NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 23/06/2025 par

Luc DAVID--BROGLIO

Tests fonctionnels diagnostiques pour l'immunologie basés sur la micro-impression d'anticorps

Discipline
Physique et sciences de la matière

Spécialité
Biophysique

École doctorale
ED352- Physique et sciences de la matière

Laboratoire/Partenaires de recherche
Laboratoire Adhésion & inflammation
Région Sud

Composition du jury

Charlotte Rivière Maitresse de conférences ILM, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteure
Sylvain Gabriele Associate Professor Université de Mons	Rapporteur
Régis Costello Professeur des universités praticien hospitalier Aix Marseille Université	Président du jury
Vincent Studer Directeur de recherche IINS, Université de Bordeaux	Examinateur
Olivier Théodoly Directeur de recherche LAI, Aix Marseille Université	Directeur de thèse
Philippe Robert Maître de conférences praticien hospitalier LAI, Aix Marseille Université	Co-directeur de thèse
Sophie Asnacios Maitresse de conférences MSC, Sorbonne Université	Invitée

A ma Bamba qui nous
a tristement quitté.

Affidavit

Je soussigné, DAVID—BROGLIO Luc, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de THEODOLY Olivier et ROBERT Philippe, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 28/04/2025



Liste de publication et participations aux conférences

Liste des publications

- Garcia-Seyda N, Song S, Seveau de Noray V, David-Broglio L, Matti C, Artinger M, Dupuy F, Biarnes-Pelicot M, Valignat MP, Legler DF, Bajénoff M, Theodoly O. Naive T lymphocytes chemotax long distance to CCL21 but not to a source of bioactive S1P. iScience. 2023 Aug 19;26(10):107695. doi: 10.1016/j.isci.2023.107695. PMID: 37822497; PMCID: PMC10562802. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10562802/
- En préparation : L David-Broglio, G Delhaye, Y Zhou, V Seveau M Pelicot, C Gastinel,, I Manasalva Pena, B Pouvelle, C Lemarié, C Demerle, C Chabannon, B Malissen, J Celis Gutierez, MP Valignat, R Costello, P Paul, P Rihet, P Robert, O Theodoly. Multiple micropatterned chips offer a time-resolved view of functional immune responses at the single-cell level for medical routine applications

Participation aux conférences

- ImmunoBiophysics 2023 https://meetings.embo.org/event/23-immunobiophysics
- Cell Mech 2023 https://cellmech2023.inviteo.fr/

Résumé

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la réponse immunitaire, ce qui en fait un des types cellulaires les plus étudiés par les médecins pour le diagnostic et la prise en charge de maladies telles que le cancer ou les immunodéficiences. L'étude de leurs fonctions est particulièrement précieuse car elle permet d'évaluer directement les capacités fonctionnelles des cellules, indépendamment des influences génétiques ou environnementales. Toutefois, les tests fonctionnels actuellement utilisés par les cliniciens sont souvent longs et coûteux, ce qui limite leur application en routine hospitalière. Ce projet vise à développer des tests d'activation des cellules immunitaires adaptés à l'hôpital, c'est à dire requérant peu de manipulations et d'équipements pour l'analyse. Notre approche repose sur la conception de micropuces dotées de micro-motifs imprimés, spécialement élaborés pour accueillir des cellules individuelles. Ces micro-motifs comportent plusieurs zones, chacune imprimée avec des anticorps spécifiques et dotée de fonctions distinctes vis-à-vis des cellules ciblées. Grâce à cette configuration, nos micropuces permettent de réaliser des tests multifonctionnels en analysant uniquement l'adhésion des cellules. Dans le cadre de cette thèse, nous avons mis au point des micropuces capables de capturer, d'activer et de révéler l'activation de lymphocytes T mémoire primaires humains. La fabrication des micropuces utilise la technique LIMAP (Light-Induced Molecular Adsorption of Proteins), qui combine un microscope optique avec un dispositif de micromiroirs numériques (DMD, digital mirror device). Nous avons optimisé les conditions et les temps de production pour des micropuces à trois zones. La capture et l'identification sont assurées par une zone d'anticorps anti-CD45RO, le signal d'activation par une zone imprimée mixte d'anticorps anti-CD3/anti-CD28, et la mesure de l'activation par une zone d'anticorps anti-CD69. La performance de nos micropuces a été évaluée au moyen d'expériences de dose-réponse avec un inhibiteur de l'activation des cellules T, la ciclosporine, en utilisant des mesures classiques de cytométrie comme référence. Les résultats démontrent que nos micropuces peuvent discriminer efficacement les cellules inhibées par des doses thérapeutiques de l'inhibiteur testé. Ce travail présente une preuve de concept pour des tests biomédicaux innovants sur micropuces multi-imprimées, permettant d'obtenir des informations fonctionnelles multiplexées et cinétiques sur des cellules individuelles. La même approche, appliquée avec d'autres anticorps imprimés, ouvre la voie à la conception de dispositifs adaptés à différents types cellulaires, avec de nombreuses applications potentielles : diagnostic de pathologies aiguës et chroniques, suivi personnalisé des patients et criblage pharmacologique in vitro.

Abstract

T lymphocytes play a central role in the immune response, making them one of the most studied cell types by clinicians for diagnosing and managing diseases such as cancer and immunodeficiencies. Studying their functions is especially valuable because it allows for the direct assessment of the cells' functional capacities, independent of genetic or environmental influences. However, functional tests currently used by clinicians are often lengthy and expensive, which limits their application in routine hospital settings. This project aims to develop rapid activation tests for immune cells that require minimal manipulation and equipment for analysis. Our approach is based on designing microchips with printed micro-patterns specifically created to host individual cells. These micro-patterns contain multiple zones, each printed with specific antibodies, with each zone serving distinct functions in relation to the targeted cells. With this configuration, our microchips enable multifunctional testing by analyzing only the cell adhesion. As part of this research, we have developed microchips capable of capturing, activating, and revealing the activation of primary human memory T lymphocytes. The fabrication of these microchips uses the LIMAP technique (Light-Induced Molecular Adsorption of Proteins), which combines an optical microscope with a digital mirror device (DMD). We optimized the conditions and production times for three-zone microchips. Capture and identification are carried out by an anti-CD45RO antibody zone, activation signalling by a mixed anti-CD3/anti-CD28 antibody zone, and activation measurement by an anti-CD69 antibody zone. The performance of our microchips was evaluated through dose-response experiments with an inhibitor of T cell activation, cyclosporine, using conventional flow cytometry measurements as a reference. Results demonstrate that our microchips can effectively discriminate cells inhibited by therapeutic doses of the tested inhibitor. This work provides a proof of concept for innovative biomedical tests on multi-printed microchips, allowing multiplexed functional and kinetic information to be obtained from individual cells. The same approach, applied with other printed antibodies, paves the way for the design of devices adapted to different cell types, with numerous potential applications: diagnosis of acute and chronic pathologies, personalized patient monitoring, and in vitro pharmacological screening.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants, Olivier et Philippe, pour m'avoir offert la chance de pouvoir réaliser un doctorat. Leur prévenance et leur gentillesse ont été d'un grand soutien tout au long de ces trois années.

Je voulais ensuite remercier Martine pour son dévouement et sa disponibilité pour réaliser toutes les analyses de cytométrie en flux, et Valentine pour son implication à réaliser les programmes d'analyses, même durant ses vacances.

Je remercie très chaleureusement tous ceux qui ont fait de ces trois années des années très riches sur le plan humain, merci à vous Rémy, Lama, Fabio, Hakim, Jana, Loriane, Valentine, Pierre-Henri, Lisa, Adrien, Pierre, Ahmad, Lorna, Chandrasekar, Marc, Dalia, Florian, Stéphanie, Thi Tien et Sophie.

Un merci particulier à Rémy, qui n'a jamais compté son temps pour m'aider à l'écriture des programmes en python, et à Pierre-Henri pour son implication dans mon avenir professionnel et mon bien-être.

Merci à mes parents qui m'ont permis de réaliser de longues études et ont su me transmettre le goût de la science, de l'observation et de l'implication dans le travail. Merci à mes amis de longue date, Manon, Hugo, Théo, Alexis, Jérémie, Anaïs, Mattéo, Ludovic et Louis, qui ont toujours été présents pour me soutenir. Enfin, merci à Ewa, ma compagne, ma moitié, qui a su me supporter et m'épauler durant toutes ces années.

Table des matières

Liste de publication et participations aux conférences 4
Résumé 5
Abstract 6
Remerciements 7
Table des matières 9
1. Introduction 16
1.1. Le système immunitaire 16
1.1.1. Immunité Innée 17
1.1.2. L'inflammation 21
1.1.3. Immunité Adaptative 21
1.1.4. Récepteurs immunitaires 25
1.1.5. Mémoire immunitaire 27
1.2. Activation des lymphocytes T 29
1.2.1. Interactions cellulaires 29
1.2.2. Mécanismes moléculaires de la signalisation du TCR 31
1.2.3. Trafic cellulaire des Lymphocytes T 32
1.2.4. Activation des Lymphocytes T mémoire 33
1.2.5. Régulation et tolérance Immunitaire 33
1.2.6. Phénotype des Lymphocytes T 34
1.2.7. Stratégies thérapeutiques ciblant les lymphocytes T 35
1.3. Tests fonctionnels des cellules immunitaires 37
1.3.1. Tests de la fonction de prolifération des Lymphocytes T (TPL) ou Test de Transformation lymphoblastique (TTL) 38
1.3.2. Tests de fonctionnalité de récepteur 41
1.3.3. Tests de la fonction cytotoxique 43
1.3.4. Tests fonctionnels par mesure de métabolites 43
1.3.5. Tests de la fonction de sécrétion de cytokines 43
1.3.6. Tests de la fonction d'adhésion 45
1.3.7. Tests fonctionnels par expression de marqueurs 45
1.4. Microscopie optique pour la mesure de fonction cellulaire 46
1.4.1. Microscopie inversée 46
1.4.2. Microscopie à épifluorescence 47
1.4.3. Microscopie interférentielle 48

1.4.4. Microscopie TIRF 50
1.4.5. Microscopie spectrale 50
1.5. Création de micro-motifs de molécules sur des substrats 51
1.5.1. Création de micro-motifs en écriture directe 51
1.5.2. Création de micro-motifs avec des masques 53
1.5.3. Création de micro-motifs avec des tampons 53
1.5.4. Création de micro-motifs avec des systèmes micro fluidique 54
1.5.5. Adsorption de molécule induite par la lumière 55
1.5.6. Réalisation de micro-motifs protéiques 57
1.6. Projet de thèse 58
1.6.1. Motivations : 58
1.6.2. Projet : 59
2. Résultats et discussion 61
2.1. Composition des motifs d'anticorps pour les tests d'activation 62
2.2. Caractérisation des motifs imprimés d'anticorps 65
2.3. Optimisation du protocole d'adsorption des anticorps sur les substrats 66
2.4. Protocoles d'impressions multiples à haute résolution 69
2.5. Amélioration des performances de quantification de l'expression de CD69 par les lymphocytes T sur des micro-motifs à deux zones fonctionnelles 72
2.6. Développement du micro-motif à trois zones fonctionnelles 76
2.7. Test de sensibilité du micro-motif à 3 zones fonctionnelles 82
2.8. Évaluation de la performance du motif à trois zones fonctionnelles pour déterminer une expression de CD69 84
2.9. Cinétique d'adhésion des cellules T mémoire sur les zones du motif à trois zones fonctionnelles 85
2.10. Etude du phénotype des lymphocytes T mémoire activés sur une courte durée 88
3. Perspectives d'applications 89
3.1. Applicabilité du test d'activation des lymphocytes T mémoire pour un contexte clinique 89
3.2. Perspectives d'applications du test d'activation des lymphocytes T mémoire . 90
3.3. Perspectives d'applications du test d'activation des cellules CAR-T anti CD19 92
3.4. Perspectives d'applications pour le criblage thérapeutique 93
3.5. Perspectives d'applications pour le multiplexage 93
4. Conclusion 93
5. Protocoles 95

5.1. Micro-motifs 95
5.1.1. Traitement de surface du verre pour la production de substrats avec des micro-motifs de molécules imprimées 96
5.1.2. Micro-motifs à 2 zones fonctionnelles 96
5.1.3. Micro-motifs à 3 zones fonctionnelles 97
5.2. Culture cellulaire 97
5.2.1. Préparation des milieux de culture 97
5.2.2. Isolation des PBMC 98
5.2.3. Tri des Lymphocytes T mémoire 98
5.3. Cytométrie 99
5.4. Microscopie 100
5.4.1. Observation des cellules sur les micro-motifs 100
5.4.2. Observation des micro-motifs 101
5.4.3. Cinétique d'adsorption 101
5.5. Analyse 101
5.5.1. Analyse de l'adhésion 102
5.5.2. Analyse de la Fluorescence des cellules 105
5.5.3. Association des donnés d'adhésion et de fluorescence des cellules. 107
5.5.4. Analyse de la fluorescence des micro-motifs 109
6. Bibliographie 114

Liste des abréviations

α : Anti

7AAD : 7-amino-actinomycine D

ADAP : Adaptor protein

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : Alexa fluor

AFM : Atomic force microscopy

AIRE : Auto-immune regulator

APHM : Assistance publique hôpitaux de Marseille

APTS : (3-aminopropyl) triethoxysilane

ATP : Adénosine triphosphate

AUC : Area under the curve

BCR : B cell receptor

BrdU : Bromodeoxyuridine or 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA : Bovine serum albumin

CAR-T cell : Chimeric antigen receptor T cell

CBA : cytokine bead array

CD : Cluster de différenciation

CFSE : carboxylfluorescein succinimidyl ester

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomegalovirus

ConA : Concanavalin a

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

Cr51 : Chrome-51

CsA : Cyclosporine A

Csk : C-terminal Src kinase

CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4

DAMP : Damage associated molecular pattern

DICV : déficit immunitaire commun variable

DMD : Digital micromiror device

DPN : Dip-Pen nanolithography

EdU : 5-Ethynyl-2′-deoxyuridine

EFS : Etablissement français du sang

EBL : Electron Beam lithography

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT : Enzyme-linked immunospot

FcεR : Fc epsilon receptor

FDA : U.S. Food and drug administration

FIB : Focus ion beam lithography

FPR : False positive ratio

HEPES : 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanesulfonic acid

HEV : High endothelial venules

ICAM : Intercellular adhesion molecule

IFN : Interferon

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : Innate lymphoid cells

IRM : Interferential reflexion microscopy

ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

Itk : Tyrosine-protein kinase

Lag3 : Lymphocyte-activation gene 3

Lat : Linker for activation of T cells

LIMAP : Light induced molecular adsorption of proteins

LPS : Lipopolysaccharides

MDSC : myeloid derived suppressor cells

mPEG-SVA : polyéthylène glycol succinimidyl valérate

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NFκB : Nuclear factor-κ B

NK : Natural killer cell

TB : Tuberculosis

TCR : T cell receptor

TGF-β : Transforming growth factor beta

TPR : True positive ratio

PAMP : Pathogen associated molecular pattern

PBS : Phosphate buffered saline

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell

pCMH : Peptide-CMH

PD-1 : Programmed Cell Death Protein 1

PDL-1 : Programmed death-ligand 1

PDMS : Polydiméthylsiloxane

pH : Potentiel hydrogène

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIP_3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PIP_2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PLC-γ : Phospholipase C Gamma

PRR : Pattern recognition receptor

PWM : poke weed mitogen

RICM : reflection interference contrast microscopy

RPMI : Roswell park memorial institute medium

SLP-76 : Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

STAT : signal transducer and activator of transcription

SVF : Sérum de veau fœtal

T_{CM} : Central memory T cell

T_{EM} : Effector memory T cell

T_{FH} : Follicular helper T cell

TIRF : Total internal reflection fluorescence microscope

T_{REG} : Regulatory T cell

T_{RM} : Residential memory T cell

T_{SCM} : Stem cell memory T cell

T_N : Naive T cell

Th : lymphocyte T helper

UV : Ultraviolet

Zap-70 : Zeta-chain-associated protein kinase 70

1. Introduction

L'activité des cellules immunitaires, notamment des lymphocytes, peut être déterminante pour le développement ou le traitement de pathologies comme le cancer, les maladies auto-immunes, le sepsis, ou encore les greffes d'organes. Ainsi, pour le diagnostic, mesurer l'activité des cellules immunitaires peut être d'une importance capitale pour la prise en charge des patients. Cependant, les tests fonctionnels des cellules immunitaires ont aujourd'hui une place marginale dans la routine des laboratoires d'analyses médicales des hôpitaux. Leur utilisation est coûteuse pour les ressources des centres d'analyses médicales, particulièrement en ce qui concerne les ressources humaines. Ils sont donc peu utilisés malgré l'importance des informations apportées pour le traitement et le diagnostic des patients. Il est donc apparu nécessaire de développer de nouveaux outils d'évaluation des capacités fonctionnelles des cellules immunitaires qui seraient moins demandeurs en ressources.

Les cellules les plus étudiées par les tests fonctionnels hospitaliers actuels sont les lymphocytes T car ils sont un élément central de la réponse immunitaire humaine. Ainsi, ce projet de thèse vise à produire, pour des besoins hospitaliers, un test d'activation innovant des lymphocytes T humains. Ce test se base sur une technologie de micro-impression de protéines pour produire des micro-motifs multifonctionnels capables de capter, d'activer et de lire l'activation des lymphocytes T uniquement par l'adhésion cellulaire. La lecture de ce test s'effectue avec l'analyse de l'adhésion des cellules sur les micro-motifs par une méthode de microscopie interférentielle, ce qui permet de pouvoir suivre en temps réel et au niveau de la cellule unique la cinétique d'adhésion des cellules sur chaque zone des micro-motifs. Notre ambition a été de proposer un test réalisable en quelques heures, ne nécessitant que peu de formation pour le personnel et pouvant être effectué avec un microscope optique inversé classique adapté à la réalisation de microscopie interférentielle. Un tel test permettrait une utilisation plus fréquente des tests fonctionnels, ce qui représenterait un gain pour l'aide au diagnostic et pour la prise en charge des patients.

Ce manuscrit résume d'abord les connaissances fondamentales en immunologie, en microscopie optique et en création de micro-motifs protéiques sur des substrats humides, nécessaires à la bonne compréhension de ce sujet de thèse. Seront ensuite présentés les méthodes de production des substrats micro-imprimés, les résultats et les analyses de l'observation en microscopie de cellules T mémoire humaines sur les substrats micro-imprimés au cours d'expériences visant d'une part à améliorer la capacité de lecture de l'activation des micro-motifs et d'autre part à éprouver la sensibilité par une série d'expériences de doses-réponse avec un inhibiteur de l'activation T. L'observation des cellules en microscopie est complétée par des analyses en cytométrie en flux, qui est aujourd'hui la méthode de référence pour l'étude de l'expression de marqueurs membranaires.

1.1. Le système immunitaire

Le système immunitaire humain est un système de défense complexe et multi-niveaux qui protège l'organisme contre les infections bactériennes, virales ou parasitaires et contre le développement de tissus cancéreux. Il est composé de deux branches principales : l'immunité innée, la première ligne de défense, rapide mais limitée dans la variété des pathogènes détectables, et l'immunité adaptative, qui consiste à développer une réponse spécifique à un agent pathogène inconnu et à conserver une mémoire immunologique de cette rencontre pour une réponse plus rapide et plus efficace lors d'expositions futures. Les cellules du système immunitaire se développe dans les organes lymphoïdes, des tissus spécialisés qui permettent également l'articulation entre le système immunitaire innée et adaptatif. Les organes lymphoïdes primaires, la moelle osseuse et le thymus, sont les lieux de développement des cellules immunitaires qui descendent des cellules souches hématopoïétiques. Les organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate et les ganglions lymphatiques, sont les tissus ou les cellules de l'immunité adaptative sont activées par des cellules de l'immunité innée.

1.1.1. Immunité Innée

L'immunité innée regroupe les premières barrières rencontrées par un pathogène lors de l'infection d'un organisme. Elle est constituée de barrières physiques, de facteurs solubles et de cellules, qui, ensemble, limitent drastiquement l'entrée et la prolifération d'éléments exogènes, pathogènes ou non.

Plusieurs types barrières (Figure 1 adaptée de [1]) empêchent ou freinent l'entrée des pathogènes dans l'organisme :

- Barrières mécaniques : les jonctions serrées des cellules épithéliales ne permettent pas le passage de pathogènes, les flux de mucus ou de sécrétion comme les larmes permettent une évacuation des pathogènes.
- Barrières chimiques : l'acidité de l'estomac maintenue à un pH entre 1 et 3 élimine les pathogènes contenus dans les éléments ingérés. Les peptides anti-microbiens sécrétés par des cellules de certains épithéliums dégradent les membranes bactériennes.

– Microbiologique : les microbiomes normaux présents sur les différentes zones du corps humain limitent la survie des bactéries par une concurrence pour les ressources essentielles à leur survie.

<table>
<tr><th></th><th>Skin</th><th>Gut</th><th>Lungs</th><th>Eyes/nose/oral cavity</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Mechanical</td><td colspan="4">Epithelial cells joined by tight junctions</td></tr>
<tr><td>Longitudinal flow of air or fluid</td><td>Longitudinal flow of air or fluid</td><td>Movement of mucus by cilia</td><td>Tears
Nasal cilia</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Chemical</td><td rowspan="2">Fatty acids</td><td>Low pH</td><td rowspan="2">Pulmonary surfactant</td><td rowspan="2">Enzymes in tears and saliva (lysozyme)</td></tr>
<tr><td>Enzymes (pepsin)</td></tr>
<tr><td></td><td>β-defensins
Lamellar bodies
Cathelicidin</td><td>α-defensins (cryptdins)
RegIII (lecticidins)
Cathelicidin</td><td>α-defensins
Cathelicidin</td><td>Histatins
β-defensins</td></tr>
<tr><td>Microbiological</td><td colspan="4">Normal microbiota</td></tr>
</table>

Figure 1 : Barrières limitants l'entrée des pathogènes dans les tissus (adaptée de Murphy et al.).

Lors de l'entrée d'un pathogène dans le système circulatoire ou dans les tissus, des facteurs solubles tels que le complément ou les peptides antimicrobiens dégradent les pathogènes par l'altération de leur structure externe. Dans le même temps les cellules de l'immunité innée, présentes dans les tissus et le sang, détectent les pathogènes par des récepteurs intracellulaires ou membranaires, les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, Pattern Recognition Receptor) ce qui initie la phase cellulaire de l'immunité innée.

Il existe chez l'homme une grande variété de types cellulaires distincts au sein de l'immunité innée, chacun étant spécialisé dans une ou plusieurs fonctions (Figure 2 adaptée de [1]). Ces cellules sont issues des cellules souches hématopoïétiques (Figure 3 adaptée de [1]). Les macrophages et neutrophiles phagocytent et détruisent les agents pathogènes bactériens, les cellules dendritiques agissent comme sentinelles en détectant les éléments exogènes, les cellules tueuses naturelles (NK, Natural Killer) peuvent identifier et détruire les cellules infectées par des virus ou les cellules tumorales. Les éosinophiles et les mastocytes sont capables d'induire la lyse de parasites. Les cellules stromales n'appartenant pas au système immunitaire possèdent des moyens de défense qualifiés d'immunité intrinsèque, il s'agit d'un ensemble de protéines ayant la capacité de restreindre la réplication virale. Au-delà de leurs fonctions de lyse des pathogènes les cellules de l'immunité innée initient la réponse inflammatoire, un processus complexe porté par des facteurs solubles protéiques, les cytokines, et lipidiques, les prostaglandines.

Effector module	Cell types, functions, and mechanisms
Cytotoxicity	NK cells, CD8 T cells
	Elimination of virally infected and metabolically stressed cells
Intracellular immunity (Type 1)	ILC1, T_H1 cells
	Elimination of intracellular pathogens; activation of macrophages
Mucosal and barrier immunity (Type 2)	ILC2, T_H2 cells
	Elimination and expulsion of parasites; recruitment of eosinophils, basophils, and mast cells
Extracellular immunity (Type 3)	ILC3, T_H17 cells
	Elimination of extracellular bacteria and fungi; recruitment and activation of neutrophils

Figure 2 : Fonctions cellulaires partagées entre le système immunitaire inné et adaptatif (adaptée de Murphy et al).

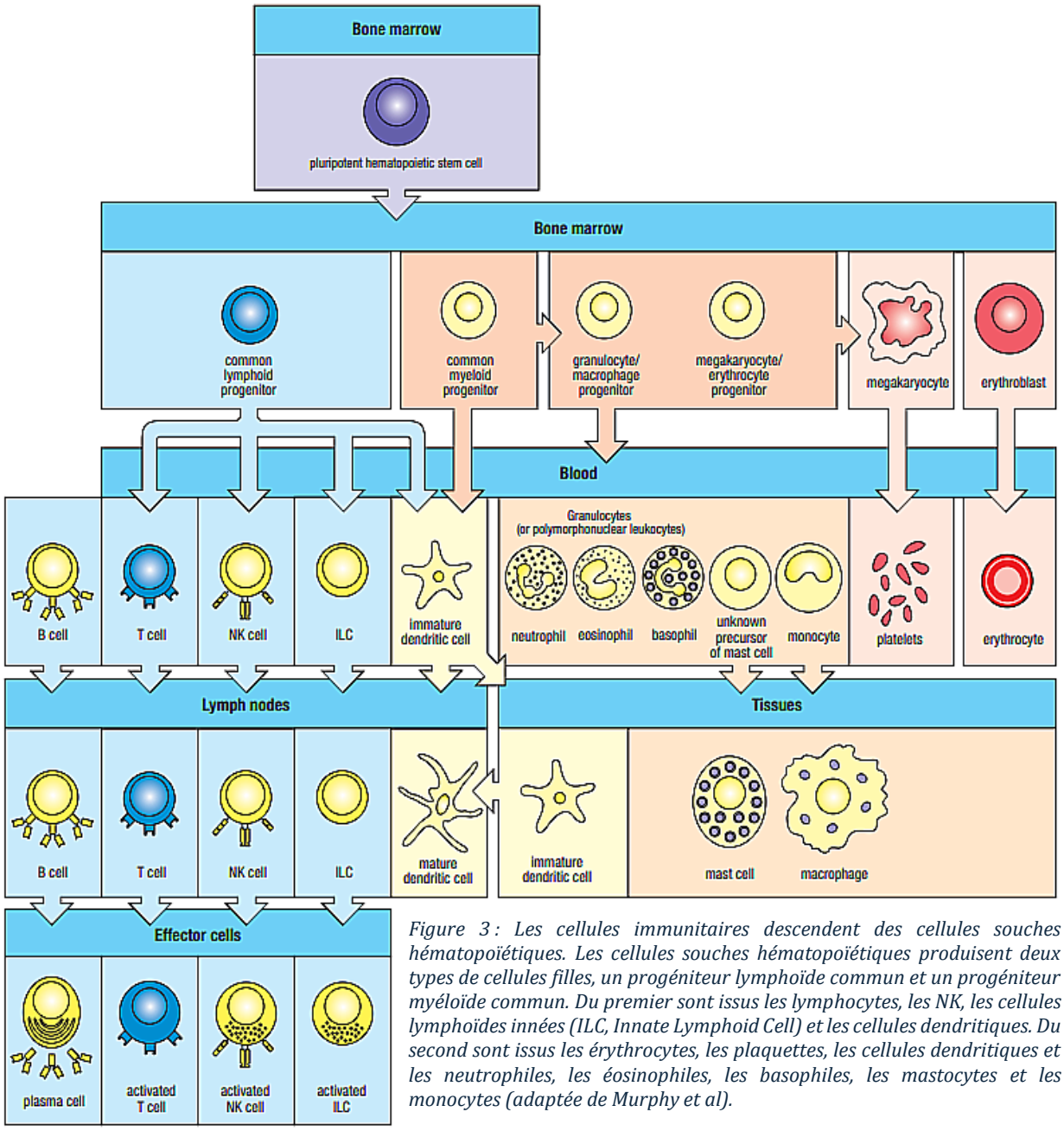


Figure 3 : Les cellules immunitaires descendent des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques produisent deux types de cellules filles, un progéniteur lymphoïde commun et un progéniteur myéloïde commun. Du premier sont issus les lymphocytes, les NK, les cellules lymphoïdes innées (ILC, Innate Lymphoid Cell) et les cellules dendritiques. Du second sont issus les érythrocytes, les plaquettes, les cellules dendritiques et les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes et les monocytes (adaptée de Murphy et al).

1.1.2. L’inflammation

Le processus inflammatoire joue un rôle central dans la prise en charge des infections et des blessures. Il se caractérise par l’initiation, en quelques minutes, d’une série de réponses immunitaires. Elles visent à attirer les cellules immunitaires effectrices vers le site de l'infection ou de la blessure afin de contrôler l'agent pathogène et de réparer les tissus endommagés. L’inflammation s’organise en plusieurs étapes :

- Induction de l’inflammation par des molécules telles que le lipopolysaccharide qui traduit une infection bactérienne ou l’adénosine triphosphate (ATP) extracellulaire qui traduit un dommage cellulaire. Ces molécules les récepteurs de type PRR, portés par les cellules immunitaires.
- La détection des molécules pro-inflammatoires par les cellules immunitaires entraîne la sécrétion par celle-ci de facteurs solubles de l’inflammation. Ces facteurs solubles, tels que C5a, l’IL1β, l’IL6, le TNFα ou l’histamine, induisent une vasodilatation causant rougeurs et douleurs, une perméabilisation des vaisseaux et une migration des cellules immunitaires du sang vers le site d’inflammation à travers les tissus. Les premières cellules immunitaires à migrer vers le site d’inflammation sont les cellules non spécifiques de l’immunité innée, neutrophiles puis monocytes, viennent ensuite les cellules de l’immunité adaptative activées dans les organes lymphoïdes secondaires car spécifiques d’un antigène présent sur le site d’inflammation.
- Résolution de la cause de l’inflammation par les cellules immunitaires et réparation des tissus.

L’inflammation est un état normalement transitoire, alors appelé inflammation aiguë, mais cet état peut persister ; on parle alors d’inflammation chronique. Des inflammations chroniques sont à l’origine de nombreuses pathologies, comme les maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (IBD, Inflammatory Bowel Disease). Des patients affaiblis par d’autres pathologies peuvent également développer un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou sepsis. Il s’agit d’une réaction brutale du system immunitaire capable d’entrainer la dysfonction d’un organe par la destruction des tissus. L’inflammation est pour autant nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire. Par exemple, pour certains organes particulièrement exposés un niveau basal d’inflammation est protecteur, comme dans le cas du tube digestif.

1.1.3. Immunité Adaptative

L'immunité adaptative permet le développement d’une immunité spécifique au pathogène rencontré. Pour cela, au contraire de l’immunité innée, l’immunité adaptative développe une très grande diversité de récepteurs pour ne conserver que les plus efficaces. Chaque nouveau lymphocyte naïf porte un récepteur antigénique unique issu d’un processus aléatoire. Ce récepteur a été sélectionné au cours du développement pour écarter une réaction contre les tissus de l’hôte. Les lymphocytes naïfs spécifiques d’un

antigène sont rares, moins de 0,01%, l'activation d'un lymphocyte par un antigène entraîne une prolifération importante multipliant par 100 le nombre de lymphocytes spécifiques. Les virus et les bactéries, sous la pression de sélection du système immunitaire ou par mutation ponctuelle, peuvent échapper aux récepteurs invariants de l'immunité innée, tandis que la diversité des récepteurs générée par les lymphocytes garantit la reconnaissance des antigènes. Du fait de la rareté des lymphocytes spécifiques, la mobilisation du système immunitaire adaptatif dure plusieurs jours, alors que le système inné est mobilisé en quelques minutes à quelques heures. Cette branche de l'immunité est aussi caractérisée par sa capacité à maintenir la mémoire des pathogènes précédemment rencontrés. Cela conduit à une réponse plus rapide et plus forte lors de rencontres ultérieures. Deux types principaux de lymphocytes constituent le système immunitaire adaptatif :

- Les lymphocytes T, qui peuvent tuer directement les cellules infectées ou aider d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes B, les macrophages ou d'autres lymphocytes T.
- Les lymphocytes B, qui produisent des anticorps capables de neutraliser les toxines et d'induire la dégradation des agents pathogènes en facilitant l'action du complément et la phagocytose.

Le rôle principal des lymphocytes B est la sécrétion d'anticorps. Ils produisent initialement des anticorps de type IgM après leur prolifération post-activation, mais ils peuvent effectuer une commutation isotypique et ainsi produire des anticorps de type IgG, IgA ou IgE. Chaque isotype présente des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles distinctes Figure 4 adaptée de [1]. Les IgG constituent l'isotype le plus représenté dans le sang. Les lymphocytes B post-activation se différencient en plasmocytes, spécialisés dans la production d'anticorps, en cellules mémoire ou en lymphocytes B de centre germinatif.

	Immunoglobulin								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Heavy chain	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ε
Molecular weight (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Serum level (mean adult mg/ml)	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10^{-5}
Half-life in serum (days)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Classical pathway of complement activation	++	+	+++	–	++++	–	–	–	–
Alternative pathway of complement activation	–	–	–	–	–	+	–	–	–
Placental transfer	+++	+	++	–/+	–	–	–	–	–
Binding to macrophage and phagocyte Fc receptors	+	–	+	–/+	–	+	+	–	+
High-affinity binding to mast cells and basophils	–	–	–	–	–	–	–	–	+++
Reactivity with staphylococcal Protein A	+	+	–/+	+	–	–	–	–	–

Figure 4 : Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des anticorps humains en fonction de leurs isotypes (adaptée de Murphy et al).

