afin de sélectionner des amorces adaptées.

Discussion et conclusion

Durant ce travail nous avons généré de l'ADNc de cellules T individuelles et sélectionné douze paires d'amorces pour l'identification des sous-types de cellules T CD4+ par la technique d'analyse PCR « single cell ». Ces amorces peuvent être utilisées dans le futur en combinaison avec des cellules spécifiques triées par marquage des multimères pMHCII. Cette méthode permettra de comprendre le rôle ainsi que l'amplitude et la diversité fonctionnelle de la réponse de la cellule T CD4+ antigène-spécifique dans les cancers et dans d'autres maladies. Cela afin d'affiner les recherches en immunothérapie oncologique. (8)

Lors de l'utilisation des amorces sélectionnées pour la caractérisation de cellules T CD4, il faudra, en outre, tenir compte de l'apparence des photos UV obtenues dans ce rapport. En effet, certaines amorces se lient à d'autres séquences ADN, produisant des bandes différentes. Cela peut rendre l'interprétation des résultats difficiles, surtout lorsque ces bandes « parasites » se forment lors des contrôles négatifs mimant ainsi des résultats positifs. C'est le cas pour une partie des amorces retenues dans ce travail : Il-5 (2), Il-2 (2), CCR6 (5), GATA3 (3), FOXP3 (2) et RORC (10).

Quand on compare les résultats obtenus par cytométrie de flux et par PCR, il ne faut pas oublier que la technique « single cells » met en évidence l'expression d'ARNm (sous la forme ADNc) et non pas l'expression protéique en soi. Des différences peuvent exister entre les résultats de ces deux méthodes. En effet la proportion de cellules positives pour certains facteurs lors du test de caractérisation par cytométrie de flux (Figure 6) peut différer de la proportion de cellules positives lors du test par PCR. Ces différences sont dues au fait que l'ARNm peut être détruit ou modifié avant la synthèse de protéines. De plus, la cytométrie de caractérisation des clones (Figure 6) n'est pas faite le même jour que le tri des cellules pour l'analyse par PCR. Entre temps, les cellules sont stockées dans l'azote liquide et leur expression protéique peut fluctuer (27).

Nous avons retenu les amorces avec les meilleurs résultats pour les expériences futures. Il faudra toutefois tenir compte des valeurs prédictives positives et négatives des tests afin de pouvoir apprécier les limites de chaque paire d'amorces. Cependant, relativement peu d'aliquotes ont été testées durant cette étude (7 à 10 contrôles positifs et 7 à 10 contrôles négatifs). Afin de garantir une meilleure précision des valeurs prédictives des différentes paires d'amorces, des analyses sur un plus grand nombre d'aliquotes pourraient être faites.

Pour permettre l'analyse PCR rapide d'un grand nombre de cellules au niveau individuel, d'autre laboratoire de recherche ont mis en place une nouvelle technique, le « nucleotide barcoding ». Le barcode est une séquence de deoxyribonucléotides dans un ordre aléatoire qui permet de marquer l'ADNc d'une cellule. Chaque barcode est différent et permet donc de différencier l'ADNc marqué. Après marquage par barcoding, les aliquotes d'ADNc issus de cellules individuelles sont regroupés. Après PCR, un système bioinformatique met en évidence l'expression des différentes cellules grâce au barcoding. Cette méthode permet d'effectuer qu'une seule PCR par facteurs testés, mais d'avoir un résultat à niveau unicellulaire. L'analyse PCR est, donc, plus rapide et peut être faite sur un plus grand nombre d'aliquotes. (28). Cette méthode pourrait être utilisée afin de tester un plus grand nombre d'aliquotes et ainsi d'augmenter la fiabilité de nos résultats.