Les lymphocytes T forment un groupe hétérogène de cellules, on distingue deux grands groupes : les cellules T portant un co-récepteur CD4+ et celles portant un co-récepteur CD8. Ces co-récepteurs conditionnent la reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type 1 pour CD8 et de type 2 pour CD4+. Les CMH de type 1 présentent des antigènes principalement d'origine cytoplasmique et peuvent être aussi exprimés par les cellules stromales pour signaler leur infection par un pathogène intracellulaire. Les CMH de type 2 présentent principalement des antigènes d'origine exogène récupérés par endocytose et sont exprimés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) uniquement. Il est également possible pour les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles d'effectuer de la présentation croisée, c'est-à-dire des antigènes exogènes présentés sur CMH de type 1 et des antigènes endogènes présentés sur des CMH de type 2. Cela permet d'activer des lymphocytes CD4+ avec des antigènes endogènes et inversement pour les lymphocytes T CD8+.

La fonction essentielle des lymphocytes T CD8+ est la lyse des cellules de l'organisme qui sont infectées ou qui présentent des signes de dysfonctionnement comme les cellules cancéreuses. Toutes les cellules de l'organisme présentent à leur surface des CMH de type 1 de façon constitutive, à l'exception des hématies et des cellules des tissus immuno-protégés, comme celles des yeux. Lorsqu'une cellule présente des CMH de type 1 porteurs d'un antigène associé à un danger, une fraction de capside virale par exemple, des lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène pourront alors induire une lyse par apoptose de la cellule infectée. L'apoptose est une forme de mort cellulaire qui est dite programmée et qui n'induit pas d'inflammation.

Les lymphocytes T CD4+ ont une fonction de contrôle et d'orientation des autres cellules effectrices du système immunitaire, notamment les cellules B dont l'activation est dépendante des cellules T. Selon la polarisation du lymphocyte T adoptée lors de son activation il enverra des signaux différents pour contrôler le système immunitaire. Après leur activation, les lymphocytes T migrent vers les sites d'inflammation et sécrètent différentes cytokines en fonction de leur polarisation. Ces cytokines soutiennent et orientent l'activité des autres cellules du système immunitaire dans leurs diverses fonctions. Ces cytokines ont essentiellement une activité locale au contraire des cytokines comme l'IL6 ou l'IL1 qui ont des effets systémiques et qui sont sécrétées par des cellules de l'immunité innée.

Les lymphocytes T polarisés en lymphocytes T auxiliaires 1 (LTa1) sécrètent de l'INF-γ qui favorise l'immunité cellulaire et active les macrophages. Le rôle des LTa1 est notamment très important pour la résistance à la bactérie intracellulaire *Mycobacterium tuberculosis* qui cause la tuberculose.

Les lymphocytes T CD4+ polarisés en lymphocytes T auxiliaires 2 (LTa2) favorisent l'immunité humorale, le recrutement des cellules éosinophiles et basophiles, grâce à la sécrétion d'IL4 et d'IL5 et l'intégrité des muqueuses par leur sécrétion d'IL13. La polarisation LTa2 vise à lutter contre les vers parasites.

Les lymphocytes T CD4+ polarisés en lymphocytes T auxiliaires 17 (LTa17) sécrètent de l'IL17et de l'IL22, qui stimulent les cellules stromales et épithéliales. À travers leur sécrétion de cytokines, les LTa17 promeuvent l'immunité anti-bactéries extracellulaire, notamment au niveau des épithéliums. Pour induire la lyse des bactéries extracellulaires, les Th17 induisent une augmentation de l'activité des neutrophiles et une augmentation de la sécrétion des peptides antibactériens.

Les lymphocytes T CD4+ polarisés en lymphocytes T auxiliaires folliculaires (LTaf) participent à la production d'anticorps par leur coopération avec les lymphocytes B. Si un lymphocyte LTaf reconnaît un antigène présenté sur le CMH d'un lymphocyte B, cela active les lymphocytes B par des cytokines telles que l'IL21 et via l'interaction des récepteurs membranaires. Ces signaux induisent l'activation, la prolifération et plus tard la formation de centres germinatifs de plasmocytes et de lymphocytes B mémoire. De cette façon les LTaf participent à la lyse de la plupart des classes de pathogènes et participent aux changements d'isotype des anticorps en fonction des cytokines qu'ils produisent.

Les lymphocytes T CD4+ régulateurs peuvent être issus d'une polarisation fonctionnelle au moment de leur activation dans les organes lymphoïdes secondaires ou peuvent avoir acquis cette polarisation au cours de leur développement dans le thymus.

Leur rôle est d'inhiber l'activité des autres cellules T à travers la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL10 et à travers leur expression membranaire de récepteurs inhibiteurs.

1.1.4. Récepteurs immunitaires

Le système immunitaire inné, tout comme adaptatif, dispose de récepteurs capables de reconnaître des motifs moléculaires associés à un danger. Dans le cas du système immunitaire inné, il y a une diversité de récepteurs de reconnaissance de motif moléculaire (PRR, Pattern Recognition Receptor), capables de détecter la présence de molécules associées à des pathogènes (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns), mais également des molécules associées aux dommages cellulaires (DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns). Les PRRs peuvent être localisés à la membrane des cellules, dans le cytosol ou dans des endosomes. Ensemble, ils peuvent détecter une grande variété de molécules telles que le LPS, un constituant de la membrane bactérienne, les ARN doubles et simples brins d'origine virale ou encore l'ATP extracellulaire.

Dans le cas de l'immunité adaptative, on compte seulement deux types de récepteurs antigéniques : les récepteurs des cellules B (BCR, B Cell Receptors) et les récepteurs des cellules T (TCR, T Cells Receptor). Le premier est porté par les lymphocytes B et le second par les lymphocytes T. Au contraire des PRR, les récepteurs de l'immunité adaptative sont extrêmement variables d'une cellule à l'autre. Durant le développement des lymphocytes, les régions d'ADN codant pour les anticorps et les TCR subissent des réarrangements génétiques stochastiques, ce qui permet de générer une grande variabilité de spécificité des récepteurs, chaque récepteur étant propre à chaque cellule mature sortant du thymus, pour les lymphocytes T, et de la moelle osseuse, pour les lymphocytes B. De plus, les pertes et les gains de paires de bases aux extrémités des segments réarrangés induisent davantage de diversité. Ce processus, appelé recombinaison somatique (Figure 5 adaptée de [1]), est à l'origine de l'adaptabilité du système immunitaire. Les cellules portant un récepteur efficace pour détecter les molécules de pathogènes pourront proliférer, contrairement aux autres. Ainsi, les cellules mémoire permettant une défense de l'organisme deviennent de plus en plus nombreuses avec l'âge. S'ajoute à cela un autre processus appelé maturation d'affinité, qui ne concerne que les cellules B et donc les anticorps. Ce processus intervient après le développement et l'activation des cellules B, et il induit des mutations aléatoires dans l'ADN codant pour les anticorps. Ce processus aboutit à la diversification des anticorps ainsi qu'à l'augmentation de leur efficacité. Au contraire de la recombinaison somatique, qui se déroule dans la moelle osseuse pour les lymphocytes B et dans le thymus pour les lymphocytes T, la maturation d'affinité se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires, dans des structures appelées follicules lymphoïdes secondaires. La reconnaissance antigénique du TCR est portée par deux chaînes alpha et bêta de type immunoglobuline, celle du BCR est portée par un anticorps

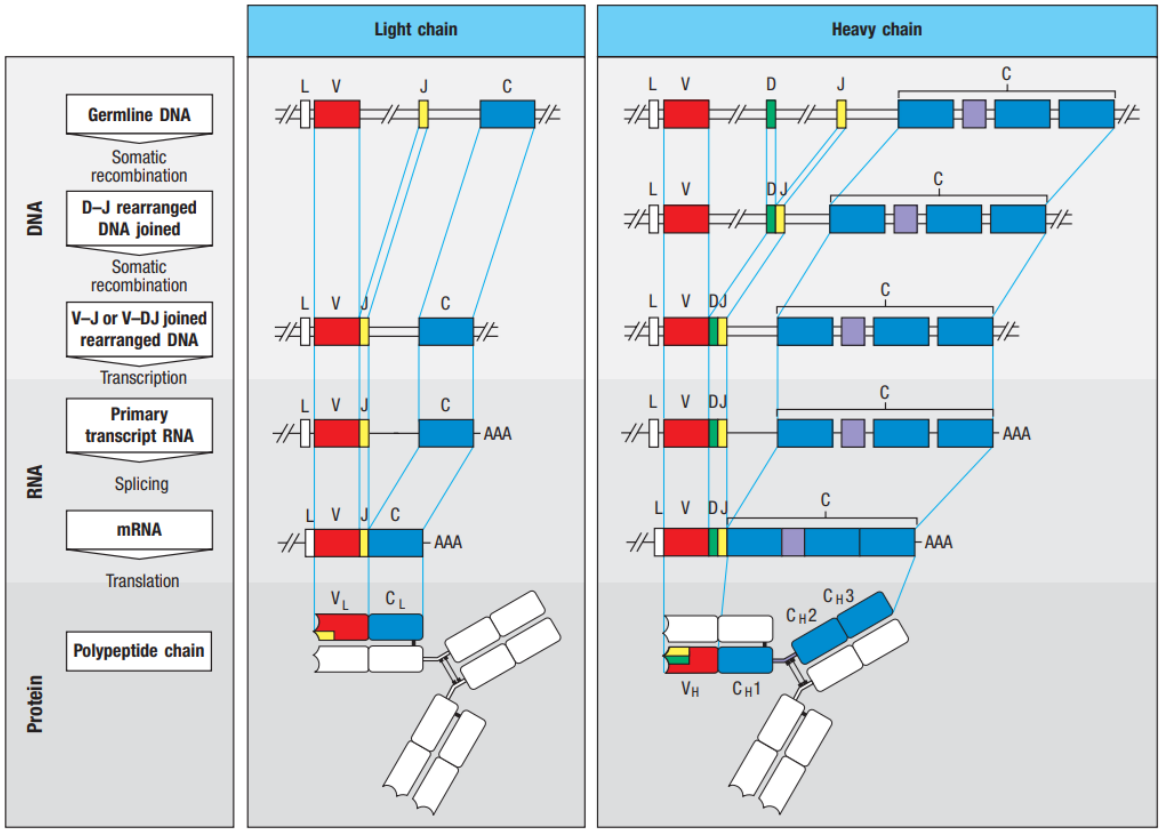


Figure 5 : Recombinaison somatique des anticorps. A : Schéma de la recombinaison somatique des chaînes lourdes et légères. La région variable de la chaîne légère est constituée d'un assemblage aléatoire d'un segment V (34-38 kappa, 29-33 lambda), d'un segment J (5 kappa, 4-5 lambda) et d'un segment C (1 kappa, 4-5 lambda). La région variable de la chaîne lourde est de la même façon est constituée d'un assemblage aléatoire d'un segment V (38-46), d'un segment D (23), d'un segment J (6) et d'un segment C (9). Le segment L est un exon leader qui dirige la protéine vers les voies de sécrétion (adaptée de Murphy et al).

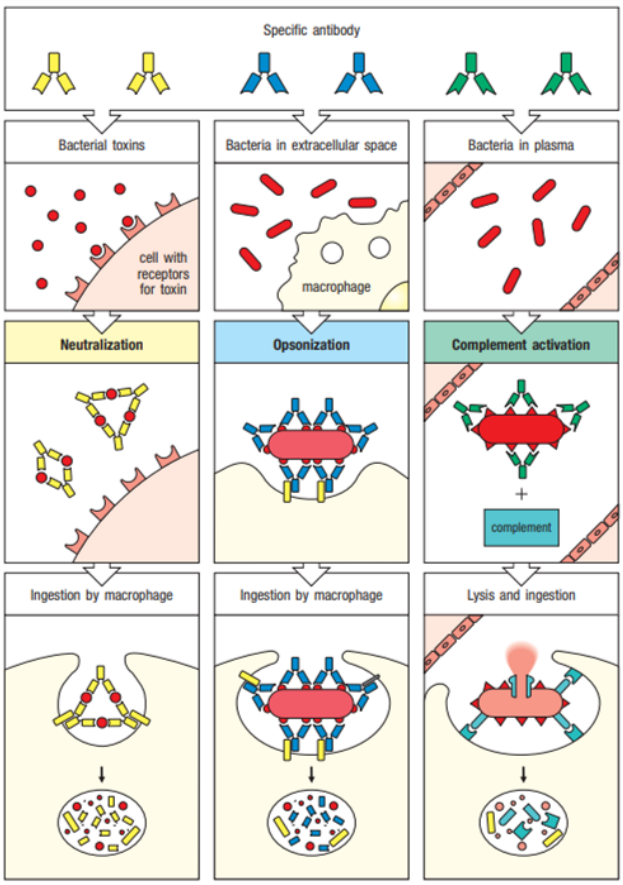


Figure 6 : Fonctions et modes d'action des anticorps sécrétés par les lymphocytes B. La reconnaissance d'une toxine par les anticorps entraîne sa neutralisation, le complexe ainsi formé inhibe la toxicité de la toxine. Les complexes formés sont alors dégradés par les macrophages. De la même façon les virus et les bactéries sont opsonisés par les anticorps puis les complexes sont phagocytés et lysés. La phagocytose est grandement facilitée par l'association des anticorps aux récepteurs Fc. Enfin les anticorps fixés sur une bactérie peuvent entraîner l'activation du complément et créer des pores dans la membrane de la bactérie ainsi lysée. Les molécules de complément dans la membrane bactérienne ont également un récepteur sur les cellules phagocytaires qui facilite leur phagocytose (adaptée de Murphy et al).

qui est constitué de quatre chaînes immunoglobulines, deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Les lymphocytes B sont capables de sécréter les anticorps, ce qui leur confère d'autres fonctions (Figure 6 adaptée de [1]).

1.1.5. Mémoire immunitaire

La protection contre les pathogènes fournie par la mémoire immunitaire peut se distinguer qualitativement et quantitativement de la réponse des lymphocytes naïfs. La vaccination illustre bien l'importance et l'efficacité de la mémoire immunitaire. Son principe est de faire émerger une mémoire immunitaire contre un pathogène donné, et elle a permis la diminution drastique de la mortalité due à des pathologies infectieuses, bactériennes et virales, au XXe siècle (Figure 7 adaptée de [1]).

En plus de leur efficacité, les lymphocytes mémoire persistent plusieurs dizaines d'années. Les lymphocytes B mémoire peuvent sécréter des anticorps à un niveau relativement stable pendant plus de 30 ans. Les lymphocytes T mémoire ont une demi-vie située entre 8 et 15 ans. Chaque individu constitue un répertoire qui lui est propre au cours de sa vie, en accumulant les lymphocytes mémoire à chaque infection ou vaccination. L'accumulation de cellules mémoire est néanmoins limitée par la disponibilité des facteurs de survie. Les cellules mémoire maintiennent leurs populations par prolifération homéostatique sous l'influence de cytokines comme l'Il-15 et l'Il7.

Les lymphocytes B mémoire peuvent être issus des centres germinatifs générés lors de la primo-exposition ; ils peuvent également se différencier à partir des plasmocytes issus de la réponse primaire. La fréquence des lymphocytes B spécifiques d'un antigène est bien plus élevée lors de la seconde exposition à un antigène par rapport à la première, entre 0,01 % et 0,001 % pour la primo exposition, et entre 1 % et 0,1% pour la seconde exposition. De plus, l'affinité des anticorps ayant été améliorée à travers le processus de maturation d'affinité, les anticorps sécrétés par les lymphocytes B mémoire ont en moyenne une affinité plus haute que ceux des naïfs. On observe également une production beaucoup plus importante d'anticorps spécifiques lors d'une réponse secondaire par rapport à la réponse primaire. Les lymphocytes B mémoire, une fois différenciés, se logent dans les organes lymphoïdes et dans la rate. La réactivation des lymphocytes B mémoire est facilitée par leur forte expression de CMH de classe II, comparée à celle des naïfs, ce qui permet une coopération plus efficace avec les lymphocytes CD4+.

L'acquisition du phénotype mémoire par les lymphocytes T n'est pas encore parfaitement élucidée. Le schéma le plus communément admis est que les lymphocytes T mémoire sont des effecteurs survivants à la phase de restriction post-infections ou post-vaccination. En effet après l'infection la majorité des lymphocytes activés meurent par apoptose. Un autre modèle est également proposé dans lequel les cellules T mémoire sont directement différenciées à partir des lymphocytes T naïfs activés [2]. On distingue trois catégories de lymphocytes T mémoire, la mémoire centrale qui réside essentiellement dans les ganglions lymphatiques, la mémoire effectrice ou périphérique qui circule dans

l'organisme sur le même modèle que les lymphocytes T naïfs, comme décrit dans la section 1.2.3, et les mémoire résidents qui sont localisés dans les tissus périphériques.

La mobilisation des lymphocytes T mémoire est grandement facilitée comparée au lymphocytes T naïfs et ce pour plusieurs raisons :

- La distribution, en partie dans les tissus périphériques, des lymphocytes T mémoire les place en première ligne lors de l'entrée d'un pathogène.
- Les cellules T mémoire expriment plus de molécules d'adhésion (CD44 et CD11a) que les naïves [3] ce qui faciliterait la formation d'une synapse immunitaire avec une CPA, et donc l'activation.
- Les cellules T mémoire ne sont pas restreintes à l'activation par une cellule dendritique [4] contrairement aux cellules naïves [5].
- Les lymphocytes T mémoire ont un seuil d'activation plus bas que les naïfs nécessitant ainsi des contacts moins longs et avec une CPA et moins de TCR engagés pour s'activer par rapport aux naïfs [3], également ils sont sensibles à des quantités plus faibles d'antigènes.
- La signalisation même du TCR semble plus efficace chez les lymphocytes T mémoire qui s'activent plus vite que les naïfs avec l'utilisation de mitogènes [3].

Une forme de mémoire immunitaire a également été décrite chez les cellules de l'immunité innée, cependant cette mémoire est portée notamment par des caractéristiques épigénétiques et ne perdurent que quelques mois [6].

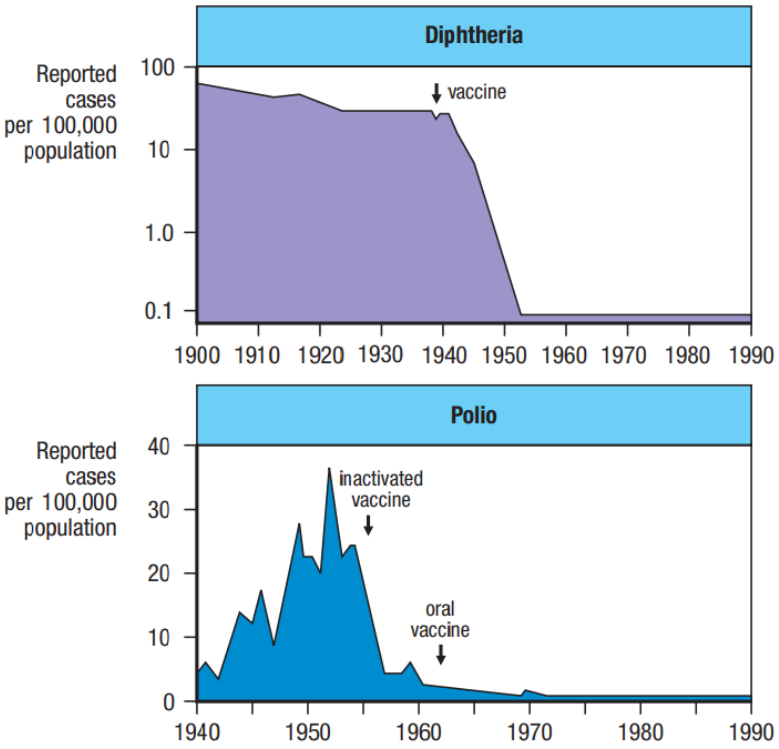


Figure 7 : Campagne de vaccination et nombre de cas par an et pour 100 000 habitants de diphtérie et de polio aux États Unis (adapté de Murphy et al).

1.2. Activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes T est un processus central de la réponse immunitaire adaptative chez l'humain, jouant un rôle crucial dans la défense contre les pathogènes et dans la surveillance des cellules tumorales. *In vivo*, l'activation des lymphocytes T n'est possible que par la reconnaissance de l'antigène spécifique du TCR porté par le lymphocyte T. *In vitro*, des molécules peuvent être utilisées pour activer les cellules T de façon non spécifique. Les paragraphes suivants visent à synthétiser les connaissances actuelles sur les mécanismes d'activation des lymphocytes T, les voies de signalisation impliquées et les stratégies thérapeutiques ciblant leur activation.

1.2.1. Interactions cellulaires

L'activation des lymphocytes T naïfs se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate. Elle nécessite la mise en contact d'une cellule T spécifique et d'une CPA présentant l'antigène adapté. Plusieurs types cellulaires peuvent tenir le rôle de CPA ; classiquement ce sont des cellules dendritiques qui remplissent ce rôle mais les macrophages et les lymphocytes B le peuvent également. La rencontre entre une CPA portant un antigène et un lymphocyte T spécifique est favorisée par la structure des organes lymphoïdes secondaires qui sont connectés à la circulation sanguine et lymphatique drainant ainsi tous les tissus périphériques. Les CPA migrent depuis les tissus infectés par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions, et les lymphocytes T circulent de ganglion en ganglion jusqu'à leur apoptose ou leur activation. Deux signaux résultant de l'interaction entre la CPA et le lymphocyte T sont nécessaires à l'activation du lymphocyte T. Le premier est la reconnaissance spécifique d'un antigène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité sur les CPA par le TCR (Figure 8).

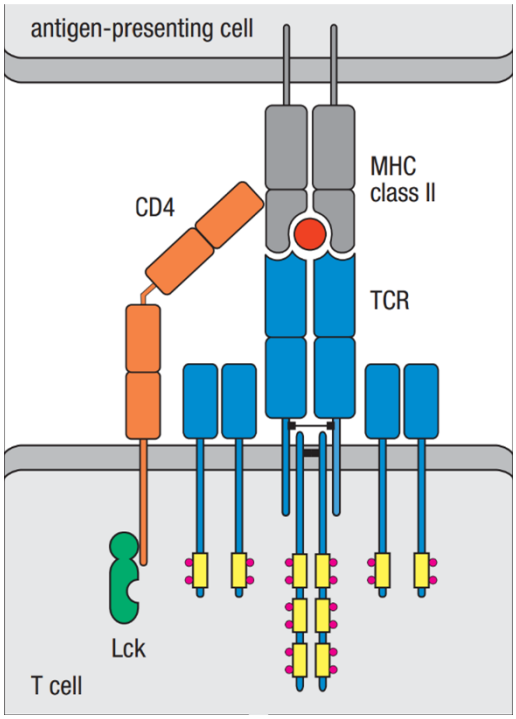


Figure 8 : schéma simplifié de l'engagement du TCR avec un complexe peptide-CMH de classe 2 (adaptée de Murphy et al).

Le deuxième signal, la costimulation, est fourni par l'interaction entre les molécules costimulatrices sur les CPA et leurs récepteurs sur les lymphocytes T, tels que l'interaction CD28/B7. L'absence de ce signal co-stimulateur peut entraîner l'anergie des lymphocytes T [7]. L'anergie est un mécanisme de tolérance immunitaire qui se caractérise par un état induit d'inactivité de la cellule résistant aux signaux activateurs. Un dernier signal, non nécessaire à l'activation, est transmis par des cytokines qui orientent le lymphocyte T dans ses fonctions effectrices. Les lymphocytes T CD4+ notamment peuvent se polariser, en fonction du contexte cytokinique, en plusieurs types de cellules effectrices. Les principaux types sont LTa1, LTa 2, LTa17 et

lymphocytes T régulateurs (Treg) induits (Figure 9 adaptée de [1]).

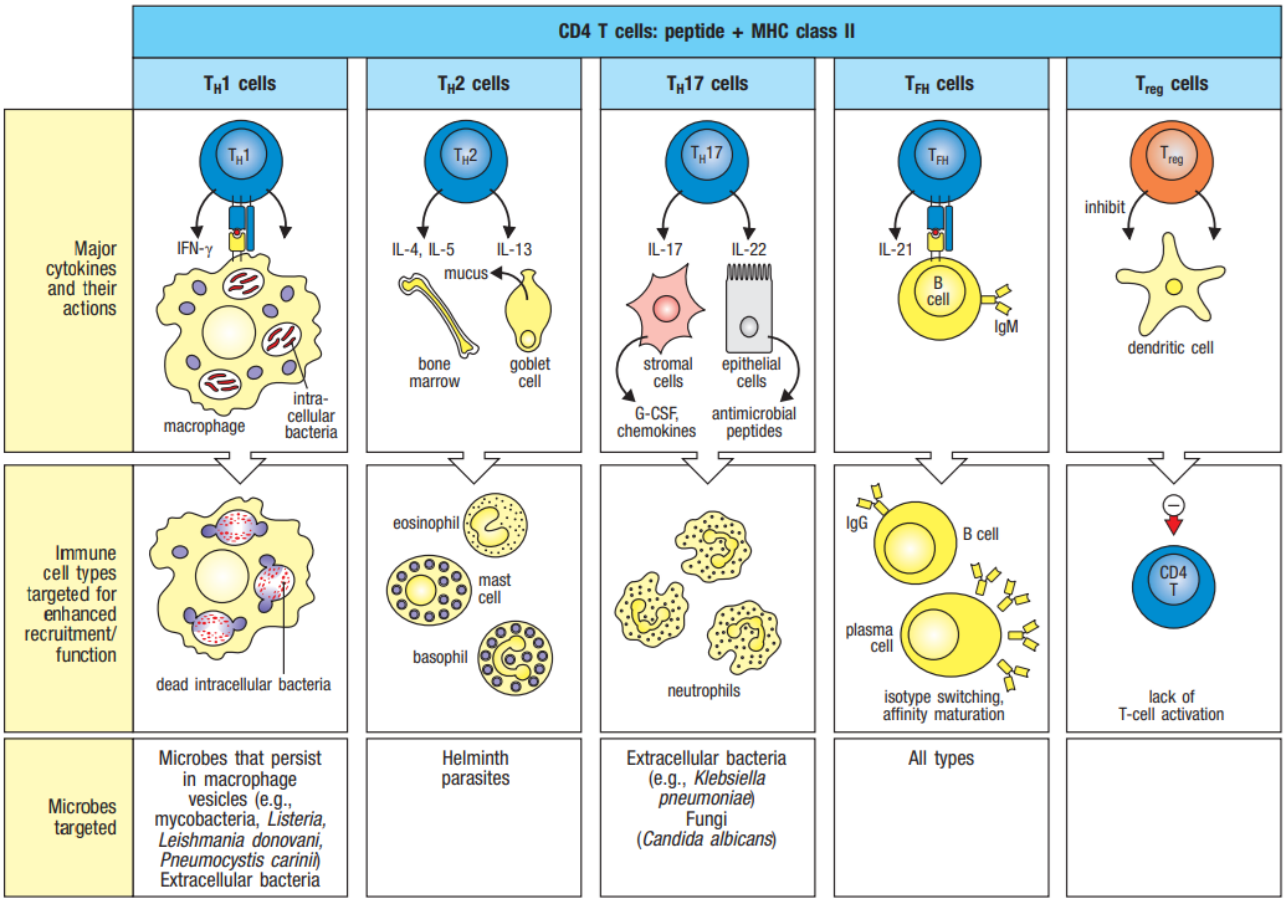


Figure 10 : Polarisation fonctionnelle des lymphocytes T CD4+ (adaptée de Murphy et al).

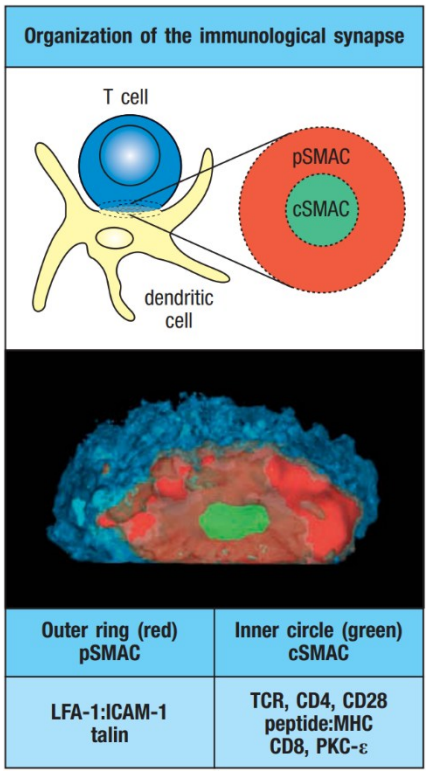


Figure 9 : Organisation spatiale de la synapse immunitaire (adaptée de Murphy et al).

La reconnaissance d'un antigène sur CMH par une cellule T induit la formation d'une synapse immunologique (Figure 10 adaptée de [1]) qui regroupe les molécules de TCR et de costimulation dans une zone centrale et les molécules d'adhésion dans la zone périphérique. Les molécules de CD45 portant des motifs d'inhibition des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITIM, Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) sur leur partie intracellulaire sont exclues de la synapse.

1.2.2. Mécanismes moléculaires de la signalisation du TCR

La reconnaissance d'un complexe peptide-CMH (pCMH) par le TCR entraîne la formation de micro-regroupements de récepteurs engagés (TCR, co-stimulation et adhésion) au centre de l'interface entre la CPA et le lymphocyte T. Ce regroupement aboutit, si la quantité de TCR engagée est suffisante, à la formation d'une synapse immunitaire mature. La signalisation du TCR et de CD28 est organisée en une cascade de phosphorylation aboutissant à l'expression des gènes associés à l'IL2, l'augmentation du flux calcique, la réorganisation du cytosquelette et une augmentation de l'adhésion cellulaire. Les protéines catalysant ces phosphorylations ainsi que leurs substrats sont pour beaucoup associés à la face interne de la membrane plasmique ce qui augmente l'efficacité de la signalisation en limitant la diffusion des protéines dans le cytoplasme. Cet effet est renforcé par le regroupement initial puis par la formation de la synapse immunitaire. Le TCR est un complexe protéique composé d'un hétérodimère avec une chaîne alpha et bêta (ou gamma et delta) qui réalise la reconnaissance antigénique, cet hétérodimère est associé avec six chaînes portant la signalisation cellulaire. Ces chaînes sont collectivement appelées CD3. Ce complexe est composé de deux chaînes ε, une chaîne γ, une chaîne δ et deux chaînes ζ. Ces deux dernières forment un homodimère stabilisé par un pont disulfure et n'ont pas de domaine extracellulaire de type immunoglobuline, comme les autres chaînes CD3. Les chaînes CD3 ont sur leur domaine intracellulaire des motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) ces motifs sont également associés aux BCR et aux FcR (Fc récepteurs). L'association du TCR avec un complexe pCMH est stabilisée par les corécepteurs CD4 pour les CMH de type 2 ou CD8 pour les CMH de type 1. La reconnaissance du complexe pCMH par les chaînes alpha et bêta ainsi que le corécepteur entraîne la phosphorylation réversible des tyrosines sur les sites ITAM des chaînes CD3. La kinase Lck, constitutivement associée au domaine intracellulaire du corécepteur, est pensée comme majoritairement responsable de ces phosphorylations. Lck est activée par la déphosphorylation de son domaine C-ter par CD45 (préalablement phosphorylé par Csk) puis par autophosphorylation de son domaine kinase. CD45 peut également déphosphoryler le domaine kinase. La modification des motifs ITAM entraîne le recrutement de la kinase Zap70 par ses domaines SH2 phosphorylés. Associée aux ITAMs, LcK active Zap-70 avec une triple phosphorylation. Zap-70 phosphoryle ensuite LAT, une protéine échafaudage membranaire possédant un large domaine cytoplasmique, et SLP-76 une protéine cytoplasmique. Avec la protéine adaptatrice Gads, LAT et SLP-76 activés forment le complexe LAT :Gads :SLP76 à la membrane. Suite à l'activation de Zap-70 on observe également le recrutement et l'activation de la PI 3-kinase qui phosphoryle le phospholipide membranaire PIP_2 pour former PIP_3. PIP_3 permet ensuite le recrutement a la membrane de Vav, Akt, Itk et PLC-γ. Une fois la phospholipase PLC-γ recrutée à la membrane elle se lie au complexe LAT :Gads :SLP76 et il en est de même pour la kinase Itk. La formation de ces complexes membranaires permet de stopper la diffusion et mettre à proximité les enzymes et leurs substrats, et ainsi de promouvoir les interactions de longues durées. Le complexe ainsi formé, Itk phosphoryle PLC-γ ce qui l'active. PLC-γ activé clive PIP_2 pour générer le diacylglycérol (DAG) membranaire et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3). IP_3 induit immédiatement l'augmentation du flux calcique en

permettant l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire et en libérant celui stocké dans le réticulum endoplasmique. Dans un second temps les deux seconds messagers produits par PLC-γ induisent par des cascades de signalisation l'activité des facteurs de transcription tels que NFκB et NFAT associés aux gènes de l'IL2 et de CD25. L'expression de CD25 permet de former le récepteur haute affinité de l'IL2, cette cytokine étant nécessaire à la prolifération et à l'acquisition du phénotype effecteur des lymphocytes T. Ainsi les lymphocytes T activés expriment l'IL2 et son récepteur à haute affinité permettant un effet autocrine de cette cytokine. Enfin, l'activation des protéines Vav et ADAP par le complexe LAT :Gads :SLP76 permet respectivement la réorganisation du cytosquelette accompagné de la polymérisation de l'actine et l'augmentation de l'adhésion par l'activité des intégrines. Le récepteur de costimulation CD28 est activé après sa liaison au récepteur activateur B7 ou B7.2. Son activation entraîne la phosphorylation activatrice de Lck et permet d'atteindre le potentiel d'activation maximal de PLC-γ, qui est nécessaire à l'activation des lymphocytes T naïfs (Figure 11 adaptée de [8]).

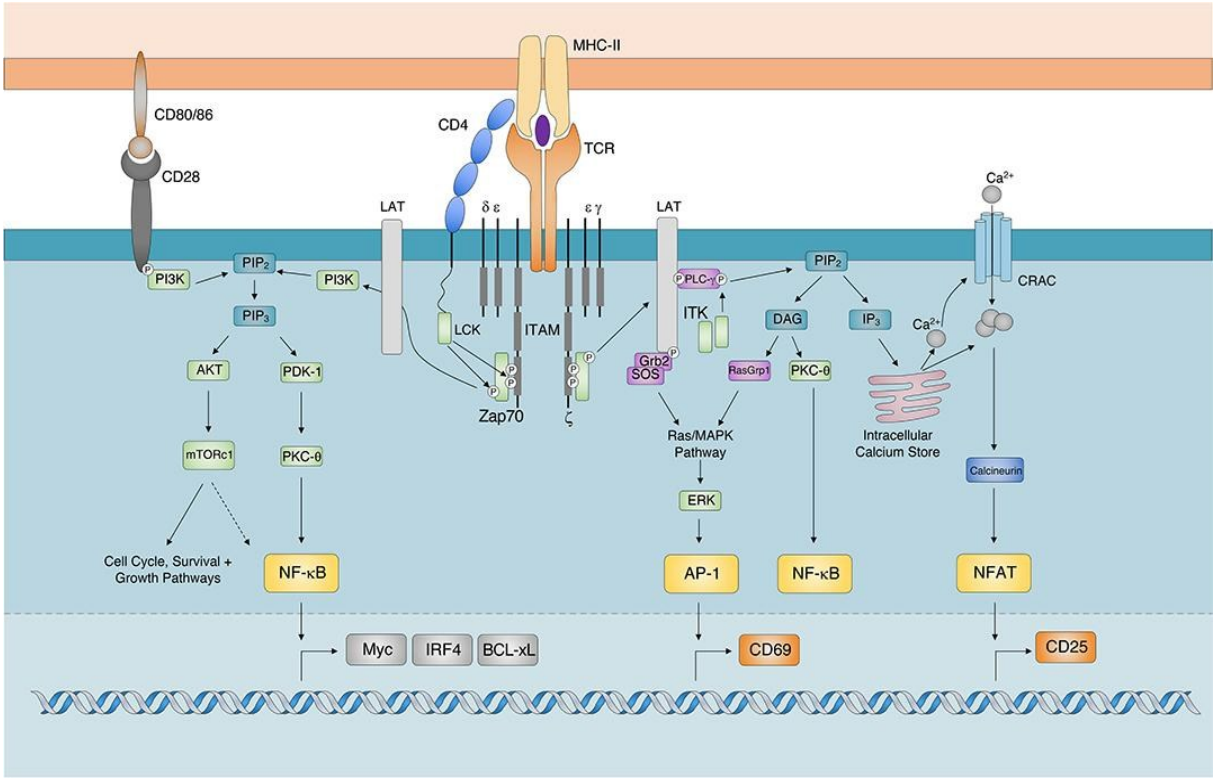


Figure 11 : Signalisation associée au TCR (adaptée Bhattacharyya et al).

1.2.3. Trafic cellulaire des Lymphocytes T

Les lymphocytes T naïfs circulent en permanence entre les organes lymphoïdes secondaires et la circulation sanguine. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T se concentrent dans des zones dites zones T, ils sont guidés jusqu'à ces zones par les chimiokines CCL19 et CCL21. Ces chimiokines sont produites par les cellules stromales des zones T pour CCL21 et par les cellules dendritiques pour CCL19, le LT exprime CCR7, qui est un récepteur commun pour ces deux chimiokines. Les LT naïfs passent du sang au cortex des organes lymphoïdes secondaires par les veinules à

endothélium épais (HEVs, High Endothelial Venules). Les lymphocytes T activés par une CPA perdent la capacité de sortir du ganglion et prolifèrent pendant plusieurs jours, alors que ceux non activés, après quelques heures, repartent dans la circulation soit par le sang soit par la lymphe. La rétention des lymphocytes T dans le ganglion est permise par l'inhibition de l'expression de S1PR1 par CD69, qui est exprimé immédiatement après l'activation. Une fois différenciés en effecteurs, les lymphocytes T activés sortent également du ganglion, pour la majorité d'entre eux, pour se diriger vers les sites d'inflammation. Une partie des lymphocytes T activés est destinée à la coopération avec les lymphocytes B, ils restent donc dans les organes lymphoïdes secondaires et se dirigent vers les zones B. Là, ils peuvent participer aux centres germinatifs ou rester à la frontière de la zone B pour activer les lymphocytes B présentant un antigène sur leur CMH. La circulation constante des lymphocytes T entre les organes lymphoïdes secondaires et tertiaires leur permet de tester les antigènes présentés par plusieurs milliers de CPA par jour, ainsi, en cas d'infection, l'essentiel des lymphocytes T spécifiques peut être mobilisé en 48h dans les ganglions drainant le site de l'infection.

1.2.4. Activation des Lymphocytes T mémoire

Comme abordé précédemment les lymphocytes T mémoire sont plus rapidement mobilisables, ils initient plus tôt leurs réponses effectrices et ont un seuil d'activation plus faible. L'activation des lymphocytes T mémoire a été décrite comme indépendante de la costimulation d'après des études in vitro [9] et sur modèle murin CD28 déficient [10,11]. Des études plus récentes, sur modèle murin, ont au contraire montré une dépendance à la costimulation et ce pour les lymphocytes CD4+ et CD8+ [12–14]. Il a cependant été relevé que la production d'IFNγ semblait indépendante de la costimulation [14].

1.2.5. Régulation et tolérance Immunitaire

La régulation de l'activité des lymphocytes T est essentielle pour prévenir les réponses auto-immunes et maintenir la tolérance immunitaire. Les lymphocytes T sont d'abord fortement sélectionnés au cours de leur développement dans le thymus, 99% des lymphocytes T immatures sont éliminés au cours de deux processus de sélection qui constituent la tolérance centrale. La sélection positive qui s'effectue sur les cellules CD4+CD8+ promeut la survie des lymphocytes T portant un TCR capable de reconnaître un CMH de façon spécifique. La sélection négative élimine les lymphocytes T ayant une trop grande affinité pour des antigènes du soi. Pour cela les cellules stromales de la zone médullaire du thymus expriment sur leurs CMH des antigènes du soi de tous les tissus. L'expression de ces antigènes est régulée par le gène Auto-immune regulator (AIRE). Les lymphocytes T matures sont eux sous le contrôle de la tolérance périphérique, les cellules T régulatrices (Treg) jouent un rôle clé dans ce processus en supprimant l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Les mécanismes tels que l'anergie, la suppression et la délétion clonale, contribuent également à la prévention de l'auto-immunité. Les cellules d'origine myéloïde peuvent également participer à la tolérance périphérique par la modulation de l'activité des lymphocytes T. C'est le cas des cellules myéloïdes suppressives (MDSC, Myeloid-Derived Suppressor Cells). Une fois activés, les lymphocytes T expriment progressivement des récepteurs inhibiteurs tels que PD1 et

CTLA4. CTLA4 inhibe l'activation du lymphocyte T par une concurrence pour la liaison aux récepteurs B7 avec CD28. Au contraire de CTLA4, PD-1 porte des motifs ITIM sur sa partie intracellulaire et il possède un ligand qui lui est propre, PDL-1. Dans le cas où les signaux inhibiteurs se font plus importants que les signaux activateurs, la cellule T peut devenir anergique et mourir par apoptose. Ce phénomène est en grande partie responsable de la phase de restriction de la réponse immunitaire. Les cytokines anti-inflammatoire, telles que l'IL-10 ou le TGF-β, jouent également un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire et le maintien de la tolérance. Elles favorisent la différenciation des Treg et suppriment l'activité des lymphocytes T effecteurs.

1.2.6. Phénotype des Lymphocytes T

Le grand nombre de sous-type de lymphocytes T peut être partiellement décryptée par l'identification des marqueurs extracellulaires. Une exploration plus complète des phénotypes des lymphocytes T nécessitera la mesure de l'activité des facteurs de transcription qui caractérisent ces phénotypes. La distinction des différents groupes de lymphocytes T mémoire, naïfs et effecteurs peut s'effectuer par des marqueurs membranaires (Figure 12). On trouve quatre sous-groupes de lymphocytes T mémoire, les cellules souches mémoire (T_{SCM}) qui ont une très forte capacité de prolifération et qui sont particulièrement présentes dans les ganglions, de la même façon les lymphocytes T de la mémoire centrale (T_{CM}) sont surtout présents dans les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes T de la mémoire effectrice (T_{EM}) circulent de la même façon que les cellules T naïves (T_N), et les lymphocytes T mémoire résident (T_{RM}) sont eux associés aux tissus périphériques. On peut également ajouter à ces phénotypes celui des lymphocytes T épuisés qui se caractérise par une surexpression des récepteurs inhibiteurs et une baisse des fonctions effectrices, de la production de cytokines et de la cytotoxicité.

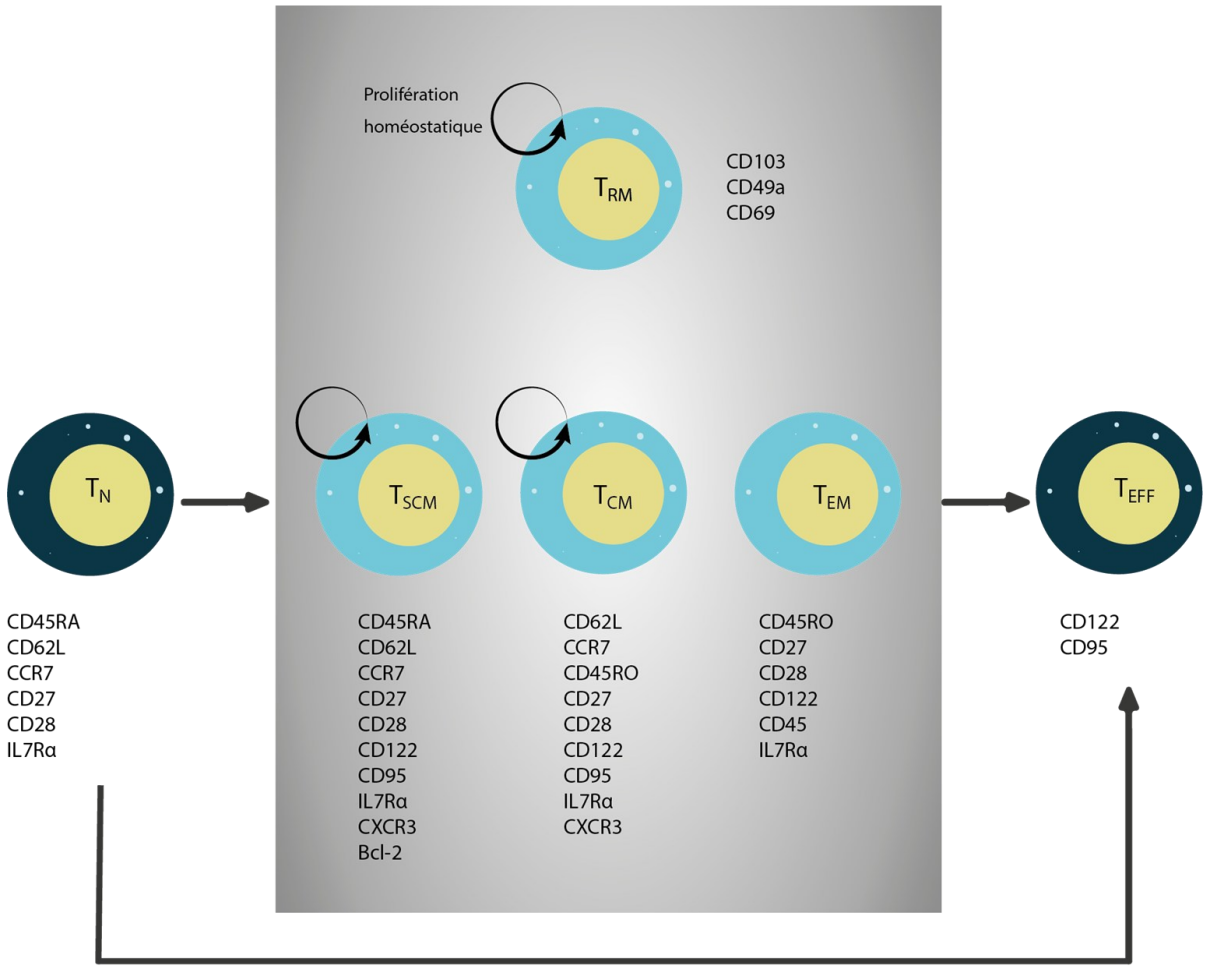


Figure 12 : Phénotype des cellules T. T_N : Cellules T naïves, T_{SCM} : Cellules souches mémoire T, T_{CM} : Cellules T mémoire centrale, T_{RM}: Cellules T résidentes mémoire, T_{EM} : Cellules T effectrices mémoire, T_{EFF}: Cellules effectrices.

1.2.7. Stratégies thérapeutiques ciblant les lymphocytes T

Comme détaillé précédemment le rôle des lymphocytes T est central dans la réponse immunitaire. Ainsi, promouvoir ou inhiber leur activité s'est avéré efficace pour le traitement d'un large spectre de pathologies. Parmi ces pathologies on trouve notamment certains types de cancer, les rejets de greffe et des maladies auto-immunes. Dans ce paragraphe sont résumés les différentes stratégies de modification de l'activité des lymphocytes T ainsi que les pathologies traitées.

En oncologie, l'activité des lymphocytes T est particulièrement étudiée pour le développement de thérapies. Plusieurs stratégies et molécules ont fait l'objet de nombreux essais cliniques. Ces stratégies ont en commun le fait d'augmenter l'activité anticancéreuse des lymphocytes T :

- Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire sont une classe de molécules qui inhibe l'activité des récepteurs inhibiteurs de lymphocytes T. Physiologiquement ces récepteurs sont progressivement exprimés par les cellules T au cours de leur prolifération. Leur activité inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules. Les récepteurs inhibiteurs participent ainsi à la phase de restriction. Chez des

patients atteints d'un cancer, l'expression de ces molécules par les lymphocytes T limite leur activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses. Deux approches ont ainsi été développées, premièrement des immunothérapies anti-CTLA4, anti-PD-1/PDL-1[15] ou anti-Lag3 [16] qui visent à bloquer l'interaction du récepteur inhibiteur avec son ligand ce qui favorise la survie des cellules T cytotoxique. La deuxième approche consiste à utiliser des petites molécules pour affecter la signalisation intracellulaire des points de contrôle du système immunitaire[17]. Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire sont utilisés pour le traitement du plusieurs types de cancer dont le cancer du poumon et le mélanome.

- Les immunothérapies par anticorps bispécifiques, tel que le Blinatumomab [18], reposent sur le principe de forcer la reconnaissance des cellules cancéreuses par les lymphocytes T. Les anticorps bispécifiques sont des anticorps chimériques construits pour porter deux paratopes différents, au contraire des anticorps naturels qui portent les mêmes paratopes sur leurs deux branches. Ici ils possèdent une spécificité pour un marqueur tumoral et pour un marqueur de la cellule tueuse, respectivement CD19 et CD3 dans le cas du Blinatumomab développé pour traiter les leucémies.
- La thérapie par lymphocyte T à récepteur antigénique chimérique (lymphocytes T CAR) repose sur le transfert de lymphocytes T autologue modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur antigénique avec une spécificité choisie. Pour cela les cellules du patient sont prélevées, une séquence d'ADN codant pour le récepteur est insérée dans le génome puis les cellules sont réinjectées au patient. Ce récepteur chimérique, indépendant du CMH, est constitué d'une partie extracellulaire assurant la reconnaissance antigénique et d'une partie intracellulaire assurant la transmission du signal. La reconnaissance antigénique est assurée par un single-chain variable fragment (scFv), une construction artificielle reliant les parties variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps. La transmission du signal est assurée par une construction contenant les domaines de signalisation des chaînes ç du TCR ainsi que les domaines de signalisation des protéines de co-stimulation telles que CD28. La construction du domaine assurant la transduction du signal a beaucoup évolué au cours de différentes générations de lymphocytes T CAR pour optimiser l'activation. Cependant, son principe qui est de stimuler les voies de signalisation du TCR pour activer les lymphocytes T est resté le même[19]. Après la modification génétique des cellules T du patient, celles-ci sont réinjectées au patient et ont normalement un effet cytotoxique sur les cellules ciblées par le récepteur antigénique chimérique. Des lymphocytes CAR anti-CD19 ont montré une forte efficacité dans le traitement des leucémies lymphoblastiques aigues [20]. Une approche par transfert de cellules CAR T allogénique est également en développement afin de simplifier la production des cellules CAR T.

Pour certaines pathologies, il peut être important de diminuer l'activité des cellules T car elle peut induire des dommages sur l'organisme. C'est le cas pour des pathologies auto-immunes, lorsque l'activité des cellules T est dérégulée et s'attaque aux tissus sains. C'est également le cas lors de transplantation d'organes, les cellules T du donneur comme du

receveur pouvant endommager les tissus de l'autre partie. Les principales méthodes d'inhibition de l'activité des lymphocytes T sont :

- Les petites molécules telles que la cyclosporine A (CsA) ou le tacrolimus qui sont des immunosuppresseurs puissants utilisés pour la prévention du rejet de greffe.

- Les immunothérapies à anticorps bloquants telles que le Daclizumab[21] qui inhibe l'activité de CD25. CD25 est nécessaire à la prolifération des lymphocytes T et le blocage de son activité permet d'inhiber le rejet de greffe.

- Induire l'expansion des lymphocytes T régulateurs par l'administration d'IL2 à faible dose [22] afin d'augmenter la pression de la tolérance immunitaire dans le cas des maladies auto-immunes.

1.3. Tests fonctionnels des cellules immunitaires

Un test fonctionnel se définit par l'étude du fonctionnement d'une fonction cellulaire des cellules immunitaires. En principe, il s'agit d'induire via un stimulus une fonction cellulaire, de mesurer l'effectivité de ladite fonction, si possible de façon standardisée, pour pouvoir discriminer les réactions anormales des réactions normales. Ces tests peuvent être pratiqués dans des contextes différents : les laboratoires de recherche les utilisent pour l'étude fondamentale des fonctions cellulaires des cellules de l'immunité. Les laboratoires d'immunologie clinique les utilisent pour le diagnostic, le suivi thérapeutique des patients et lors d'essais cliniques visant une nouvelle utilisation de ces tests pour une meilleure prise en charge des patients. Les médecins utilisent également des tests fonctionnels *in vivo* en consultation, comme dans le cas des applications cutanées d'antigènes afin de caractériser l'allergène responsable des symptômes allergiques.

Le système immunitaire est un ensemble complexe de tissus, de cellules et de molécules finement régulé. Un déséquilibre dans la régulation du système immunitaire caractérise un grand nombre de pathologies. En effet, une réponse exacerbée peut engendrer des maladies auto-immunes ; inversement, une réponse trop faible favorise les infections par tous types de pathogènes. De plus, une activité mal orientée du système immunitaire peut induire des pathologies telles que l'allergie ou encore potentialiser le développement de tissus malins. Les analyses de routine pratiquées sur les patients pour comprendre l'état et les capacités du système immunitaire se concentrent en première intention sur les analyses hématologiques, le phénotypage et la numération des populations cellulaires du système immunitaire. Cependant, l'essentiel des activités du système immunitaire est dirigé par des interactions complexes, cellules/cellules et/ou cellules/facteurs solubles. Les analyses de première intention, biochimique et hématologique, qui ne font que mesurer la quantité de cellules et d'effecteurs solubles, ne permettent pas toujours de mettre en lumière des défauts potentiellement majeurs. Il apparaît donc indispensable d'effectuer des tests fonctionnels afin d'explorer les capacités du système immunitaire.

Il existe des tests fonctionnels pour mesurer toutes les fonctions principales des cellules immunitaires. Les mêmes fonctions sont mesurées par les cliniciens et par les chercheurs, les protocoles des cliniciens ayant normalement subi des processus de validation plus exigeants. Ainsi les fonctions cellulaires mesurées sont les suivantes :

- La fonction de prolifération, qui est indispensable à une immunité adaptative efficace. La prolifération intervient après l'activation des lymphocytes par leur antigène spécifique et permet d'augmenter l'effectif de cellules spécifiques capables de lutter contre l'infection.
- La fonction de cytotoxicité des NK et des T CD8+, il s'agit d'une fonction essentielle pour la résistance aux infections virales et pour inhiber le développement de tissus malins.
- La fonction de sécrétion de cytokines, qui est essentielle à l'activation, à la polarisation fonctionnelle et au contrôle du système immunitaire.
- L'expression de marqueurs membranaires et cytoplasmiques qui témoigne, ou est prédictive, d'une fonction cellulaire.
- La production de métabolites tels que l'ATP, même si peu spécifique et peu informative quant aux capacités fonctionnelles des cellules, permet de détecter une augmentation de l'activité cellulaire consécutive à une stimulation.
- La fonction d'adhésion, qui est un préalable à des fonctions majeures des cellules du système immunitaire, telles que la formation de synapses immunitaires ou la migration vers les sites d'inflammation au travers des endothéliums.

Les fonctions des lymphocytes T sont particulièrement étudiées pour leur rôle central dans le déploiement du système immunitaire adaptatif et dans la potentialisation du système immunitaire inné. Les lymphocytes T sont en effet essentiels pour la mise en place de l'immunité cellulaire et l'immunité humorale par leur rôle dans l'activation des cellules B, et ils participent en outre à la régulation du système immunitaire inné. Le besoin de suivi de l'activité des cellules T a récemment été accru par l'émergence des immunothérapies visant à moduler l'activité des cellules T. Ces thérapies ayant permis une baisse significative de la mortalité dans de nombreux cancers, elles sont de plus en plus utilisées. Parmi les immunothérapies visant les LT on compte les anticorps monoclonaux tels que les inhibiteurs de point de contrôle du système immunitaire, des thérapies visant les récepteurs inhibiteur CTL-4 (Ipilimumab) ou PD-1(Nivolumab) sur les lymphocytes T ou son ligand sur les cellules cible PD-L1(Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab). Ces thérapies reposent sur le blocage de ces récepteurs inhibiteurs pour augmenter l'activité anti tumorale des lymphocytes T. On compte également des thérapies cellulaires type CAR-T, leur principe est de modifier génétiquement les cellules T du patient afin qu'elles expriment un récepteur antigénique chimérique. Ce récepteur peut être dirigé contre une cible choisie, CD19 dans le cas du lymphome B.

1.3.1. Tests de la fonction de prolifération des Lymphocytes T (TPL) ou Test de Transformation lymphoblastique (TTL)

L'objectif de ce test est d'évaluer la capacité mitotique des lymphocytes T à la suite d'une stimulation par un mitogène ou par des anticorps agonistes ou par un antigène. Un

mitogène est une molécule capable d'induire, de façon non antigène spécifique, l'activation et la prolifération d'une cellule, cela en stimulant les molécules de signalisation. Dans le cas des lymphocytes T plusieurs mitogènes sont couramment utilisés : la phytohémagglutinine (PHA), la concanavaline A (Con A), le poke weed mitogen (PWM), la phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et la ionomycine. Les deux derniers sont couramment utilisés conjointement. Les anticorps agonistes anti-CD3 et anti-CD28, ou uniquement anti-CD3, sont également une façon très efficace d'induire la prolifération des lymphocytes T en mimant le signal d'activation de la CPA pour le lymphocyte T. Dans certaines situations il est nécessaire de savoir s'il existe une réactivité des lymphocytes vis-à-vis d'un ou plusieurs antigènes particuliers. Dans ce cas les PBMC sont mis en présence de l'antigène in vitro, les monocytes différenciés en macrophages présentent l'antigène aux cellules T, et s'il existe une réactivité on devrait alors observer une prolifération. Parmi les antigènes les plus utilisés on trouve la candidine, l'anatoxine tétanique, la tuberculine et le cytomégalovirus. La prolifération induite par un antigène est plus lente que celle induite par un mitogène ou un anticorps agoniste car les antigènes doivent d'abord être présentés par les cellules présentatrices d'antigènes. De plus la fréquence de cellules répondant à la stimulation antigénique est beaucoup plus faible. Dans le cas d'une stimulation par mitogène ou anticorps agoniste on observe l'apparition du marqueur d'activation précoce CD69 après quelques heures et la prolifération est mesurée après 3 ou 4 jours. Dans le cas d'une stimulation par antigène l'expression de CD69 est détectable après 48h et la prolifération mesurable après 6 ou 7 jours[23].

Plusieurs méthodes existent pour mesurer une prolifération des LT. La première qui a été développée consiste à utiliser une thymidine radioactive, la thymidine tritiée. Celle-ci ne s'incorpore que dans le matériel génétique des cellules en phase S, la phase de synthèse de l'ADN. Cela permet de quantifier, par la quantité de radiation, la quantité d'ADN produite qui augmente de façon linéaire avec la quantité de cellules filles. L'utilisation d'éléments radioactifs étant un problème tant pour la manipulation que pour la gestion des déchets, la méthode utilisant un radioisotope est progressivement remplacée par d'autres méthodes.

- Le 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) est un analogue de la thymidine avec un atome de brome à la place d'un groupe méthyle. De la même façon que la thymidine tritiée il s'incorpore à l'ADN à la place de la thymidine, cependant la méthode de lecture est différente car il s'agit de marquer l'ADN avec des anticorps anti-BrdU pour le quantifier. Le BrdU est également très toxique mais il n'est plus nécessaire de manipuler des éléments radioactifs et la mesure par fluorescence est sujette à moins de problèmes que la mesure de la radioactivité.
- Le 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) s'incorpore à l'ADN également à la place de la thymidine mais sa révélation est simplifiée par l'utilisation de la chimie clic pour l'associer, de façon covalente et sans dénaturer l'ADN, à un azide modifié fluorescent.
- Le Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) est capable de diffuser au travers de membranes cellulaires et permet de marquer le cytoplasme en se liant de façon covalente à des protéines intracellulaires. Le signal fluorescent du CFSE est divisé par deux à chaque division cellulaire, ce qui permet de suivre en cytométrie les générations de cellules par la décroissance du signal de fluorescence. La mesure de la prolifération au CFSE est progressivement adoptée comme méthode de référence car elle ne présente pas de toxicité contrairement aux analogues de la

thymidine. Il existe d'autres molécules permettant de mesurer la prolifération sur le même principe, comme le VPD50 qui marque également le cytoplasme et les PKH2, PKH26 et PHK67 qui eux marquent les membranes.

A l'APHM (Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille), l'utilisation la plus fréquente des tests de prolifération concerne le contrôle qualité des photophorèses extra corporelles. Il s'agit d'un traitement immunomodulateur utilisé dans le cas de maladie chronique du greffon contre l'hôte ou de lymphome T cutané. Le principe est de récupérer les leucocytes dans le sang du patient de les traiter avec un agent photo actif le 8-méthoxypsoralène, d'exposer les cellules au rayonnement ultraviolet A puis de réinjecter ses cellules au patient. Ce traitement doit entraîner une réaction immunitaire bénéfique au patient : dans le cas des lymphomes, il permet d'augmenter la cytotoxicité dirigée contre les lymphocytes T malins, et dans le cas des maladies chroniques du greffon contre l'hôte il promeut la tolérance des cellules allogénique par l'activité des Treg. Le mode d'action n'est pas actuellement complétement déchiffré, mais le traitement doit inhiber la prolifération des lymphocytes T [24] en induisant l'apoptose d'une partie d'entre eux. Le test pratiqué est une stimulation à la PHA puis une lecture de la prolifération au CFSE 3 jours plus tard. Il est à noter que ce traitement est effectué en ambulatoire sur une demi-journée, les résultats du test de prolifération ne sont donc disponibles qu'a posteriori.

Un autre usage important des tests de prolifération par mitogène ou anticorps agoniste est la caractérisation d'immunodéficiences primaires ou secondaires qui n'induisent pas une absence complète de cellules T. Dans ce cas plusieurs mitogènes sont utilisés en parallèle ainsi que des anticorps agonistes. Il a été observé que parmi des patients ayant un déficit immunitaire commun variable (DICV), 50% avaient une réponse anormale à au moins un mitogène[25].

Les tests de prolifération utilisant des antigènes comme stimulant sont plus long à effectuer pour les raisons évoquées ci-dessus. Il y a au moins deux classes d'antigènes utilisés, ceux originaires de pathogènes et les allergènes. Généralement un ou plusieurs mitogènes sont utilisés en contrôle positif de ces tests. Les tests utilisant des molécules originaires de pathogènes permettent de rechercher un déficit immunitaire en vérifiant l'effectivité de la réponse immunitaire à la suite d'une infection ou une vaccination. Les tests utilisant des allergènes peuvent servir à diagnostiquer des hypersensibilités de type 4, ou retardée, dirigées par les lymphocytes et intervenant environ 48h après exposition à l'allergène. Ces tests peuvent être utilisés pour prédire l'apparition de maladies liées à l'intoxication aux métaux, les patients concernés présentent une sensibilité des lymphocytes pour certains métaux. Le test le plus pratiqué est le BeLPT qui concerne le béryllium, d'autres concernant le nickel, le titane, l'aluminium et le chrome ont pu montrer leur efficacité[26].

Le crossmatch est une coculture de lymphocytes réalisée dans le cas d'allogreffe, il permet d'évaluer la réactivé du donneur contre le receveur et inversement. Le principe est d'observer la prolifération des lymphocytes à la suite de la mise en coculture des PBMC des deux parties, les cellules d'une des deux parties ayant été lysées pour servir de stimulant aux cellules de l'autre partie. La durée minimale de ce test est de 6 jours[27]. Ce test est pratiqué uniquement en complément de l'étude d'histocompatibilité.

1.3.2. Tests de fonctionnalité de récepteur

Il a été observé que chez certains patients une susceptibilité mendélienne aux infections par Mycobacterium ou salmonella était due à des mutations, notamment de gènes codant pour des récepteurs membranaires de cytokines. Les cytokines concernées sont particulièrement l'IFN-γ et l'Il12 qui forment un axe de communication entre les macrophages et les lymphocytes (Figure 13). Les macrophages infectés par une bactérie intracellulaire produisent entre autres de l'IL12 qui induit la sécrétion d'IFN-γ par les LTa1 et lymphocytes T CD8+. L'IFN-γ produit active les macrophages et les polarise en M1, un phénotype plus inflammatoire, ce qui permet une meilleure élimination du pathogène[28]. Dans ce contexte il est possible de tester soit la fonctionnalité des récepteurs à l'IFN-γ sur les macrophages ou bien la fonctionnalité des récepteurs à l'IL12 sur les lymphocytes T. La fonctionnalité est mesurée par la phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT4 respectivement. Dans le cas du test de fonctionnalité du récepteur à l'IL12 les cellules sont stimulées pendant 3 jours avec de la PHA, puis elles en

sont privées pendant 24h et enfin elles sont exposées à de l'IL12 pendant 15 minutes avant d'être analysées par cytométrie en flux.

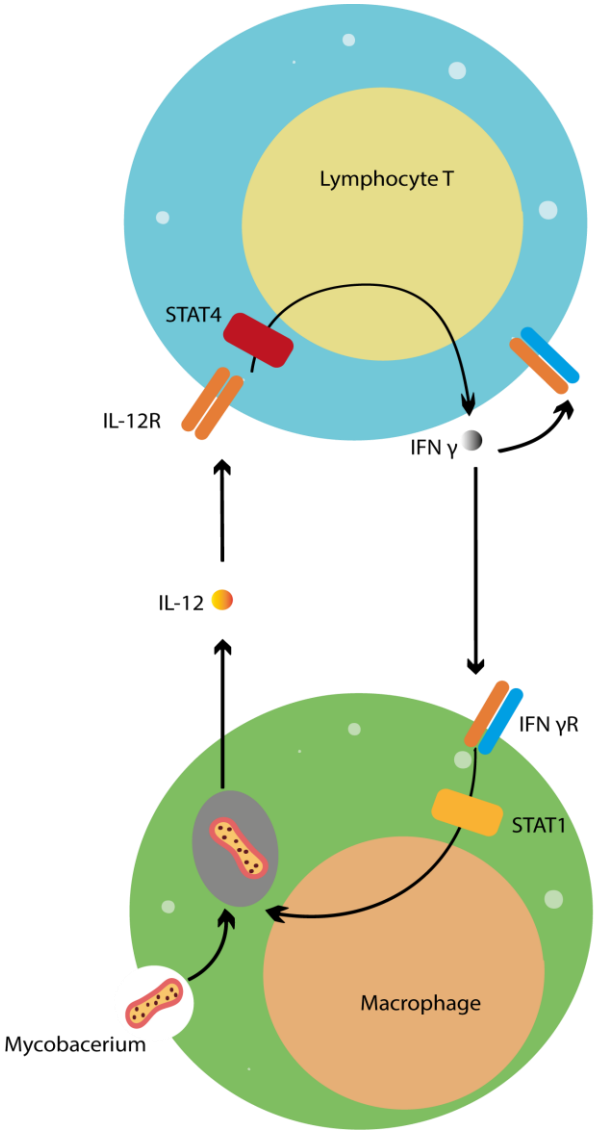


Figure 13 : Axe IL12/IFNγ entre les lymphocytes T et les macrophages. L'IL12 sécrété par les macrophages lors de la détection de bactéries intracellulaires et induit la sécrétion d'IFNγ par les lymphocytes T. L'IFNγ promeut la lyse des bactéries intracellulaires par les macrophages.