La technique « single cell » optimisée dans ce travail, sera utilisée pour comprendre le rôle des cellules CD4+ en immunothérapie oncologique du mélanome métastatique humain. Toutefois d'autres applications de la technique « single cell », ont déjà été explorées. En effet, plusieurs études scientifiques utilisent l'analyse PCR au niveau unicellulaire pour l'étude de la réponse des cellules T CD4+. Nous la retrouvons dans l'étude des maladies auto-immunes comme la maladie cœliaque (29) ou le diabète auto-immun (30) ; mais encore dans l'étude du rôle des CD4+ dans les cancers comme le carcinome colorectal humain (9). Cette méthode est utilisée dans l'étude du rôle et de l'expression des cellules Treg (31), dans l'analyse de l'expression génétique des CD4+ selon leur localisation (32), leur polarisation (33) et leur stimulation (34) ainsi que la compréhension du signal intracellulaire dans la réponse des CD4+ (35).

Plusieurs de ces études utilisent la PCR quantitative (« real time PCR »). À partir de la technique optimisée dans ce travail, la PCR quantitative à niveau unicellulaire pourrait encore être développée. Contrairement à notre PCR qualitative, la PCR quantitative permettrait de connaître précisément la quantité d'expression des gènes testés en nous indiquant la quantité relative du signal par rapport aux gènes contrôle. En effet la quantité de facteur exprimé par une cellule signe sa nature. Un développement dans cette direction nous permettrait d'affiner nos recherches.

Par ailleurs, des systèmes d'analyse PCR au niveau individuel ont été commercialisés, comme le *Fluidigm* qui offre un système de tri automatisé. Après coloration des cellules, le « *CI system* » sépare les cellules (de 5-25µm) une par une dans 96 puits, grâce à la technique microfluidic IFCs. Contrairement à la méthode « standard » utilisée dans notre travail, le *Fluidigm* permet un contrôle direct des échantillons de cellule avant la lyse. En effet, le liquide utilisé dans cette étape est transparent ce qui permet l'observation directe des cellules au microscope. En plus du tri des cellules, *Fluidigm* offre un système automatisé de synthèse d'ADNc qui effectue 10 à 14 cycles par rapport à 40 cycles faits pendant les PCR de notre travail. Avec notre méthode, après 40 cycles de PCR pour générer l'ADNc, même les gènes faiblement exprimés sont mis en évidence. Tandis qu'après 14 cycles, il y a d'un côté le risque de négliger certains gènes faiblement exprimés, mais d'un autre côté cela permet d'être un peu plus quantitatifs. Avec la méthode *Fluidigm*, il est difficile de tester beaucoup de cellules et son rapport prix/quantité est relativement élevé.

L'analyse de l'expression génétique des cellules au niveau individuel, se développe de plus en plus. Ceci est expliqué, d'une part, par le manque de précision d'une analyse de population hétérogène de cellules et d'autre part, par la nécessité d'étude de cellules rares pour lesquelles l'analyse ne peut se faire que sur un petit nombre de cellules.

Récemment, la technique de l'analyse PCR sur des échantillons issus de cellules uniques s'étend au séquençage de l'entier du transcriptome. Cette nouvelle technique d'analyse PCR de l'entier de l'ARN est utilisée depuis longtemps sur des populations de cellules. Une analyse au niveau de la cellule individuelle écarterait les biais causés par l'hétérogénéité des cellules dans les populations (36).

Cette technique fraîchement explorée, pourrait être développée pour l'analyse du transcriptome des lymphocytes. Etant petites, ces cellules ne comportent que peu d'ARN. Ceci rend l'analyse de l'entier du transcriptome compliquée. De plus, les lymphocytes naïfs ont une faible activité et ne produisent pas beaucoup d'ARN. Un début dans l'analyse du transcriptome des lymphocytes effecteurs stimulés à niveau unicellulaire serait par conséquent plus approprié. Une telle analyse permettrait de connaître l'entier de l'expression génétique des lymphocytes. Cette perspective favoriserait la compréhension du rôle des cellules CD4+ dans les maladies comme le cancer et avancerait la recherche en immunothérapie oncologique.