Un autre test de fonctionnalité de récepteur pratiqué à l'APHM concerne l'IL10 qui est une cytokine essentielle à la tolérance immunitaire. Ce test est beaucoup plus court car le résultat est donné par la mesure d'immuno-absorption enzymatique (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de la concentration d'IL1-β qui est une cytokine préformée sécrétée très tôt après la stimulation. En l'occurrence l'IL10 doit inhiber la production d'IL1-β des cellules stimulées 24h avec du LPS.

1.3.3. Tests de la fonction cytotoxique

Les tests de cytotoxicité sont essentiellement pratiqués dans le cadre de l'étude de cellules NK du patient. Il est néanmoins tout à fait possible de réaliser un test de cytotoxicité des cellules T. Ces tests sont généralement pratiqués avec la technique utilisant du chrome 51 (Cr51). La technique du chrome 51 a été développée à la fin des années 1960[29] et reste encore aujourd'hui la méthode de référence pour la mesure de la cytotoxicité. Le principe de cette méthode est de quantifier le relargage de Cr51 contenu dans les cellules cibles lors de la lyse de celles-ci par les cellules cytotoxiques. Les cellules cibles sont incubées un minimum de 4h avec les cellules cytotoxiques avant la mesure du Cr51 dans le surnageant[30].

D'autres méthodes ont ensuite été développées afin de limiter l'usage de molécules chaudes. La méthode Bioluminescence Imaging Luciferase (BLI) se base sur l'utilisation de cellules cibles génétiquement modifiées pour exprimer l'enzyme reportrice luciférase. Cette enzyme requiert de l'ATP pour dégrader son substrat, la luciférine, en oxyluciférine bioluminescente. La dépendance de la luciférase à l'ATP implique un arrêt de son activité enzymatique en cas de mort de la cellule, ainsi la cytotoxicité est mesurée par la décroissance du signal des cellules cibles[31]. Une autre méthode sans marquage utilise l'impédance générée par les cellules cibles adhérentes sur une surface conductrice. L'impédance mesurée par les électrodes du contenant de culture est proportionnelle à la quantité de cellules adhérentes et les cellules en suspension n'ont pas, ou peu, d'effet sur l'impédance [32]. Des tests de cytotoxicité par cytométrie ont également été développés. Ils consistent en l'utilisation de marqueurs de viabilité tels que l'iodure de propidium ou le 7-aminoactinomycin D qui sont des intercalants de l'ADN fluorescent.

1.3.4. Tests fonctionnels par mesure de métabolites

Toute activité cellulaire nécessite de l'énergie, cette énergie est portée par des métabolites tels que l'ATP, une augmentation de l'ATP intracellulaire indique une augmentation de l'activité de cellules. C'est le principe du test commercial standardisé ImmuKnow. Dans ce cas le sang complet est activé avec la PHA pendant 15 à 18 heures, les cellules T sont ensuite triées par séparation magnétique puis lysées pour pouvoir quantifier par colorimétrie la quantité d'ATP intracellulaire. Ce test approuvé par la FDA a pu montrer son efficacité dans la prévention des infections post greffe du foie chez l'adulte[33].

1.3.5. Tests de la fonction de sécrétion de cytokines

Les cytokines sont un des constituants majeurs de la communication intra-système immunitaire mais également entre les cellules du système immunitaire et les autres cellules de l'individu. En fonction des cytokines produites les cellules du système immunitaire mobilisées ainsi que leurs fonctions seront différentes. Il est donc très important de pouvoir déterminer si la réponse cytokinique d'un patient est adaptée aux situations rencontrées. Certains types d'allergies sont par exemple fortement dépendantes d'une production inadéquate d'IL5, IL4 et IL13, des cytokines produites par les lymphocytes T polarisés LTa2 qui induisent une production d'IgE des plasmocytes et

activent les mastocytes. Les IgE fixés sur les FcεR des mastocytes (récepteurs haute affinité pour les IgE) permettent la reconnaissance antigénique des allergènes par les mastocytes. Une fois activés les mastocytes libèrent des molécules inflammatoires dont l'histamine.

Des tests de sécrétion utilisant des antigènes sont effectués pour des patients immunodéprimés pour déterminer leur susceptibilité à certains pathogènes notamment les mycobactéries et les cytomégalovirus. Les infections par ces pathogènes sont en effet très courantes chez les patients ayant subi une greffe d'organe et qui doivent suivre une thérapie immunosuppressive. Les tests commerciaux QuantiferonTB et QuantiferonCMV ont été développés pour étudier la production d'interféron par les lymphocytes T CD8+. QuantiferonTB permet également le diagnostic de tuberculose latente. Ces deux tests nécessitent 16 à 24h d'incubation avant la lecture des résultats par ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay) (Figure 14). Des tests similaires (T-SPOT-TB) se basent sur une lecture par ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot) Figure 15) et non par ELISA. La lecture par ELISPOT au contraire de l'ELISA ne permet pas de quantifier précisément la

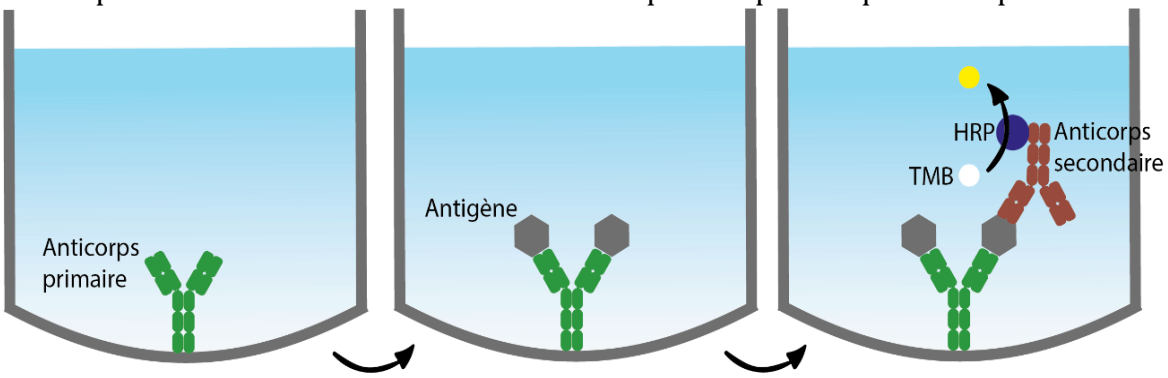


Figure 14 : Schéma de l'ELISA. Le but de l'ELISA est de mesurer la concentration d'une molécule soluble dans un échantillon en utilisant des anticorps spécifiques de la molécule à doser grâce à une révélation par coloration enzymatique. Pour cela il faut premièrement fixer au fond d'un puits un anticorps primaire anti-molécule d'intérêt, puis déposer l'échantillon avec la molécule à doser et enfin révéler la présence de la molécule avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme Peroxydase de raifort (HRP, Horseradish peroxidase) qui colore le substrat.

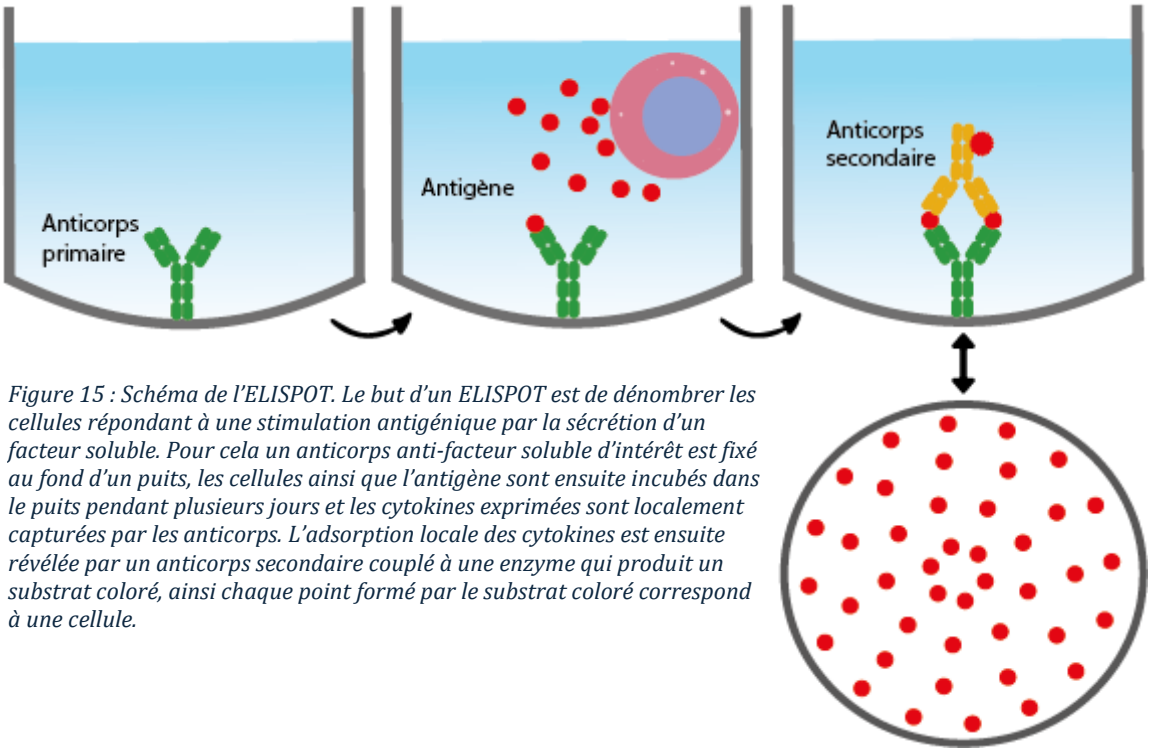


Figure 15 : Schéma de l'ELISPOT. Le but d'un ELISPOT est de dénombrer les cellules répondant à une stimulation antigénique par la sécrétion d'un facteur soluble. Pour cela un anticorps anti-facteur soluble d'intérêt est fixé au fond d'un puits, les cellules ainsi que l'antigène sont ensuite incubés dans le puits pendant plusieurs jours et les cytokines exprimées sont localement capturées par les anticorps. L'adsorption locale des cytokines est ensuite révélée par un anticorps secondaire couplé à une enzyme qui produit un substrat coloré, ainsi chaque point formé par le substrat coloré correspond à une cellule.

quantité d'interféron gamma produite cependant elle permet de déterminer une fréquence précise des lymphocytes T spécifiques de l'antigène tuberculinique.

D'autres tests plus généraux visent à mesurer une variété de cytokines à la suite d'une stimulation pendant 3 jours avec de la PMA/ionomycine et du LPS, séparément. Les cytokines sont ensuite dosées par cytométrie, l'analyse par cytométrie permet de déterminer un profil cytokinique Th1, Th2 ou Th17, elle est réalisée grâce à une technique utilisant des billes de capture fluorescentes (CBA, Cytometric Bead Array) qui permet de mesurer les cytokines dans le surnageant. Cette technique repose sur la capture des cytokines par des billes fluorescentes couvertes d'anticorps. La présence des cytokines est ensuite révélée par un anticorps secondaire fluorescent. Il est également possible de mesurer par cytométrie les cytokines intracellulaires, il faut pour cela bloquer leur sécrétion puis au moment du marquage il faut perméabiliser les cellules.

1.3.6. Tests de la fonction d'adhésion

La fonction d'adhésion à proprement parler fait référence aux protéines membranaire telles que les intégrines qui assurent une adhésion réversible des cellules. Cette fonction permet notamment aux leucocytes de migrer de la circulation vers les tissus à travers l'endothélium et de former des contacts avec les autres cellules, immunitaires ou non. Ainsi tester la fonction d'adhésion des leucocytes peut permettre la mise en évidence de défauts génétiques altérant la fonction d'adhésion d'une protéine d'adhésion. Par un test d'adhésion des neutrophiles d'un patient atteint d'une mutation sur le gène *FERMT3,* il a été montré qu'il était possible de distinguer le patient d'un contrôle. Le test d'adhésion des neutrophiles du patient sur un surface d'ICAM1 a permis de montrer un défaut d'adhésion critique porté par les intégrines β_2 [34].

L'adhésion des cellules sur un substrat couvert d'anticorps peut également être testée pour le diagnostic. Cela permet en effet de tester rapidement l'expression de marqueurs par les cellules s'il est suffisamment exprimé pour induire l'adhésion. Il est par exemple possible de tester l'adhésion pour 3 marqueurs CD25, CD69 et CD64 pour discriminer des patients atteint de sepsis des donneurs sains[35].

1.3.7. Tests fonctionnels par expression de marqueurs

L'expression d'un marqueur membranaire peut être prédictive ou témoigner de l'effectivité d'une fonction cellulaire. Par exemple le marqueur d'activation CD25 est exprimé après l'activation des lymphocytes T non Treg, et l'association de CD25 avec l'IL2 du milieu extra-cellulaire entraîne la prolifération. L'expression de CD25 est donc prédictive de la prolifération. L'expression de CD107a traduit la dégranulation des granules lytiques des cellules cytotoxique. CD107a est le marqueur de dégranulation le plus utilisé pour évaluer la cytotoxicité des cellules cytotoxiques. CD107a est présent sur la bicouche lipidique des granules lytiques et est exprimé sur la membrane lors de la dégranulation par la fusion des granules à la membrane. La dégranulation observée par

l'expression membranaire de CD107a est prédictive de la cytotoxicité, la corrélation entre l'expression CD107a et la mesure au Cr51 [36] montre un r^2 =0,83 (Spearman, pvalue=0,005) pour les NK. Pour les lymphocytes T CD8+ la corrélation entre Cr51 et CD107a [37] montre un r^2=0,95.

L'expression de CD40L (ou CD154) est un marqueur d'inflammation mais également d'activation en ce qui concerne les cellules T. Avec son ligand CD40, qui a une expression constitutive sur certaines cellules du système immunitaire, ils constituent un axe central dans la réaction immunitaire. L'expression de CD40L sur les cellules T mémoire cytotoxiques indique une réactivité vis-à-vis d'un antigène. Le test commercial Pleximmune se base sur cela pour évaluer le risque de rejet cellulaire sévère post greffe, essentiellement chez des patients de moins de 21 ans devant subir une greffe de foie ou de petit intestin. Ce test se base sur une coculture des PBMC du donneur et du receveur. Une augmentation de l'expression de CD40L par les cellules du receveur par rapport aux contrôles indique une baisse de chance de succès pour la greffe[38].

En conclusion, un grand nombre de marqueurs d'intérêt ont déjà été identifiés pour l'étude des fonctions cellulaires des cellules immunitaires, ils sont cependant faiblement exploités. Des tests automatisés et peu exigeants en ressources pourraient permettre d'explorer plus largement les fonctions cellulaires des patients et ainsi améliorer le diagnostic et la prise en charge de leurs pathologies.

1.4. Microscopie optique pour la mesure de fonction cellulaire

La microscopie optique a des applications dans de nombreux domaines scientifiques, tels que la géologie, la microélectronique et la biologie. Son principe qui date du XVIe siècle utilise les propriétés optiques de lentille de verre pour agrandir l'image d'un objet. L'image de cet objet est ainsi observable à l'œil grâce à un oculaire ou sur un ordinateur grâce à une caméra. Pour les besoins de notre projet, nous avons utilisé la microscopie inversée et plusieurs modes d'observation tels que la microscopie de fluorescence pour l'expression de marqueur cellulaire, l'interférométrie et la microscopie par réflexion totale interne de fluorescence pour l'observation de l'adhésion à un substrat.

1.4.1. Microscopie inversée

Dans un microscope inversé, l'objectif est au-dessous de l'échantillon. Cette configuration est particulièrement bien adaptée pour l'observation de cellules immunitaires qui sédimentent ou adhèrent sur un substrat, l'objectif pouvant être approché au plus près du substrat et des cellules. Nos échantillons sont ainsi composés d'une lamelle transparente, le plus souvent des lamelles de verre de 150 µm d'épaisseur (Figure 16). Nous avons utilisé un microscope Zeiss inversé Axio Observer qui est automatisé et pilotable depuis un ordinateur. Il dispose d'une source de lumière diascopique pour les acquisitions en transmission et d'une source de lumière épiscopique pour les acquisitions en microscopie de fluorescence et en microscopie interférentielle. Le microscope, à l'exception de la caméra, est dans une enceinte en plexiglass thermo-régulée permettant de maintenir les cellules à 37°c. A la fin de ma

thèse, le microscope a également été équipé d'un dispositif Okolab qui réplique les conditions d'un incubateur (37°C, 5% CO2, 100% humidité) tout en permettant l'observation au microscope.

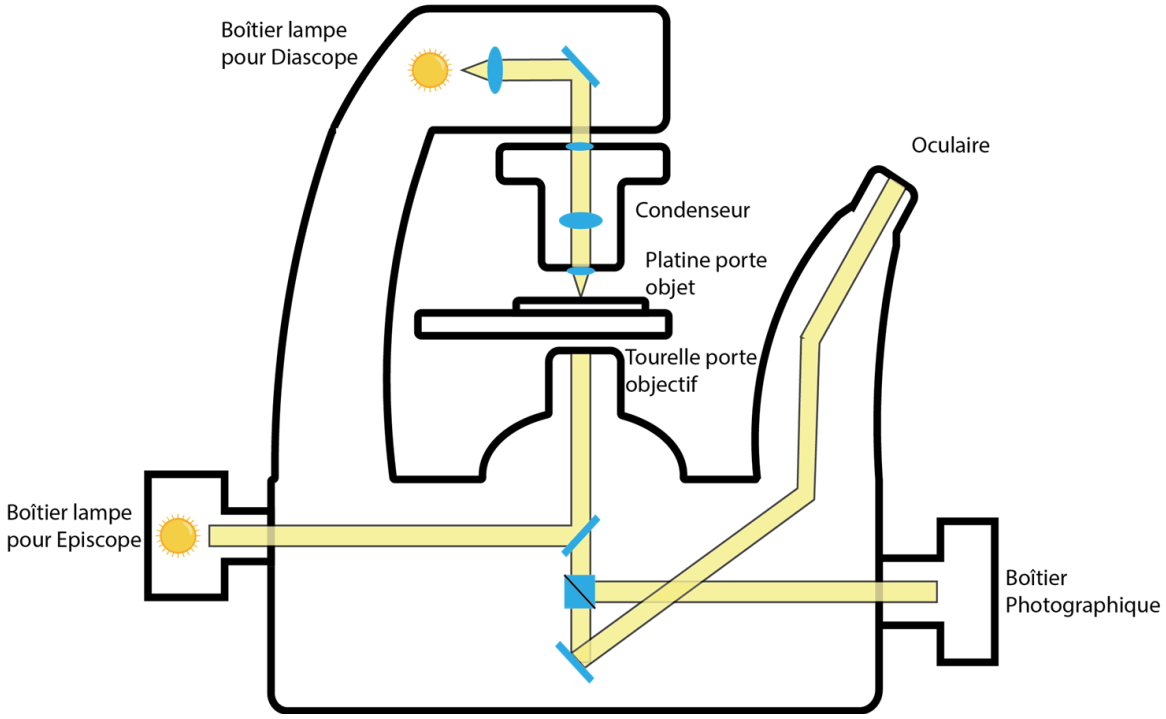


Figure 16 : Schéma d'un microscope optique inversé.

1.4.2. Microscopie à épifluorescence

La microscopie à épifluorescence permet l'observation de molécules de type fluorophores. Un fluorophore est une molécule, d'origine biologique ou non, qui est capable d'absorber la lumière à une certaine longueur d'onde et d'émettre ensuite de la lumière à une longueur d'onde plus grande (Figure 17). La microscopie à épifluorescence utilise un jeu de deux filtres passe-bande et un miroir dichroïque. La lumière incidente passe dans un filtre d'excitation passe-bande afin d'illuminer l'échantillon dans la gamme de longueurs d'ondes d'absorption du fluorophore, puis dans l'objectif et le spécimen d'intérêt. La lumière fluorescente émise par l'objet est collectée par le même objectif, ce qui permet d'éviter une grande partie de la lumière incidente diffusée par l'échantillon. La lumière est ensuite réfléchie par le miroir dichroïque (filtre passe-haut) qui coupe la lumière incidente rétrodiffusée. Enfin la lumière traverse un filtre d'émission (passe-bande) qui sélectionne une partie du spectre spécifique à la lumière émise par le spécimen par fluorescence. En biologie, les propriétés fluorescentes des molécules sont largement exploitées afin d'étudier les structures cellulaires, qui sont par nature peu contrastées en microscopie par

transmission, et de cibler les molécules d'intérêt par l'utilisation de fluorophore couplés à des anticorps.

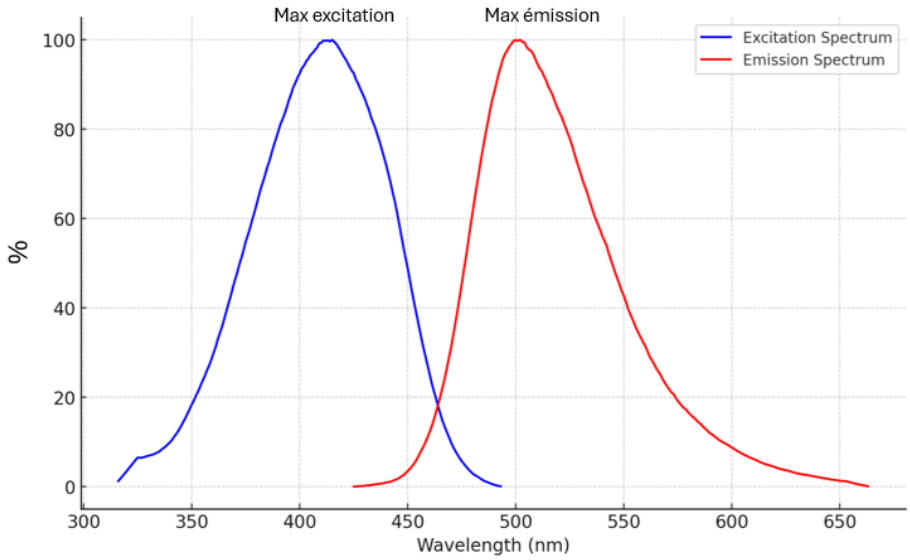


Figure 17 : Graphique des spectres d'excitation et d'émission du fluorophore Pacific Green

1.4.3. Microscopie interférentielle

La microscopie interférentielle est un outil très utile en biophysique pour imager l'empreinte adhésive d'une cellule sur un substrat transparent [39]. Elle repose sur les interférences entre les rayons de lumière réfléchis à l'interface entre le substrat et la solution d'une part, et l'interface entre la solution et la cellule proche du substrat d'autre part (Figure 18). La distance entre la cellule et le substrat conditionne la nature de l'interférence entre les rayons réfléchis. La résolution verticale de cette technique peut aller jusqu'à quelques nanomètres. Si la cellule est adhérente donc en contact très proche avec le substrat, l'interférence est plutôt destructive et la zone de contact est plus sombre que le substrat nu. Nous utilisons deux techniques de microscopie interférentielle, la microscopie par réflexion interférentielle (IRM, Interferential Réflexion Microscopy) et la microscopie à contraste interférentiel en réflexion (Reflexion Interference Contrast Microscopy, RICM). Le RICM se distingue par l'utilisation d'un objectif Zeiss antiflex qui intègre une lame quart d'onde et permet de réduire le signal parasite et d'augmenter le contraste. La microscopie interférentielle permet en principe de mesurer des distances entre objets et substrats moyennant une modélisation optique du signal prenant en compte les caractéristiques de l'objet, les réflexions multiples, le spectre d'illumination et les différents angles d'illumination [40,41].

Ce type de quantification a cependant des limites avec un objet optique aussi complexe qu'une cellule. Dans ce travail, une mesure précise de la distance ne sera pas nécessaire et l'identification de la surface de d'adhésion de la cellule sera uniquement considéré.

La technique d'imagerie Wet-SEEC [42–45] a été développée dans l'objectif d'étudier les dépôts organiques transparents et de très faible épaisseur sur des surfaces immergées. Elle se base sur l'utilisation de lames Wet-SURF optimisées pour fournir un fond noir pour les substrats nus et une forte augmentation de l'intensité réfléchie pour des films déposés d'épaisseurs nanométrique .

Les substrats Wet-Surfs sont fabriqués par l'application de plusieurs couches d'oxydes

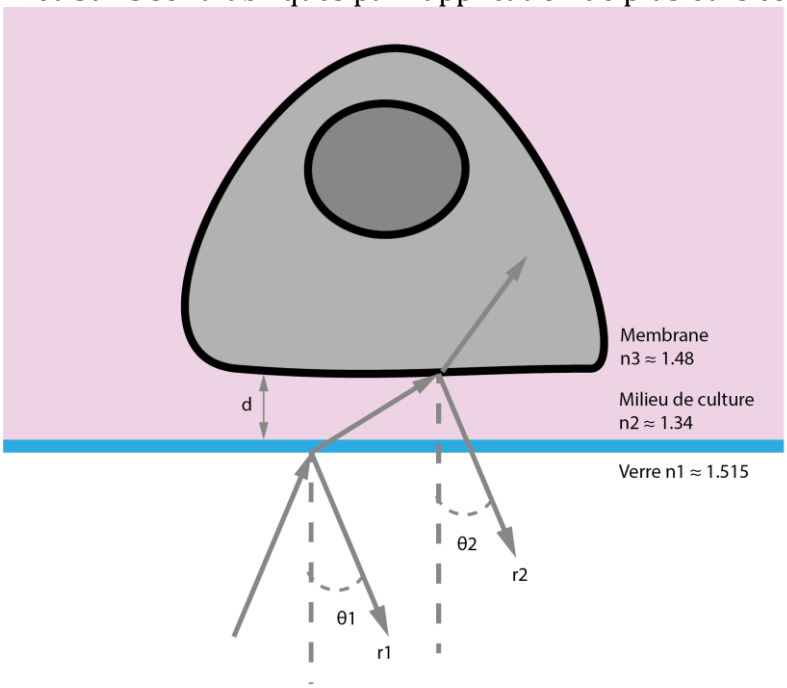


Figure 18 : schéma de la réflexion de la lumière sur la cellule sédimentée sur une lame de verre. La cellule est à une distance d de la lame de verre. Le faisceau réfléchi r1 est généré à l'interface entre le verre et le milieu de culture avec un angle ϑ1, r2 est généré à l'interface entre le milieu de culture et la membrane de la cellule avec un angle ϑ2.

inorganiques transparents. Par exemple une couche de MgF2 de 52 nm et une couche de SiO_2 de 40 nm sur des lames de verre classiques forment des substrats très efficaces en Wet-SEEC pour illumination épiscopique convergente. Ces lames utilisées conjointement avec le RICM rendent possible la mesure de l'épaisseur de dépôt à partir de 0,2nm. Nous avons utilisé ces lames dans l'objectif de mesurer les cinétiques de dépôt de différentes molécules sur les substrats activés.

1.4.4. Microscopie TIRF

La microscopie par Réflexion Totale Interne de Fluorescence (TIRF , Total Internal Reflection Fluorescence) est une technique de microscopie optique qui permet d'observer des événements à proximité immédiate d'une surface réfléchissante. Elle est typiquement utilisée en biophysique pour l'étude des processus dynamiques à la surface des cellules sédimentées ou adhérentes à la surface d'une lamelle de microscope. La microscopie TIRF repose sur le phénomène de réflexion totale interne, qui se produit lorsque la lumière passe d'un milieu à indice de réfraction élevé (comme le verre) à un milieu à indice de réfraction plus bas (comme l'eau ou le cytoplasme des cellules) et a un angle d'incidence supérieur à l'angle critique. Lors de cette réflexion totale interne, une onde évanescente est générée à l'interface entre les deux milieux, pénétrant seulement quelques centaines de nanomètres dans le milieu à faible indice de réfraction. Cette onde évanescente peut exciter des fluorophores situés très près de la surface, limitant ainsi l'excitation à une très fine couche de l'échantillon, typiquement quelques centaines de nanomètres (Figure 19). Ainsi si on illumine un échantillon biologique marqué avec un fluorophore il sera possible d'observer uniquement le marquage sur ces quelques centaines de nanomètres. Dans le contexte de notre projet, la microscopie TIRF nous a permis d'étudier le marquage de protéines membranaires à l'interface des cellules et des micro-motifs.

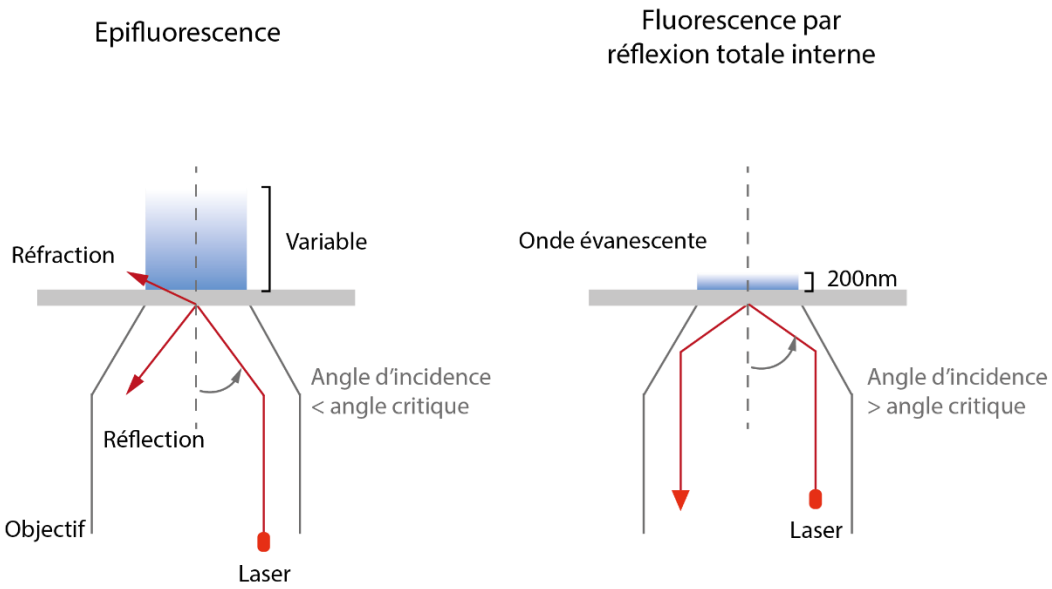


Figure 19 : Schéma comparatif entre la microscopie à épifluorescence et la microscopie par réflexion totale interne de fluorescence.

1.4.5. Microscopie spectrale

La microscopie spectrale est une technique avancée de microscopie qui combine l'imagerie optique avec l'analyse spectrale pour obtenir des informations détaillées sur la

composition chimique et les propriétés optiques des échantillons. La microscopie spectrale utilise des sources lumineuses variées (lumière blanche, lasers) pour illuminer l'échantillon. La lumière interagit avec l'échantillon et est adsorbée, réfléchie, ou émise (fluorescence ou phosphorescence). En analysant le spectre de la lumière émise il est possible de distinguer des fluorophores ayant des spectres d'émission très similaires. Cela permet d'augmenter le nombre de fluorophores pouvant être utilisés simultanément.

1.5. Création de micro-motifs de molécules sur des substrats

La création de micro-motifs sur une surface peut se définir comme la création de zones chimiquement ou physiquement différentes sur la surface d'un substrat. Plusieurs méthodes ont été développées pour la micro-impression de biomolécules dont une partie a été dérivée du domaine de la microélectronique.

Dans cette section sont présentées les différentes méthodes de réalisation de micro-motifs sur des surfaces, par écriture directe, avec des tampons, des masques ou par des systèmes microfluidiques. Sera également abordée plus en détail la méthode d'adsorption moléculaire induite par la lumière (LIMAP, Light Induced Molecular Absorption) utilisée dans cette thèse.

1.5.1. Création de micro-motifs en écriture directe

La création de micro-motifs en écriture directe comprend les méthodes par lesquelles la surface est modifiée par le balayage avec un « stylet » structurant le substrat par des moyens divers (Figure 20 A adaptée de [46]). Parmi ces moyens on trouve les techniques Inkjet (Figure 20 B adaptée de [47]) ou Dip-Pen Nanolithography (DPN) qui déposent sur le substrat de très faibles volumes de solutions, de l'ordre du picolitre. D'autres méthodes projettent un faisceau énergétique qui modifie chimiquement ou physiquement le substrat ; le faisceau peut être constitué de lumière (Figure 20 D, E, respectivement adapté de [48] et [49]), d'électrons ou d'ions. Les méthodes utilisant des faisceaux d'électrons (electron beam lithography, EBL) (Figure 20 C adaptée de [50]) ou d'ions (focus ions beam lithography, FIB) nécessitent des substrats secs et sous vide. Elles ont cependant une meilleure résolution que les méthodes utilisant des faisceaux de lumière qui sont limitées à environ 200nm. Également, les méthodes de Nanoshaving et de Nanografting utilisent la technique de microscopie à force atomique (Atomic Force Microcopy, AFM) pour graver mécaniquement la surface afin d'exposer une couche moléculaire. Un dernier type de méthode consiste à utiliser un champ électrique pour induire une réaction électrochimique, telle que l'oxydo-réduction, localement sur la surface.

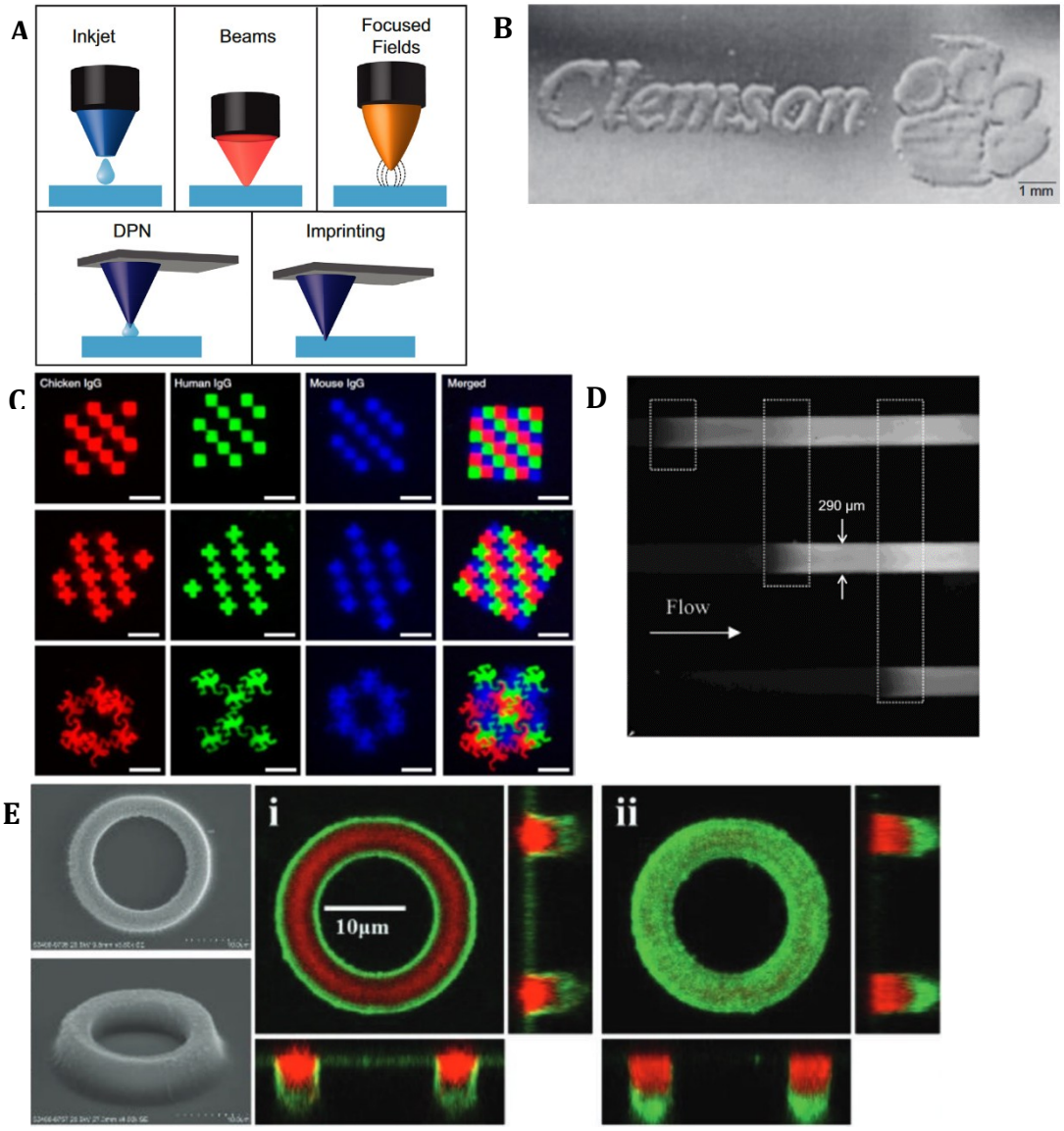


Figure 20 : Méthode de création de micro-motifs en écriture directe. (A) Schéma des différentes méthodes de création de micro-motifs en écriture directe (adaptée de Lee et al.). (B) Création de micro-motifs avec un faisceau lumineux (un laser à 488 nm) de 300 µm de diamètre. Des canaux micro fluidique sont couverts de fibrinogène puis le bleaching des molécules de biotine-4-fluorescéine en solution entraîne leur polymérisation sur le fibrinogène. Les patchs de biotines créés permettent l'attachement d'une enzyme qui catalyse un substrat en molécule fluorescente (adaptée de Holden et al.). (C) Lithographie par faisceau d'électrons de motifs protéiques multiples (échelle = 25 µm). Des molécules de polystyrenyl ether trehalose (poly(SET)) couplées à des protéines d'intérêt sont séquentiellement couplées de façon covalente à une surface de silicone. Les chaînes latérales de tréhalose de poly(SET) protègent les protéines imprimées du faisceau d'électrons et du vide (adaptée de Bat et al.). (D) Création de micro-motifs avec le dispositif Inkjet, dépôt de colonie d'Escherichia coli sur un substrat d'agarose (adaptée de Xu et al.). (E) Photopolymérisation à deux photons avec un laser 800 nm, une première couche de BSA (en rouge sur les images en fluorescence à droite) est polymérisée sur la surface puis une deuxième couche de matrice extra cellulaire (en vert) est d'abord polymérisée sur les côtés(i) et ensuite sur le dessus(ii) de la micro matrice de BSA. A droite image en microscopie électronique à balayage (adaptée de Huang et al.).

1.5.2. Création de micro-motifs avec des masques

La réalisation de micro-motifs avec des masques a rencontré un grand succès en microélectronique et a été adaptée pour les biomolécules. Le principe est qu'un masque module spatialement l'exposition du substrat à une illumination électromagnétique (souvent UV ou UV profond). Le masque peut être réalisé en différents matériaux et comporte des zones laissant passer la lumière dessinant ainsi un motif (Figure 21 adaptée de [46]). Cette technique nécessite un nouveau masque pour chaque nouveau motif à réaliser et la fabrication des masques est un processus long, onéreux et nécessitant des équipements particuliers. Elle a cependant l'avantage de pouvoir traiter de grandes surfaces rapidement avec une résolution possiblement nanométrique comme dans le cas des processeurs.

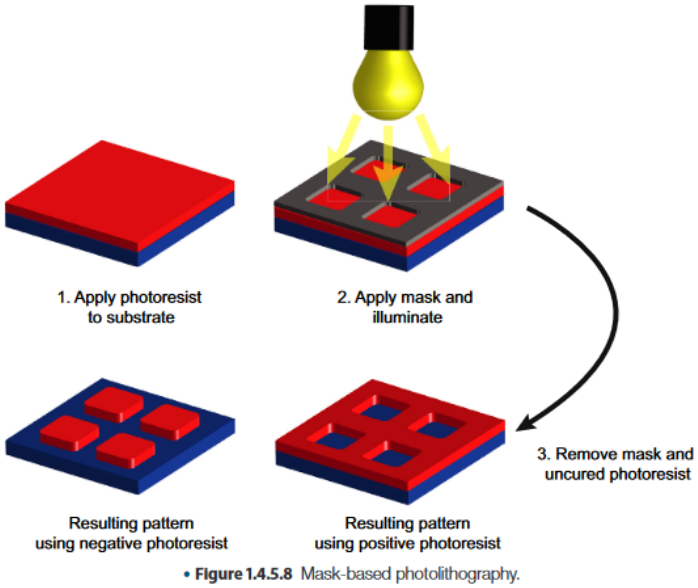


Figure 21 : Création de micro-motifs de surface avec des masques. Schéma des stratégies de création de micro-motifs avec des masques (adaptée de Lee et al.).

1.5.3. Création de micro-motifs avec des tampons

Le principe de la création de micro-motifs avec des tampons en élastomère est de déposer des motifs de molécules par contact sur une surface avec un tampon couvert de

molécules. Les tampons sont fabriqués par photolithographie douce. Un masque est utilisé pour la réalisation de moules avec des résines photosensibles. Ces moules de structure 3D sont ensuite moulés avec un élastomère, le plus souvent du polydiméthylsiloxane [O-Si(CH-3)2]n ou PDMS (Figure 22 A adaptée de [46]). En utilisant des repères d'alignement sur une surface de silicium nanoporeuse Ng et al [51] ont réalisé des micro-motifs multiples avec des tampons (Figure 22 B). Un repère d'alignement sur la surface de silicium a permis d'aligner un motif de fluorescéine (FITC) et un motif de Tetramethylrhodamine (TRITC). L'avantage de ces méthodes est de pouvoir rapidement créer un grand nombre de motifs avec des tampons optimisés. Les désavantages principaux de ces approches concernent le manque de contrôle des quantités déposées sur les surfaces, et une possible dénaturation des protéines d'intérêt à la fois sur le tampon et sur la surface du fait que l'étape de tamponnage soit faite à sec.

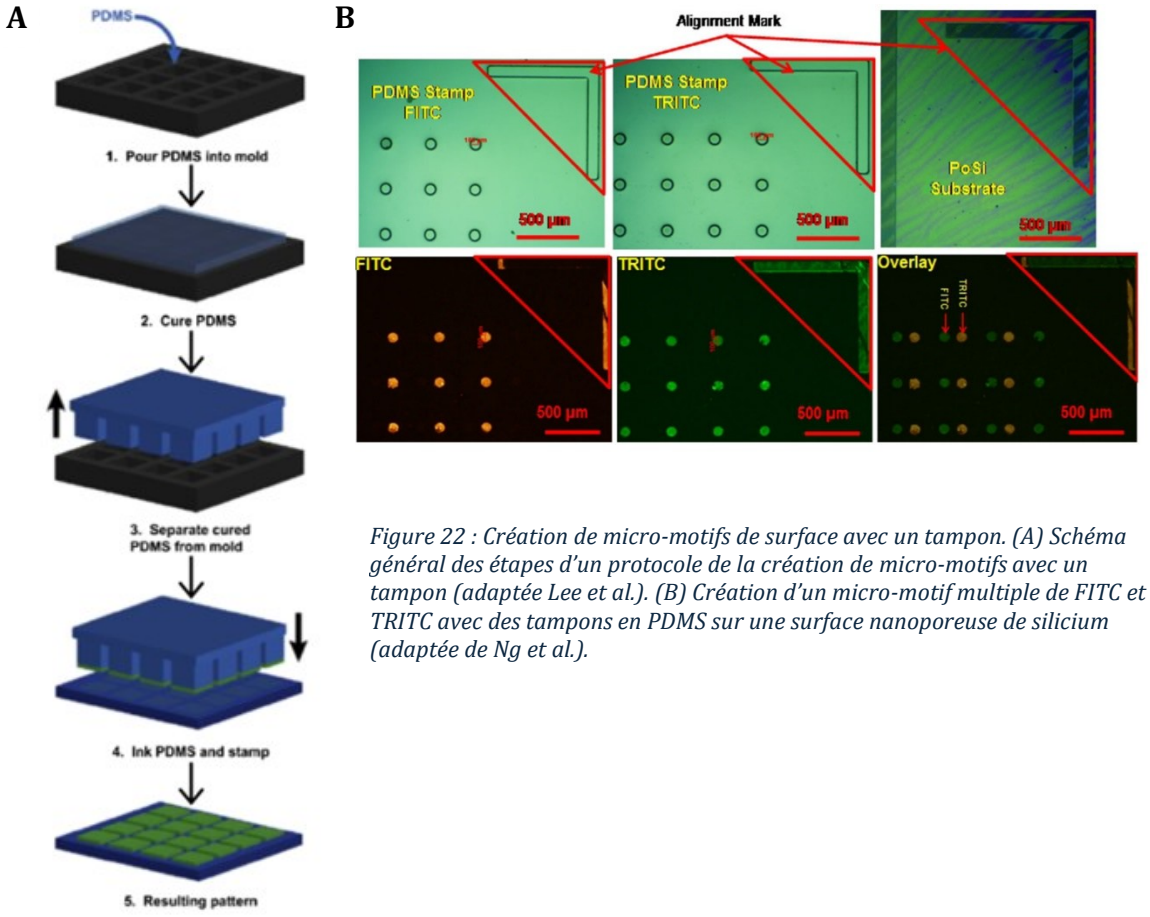


Figure 22 : Création de micro-motifs de surface avec un tampon. (A) Schéma général des étapes d'un protocole de la création de micro-motifs avec un tampon (adaptée Lee et al.). (B) Création d'un micro-motif multiple de FITC et TRITC avec des tampons en PDMS sur une surface nanoporeuse de silicium (adaptée de Ng et al.).

1.5.4. Création de micro-motifs avec des systèmes micro fluidique

La création de micro-motifs sur de substrats avec des dispositifs de micro fluidique a par exemple permis la création de motifs de gradients de fluorescéine. Le principe est de transférer un gradient soluble sur une surface adhésive, le gradient soluble étant généré par un dispositif de micro fluidique dédié (Figure 23 adaptée de [52]). Cette méthode

permet la réalisation de micro-motifs sur de grandes surfaces sans appareil coûteux. Cependant, elle est très restreinte en termes de motifs réalisables, notamment parce qu'il est difficile de moduler le processus de transfert depuis le volume vers la surface.

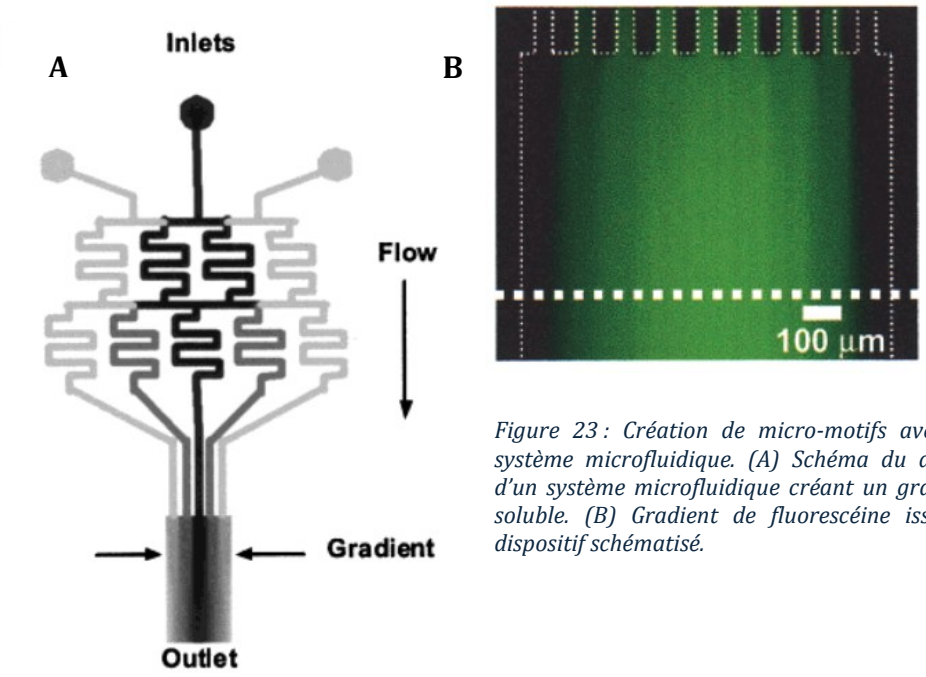


Figure 23 : Création de micro-motifs avec un système microfluidique. (A) Schéma du design d'un système microfluidique créant un gradient soluble. (B) Gradient de fluorescéine issu du dispositif schématisé.

1.5.5. Adsorption de molécule induite par la lumière

La méthode de création de micro-motifs utilisée dans cette thèse est la méthode LIMAP développée par Vincent Studer [53]. Elle se base sur l'utilisation d'un faisceau lumineux pour créer des motifs micrométriques de protéines sur un substrat humide. Pour cela, un dispositif à micro-miroirs (*DMD,* Digital Micro-miror Device) illuminé par un faisceau UV crée une image qui projetée sur un substrat par un microscope inversé en mode épiscopique. Ce dispositif permet de projeter des motifs avec une résolution micrométrique. La lumière UV excite un photo-initiateur hydrosoluble qui forme des radicaux libres. Ces radicaux libres modifient localement la chimie de surface du substrat créant ainsi des motifs sur la surface.

Le poste d'impression de surface utilisé pour la réalisation de la méthode LIMAP est constitué d'un microscope inversé Nikon Ti auquel est couplé un dispositif commercial Primo qui est distribué par l'entreprise Alvéole. Le dispositif Primo comprend un laser UV et un DMD. Les micromiroirs du DMD sont individuellement pilotables par ordinateur, en fonction de leur orientation, ils réfléchissent la lumière vers le microscope ou vers un piège optique. Cela permet de créer des motifs avec la lumière réfléchie (Figure 24). Ainsi pour pouvoir imprimer un motif il faut créer une image en 8 bits à des dimensions

données (1824x1140 pixels) du motif à imprimer. Le DMD permet également la création simple de gradient par la rotation des miroirs du DMD, ainsi le temps d'exposition d'une zone dépend du niveau de gris des pixels de cette zone dans l'image entrée. Le microscope comme le dispositif primo sont entièrement pilotables depuis un ordinateur avec des programmes dédiés. Comparée aux méthodes traditionnelles de micro-impression de protéines la technique LIMAP présente certains avantages :

- Elle ne nécessite pas de masque, les motifs sont créés grâce au DMD.
- Elle autorise la réalisation de gradients, également grâce au DMD qui peut faire varier localement les temps d'exposition au laser UV.
- Elle rend accessible l'impression multiple en utilisant des repères de molécules fluorescentes.
- Elle est fortement biocompatible par le fait que les substrats peuvent être conservés immergés dans une solution adaptée à la conservation des protéines comme le PBS.
- Elle permet un contrôle moléculaire du dépôt de protéine du fait que l'adsorption se déroule en solution, ce qui permet le contrôle précis des concentrations des molécules en solution et des temps d'incubation.
- Elle permet d'imprimer plusieurs motifs successifs et d'aligner ces différents motifs à l'échelle microscopique.

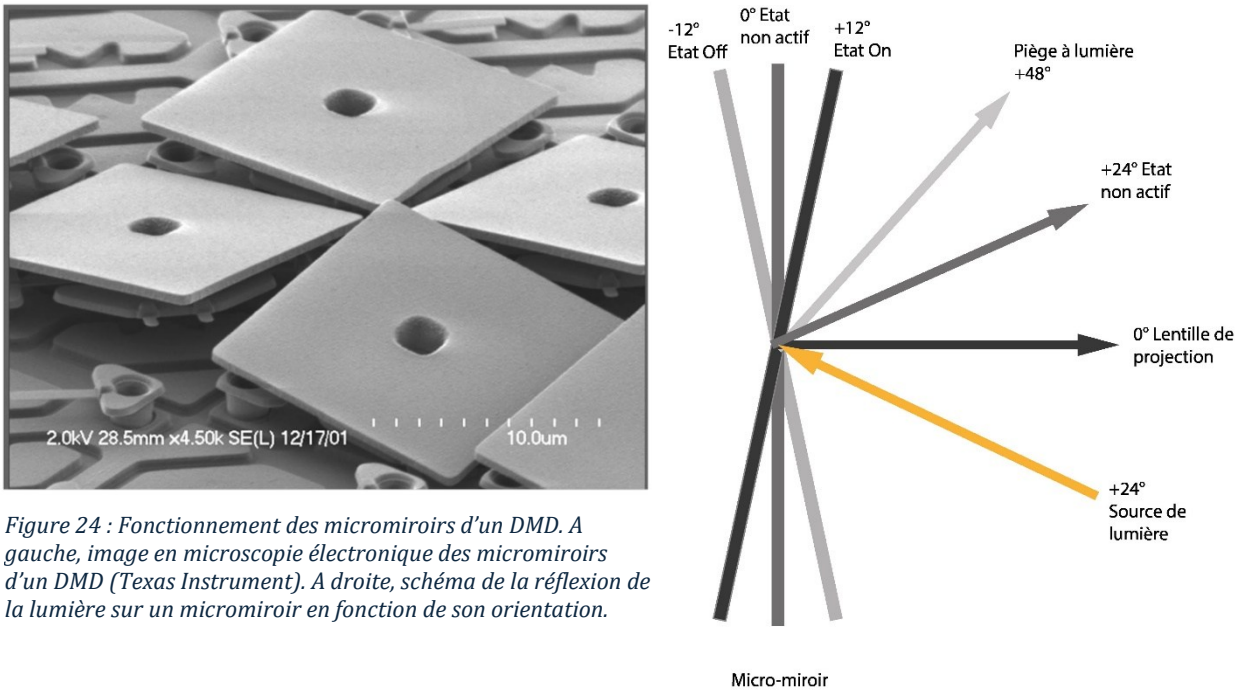


Figure 24 : Fonctionnement des micromiroirs d'un DMD. A gauche, image en microscopie électronique des micromiroirs d'un DMD (Texas Instrument). A droite, schéma de la réflexion de la lumière sur un micromiroir en fonction de son orientation.

Plusieurs approches sont possibles pour créer des micro-motifs de protéines :

La première est de préalablement couvrir la surface de la biomolécule d'intérêt puis de la dégrader localement pour former un motif. Cette méthode est rapide mais ne permet pas l'impression multiple[54].

La deuxième approche[53], celle utilisée dans notre projet, consiste à couvrir la surface d'une couche de molécule antiadhésive puis de la dégrader localement afin que la biomolécule d'intérêt puisse s'adsorber, cette méthode nécessite des temps d'expositions plus longs mais permet l'impression multiple (Figure 25).

Le photo initiateur est accessible soit en solution dans du PBS (PLPP), soit sous une formulation en gel (PLPP gel). Le PLPP est compatible avec la conservation des protéines déjà imprimées et permet l'impression multiple séquentielle. Le PLPP gel est adapté aux mono-impressions uniquement car il dégrade les protéines et son intérêt est de permettre des impressions jusqu'à 30 fois plus rapides.

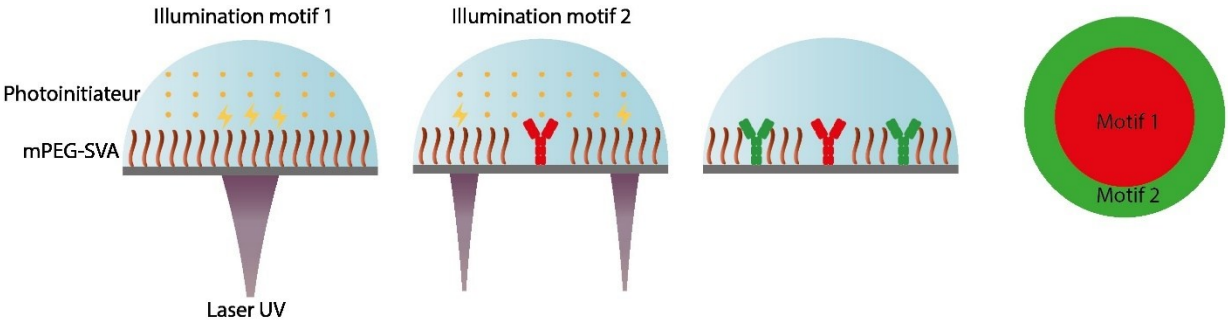


Figure 25 : Schéma des étapes pour la réalisation de micro-motifs multiples avec la méthode LIMAP.

1.5.6. Réalisation de micro-motifs protéiques

Les substrats à imprimer sont réalisé en déposant sur une lame de verre silanisé une couche anti-adhésive de Methoxy Polyethylene Glycol Succinimidyl Valerate (mPEG-SVA). Lors de l'impression le motif de lumière UV est projeté sur la surface activant les molécules de photo-initiateur qui produisent des radicaux libres. Les radicaux libres dégradent localement les chaînes de PEG-SVA ce qui rend le substrat adhésif pour les protéines incubées par la suite. Ce processus est répété pour créer des motifs de différentes protéines, permettant l'impression séquentielle de multiples biomolécules sur le même substrat [53]. Geoffrey Delhaye[55] a mis à profit cette fonctionnalité pour réaliser les premiers prototypes de micropuces pour diagnostics immunitaires à plusieurs motifs d'anticorps différents. Il a cependant montré que la passivation des zones fonctionnelles

existantes pour éviter la contamination par les protéines des zones fonctionnelles imprimées ultérieurement est un enjeu délicat. La passivation à la BSA est incomplète et ne permet pas d'empêcher une contamination importante. G Delhaye a obtenu une passivation très satisfaisante avec le PEG-SVA qui limitait la contamination croisée à moins de 1% mais cette efficacité avait pour contrepoids une dégradation partielle des protéines imprimées.

Les principales protéines imprimées pour ce projet sont des anticorps. Cependant, de par sa structure un anticorps imprimé ne sera fonctionnel que si son orientation permet une exposition des paratopes. Si un anticorps est adsorbé sur la surface par sa partie variable il ne sera pas apte à capturer un antigène. Dans le cas de l'ELISA l'adsorption des anticorps sur la surface du puits de façon aléatoire donne une fonctionnalité finale des anticorps inférieure à 10% [56].

En conclusion, LIMAP est une méthode avancée pour l'impression de micro-motifs à zones fonctionnelles multiples, combinant haute résolution, rapidité et compatibilité avec divers substrats et biomolécules. Elle ouvre des possibilités étendues pour l'étude des interactions moléculaires et le contrôle de l'adhésion cellulaire, avec des applications potentielles dans la recherche biomédicale.

1.6. Projet de thèse

1.6.1. Motivations :

Les facteurs génétiques et environnementaux rendent chaque individu unique, y compris en ce qui concerne notre biologie. Les pathologies, les traitements et les soins peuvent avoir des impacts très variables en fonction des personnes. Les pathologies complexes et hétérogènes comme les cancers ou les sepsis nécessitent une stratification des patients afin d'appliquer le bon traitement au bon patient et au bon moment. L'exemple récent du COVID illustre bien que des différences imperceptibles en temps normal entre deux individus peuvent se révéler critiques en cas d'infection. Si des facteurs de risque tels que l'obésité ou la vieillesse ont été parfaitement identifiés, beaucoup de patients ont été admis en soins intensifs sans avoir de facteurs de comorbidité identifiés. La médecine personnalisée entend mieux prendre en compte les différences entre patients pour mieux les traiter ou les diagnostiquer, pour obtenir de meilleurs taux de survie ou de rémission et des coûts de prise en charge. L'approche génétique ou protéomique pour caractériser les susceptibilités de chacun présente des avantages certains mais elle est limitée par l'état des connaissances qui relient les gènes à leurs fonctions ou par l'accès au séquençage. Une approche fonctionnelle permet d'éviter la complexité du fond génétique et des facteurs environnementaux pour directement établir les résistances et les susceptibilités effectives du patient. Les tests fonctionnels des propriétés des cellules immunitaires permettent de mesurer directement les particularités de chaque patient par rapport à des expositions à des agents infectieux ou des traitements thérapeutiques. Ils peuvent donc être des outils précieux pour envisager de nouvelles possibilités de la médecine personnalisée.

Les efforts de la recherche clinique pour identifier des tests fonctionnels de cellules immunitaires permettant de prédire des situations cliniques, ou pour ajuster des traitements, ont pu rencontrer certains succès. Après une greffe d'organes solides, l'immunosuppression médicamenteuse qui inhibe le rejet du greffon peut entraîner des infections potentiellement mortelles. Les essais cliniques testant l'ajustement des prescriptions d'antibiotiques en fonction des résultats de tests fonctionnels de sécrétion d'interféron de type 2, avec un antigène comme stimulant, ont montré un bénéfice pour la santé des patients [57].

Cependant, la faible utilisation des tests fonctionnels des cellules immunitaires par les cliniciens est persistante dans le domaine médical. Cette situation est principalement due à plusieurs contraintes majeures. Tout d'abord, le temps nécessaire pour la mise en œuvre de ces tests dépasse souvent les 24 heures, ce qui n'est pas compatible avec certains besoins cliniques. Ensuite, ces tests exigent des ressources humaines importantes et des qualifications spécifiques, notamment pour manipuler des équipements complexes comme les cytomètres en flux, ce qui occasionne des coûts importants. Par ailleurs, les cytomètres sont coûteux à l'achat, à l'entretien et en réactifs. Cette combinaison de facteurs contribue à une sous-utilisation significative des tests fonctionnels des cellules immunitaires. Des tests innovants plus courts et moins coûteux en ressources humaines et matériels pourraient trouver de nouvelles applications. Notamment dans la gestion des cas d'urgence pour lesquels les tests fonctionnels ne sont pas envisageables, car le résultat serait disponible trop tard. Il est à noter qu'un test demandant moins de qualification et de temps pour les techniciens hospitaliers pourrait permettre d'augmenter le nombre de tests réalisables avec les mêmes ressources.

1.6.2. Projet :

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de thèse de Geoffrey Delhaye[55] qui ont donné lieu au dépôt d'un brevet. Geoffrey Delhaye au cours de sa thèse a démontré la faisabilité d'un test fonctionnel des lymphocytes T humains se basant sur des substrats « intelligents » multi-imprimés avec des anticorps. Le principe de ces substrats intelligents est de réaliser toutes les étapes d'un test fonctionnel, stimulation, incubation et révélation de l'activation, par l'adhésion des cellules sur des motifs d'anticorps à zones fonctionnelles multiples. Le substrat développé par Geoffrey Delhaye comprend des motifs de dimensions subcellulaires à deux zones fonctionnelles. La fonction de la première zone fonctionnelle est de capturer et d'activer les cellules T avec des anticorps anti-CD45, anti-CD3 et anti-CD28. La fonction de la deuxième zone est de révéler l'expression du marqueur d'activation précoce CD69 avec des anticorps anti-CD69 (Figure 26).

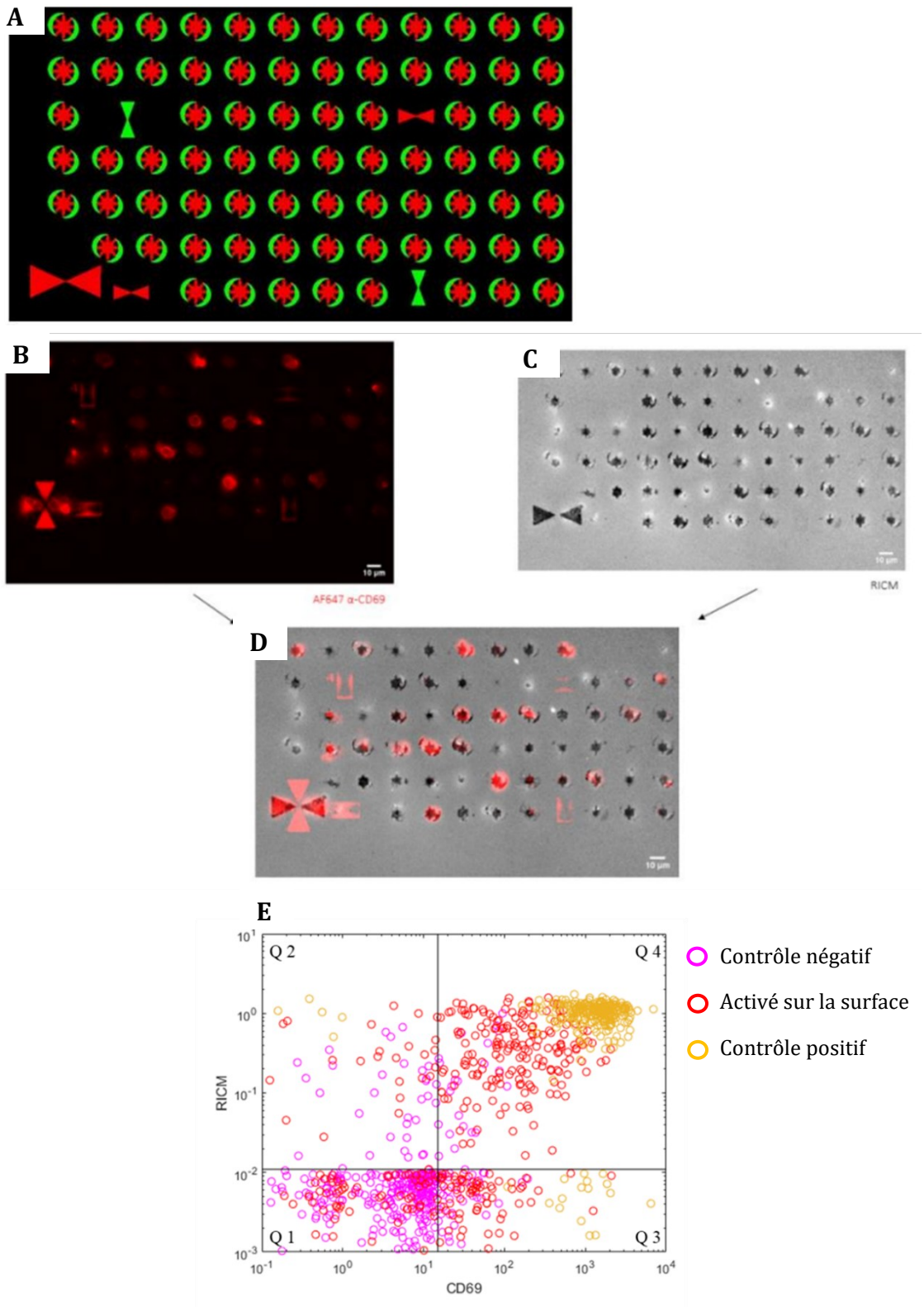


Figure 26 : Preuve de concept du test d'activation des cellules T mémoire avec des motifs d'anticorps à deux zones fonctionnelles réalisé par Geoffrey Delhaye, toutes les figures sont adaptées de la thèse de Geoffrey Delhaye. (A) superposition des images numériques du motif à deux zones fonctionnelles pour le test d'activation des cellules T mémoire, en rouge zones fonctionnelles composées d'anticorps anti-CD3, anti-CD28 et anti-CD45, en vert zones fonctionnelles composées d'anticorps anti-CD69. (B) Image en épifluorescence pour CD69 des cellules T mémoire incubées pendant 3 heures sur le motif à deux zones fonctionnelles décrit en (A). (C) Image de l'adhésion en RICM des cellules T mémoire incubées pendant 3 heures sur le motif à deux zones fonctionnelles décrit en (A). (D) Superposition des images (B) et (C). (E) Corrélation entre l'adhésion sur la zone fonctionnelle anti-CD69 et la fluorescence pour CD69 par cellule en fonction de la condition des cellules : contrôle négatif, activé sur surface et contrôle positif. Les cellules du contrôle négatif ont été déposées sur un motif non activateur, sans les anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Les cellules activées sur surface ont été incubées 3h sur des motifs activateurs. Les cellules du contrôle positif ont été préactivées durant une nuit avec des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. L'adhésion des cellules sur les zones fonctionnelles anti-CD69 est exprimée en pourcentage.