Tableau 14: récapitulatif des amorces sélectionnées

	Amorce	Allé	Retour	Longueur du produit PCR
Cytokines	IL-4 (3)	TGCTCCGGCAGTTCTACAG	CGAGCCGTTTCAGGAATCG	107bp
	IL-5 (2)	GCCAATGAGACTCTGAGGATTC	CTTTGGCTGCAACAAACC	297bp
	IL-13 (3)	CAGCTCAGGCACACTTCTTC	CCTGGTGTCCACTGCTTTAG	158bp
	IL-2 (2)	GTCACAAACAGTGCACCTAC	CCTCCAGAGGTTTGAGTTCTTC	214bp
	TNFα	CTGCCTTGGCTCAGACATGTT	CAGTTGGTCACCAAATCAGCA	154bp

Récepteurs aux chimiokines	CRTh2 (1)	AGAGCCACCCTGTGTTGAC	GGCACCGGCAAATACAGAC	<i>178bp</i>
	CCR7 (3)	GACAGGGCTGATAAGCTAACAC	TCACCAAGCCAAGAAGTCTC	<i>277bp</i>
	CCR6 (5)	TTTCTCGGCAGACCAGTGAGAC	CACAGCCCATGAGCACGTTAAG	<i>212bp</i>
Facteurs de transcription	GATA3 (3)	TGTGGGCTCTACTACAAG	GGGTAAACGAGCTGTTC	<i>158bp</i>
	RORC (10)	TATCCTTGAGGCCACAGCTTG	TGATCTTGCCTCCGACTGAC	<i>212bp</i>
	FOXP3 (2)	CCAGCCATGATCAGCCTCAC	CCGAAAGGGTGCTGTCCTTC	<i>211bp</i>
Marqueurs d'activation	IL2RA (3)	CTGGATGTGGTGGCATAAC	GGTGCCATCATGACTGAC	<i>105bp</i>

Bibliographie

1. Brichard VG, Lejeune D. GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: pilot results leading to Phase III clinical development. *Vaccine*. 27 sept 2007;25 Suppl 2:B61-71.
2. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 23 juill 2010;363(5):411-22.
3. Kenter GG, Welters MJP, Valentijn ARPM, Lowik MJG, Berends-van der Meer DMA, Vloon APG, et al. Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *N Engl J Med*. 5 nov 2009;361(19):1838-47.
4. Michielin O. Base moléculaires de l'immunologie et de l'Immunothérapie du cancer. Polycopié présenté à: Oncologie médicale; 2013; Lausanne, CHUV.
5. Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. févr 2010;21(1):3-10.
6. Jandus C, Bioley G, Dojcinovic D, Derré L, Baitsch L, Wieckowski S, et al. Tumor antigen-specific FOXP3+ CD4 T cells identified in human metastatic melanoma: peptide vaccination results in selective expansion of Th1-like counterparts. *Cancer Res*. 15 oct 2009;69(20):8085-93.
7. Rufer N, Reichenbach P, Romero P. Methods for the Ex Vivo Characterization of Human CD8+T Subsets Based on Gene Expression and Replicative History Analysis. In: Ludewig B, Hoffmann MW, éditeurs. *Adoptive Immunotherapy: Methods and Protocols* [Internet]. Humana Press; 2005 [cité 2 déc 2014]. p. 265-83. Disponible sur: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-862-5%3A265>
8. Corti D, Sallusto F, Lanzavecchia A. High throughput cellular screens to interrogate the human T and B cell repertoires. *Curr Opin Immunol*. juin 2011;23(3):430-5.
9. Han A, Glanville J, Hansmann L, Davis MM. Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level. *Nat Biotechnol*. 1 juill 2014;32(7):684-92.
10. Décès: nombre, évolution et causes [Internet]. 2014 [cité 2 déc 2014]. Disponible sur: <http://www.bfs.admin.ch/bfs/portal/fr/index/themen/14/02/04/key/01.html>
11. Misset J-L. [History of medical oncology]. *Bull Cancer (Paris)*. mai 2013;100(5):403-6.
12. Leyvraz S. Principes des traitements systémiques. Polycopié présenté à: Oncologie médicale; 2013; Lausanne, CHUV.
13. Speiser DE, Romero P. Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity. *Semin Immunol*. juin 2010;22(3):144-54.
14. Braun M, Jandus C, Maurer P, Hammann-Haenni A, Schwarz K, Bachmann MF, et al. Virus-like particles induce robust human T-helper cell responses. *Eur J Immunol*. févr 2012;42(2):330-40.
15. Speiser DE, Liénard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest*. 1 mars 2005;115(3):739-46.
16. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*. 11 avr 2003;300(5617):337-9.
17. Yamane H, Paul WE. Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cell Mol Life Sci CMLS*. mai 2012;69(10):1577-83.
18. eBioscience. Cytokine Atlas! [Internet]. FSG; 2012 [cité 2 déc 2014]. Disponible sur: <http://info.ebioscience.com/cytokine-atlas-request/>

19. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, et al. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci*. 29 oct 2013;110(44):17945-50.
20. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 4 août 2009;16(2):91-102.
21. Wilke CM, Kryczek I, Wei S, Zhao E, Wu K, Wang G, et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis*. mai 2011;32(5):643-9.
22. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. août 2009;39(8):2076-82.
23. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med*. 15 janv 2001;193(2):255-61.
24. DeFranco AL, Robertson M, Locksley RM. Immunité: La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. *De Boeck Supérieur*; 2009. 402 p.
25. Entschladen F, Zänker KS. *Cell Migration: Signalling and Mechanisms*. Karger Medical and Scientific Publishers; 2010. 185 p.
26. Kurebayashi S, Ueda E, Sakaue M, Patel DD, Medvedev A, Zhang F, et al. Retinoid-related orphan receptor γ (ROR γ) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 août 2000;97(18):10132-7.
27. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*. juin 2012;24(3):297-302.
28. McCloskey ML, Stöger R, Hansen RS, Laird CD. Encoding PCR products with batch-stamps and barcodes. *Biochem Genet*. déc 2007;45(11-12):761-7.
29. Han A, Newell EW, Glanville J, Fernandez-Becker N, Khosla C, Chien Y, et al. Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 août 2013;110(32):13073-8.
30. Baker FJ, Lee M, Chien Y, Davis MM. Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci*. 7 sept 2002;99(14):9374-9.
31. Dong S, Maiella S, Xhaard A, Pang Y, Wenandy L, Larghero J, et al. Multiparameter single-cell profiling of human CD4+FOXP3+ regulatory T-cell populations in homeostatic conditions and during graft-versus-host disease. *Blood*. 5 sept 2013;122(10):1802-12.
32. Roers A, Hansmann ML, Rajewsky K, Küppers R. Single-Cell PCR Analysis of T Helper Cells in Human Lymph Node Germinal Centers. *Am J Pathol*. mars 2000;156(3):1067-71.
33. Kelso A, Groves P, Ramm L, Doyle AG. Single-cell analysis by RT-PCR reveals differential expression of multiple type 1 and 2 cytokine genes among cells within polarized CD4+ T cell populations. *Int Immunol*. avr 1999;11(4):617-21.
34. Putheti P, Awasthi A, Popoola J, Gao W, Strom TB. Human CD4+ Memory T Cells Can Become CD4+IL-9+ T Cells. *PLoS ONE*. 14 janv 2010;5(1):e8706.
35. Itoh Y, Germain RN. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J Exp Med*. 29 août 1997;186(5):757-66.
36. Wu AR, Neff NF, Kalisky T, Dalerba P, Treutlein B, Rothenberg ME, et al. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods*. janv 2014;11(1):41-6.