CD69 est exprimé en quelques heures après l'activation des lymphocytes T. Un pic d'expression intervient 24h post activation, suivi d'une diminution de l'expression et d'une dilution du marqueur au fur et à mesure de la prolifération [58]. Le rôle physiologique de CD69 sur les cellules T est de les maintenir dans le ganglion. D'autres marqueurs d'activation tels que CD25 et HLA-DR ont des cinétiques d'expression plus lentes et sont moins intéressants pour notre objectif de développement d'un test rapide. Plusieurs études ont été réalisées pour étudier la corrélation entre l'expression de CD69 et la prolifération. Dans le cas d'une stimulation avec candidat une corrélation de $r^2 = 0,82$ entre la prolifération mesurée par CFSE et expression de CD69 [59] est observée . Dans le cas d'une stimulation par PHA, il a été observé une corrélation de r=0,68 pour les CD4+ et r=0,59 pour les CD8+ entre l'expression de CD69 et la prolifération mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée [60]. Ces études ont ainsi montré l'intérêt de mesurer l'expression de CD69 pour prédire la prolifération.

Les travaux de Geoffrey Delhaye se terminaient sur une preuve de concept du test décrit ci-dessus, et le chemin était encore long pour pouvoir proposer ce test aux praticiens hospitaliers. Ainsi, les objectifs de développement visés au début de cette thèse étaient :

- Accumuler des données de mesures d'activation leucocytaires sur micropuces afin de conforter les résultats précédemment acquis par Geoffrey Delhaye.
- Développer un motif permettant une lecture plus quantitative de l'expression d'un marqueur d'activation par les cellules.
- Augmenter le nombre de zones fonctionnelles imprimées sous une cellule pour multiplexer les informations à l'échelle des cellules uniques.
- Étudier la capacité du test à discriminer des échantillons de patients atteints de sepsis. Du fait du délai d'obtention des échantillons de patients, un modèle de dose réponse avec une molécule thérapeutique inhibitrice de l'activation des cellules T a finalement été utilisé.

2. Résultats et discussion

Le projet de thèse a débuté en reprenant les protocoles développés par Geoffrey Delhaye durant sa thèse. Les protocoles qui concernent l'impression des anticorps ont été optimisés durant ma thèse, notamment en ce qui concerne les méthodes d'incubation des molécules sur les substrats activés. Les autres protocoles de culture cellulaire et

traitement de surface, n'ayant pas été modifiés, sont présentés dans la section protocole de ce manuscrit, le protocole d'impression développé par Geoffrey Delhaye est lui présenté dans la section 2.2 et les optimisations apportées par mes travaux seront détaillées au fur et à mesure dans la section résultats.

2.1. Composition des motifs d'anticorps pour les tests d'activation

L'adhésion d'une cellule à une surface fonctionnalisée avec des anticorps est dépendante de la quantité des liaisons formées entre les anticorps et leurs antigènes sur la membrane cellulaire. Ainsi le niveau d'expression et l'accessibilité (notamment conditionnée par la taille) d'une protéine membranaire sont des paramètres limitants pour induire une adhésion par des anticorps sur une surface. Il est donc nécessaire d'effectuer des tests d'adhésion pour chaque protéine membranaire que l'on voudrait utiliser. G.D a précédemment mis en évidence l'importance de l'utilisation d'un anticorps anti CD45 avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pour l'adhésion et la résistance au flux des cellules (Figure 27). Cependant CD45 joue un rôle ambigu dans l'activation des cellules T, comme détaillé dans le chapitre 1.2, et la nécessité d'un anti-CD28 pour activer les lymphocytes T mémoire est discutée. Dans l'objectif de tester à la fois un effet d'inhibition de l'activation par l'anti-CD45 et la nécessité d'utiliser un anti-CD28, nous avons testé l'effet de différents mélanges d'anticorps sur l'adhésion de lymphocytes. Pour cela, les mélanges d'anticorps ont été adsorbés sur la surface de canaux puis les cellules T mémoire ont été déposées et incubées pendant trois heures. Puis des images en RICM ont été acquises ainsi que des images en fluorescence après le marquage de CD69. Les résultats montrent que la présence d'anticorps anti-CD45 ou anti-CD45RO permet d'augmenter la surface d'adhésion moyenne ainsi que la fréquence d'adhésion, ce qui est en accord avec les résultats de G Delhaye. Concernant l'activation mesurée par l'expression de CD69, l'absence de l'anticorps anti-CD28 semble diminuer l'activation d'une portion des cellules T mémoire. Si la fluorescence maximale observée reste similaire, la moyenne et le minimum de fluorescence sont significativement plus faibles en absence d'anti-CD28 (Figure 28). Il est à noter que la surface et la fréquence d'adhésion ne semblent pas liées au niveau d'activation mais à la présence d'anti-CD45 ou anti-CD45R0. Nous avons donc pris la décision d'utiliser un mélange d'anticorps anti-CD28 et anti-CD3 pour activer les cellules T mémoire, tout en conservant l'anti-CD45 ou anti-CD45RO pour favoriser l'adhésion.

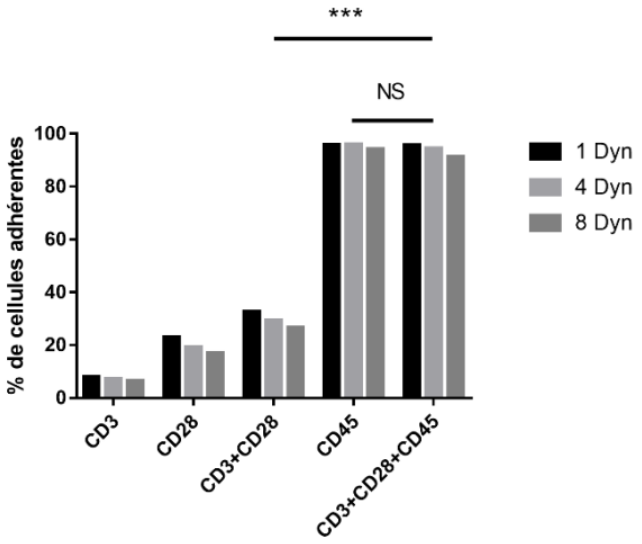
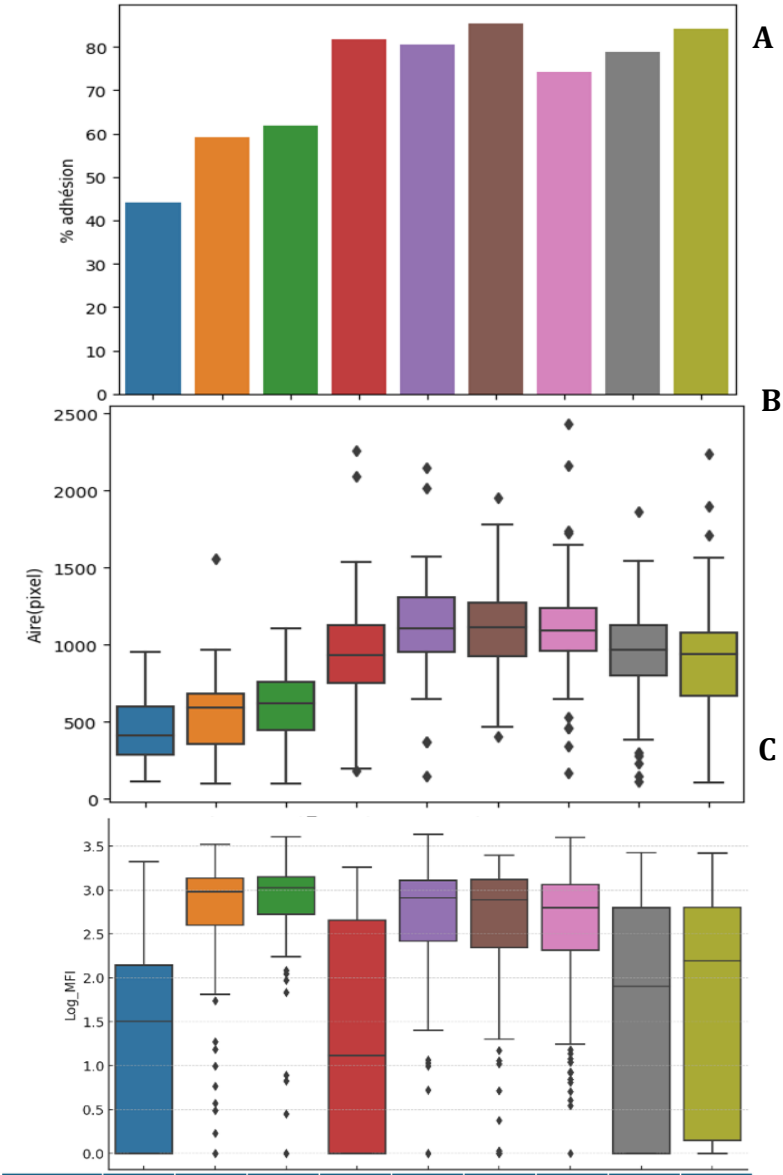


Figure 27 : Fréquence de lymphocytes T mémoire adhérents en fonction du flux et des anticorps sur la surface. Les anticorps sont couplés de façon homogène sur la surface de canaux. Dans les cas où les anticorps sont utilisés conjointement les anticorps anti-CD3/CD28 sont incubés sur les surfaces dans des proportions égales, les anticorps anti-CD45 représentent un cinquième de la concentration totale en anticorps.



	1	2	3	4	5	6	8	9	10
CD45	0	0	0	0	50	0	0	0	0
CD45R0	0	0	0	50	0	22	11	22	11
CD3	200	200	100	200	100	100	100	200	200
CD28	0	66	100	0	100	100	100	0	0

Figure 28 : Mesure de l'adhésion et de l'expression de CD69 des lymphocytes T mémoire en fonction des anticorps sur la surface et de leur concentration en solution en µg/ml. (A) Pourcentage de cellule détectée adhérentes en RICM. (B) Surface d'adhésion des cellules en RICM. (C) Fluorescence moyenne des cellules pour CD69. Les cellules ont été incubées dans les canaux 3 heures à 37°c puis fixées et marquées pour CD69.

2.2. Caractérisation des motifs imprimés d'anticorps

Comme décrit précédemment dans la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, p our réaliser les micro-motifs nous utilisons la méthode LIMAP pour localement dégrader une couche anti-adhésive de methoxy-poly(éthylèneglycol) succinimidyl valerate (mPEG-SVA). Le traitement de surface utilisé est issu des travaux de thèse de Geoffrey Delhaye. Il est nécessaire d'avoir un traitement de surface permettant l'impression multiple, donc une surface antiadhésive activable localement par illumination UV. Le traitement antiadhérent de mPEG-SVA est appliqué après que la lame de verre soit nettoyée et oxydée avec du plasma puis silanisée avec du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTS) en phase aqueuse. La silanisation du verre permet l'obtention de groupes amines libres auxquels peuvent venir ensuite se greffer les molécules de mPEG-SVA.

Afin de contrôler le bon fonctionnement de la méthode, la densité d'anticorps imprimés est quantifiée par l'utilisation d'anticorps secondaires anti-isotypes couplés à des fluorochromes. Pour l'impression des motifs 2 et 3, nous utilisons des anticorps d'origine murine et d'isotype IgG1 ou IgG2a. Les anticorps d'isotype IgG1 sont les anticorps anti-CD3, anti-CD28 et anti-CD45, tandis que l'anticorps d'isotype IgG2a est l'anticorps anti-CD69. D'après nos résultats, on observe une densité en moyenne plus élevée avec l'anticorps IgG2a (Figure 29). Les anticorps anti-IgG1 et anti-IgG2a sont couplés à des molécules fluorescentes différentes, Alexa Fluor 647 et Alexa Fluor 488 respectivement, ce qui pourrait créer un biais de mesure du fait des propriétés différentes de ces molécules fluorescentes. Si la différence de densité observée n'est pas due à un biais de mesure, elle pourrait s'expliquer par la différence de composition des structures N-glycanniques présentes sur la partie Fc des anticorps. Il est impossible de conclure sur l'origine de la différence de densité observée en l'état, il faudrait quantifier les densités des deux isotypes d'anticorps en utilisant la même molécule fluorescente pour les deux.

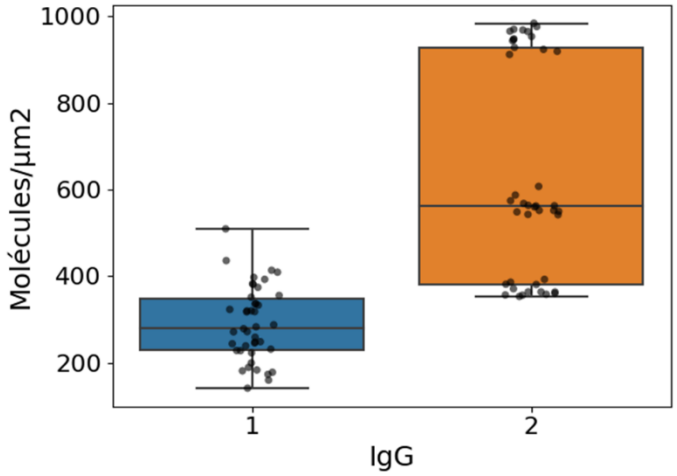


Figure 29 : Densité des anticorps imprimés en fonction de l'isotype, l'anticorps IgG1 est l'anti-CD3, l'anticorps IgG2a est l'anti-CD69. n = 3

La révélation des anticorps couplés à la surface est réalisée avec un anticorps secondaire couplé à un fluorophore, l'anticorps secondaire est spécifique de la partie Fc de l'anticorps primaire et ne traduit donc pas obligatoirement la fonctionnalité des anticorps. Le signal produit par le fluorophore est directement proportionnel à la quantité de d'anticorps

couplé à la surface. Le calcul de la densité d'anticorps sur la surface à partir des intensités de fluorescence est détaillé dans la section matériel et méthode.

2.3. Optimisation du protocole d'adsorption des anticorps sur les substrats

Les travaux précédents de Geoffrey Delhaye ont montré qu'incubé à 4°c la densité maximale d'anticorps était atteinte après une nuit d'incubation. Afin d'accélérer le protocole, qui en l'état nécessitait 24 heures pour chaque zone fonctionnelle, nous avons voulu comparer une incubation sur une nuit à 4°c avec une incubation sur une heure à 37°C dans un incubateur à CO_2. Ces expériences d'adsorption sont réalisées dans des puits micro fabriqués sans flux et sans agitation. N'ayant pas observé de différences entre les deux méthodes d'incubation (Figure 30), nous avons conclu que nous pouvions incuber les anticorps 1 heure à 37°C sans diminuer la densité. Il est à noter que la dégradation potentielle des anticorps a été prise en compte dans ces expériences, en effet les substrats étaient imprimés à J0 et révélés pour les deux conditions à J1.

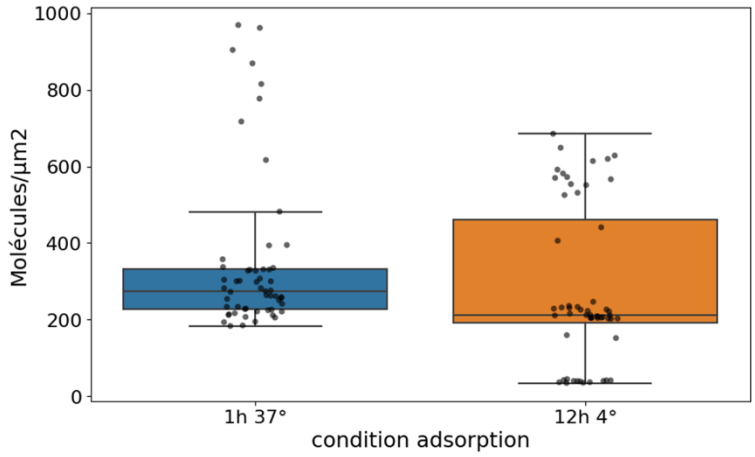


Figure 30 Densité des anticorps anti-CD45 imprimés en fonction des conditions d'adsorption, 1 heure à 37°c et 12 heures à 4°c. n = 3

Une méthode plus courte d'incubation des anticorps ayant été identifiée, nous avons voulu caractériser plus précisément les cinétiques d'adsorption de différentes molécules sur les substrats activés.

La mesure de la cinétique d'adsorption d'une molécule sur une zone activée du substrat avec des lames Wet-SURF est expérimentalement plus simple comparée à l'immunofluorescence. En effet, en immunofluorescence il faut produire autant de substrats imprimés que de points temporels. Cela implique que pour deux heures de mesures toutes les minutes, il faudrait au minimum 120 substrats imprimés. Au contraire, l'utilisation de lames wet-SURF permet de mesurer sur un seul micro-motif, sans marquage et avec une résolution temporelle inférieure à la seconde la cinétique de dépôt d'une molécule donnée. En plus des anticorps, l'utilité de la neutravidine en tant que couche primaire pour maximiser l'adsorption des anticorps a été testée. Ainsi nous avons mesuré trois cinétiques de dépôt de molécules différentes, la cinétique de dépôt d'un

anticorps, la cinétique de dépôt de neutravidine et la cinétique de dépôt d'un anticorps biotinylé sur de la neutravidine précédemment adsorbée (Figure 31 A). L'image d'un film déposé ou adsorbé a une intensité d'autant plus élevée que son épaisseur ou sa quantité de matière correspondante est élevée. Ainsi, on peut observer sur l'ajustement des courbes des données expérimentales que l'on atteint 95% de l'épaisseur maximum à 103 minutes pour les anticorps, à 58 minutes pour la neutravidine et à 22 minutes pour les anticorps biotinylés sur la neutravidine. Il est à noter que toutes ces mesures ont été effectuées avec le dispositif Okolab, donc à 37°c avec 5% de CO_2 et une saturation en eau de l'air.

Nous avons également trouvé intéressant de mesurer la cinétique de dépôt du produit commercial TransAct. Il s'agit selon le descriptif commercial d'une nano-matrice de polymère conjuguée à des fragments d'anticorps (Fragment of Antibody, Fab) anti CD3 et CD28 produit par Miltenyi pour l'activation des lymphocytes T humain. Ce type de produits pourrait être très adapté pour de futurs développements de nos tests fonctionnels pour plusieurs raisons :

- Il permet d'augmenter la surface de contact avec la cellule par la structure a priori 3D des nano polymères.
- Sa cinétique d'adsorption rapide rend compatible avec l'impression l'usage de molécules aidant à la conservation comme la BSA. Il est en effet obligatoire pour nos anticorps, adsorbés de façon directe sur les substrats activés, d'être conservés sans BSA car la BSA se dépose plus vite que les anticorps sur les substrats activés.

La mesure de la cinétique de dépôt du TransAct ne nécessite pas l'utilisation de lame wet-SURF car sur une lame de verre classique le TransAct produit un contraste suffisant de par sa taille pour être mesuré en RICM. Il est à noter qu'à l'inverse des lames wet-SURF sur une lame de verre normale, l'augmentation de l'épaisseur se traduit par une baisse du niveau de gris. Dans le cas du TransAct, la courbe d'ajustement est peu fidèle aux données expérimentales, mais l'ordre de grandeur pour atteindre une saturation est d'environ 60 minutes.

En conclusion les temps d'incubation à 37°c pour une adsorption optimale sont :

- 1h30 pour un anticorps en adsorption directe
- 1h pour de la neutravidine en adsorption directe
- 30min pour un anticorps biotinylé adsorbé sur de la neutravidine
- 1h pour le TransAct en adsorption directe

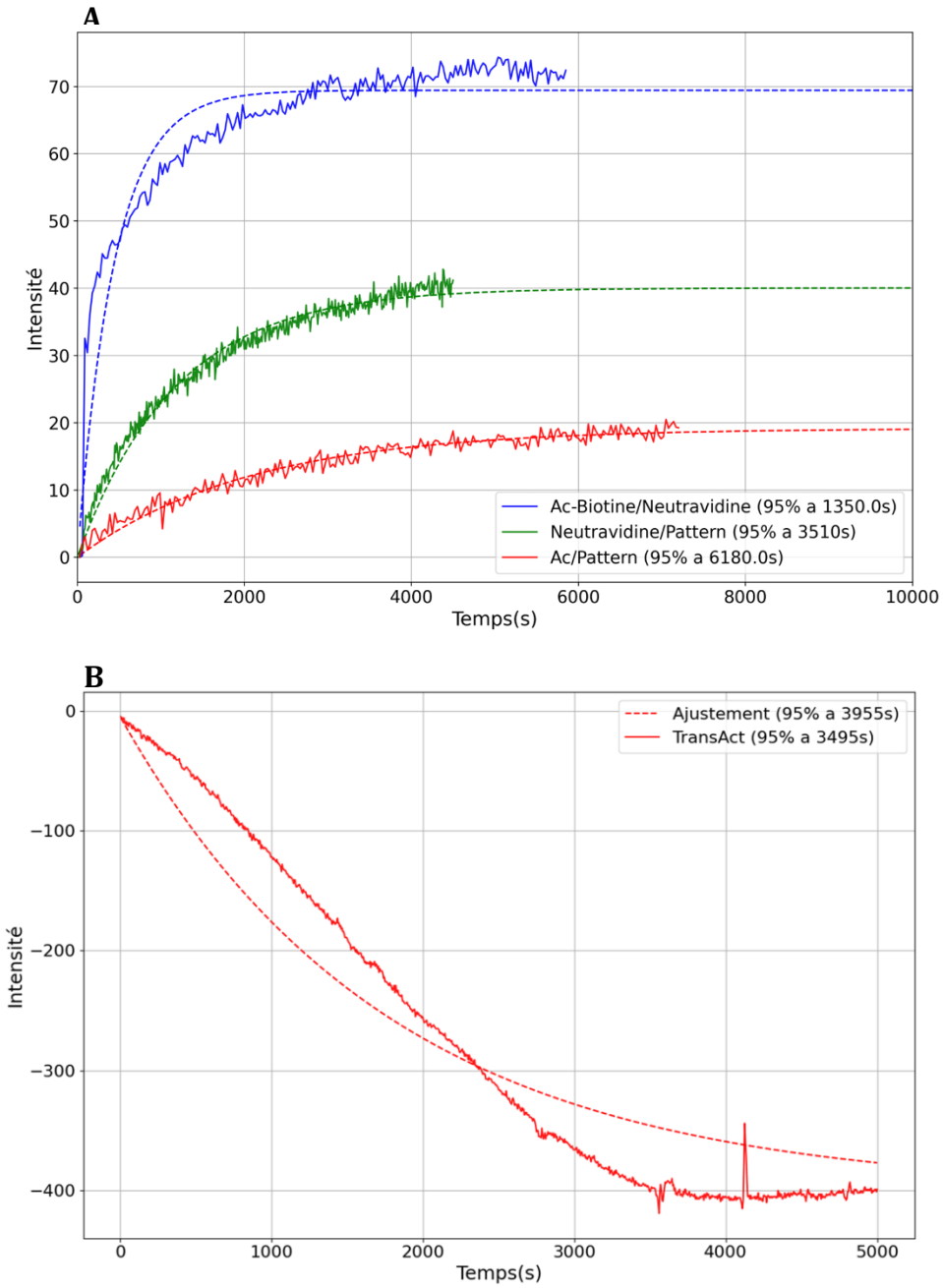


Figure 31 : Cinétique d'adsorption de molécules sur des substrats activés. (A) Mesure avec la technique wet-SEEC des cinétiques d'adsorption d'anticorps et de neutravidine sur du mPEG-SVA activé et d'anticorps biotinylés sur de la neutravidine. (B) Mesure en RICM de la cinétique d'adsorption du produit commercial TransAct sur du mPEG-SVA activé. (A, B) La mesure de l'intensité est corrigée par la valeur de l'intensité hors micro-motifs au cours du temps. Les mesures ont été réalisées à 37°c.

2.4. Protocoles d'impressions multiples à haute résolution

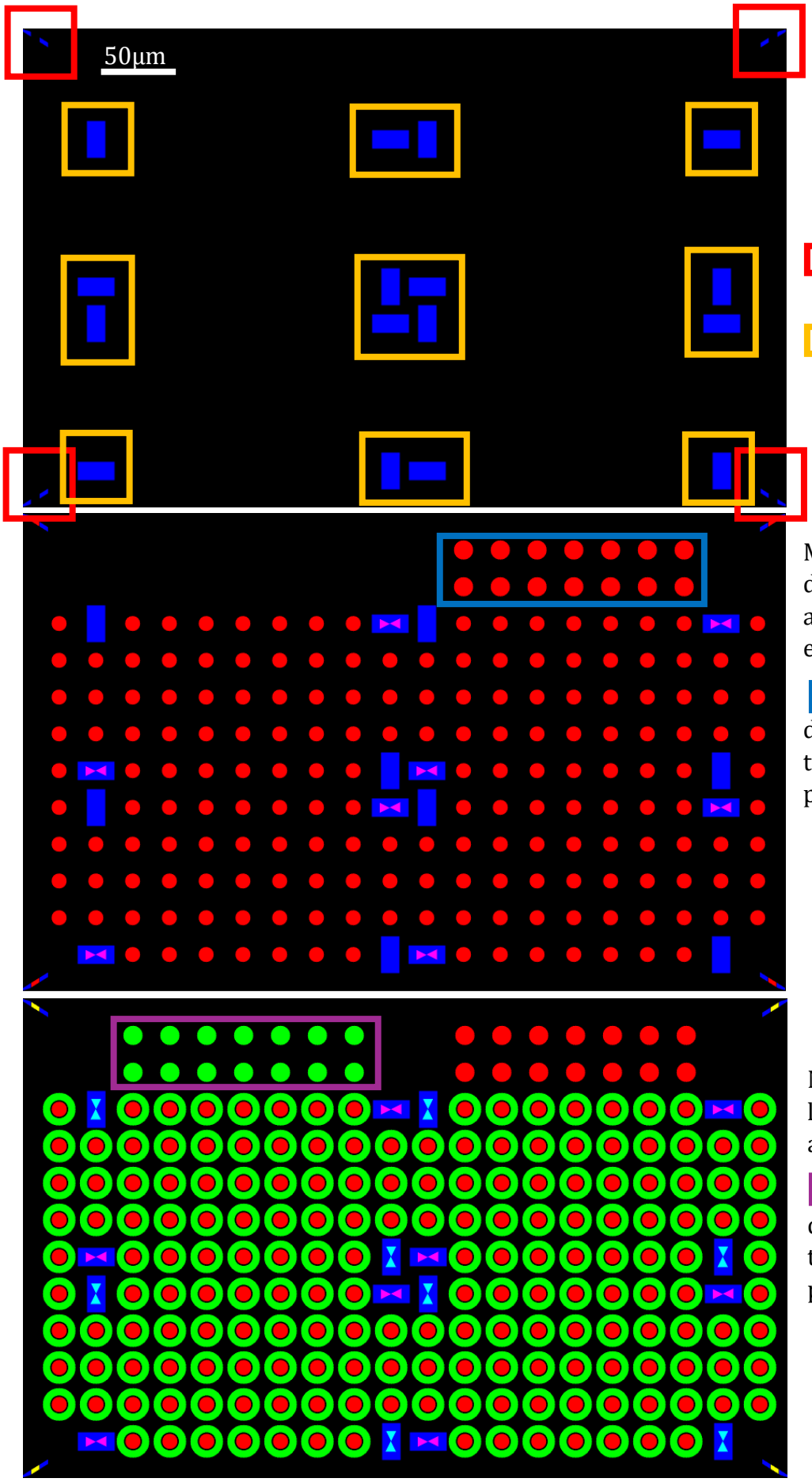
La construction des micro-motifs à zones fonctionnelles multiples nécessite l'impression séquentielle de motifs adjacents de chaque type de protéine ou de mélanges de protéines. Cela implique d'aligner avec une précision inférieure au micromètre chaque motif de protéine différent. Un premier motif est imprimé avec une molécule fluorescente afin de servir de repère pour les impressions suivantes. Un même motif fluorescent est utilisé pour aligner toutes les impressions successives ce qui permet d'éviter tout effet optique qui fausserait l'alignement. L'alignement entre le premier motif et les suivants est effectué avec les diagonales se trouvant dans chaque angle. Ces diagonales permettent un alignement précis sur les axes X et Y même dans le cas où un léger défaut de calibration du système PRIMO (entre l'image camera d'une image imprimée et l'image numérique source) ferait que la taille des repères imprimés serait légèrement différente des motifs numériques projetés. Le premier motif contient des rectangles qui ont plusieurs intérêts : ils délimitent les champs d'observation lors de l'observation de cellules sur les micro-motifs avec un objectif X63. De plus, lors de l'impression positive des deuxième et troisième motifs fonctionnels un motif en forme de sablier est imprimé en négatif dans les rectangles de molécule fluorescente préalablement imprimés. Ces repères sabliers sont utilisés lors de l'analyse d'images en fin de tests cellulaires pour localiser précisément les motifs fonctionnels qui sont invisibles. Le deuxième motif imprime des sabliers horizontaux dans les rectangles horizontaux et le troisième motif imprime des sabliers verticaux dans les rectangles verticaux. Les deuxièmes et les troisièmes motifs comprennent chacun, en plus des micro-motifs destinés à accueillir les cellules, des zones fonctionnelles rondes de 12 µm de diamètre. Ces zones de contrôle permettent la quantification de la densité des molécules imprimées et le test de l'adhésion des cellules. Pour le design de nos micro-motifs, les travaux de Geoffrey Delhaye nous ont servi de base. Il a en effet pu montrer que la taille minimale pour un motif rond capable d'activer les lymphocytes T mémoire est de 8µm de diamètre. La taille finale retenue est de 10 µm de diamètre car au-delà la fréquence de doublet par micro-motifs augmente (Figure 32).

Le protocole d'impression développé par Geoffrey Delhaye comprend :

- Une exposition du substrat couvert de PLPP au laser UV pendant 3 minutes, le substrat, rincé avec 6ml de PBS.
- Une incubation des anticorps pendant une nuit à 4°C, aux concentrations précisées dans la section protocoles, rincés avec 6ml de PBS.
- Une passivation en deux étapes, premièrement avec une solution de BSA à 4% pendant 15 minutes à température ambiante, rincée avec 6ml de PBS. Deuxièmement avec une solution de 5% de mPEG-SVA pendant 5min à température ambiante, rincé avec 6ml de PBS. La deuxième étape de passivation de la surface avec une solution de mPEG-SVA a été supprimée du protocole pour toutes les expériences car elle dégrade la fonctionnalité des protéines imprimées.

Du fait de la contamination des zones déjà imprimées par les anticorps des zones imprimées ultérieurement, l'ordre d'impression des zones fonctionnelles est important et ne peut être modifié. Ainsi, seule la dernière zone imprimée n'est pas contaminée par

d’autres anticorps, et c’est pour cela que la dernière zone imprimée est toujours la zone anti-CD69. Cela évite de fausser la mesure de l’expression de CD69 par l’adhésion.



Motif 1 : Repères d'alignement imprimés avec un molécule fluorescente inerte pour les cellules.

Diagonales pour l'alignement des impressions.

Délimitation des champs d'observation et repères pour l'analyse.

Motif 2 : Motif de capture et d'activation imprimé avec des anticorps anti-CD3, anti-CD28 et anti-CD45.

Zones de quantification des molécules imprimées et de test de l'adhésion des cellules pour les anticorps du motif 2.

Motif 3 : Motif de révélation de l'expression de CD69. Imprimé avec un anticorps anti-CD69.

Zones de quantification des molécules imprimées et de test de l'adhésion des cellules pour les anticorps du motif 3.

Figure 32 : Schéma de la construction du micro-motif à deux zones fonctionnelles et détails des éléments de construction du micro-motif.

2.5. Amélioration des performances de quantification de l'expression de CD69 par les lymphocytes T sur des micro-motifs à deux zones fonctionnelles

Nous avons souhaité explorer des possibilités concernant le design de la zone fonctionnelle anti-CD69 dans le but d'avoir une lecture semi-quantitative de l'expression de CD69 en fonction de l'adhésion sur les micro-motifs.

Nous avons pris pour modèle initial un micro-motif constitué de deux zones fonctionnelles concentriques. La zone interne mesure 10 µm de diamètre et est constituée d'anticorps anti-CD3, anti-CD28 et anti-CD45. La zone externe est constituée d'anticorps anti-CD69 (Figure 33 A et B). Nous avons ajouté un gradient sur la zone fonctionnelle anti-CD69, avec l'idée qu'une faible expression de CD69 ne permettrait l'adhésion que sur les zones les plus denses de la zone fonctionnelle, alors qu'une expression plus forte entraînerait une adhésion sur les zones les moins denses du gradient (Figure 33 C et D), offrant ainsi une lecture semi quantitative de l'expression de CD69. Dans le même temps, pour déterminer la largeur de cette zone fonctionnelle, nous avons testé différentes tailles (Figure 33 F). Sur les zones fonctionnelles au-delà de 5 µm de largeur, les cellules adhéraient uniquement sur la zone la plus dense du gradient, ce qui suggérait un possible épuisement de la membrane disponible (Figure 33 F). De plus, sur cette première version du gradient nous avions réalisé un double gradient avec deux zones de densité maximale

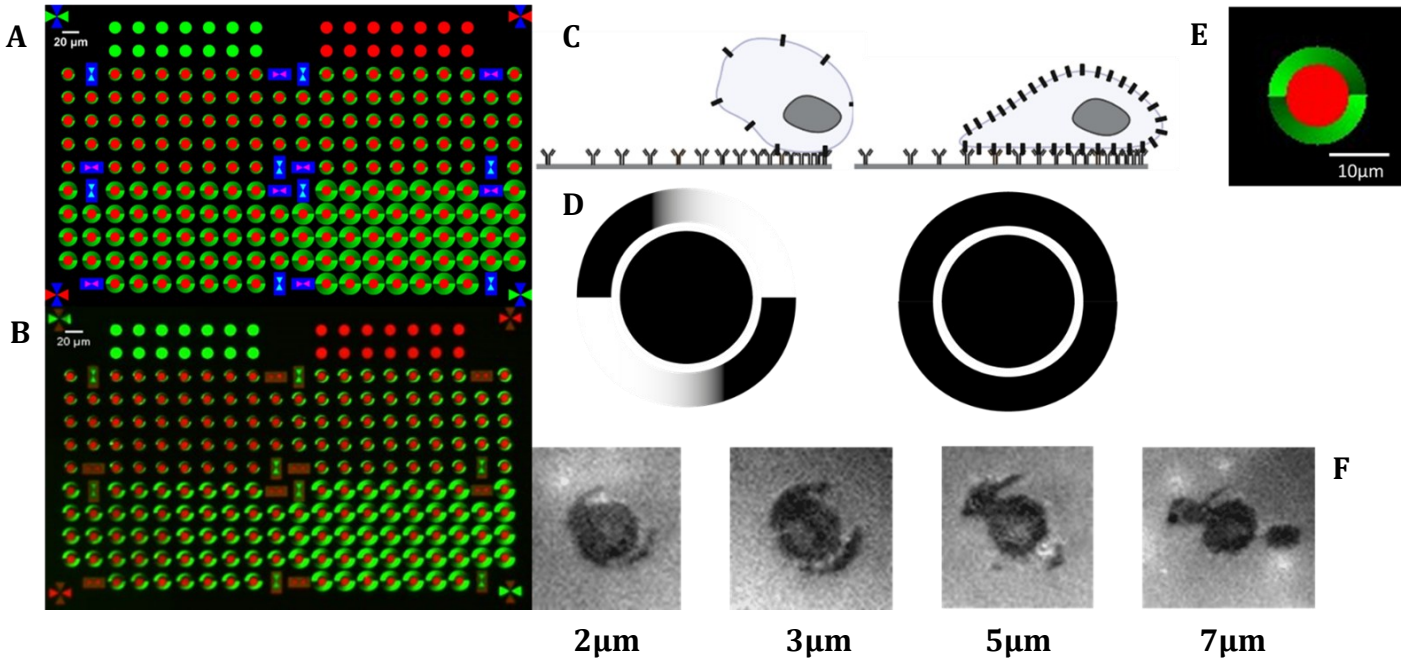


Figure 33 : Micro-motif avec gradient sur la zone anti-CD69. (A) Superposition des trois images numériques des motifs imprimés, en bleu le motif n°1 qui est imprimé avec des molécules fluorescentes, en rouge le motif n°2 imprimé avec les anticorps anti-CD45, anti-CD3 et anti-CD28, en vert le motif n°3 imprimé avec l'anticorps anti-CD69. (B) Superposition des images en épifluorescence des motifs révélés avec des anticorps secondaire anti-IgG1 et anti-IgG2a, en rouge le motif n°1 qui est imprimé avec des molécules fluorescentes et le motif n°2 imprimé avec les anticorps anti-CD45, anti-CD3 et anti-CD28, en vert le motif n°3 imprimé avec l'anticorps anti-CD69. (C) Schéma en vue de coté de l'adhésion théorique d'une cellule sur un motif anti-CD69 avec un gradient en fonction de son niveau d'expression de CD69. (D) Schéma de l'adhésion théorique d'une cellule sur un motif anti-CD69 avec un gradient observé en RICM en fonction du niveau d'expression de CD69. (E) Agrandissement de (A). (F) Observation en RICM de cellules T mémoire adhérentes sur des motifs à deux zones fonctionnelles avec un gradient sur le motif anti-CD69 et une largeur variable de ce même motif.

suivi par un gradient en arc de cercle (Figure 33 E). Or, sur cette première version les comportements des cellules n'étaient pas homogènes, les cellules adhéraient soit sur les deux zones les plus denses soit sur une seule, comme on peut le voir sur l'image du motif de 5µm (Figure 33 F). Cela pouvait diviser par deux la surface d'adhésion pour une même expression de CD69.

Nous avons donc réalisé un nouveau gradient qui comportait seulement une zone de densité maximale suivi par deux gradients symétriques de chaque côté de l'arc de cercle (Figure 34).

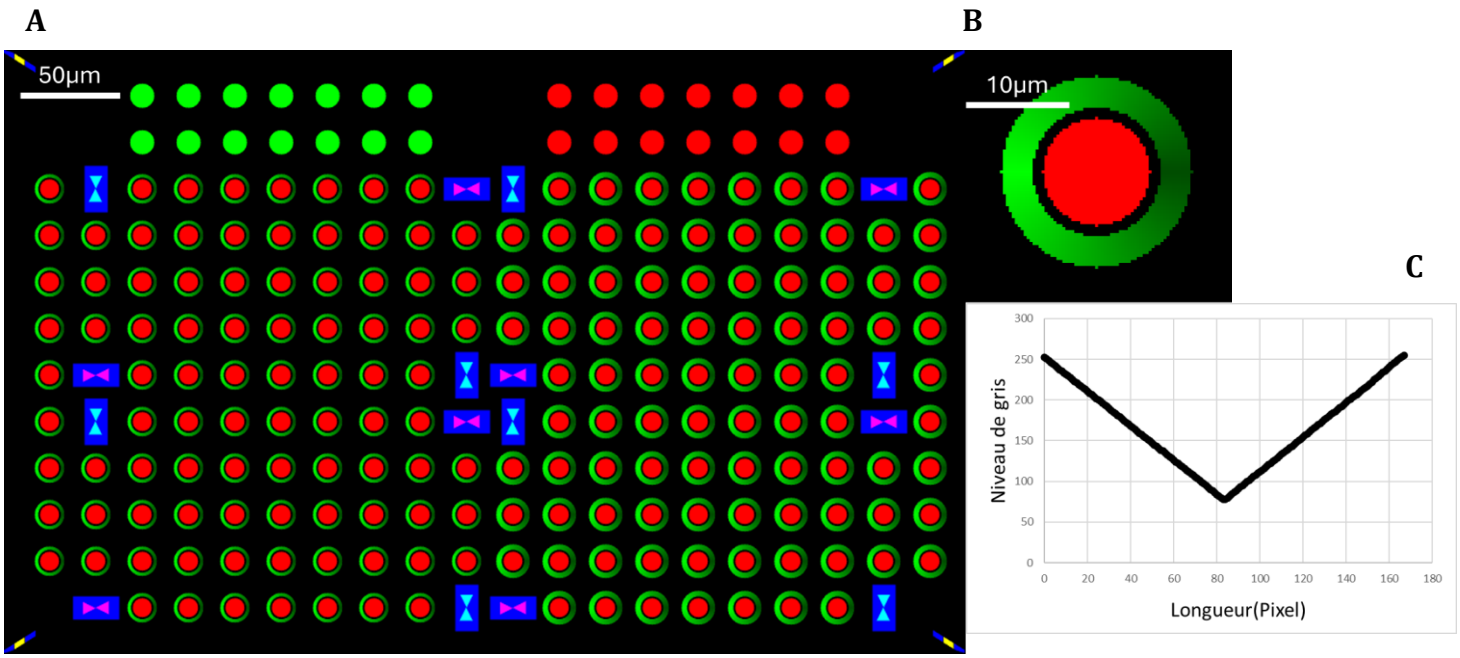


Figure 34 : Micro-motif à deux zones fonctionnelles avec un gradient sur la zone anti CD69. (A) Superposition des trois images numériques des motifs imprimés, en bleu le motif n°1 qui est imprimé avec des molécules fluorescentes, en rouge le motif n°2 imprimé avec les anticorps anti-CD45, anti-CD3 et anti-CD28, en vert le motif n°3 imprimé avec l'anticorps anti-CD69. (B) Agrandissement de (A).

Sur ces bases, nous avons donc testé quatre zones anti-CD69 de deux tailles différentes, 2 et 3µm de largeur, avec et sans gradient. Après 3 heures d'incubation des cellules T mémoire humaines sur les micro-motifs, les surfaces d'adhésion des cellules sur les zones anti-CD69 ainsi que la fluorescence pour CD69 ont été mesurées. Le contrôle de la fluorescence pour CD69 montre des différences significatives entre les cellules non activées, activées sur les micro-motifs et les cellules préactivées. De même, le pourcentage d'adhésion des cellules sur les zones anti-CD69 montre des différences significatives entre cellules non activées, activées sur les micro-motifs et préactivées. Afin d'étudier si les gradients sur les zones anti-CD69 ont apporté une meilleure lecture du niveau d'expression de CD69, la corrélation entre la mesure en fluorescence de CD69 et la mesure de l'adhésion sur la zone anti-CD69 a été réalisée. Les corrélations calculées sont de 0,31 et de 0,56 pour les micro-motifs avec gradient de 2µm et 3µm d'épaisseur respectivement. Pour les micro-motifs sans gradient les valeurs de corrélation sont de 0,63 pour 2µm

d'épaisseur et de 0,69 pour 3µm d'épaisseur. Sur la base de ces résultats moyennés, on ne note pas d'amélioration de la lecture de l'activation par l'adhésion avec les gradients (Figure 36). Cependant, on peut voir que les cellules adhèrent systématiquement sur les zones les plus denses des gradients anti-CD69 (Figure 35). Le gradient de molécules d'adhésion corrèle donc bien avec l'adhésion cellulaire et cette observation à l'échelle des cellules uniques suggère que l'adhésion cellulaire doit aussi dépendre du gradient d'adhésion. Une analyse de l'adhésion des cellules par zone de densité de molécules d'adhésion pourrait permettre de mieux discerner les niveaux d'expression des cellules dans nos expériences qu'une analyse moyennée de l'aire d'adhésion totale. La plage de densité pourrait également être améliorée en déterminant une densité adaptée à des variations d'étalement optimisées par rapport aux différents niveaux d'expressions de marqueurs cellulaires. D'autres expériences et analyses sont donc nécessaires pour déterminer plus précisément le potentiel des motifs à gradients pour la quantification d'expression de marqueurs de surface.

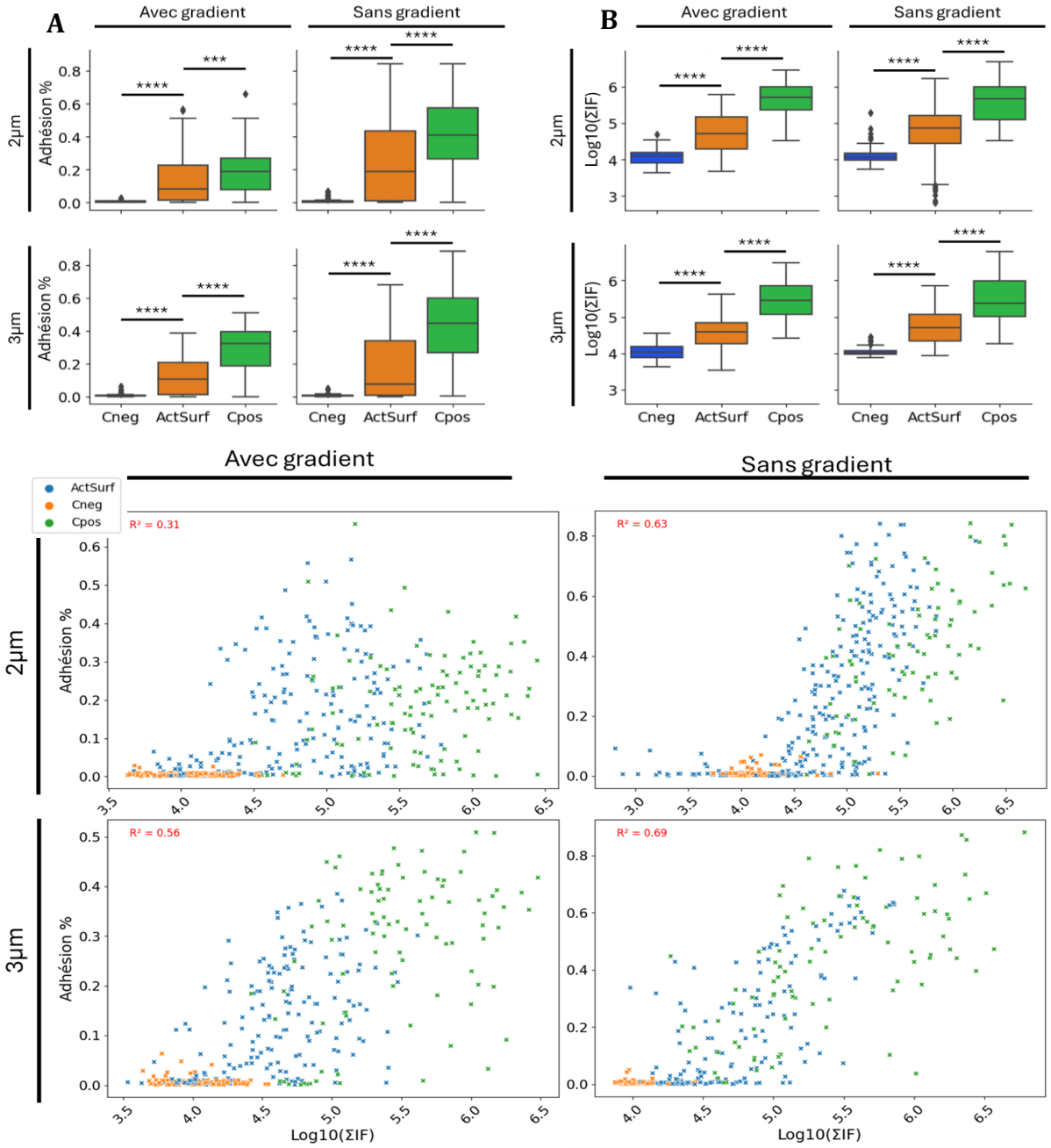


Figure 35 : Comparaison des résultats obtenus en fonction de la zone anti-CD69 avec ou sans gradient et de 2 ou 3µm de largueur. Les lymphocytes T mémoire ont été incubés 3h sur les micro-motifs. (A) Ratio de l'adhésion des cellules sur la zone anti-CD69 du micro-motif. (B) Somme des intensités de fluorescence pour CD69 par cellule. (C) Corrélation entre la mesure en fluorescence de CD69 et la mesure de l'adhésion sur la zone anti-CD69.

Avec gradient

Sans gradient

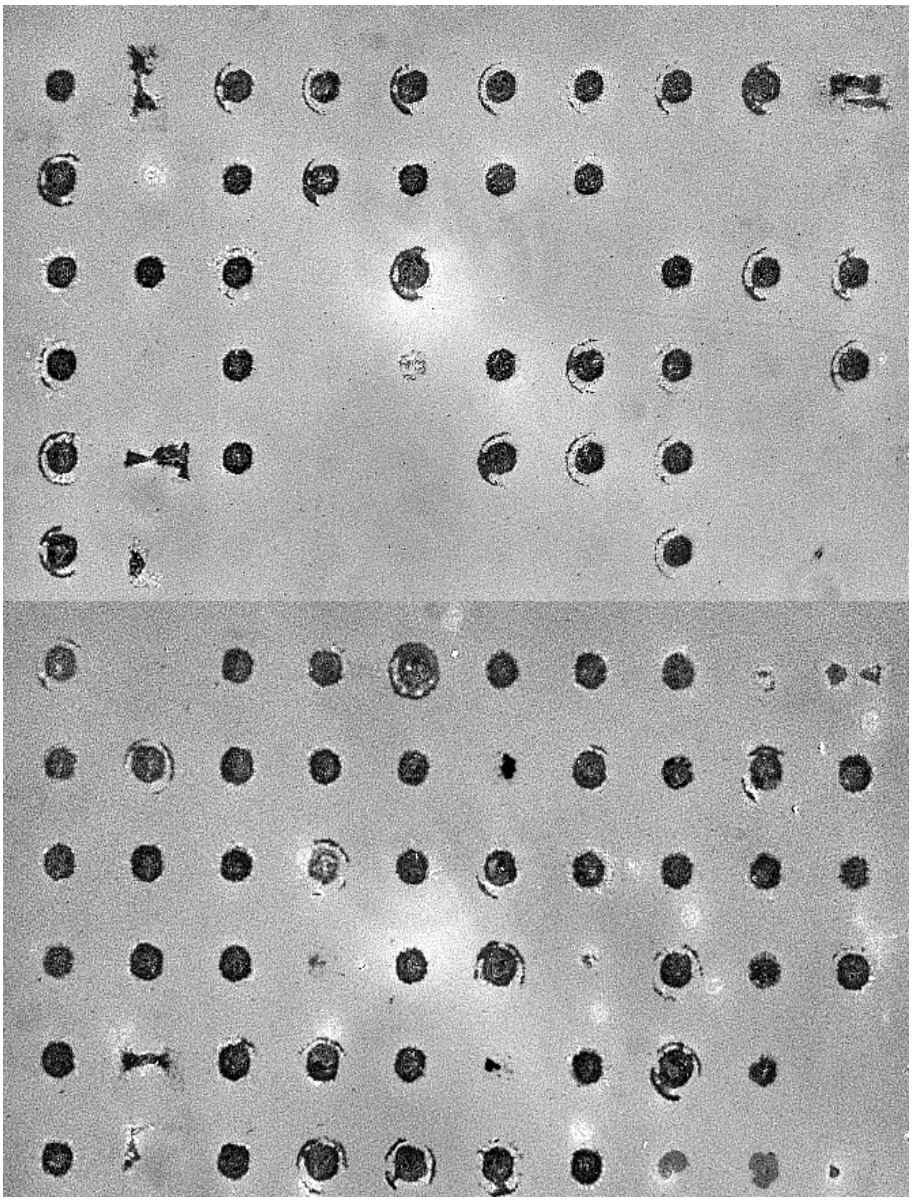


Figure 35 : Adhésion en RICM de cellules activées sur les micro-motifs pendant 3h avec ou sans gradient.

Figure 36 : Comparaison des résultats obtenus en fonction de la zone anti-CD69 avec ou sans gradient et de 2 ou 3µm de largueur. Les lymphocytes T mémoire ont été incubés 3h sur les micro-motifs. (A) Ratio de l'adhésion par cellule sur la zone anti-CD69 du micro-motif. (B) Somme des intensités de fluorescence pour CD69 par cellule. (C) Corrélation entre la mesure en fluorescence de CD69 et la mesure de l'adhésion sur la zone anti-CD69.

2.6. Développement du micro-motif à trois zones fonctionnelles

La réalisation de micro-motifs avec de nombreuses zones fonctionnelles ouvrirait de nombreuses perspectives pour le développement de tests fonctionnels multiplexés des cellules immunitaires uniques. Cela permettrait de mesurer davantage de marqueurs membranaires témoignant de la réponse cellulaire à une stimulation ou permettant le phénotypage des cellules. Il serait aussi possible de tester plusieurs fonctions de plusieurs types cellulaires différents avec un seul substrat.

C'est dans cette perspective que nous avons cherché à réaliser un dispositif à trois zones fonctionnelles afin de dépasser les capacités des prototypes précédents à 2 zones fonctionnelles. Notre choix s'est porté sur une zone fonctionnelle imprimée avec des anticorps anti-CD45RO. Une zone CD45RO peut permettre de distinguer les lymphocytes T mémoire CD45RA- CD45RO+ des lymphocytes T naïfs CD45RA+ CD45RO- [61]. Elle permettrait également de limiter les étapes de tri cellulaire à effectuer avant le test CD45RO. Pour rappel, en amont des tests sur micropuces, nous effectuons un tri par gradient de densité puis un tri des cellules T mémoire parmi les PBMC. La zone anti-CD45RO permettrait de ne plus effectuer de tri des cellules T mémoire et de déposer les PBMC sur les substrats.

Les premières tentatives de réalisation d'un motif à trois zones fonctionnelles présentaient un défaut d'adhésion des lymphocytes T mémoire sur la première zone imprimée, la zone anti-CD45RO (Figure 40 A et B). Nous avons alors supposé que les anticorps anti-CD45RO, qui étaient imprimés en premier, subissaient une dégradation par la répétition du processus d'impression. Cette hypothèse est soutenue par les résultats d'expériences mesurant le niveau d'activation des cellules T mémoire en fonction de l'impression ou non d'un micro-motif après l'impression du micro-motif anti-CD3 et anti-CD28. Ces expériences ont en effet montré un niveau d'activation plus important dans le cas où aucun micro-motif n'était imprimé après le micro-motif activateur (Figure 37).

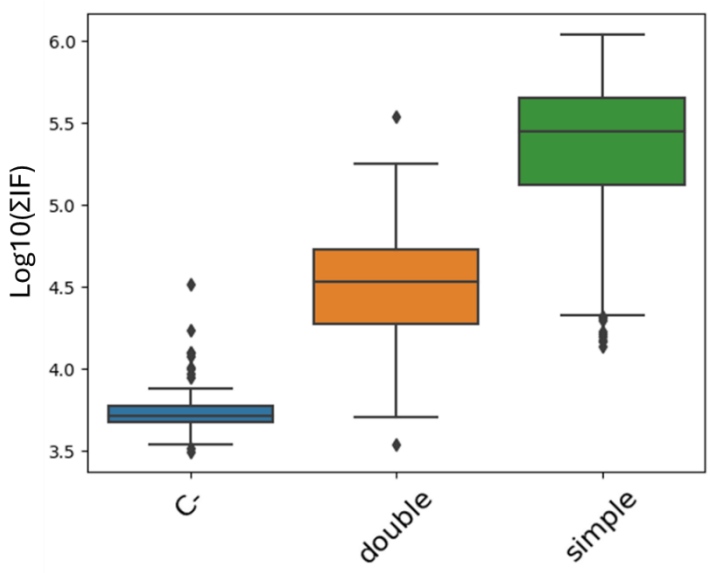


Figure 37 : Expression de CD69 mesuré en épifluorescence des cellules T mémoire en fonction du micro-motif simple ou double. Le micro-motif simple consiste en une zone fonctionnelle avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Le micro-motif double consiste en deux zones fonctionnelles, une zone anti-CD3 et anti-CD28, imprimée en première, et une zone anti-CD69, imprimée en seconde. Le contrôle négatif consiste en un micro-motif à une zone fonctionnelle anti-CD45.

Ce problème limite les possibilités d'impressions multiples envisageables par la méthode LIMAP. Il est donc important de comprendre son origine physico-chimique afin de pouvoir y remédier. Nous avons considéré plusieurs hypothèses pouvant expliquer la dégradation collatérale de zones imprimées lors d'impressions successives :

- Une hypothèse est que les radicaux libres générés lors d'une impression peuvent diffuser et dégrader les protéines dans un voisinage immédiat. Afin d'estimer l'existence de cet effet et la longueur caractéristique des dégradations induites, Valentine Seveau a réalisé au laboratoire l'impression de motifs à trois zones, où la première zone sert de repère pour l'alignement des deux suivantes, la deuxième zone est imprimée avec un anticorps anti-CD45 et la troisième zone avec de la BSA. Les deuxièmes et troisièmes motifs comprennent respectivement un carré de 12x12µm et deux rectangles de longueurs variables (entre 12 et 48µm) et disposés de chaque côté du deuxième motif selon l'axe X. L'objectif de l'expérience est de quantifier la dégradation de la deuxième zone par l'impression de la troisième zone adjacente. Les résultats montrent une dégradation sur une distance de 1 µm du deuxième motif sur l'axe X par rapport l'axe Y de contrôle (Figure 38).

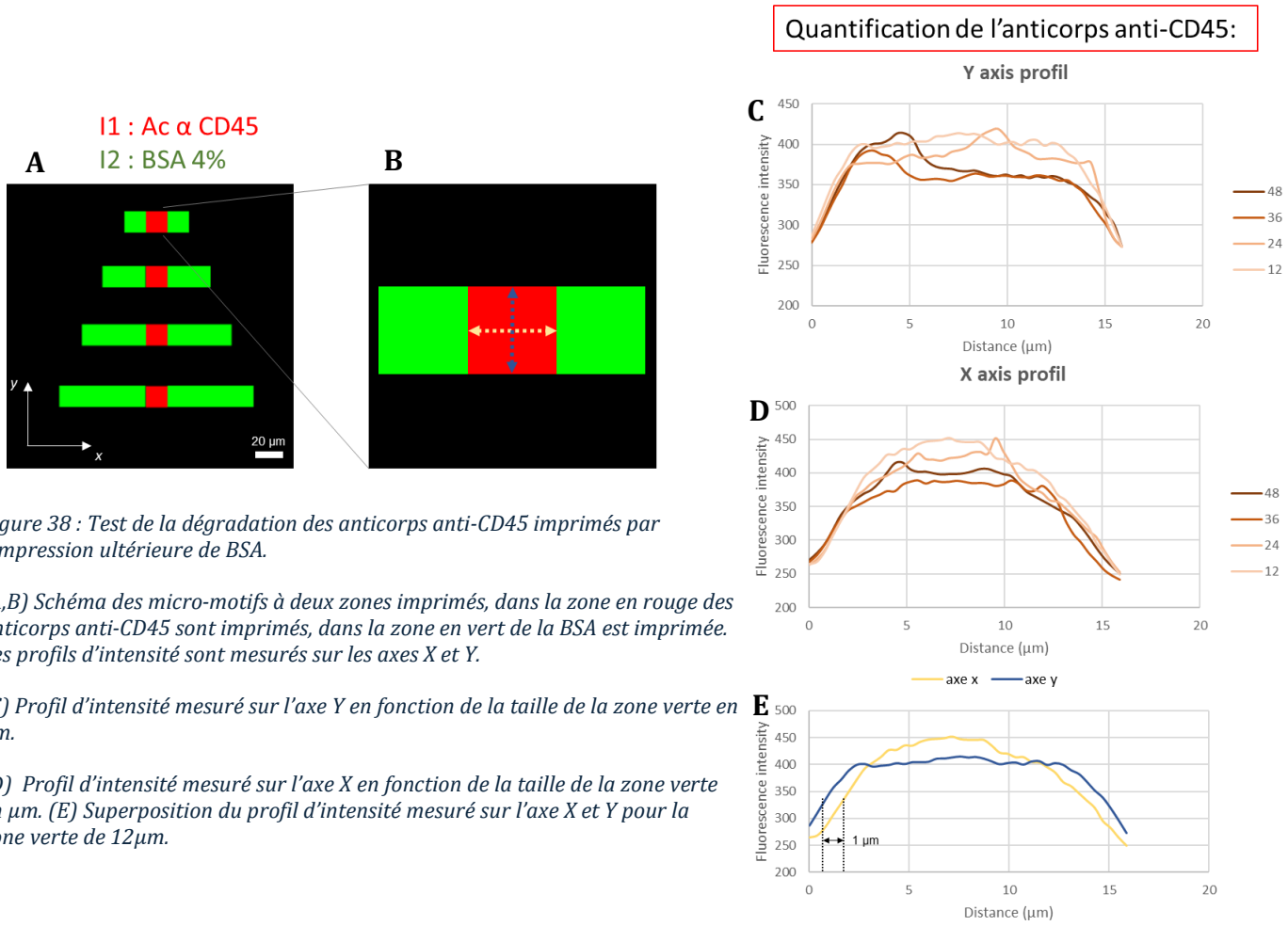


Figure 38 : Test de la dégradation des anticorps anti-CD45 imprimés par l'impression ultérieure de BSA.

(A,B) Schéma des micro-motifs à deux zones imprimés, dans la zone en rouge des anticorps anti-CD45 sont imprimés, dans la zone en vert de la BSA est imprimée. Les profils d'intensité sont mesurés sur les axes X et Y.

(C) Profil d'intensité mesuré sur l'axe Y en fonction de la taille de la zone verte en µm.

(D) Profil d'intensité mesuré sur l'axe X en fonction de la taille de la zone verte en µm. (E) Superposition du profil d'intensité mesuré sur l'axe X et Y pour la zone verte de 12µm.

- La solution de PLPP pourrait, par elle-même et sans illumination UV, dégrader les protéines présentes sur le substrat. Pour tester cette hypothèse, des tests ont été réalisés pour quantifier la dégradation de motifs imprimés d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 à la suite d'une incubation pendant une heure à 37°c de PLPP ou de PBS. (Figure 39). Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les deux conditions. Pour de courtes périodes, il n'y a donc pas de dégradation des anticorps induites par le PLPP.

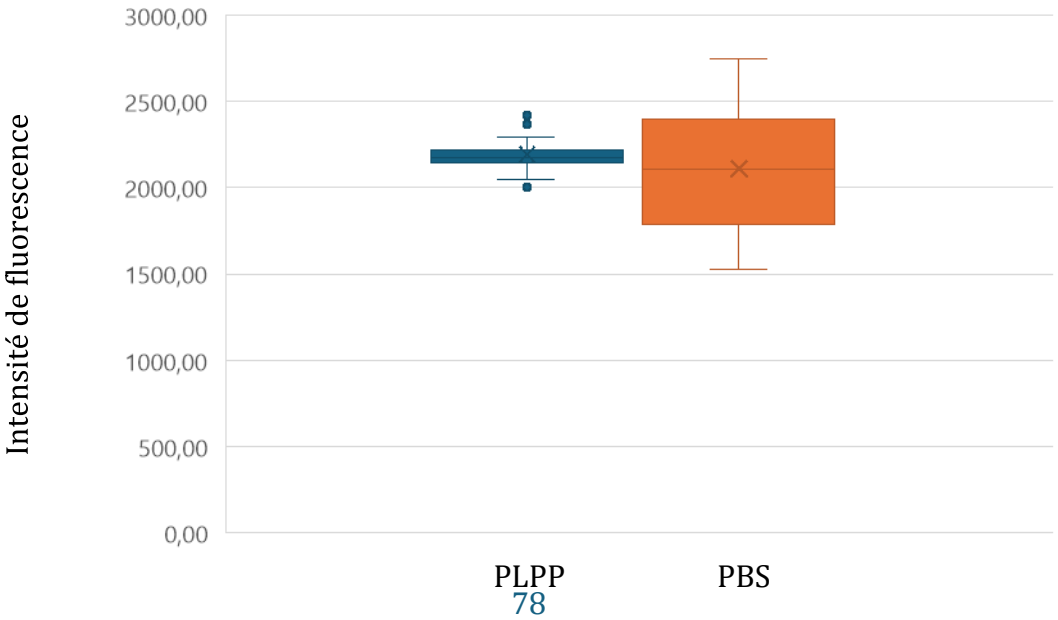


Figure 39 : Étude de la dégradation des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 imprimés en fonction de la solution dans laquelle ils ont été incubés pendant une heure à 37°c.

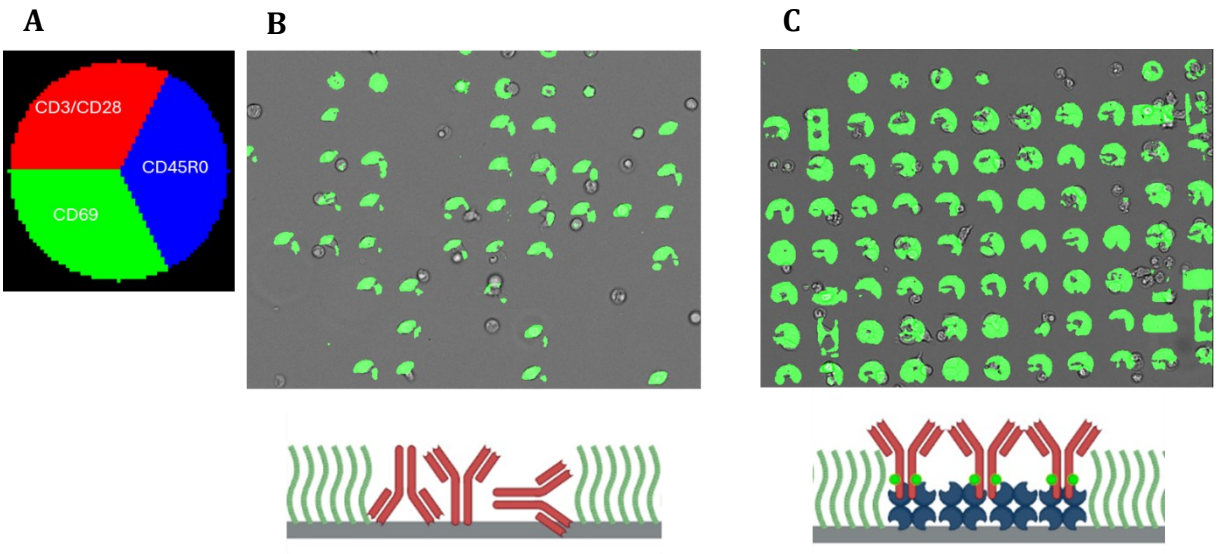


Figure 40 : Adhésion des cellules T mémoire sur des motifs à trois zones fonctionnelles. (A) Schéma du motif à 3 zones fonctionnelles avec la spécificité des anticorps pour chaque zone. (B) Image de microscopie en RICM (vert) et en lumière transmise (gris) de l'adhésion des cellules sur un motif à trois zones fonctionnelles avec adsorption directe des anticorps anti-CD45RO. (C) Image de microscopie en RICM (vert) et en lumière transmise (gris) de l'adhésion des cellules sur un motif à trois zones fonctionnelles, avec adsorption des anticorps anti-CD45RO sur de la neutravidine précédemment imprimée. (B,C) Sous les images de microscopie se trouvent les schémas des méthodes utilisées pour l'adsorption des anticorps anti-CD45RO sur le substrat activé.

N'étant pas parvenu à identifier la source de la dégradation des anticorps imprimés, nous nous sommes tournés vers un compromis. Comme évoqué dans la section 1.5.6, l'impression des anticorps avec une adsorption aléatoire sur la surface ne permet qu'une faible fonctionnalité des anticorps. Notre choix a donc été d'augmenter la fonctionnalité des anticorps pour compenser leur dégradation. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps biotinylés adsorbés sur de la neutravidine précédemment imprimée. Ceci a permis d'atteindre une adhésion satisfaisante des cellules à la première zone fonctionnelle imprimée (Figure 40 C). Cependant la spécificité de cette adhésion devrait être évaluée, ce que nous n'avons pas eu le temps de faire. En effet, ce motif étant imprimé en premier, des anticorps autres que l'anticorps anti-CD45RO peuvent se trouver dans la zone et fausser l'identification des lymphocytes T mémoire.

Le design du micro-motif choisi comporte finalement deux optimisations :

– Il s'agit d'un micro-motif rond scindé en trois par le centre comme un graphique « camembert ». A l'inverse d'un micro-motif avec des zones concentriques, un micro-motif en forme de camembert permet de limiter les zones de contact entre les zones fonctionnelles, limitant ainsi les dégradations des anticorps par les impressions.

– La zone anti-CD45RO a été réduite par rapport aux zones anti-CD3, anti-CD28 et anti-CD69 (Figure 41). Il était en effet important de maximiser les aires des zones anti-CD3 anti-CD28 et anti-CD69 alors que l'aire de la zone anti-CD45RO pouvait être réduite au minimum tant que la lecture de l'adhésion restait possible. Une large zone d'activation permet d'avoir un signal d'activation important. Une large zone de lecture d'activation permet d'envisager un effet de corrélation de l'aire d'adhésion et de l 'expression de CD69 sur une plus large gamme.

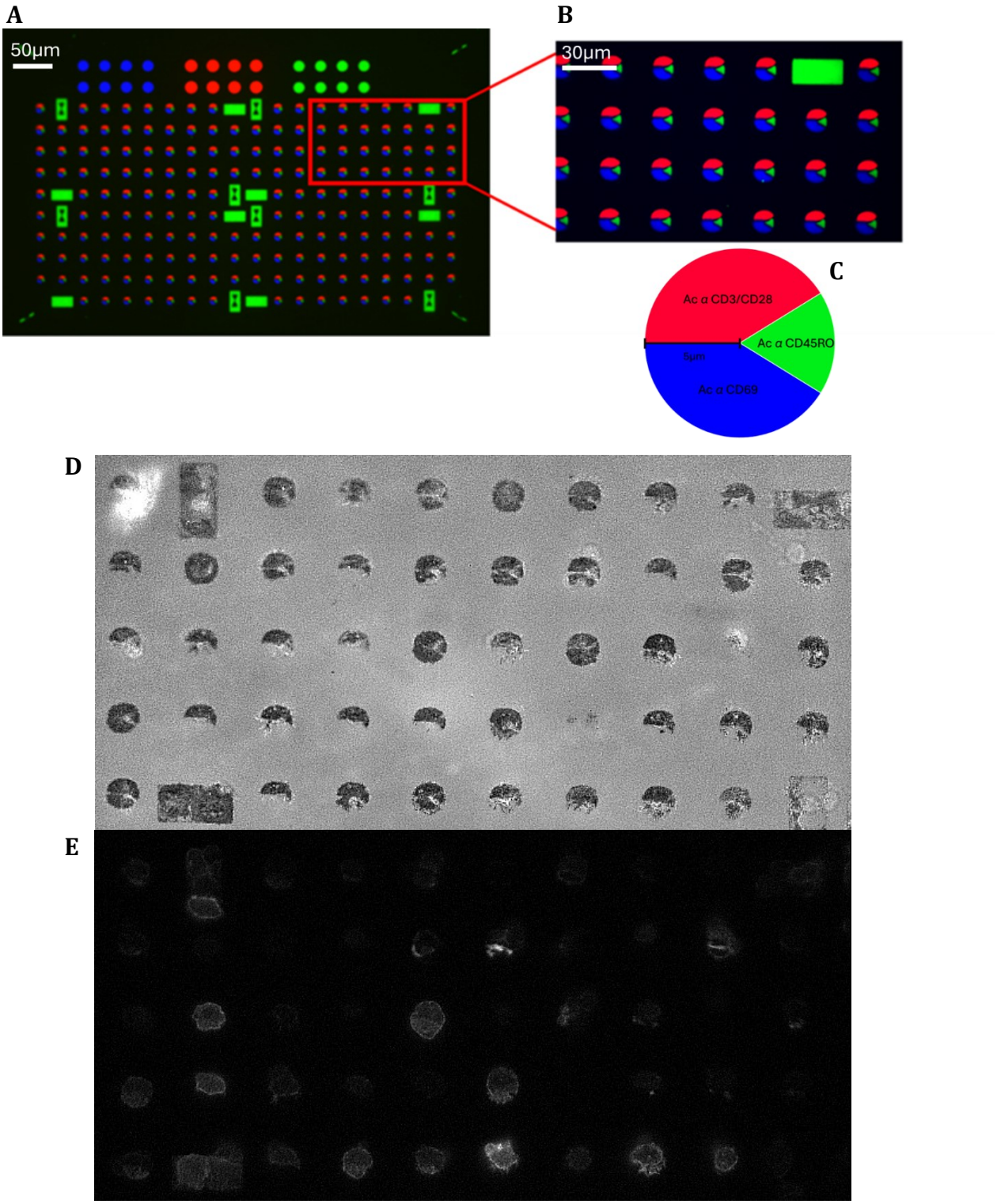


Figure 41 : Micro-motifs à 3 zones fonctionnelles. (A, B) Observation en microscopie à épifluorescence d'un micro-motif réalisé avec des molécules fluorescentes, en rouge Protéine A AF647 en vert mCherry et en bleu BSA-fluorescéine. (A) Observation avec un objectif 20x. (B) Observation avec un objectif 100x. (C) Schéma du micro-motif avec les anticorps associés à chaque zone. (D) Observation en RICM de cellules T mémoire activées sur la surface pendant 3 heures. (E) Observation en épifluorescence pour CD69 de cellules T mémoire activées sur la surface pendant 3 heures

2.7. Test de sensibilité du micro-motif à 3 zones fonctionnelles

Dans l'objectif d'étudier si la sensibilité du test est suffisante pour détecter un état d'inhibition intermédiaire de l'activation des lymphocytes T mémoire, des expériences de dose-réponse avec un inhibiteur de l'activation T ont été réalisées. La cyclosporine A (CsA) est un immunosuppresseur puissant, largement reconnu pour son efficacité dans la prévention du rejet de greffe en inhibant l'activation des lymphocytes T ainsi que leur prolifération et leur sécrétion de cytokines [62]. La CsA présente l'avantage d'avoir peu d'effet sur les autres cellules du système immunitaire et sur les lymphocytes T CD8 déjà activés [62]. De plus, l'effet de la CsA sur les lymphocytes T est réversible, ce qui représente un gros avantage pour la phase de rémission. Dans le contexte du développement d'un test d'activation pour les lymphocytes T, la CsA est une molécule idéale pour évaluer la sensibilité du test par des expériences de doses réponses. De plus, la CsA étant une molécule thérapeutique, il peut être intéressant pour les cliniciens de contrôler l'effet à une concentration donnée pour éventuellement ajuster les dosages. Ainsi, si notre test d'activation est capable de discerner l'effet de différentes doses de cyclosporine, il pourrait alors être utilisé pour le suivi thérapeutique des patients traités à la CsA.

Le mécanisme d'action repose sur la capacité de la CsA à se lier à la cyclophilin, une protéine intracellulaire. Ce complexe CsA-cyclophilin inhibe l'activité de la calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline. L'ouverture des canaux calcique, d'abord du réticulum endoplasmique puis de la membrane cellulaire, induite par IP3 permet au calcium du cytosol de fixer la calmoduline. Cela libère la calcineurine qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cells), permettant à NFAT d'entrer dans le noyau et d'initier la transcription de gènes importants pour l'activation des lymphocytes T, y compris ceux impliqués dans l'expression de CD69. En inhibant cette voie, la CsA réduit efficacement l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

Les concentrations sanguines de CsA mesurées chez les patients se situent entre 0.2 µg/ml et 1.4 µg/ml [63]. Afin d'identifier la plage de concentration efficace avec notre donneur EFS nous avons réalisé une analyse par cytométrie de l'expression par les lymphocytes T mémoire de CD69, et cela en fonction de la concentration de CsA. Pour correspondre à la durée du test, les cellules ont été activées avec du TransAct pendant 3 heures avant d'être fixées puis analysées en cytométrie. Les doses de cyclosporines choisies correspondaient aux concentrations sanguines observées chez les patients (0,1 et 1µg/ml), ainsi qu'une dose volontairement très importante pour établir une limite d'efficacité (10µg/ml). Les résultats montrent une inhibition de l'expression de CD69 croissante avec la concentration de CsA ainsi qu'une absence de différence significative entre les cellules traitées avec 1µg/ml et avec 10µg/ml de CsA (Figure 42 A). Nous avons donc conclu qu'il n'était pas nécessaire d'appliquer des doses plus fortes que 1µg/ml. Ce donneur de l'EFS, que nous appellerons A, a été conservé pour toutes les expériences de doses réponses sur les motifs à 3 zones fonctionnelles. Les concentrations de CsA choisies correspondent aux limites d'efficacité observées en cytométrie pour le donneur A, 1 µg/ml pour le maximum, 0,01 µg/ml pour le minimum, et une concentration intermédiaire de 0,1 µg/ml étant séparée d'un facteur log du maximum et du minimum.

Les expériences de dose réponse des lymphocytes T mémoire à la CsA sur micropuces ont été réalisées avec un dispositif Okolab qui reproduit les conditions d'un incubateur CO_2 tout en permettant l'observation des cellules sur le substrat avec un microscope inversé. Uniquement les cellules du donneur EFS A ont été utilisées, elles étaient traitées selon le même protocole que pour les expériences précédentes sur les motifs à deux zones fonctionnelles, à la différence qu'elles étaient incubées avec de la CsA une heure avant leur dépôt sur les motifs à trois zones fonctionnelles. Après trois heures d'incubation sur les motifs, les cellules étaient imagées en RICM puis après leur fixation et leur marquage pour CD69 les cellules étaient imagées en épifluorescence. Nos expériences ont pu démontrer que par l'adhésion sur la zone fonctionnelle anti-CD69 notre test d'activation avait la capacité de discriminer toutes les conditions entre elles à l'exception des cellules activées sur les micro-motifs sans cyclosporine avec les cellules inhibées par 0,1 et 0,01 µg/ml de CsA (Figure 43 B). Le contrôle de l'expression de CD69 par immunofluorescence discrimine également toutes les conditions entre elles à l'exception des cellules activées sans CsA comparées aux cellules inhibées avec 0.1µg/ml de CsA (Figure 43 A). A travers ces expériences nous avons pu remarquer que les cellules traitées avec 0,01µg/ml de CsA avaient en moyenne un signal en épifluorescence pour CD69 plus élevé que les cellules non traitées avec de la CsA. La bibliographie sur le sujet indique qu'un effet pro-inflammatoire de la CsA à faible dose a déjà été observé chez l'homme ainsi que chez la souris [62] . Voulant confirmer cette observation par cytométrie mais n'ayant plus accès à des échantillons du donneur A, nous avons testé une dose de 0,01µg/ml de CsA sur un donneur B de la même façon que pour le donneur A. Cependant la dose de 10µg/ml est supprimée et une dose de 0,01µg/ml est ajoutée (Figure 42 B). Les résultats montrent que l'inhibition de l'expression de CD69 par la CsA est plus faible que pour le donneur A. Pour 1µg/ml, le donneur B a une proportion de cellules CD69+ plus de deux fois supérieure au donneur A. Pour les cellules du donneur B traitées avec 0,01µg/ml de CsA, on observe une faible augmentation de la proportion de cellules CD69+ par rapport aux cellules activées sans CsA. Face au manque de significativité de cette différence, il est difficile de conclure

A

TransAct	CsA µg/ml	%CD69+
+	0	35,2
+	0,1	21,3
+	1	10,5
+	10	12
-	0	1,7

B

TransAct	CsA µg/ml	%CD69+
+	0	35,3
+	0,01	36,2
+	0,1	32,5
+	1	28,1
-	0	5,2

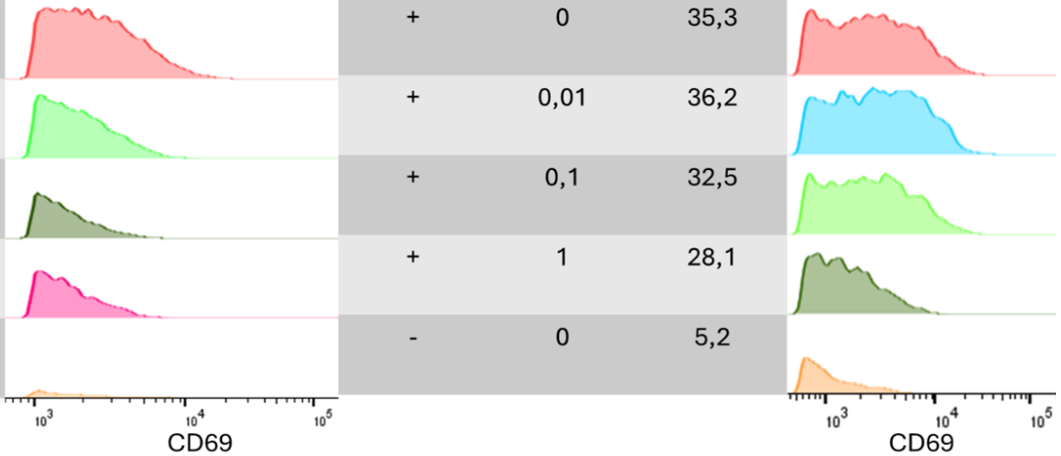
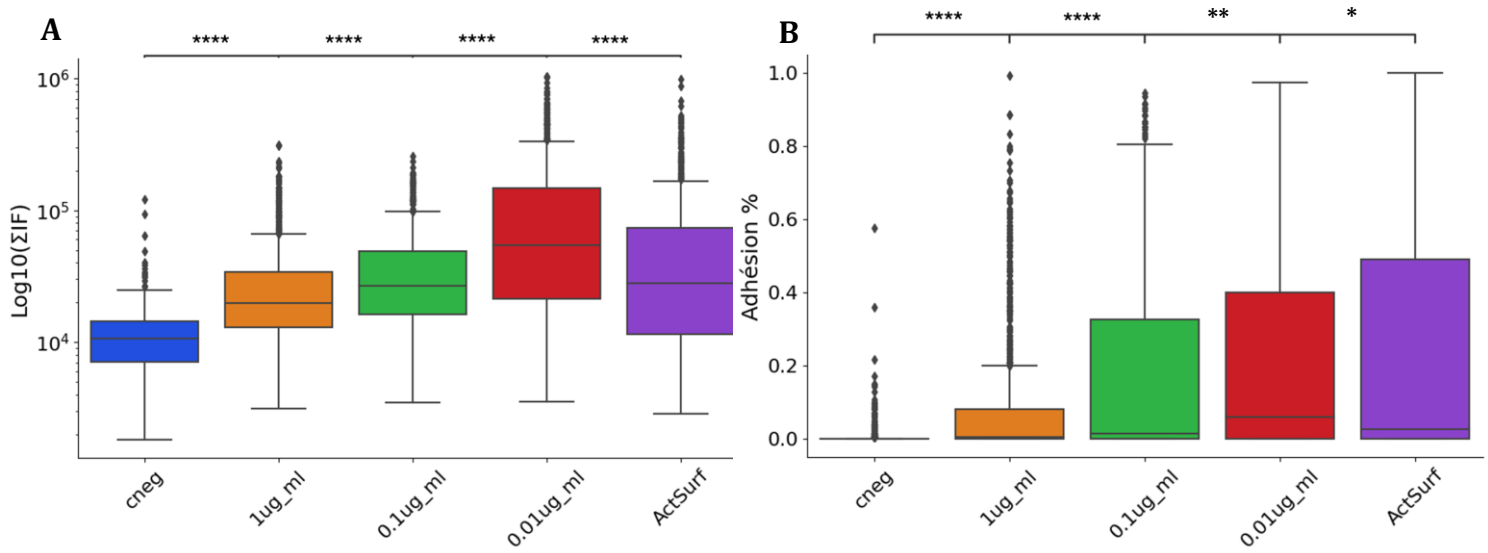


Figure 42 : Mesure en cytométrie de l'expression de CD69 par les lymphocytes T mémoire de deux donneurs. Les cellules sont activées pendant 3h avec du TransAct et traitées avec de la cyclosporine A à différentes concentrations.



X	Cneg	1µg/ml	0.1µg/ml	0.01µg/ml	0µg/ml
Cneg	X	X	X	X	X
1µg/ml	1.744596e-75	X	X	X	X
0.1µg/ml	1.592190e-86	3.725058e-09	X	X	X
0.01µg/ml	1.161530e-125	5.977047e-60	2.373854e-26	X	X
0µg/ml	2.475958e-63	6.255445e-07	5.454309e-01	8.593025e-20	X

X	Cneg	1µg/ml	0.1µg/ml	0.01µg/ml	0µg/ml
Cneg	X	X	X	X	X
1µg/ml	1.723756e-38	X	X	X	X
0.1µg/ml	4.605929e-49	8.111951e-08	X	X	X
0.01µg/ml	3.232651e-76	4.964640e-24	1.830843e-03	X	X
0µg/ml	2.635271e-48	1.575989e-11	1.447791e-01	2.641752e-01	X

Figure 43 : Lymphocytes T mémoire sur le micro-motif à 3 zones fonctionnelles et traités avec de la CsA. (A) Somme des intensités de fluorescence par cellule en fonction de la concentration de CsA. (B) Ratio de l'adhésion des cellules sur la zone anti-CD69 du micro-motif en fonction de la concentration de CsA. (A, B) Comparaison de moyenne effectuée avec un test Mann-Whitney-Wilcoxon avec une correction de Bonferonni, les valeurs p entre chaque paire sont rapportées dans les tableaux, n=4.

sur un effet de la CsA à 0,01µg/ml qui favoriserait l'expression de CD69, pour ce donneur. Cependant il est intéressant de noter la différence de sensibilité à la CsA entre les deux donneurs.

2.8. Évaluation de la performance du motif à trois zones fonctionnelles pour déterminer une expression de CD69

Afin d'examiner la performance du test d'activation nous avons réalisé une analyse *ROC (Receiver Operating Characteristic)* sur le jeu de données de dose réponse à la cyclosporine. Le principe de cette analyse est de calculer les ratios de vrai positif (True Positive Ratio, TPR) et de faux positif (False Positive Ratio, FPR), correspondant respectivement à la sensibilité et à la spécificité, pour chaque valeur de seuil de positivité sur la mesure d'adhésion. Pour réaliser cette analyse nous avons considéré la mesure en fluorescence pour CD69 comme mesure de référence avec un seuil de positivité à 40000 sur l'intensité de fluorescence intégrée. Les seuils testés pour la mesure de la proportion d'adhésion sur la zone anti-CD69 vont de 0 à 1 avec un pas de 0,1. Nous obtenons ainsi une aire sous la courbe (AUC) de 0,78 (Figure 44), ce qui signifie que pour une cellule donnée il y a 78% de chance que la mesure de l'adhésion traduise fidèlement une expression de CD69. Pour le diagnostic une valeur de 0,78 est considérée comme acceptable [64].

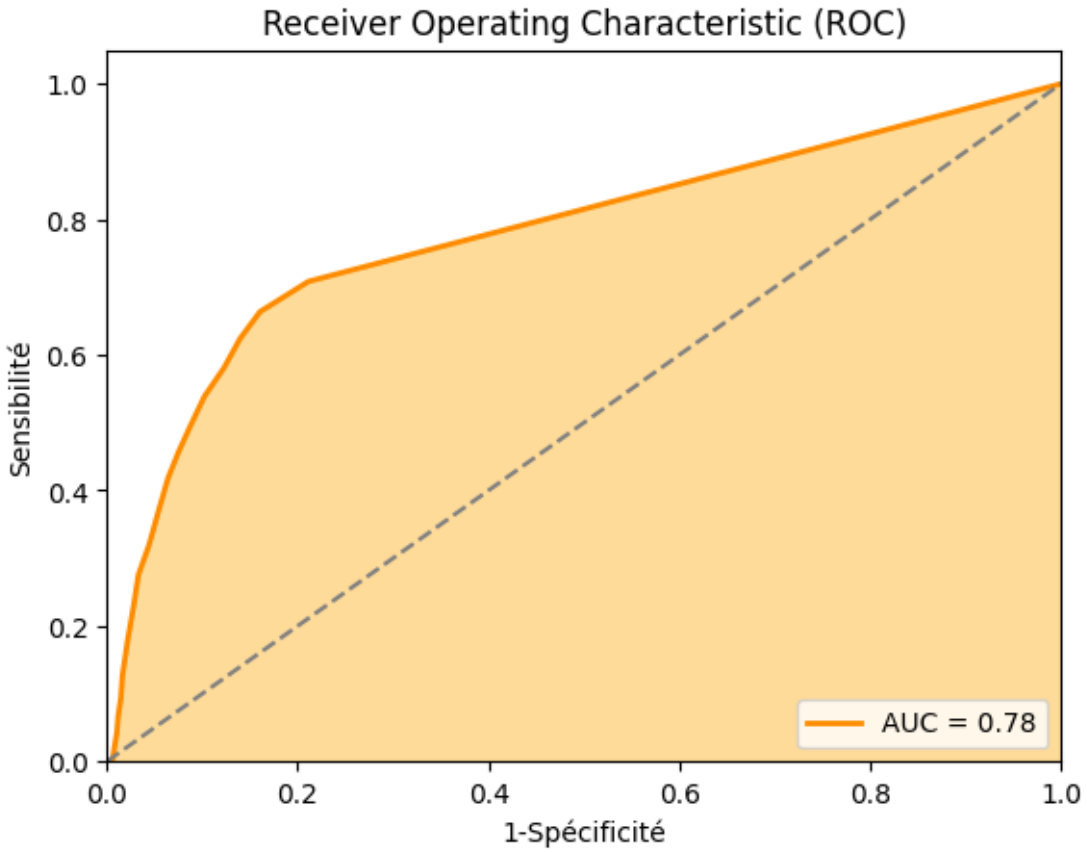


Figure 44 : Analyse ROC sur le jeu de donné constitué avec les expériences de dose réponse avec la CsA. L'aire sous la courbe (AUC) est égale à 0,78.

2.9. Cinétique d'adhésion des cellules T mémoire sur les zones du motif à trois zones fonctionnelles

La mesure précise de la cinétique d'activation au niveau de la cellule unique pourrait s'avérer utile pour détecter un retard d'activation, qui pourrait avoir un impact sur la réponse immunitaire du patient. De plus, au sein d'un même patient, cela pourrait permettre d'identifier des sous populations avec des cinétiques d'activation différentes. Notre test d'activation offre la possibilité de suivre en temps réel l'adhésion des cellules sur les différentes zones des micro-motifs. Cela permet d'estimer une cinétique d'activation par cellule en mesurant la cinétique d'expression de CD69 au travers de la cinétique d'adhésion sur la zone anti-CD69(Figure 45 A et B). La mesure d'une cinétique d'expression par l'adhésion présente des avantages en termes de résolution temporelle par des méthodes comme la cytométrie en flux. En effet, pour déterminer une cinétique d'expression par cytométrie, il faut préparer autant d'échantillons que de points temporels. Cela limite la résolution temporelle car le nombre de cellules disponible n'est pas illimité et cela induit également des temps de manipulation importants. Dans le cas de notre test, les mêmes cellules peuvent être observées sur de longues périodes, typiquement plusieurs heures. La consommation de cellules et les temps de manipulation restent minimes tout en permettant une résolution temporelle de l'ordre de la minute.

Sur les cellules du donneur utilisées pour les expériences de dose réponse présentées précédemment, nous avons mesuré les cinétiques d'adhésion des cellules traitées avec différentes doses de CsA (Figure 45). Les cellules ont été observées toutes les deux minutes et ce pendant trois heures. La cinétique d'adhésion sur les zones anti-CD45RO (Figure 45C) et anti-CD3/CD28 (Figure 45D) est très rapide par rapport à celle sur les zones anti-CD69 (Figure 45E), les marqueurs en question étant déjà fortement exprimés par la cellule au moment du dépôt des cellules sur les micro-motifs. CD69 est au contraire exprimé progressivement par les cellules après leur activation sur la zone fonctionnelle anti-CD3-CD28. Nous observons ainsi une adhésion progressive des cellules sur les zones anti CD69. Nous avons également pu observer une différence de cinétique d'adhésion moyenne en fonction de la concentration de cyclosporine. Dans le cas où les cellules qui n'adhèrent pas sur la zone anti CD69 sont conservées pour le calcul de la moyenne il y a une forte différence entre les cellules traitées avec 0,01µg/ml de CsA et les autres conditions. Cependant les autres conditions ne se distinguent que peu les unes des autres (Figure 45 F). L'application d'un seuil permet de ne mesurer la cinétique des cellules qui s'activent uniquement, et ainsi la moyenne d'adhésion ne comprend plus les cellules ayant une valeur nul pour l'adhésion CD69. Si on considère uniquement les cellules adhérant sur plus d'un dixième de l'aire du motif anti CD69 (Figure 45 G), on observe que toutes les conditions se distinguent les unes des autres et plus la concentration de CsA est faible plus la surface d'adhésion moyenne atteinte après trois heures est élevée. Dans le cas où l'on applique un seuil plus élevé de 0,5, on observe une similarité entre les cinétiques d'adhésion de toutes les conditions (Figure 45 H). Cela pourrait indiquer qu'une fraction des cellules ne sont pas sensibles à la CsA. Il est cependant à noter qu'une seule expérience par condition a pu être réalisée.

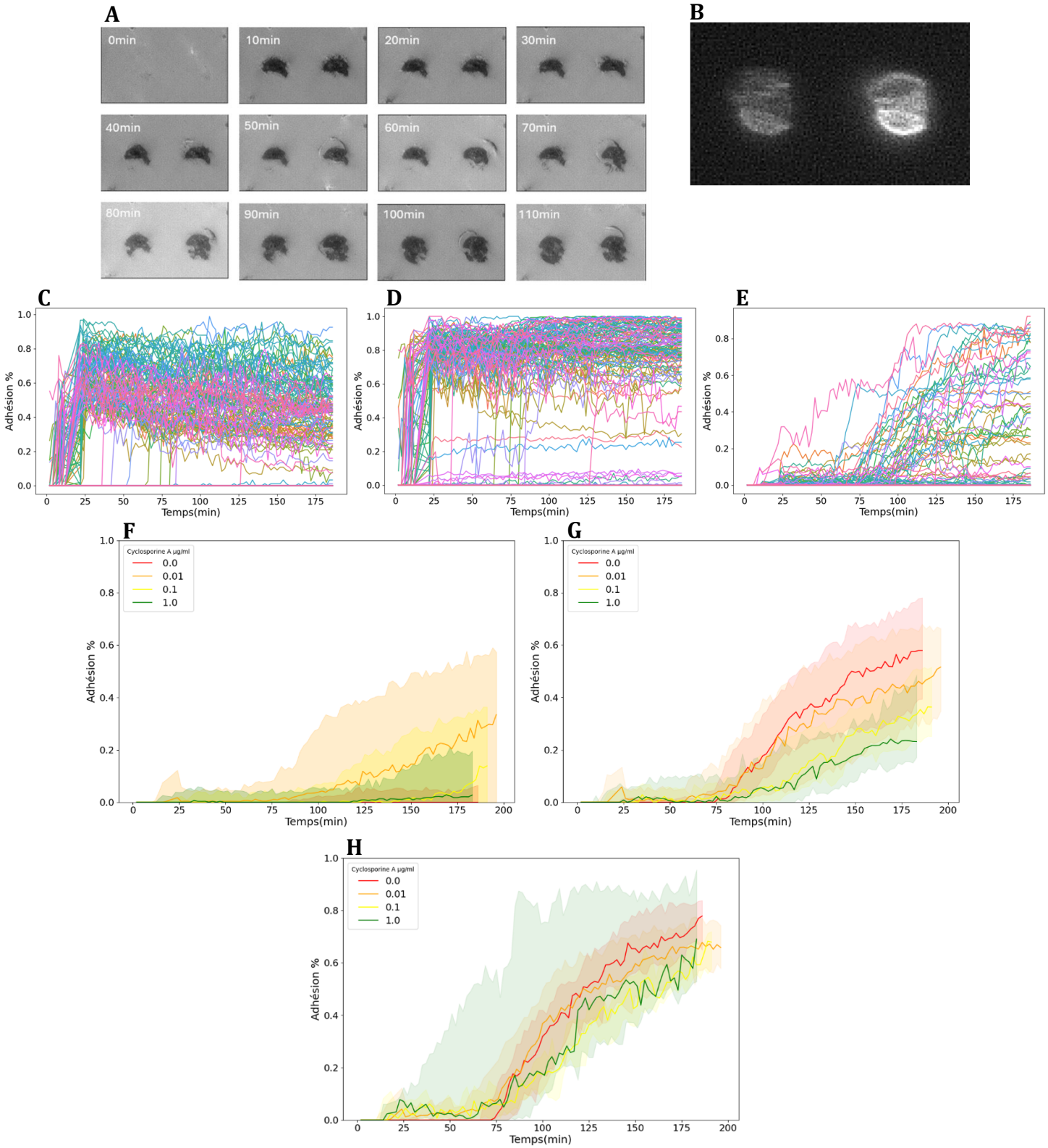


Figure 45 : Cinétique d'adhésion des lymphocytes T mémoire en fonction des zones du micro-motif. (A) Image de microscopie RICM de deux cellules sur des micro-motifs activateurs à trois zones fonctionnelles au cours du temps. (B) Image en épifluorescence pour CD69 des cellules de la figure A après 3 heures d'incubation sur les micro-motifs. (C, D, E) Cinétique d'adhésion par cellule, cellules non traitées avec de la CsA. (C) Cinétique d'adhésion sur la zone anti-CD45RO du micro-motif. (D) Cinétique d'adhésion sur la zone anti-CD3 anti-CD28 du micro-motif. (E) Cinétique d'adhésion sur la zone anti-CD69 du micro-motif. (F) Cinétique d'adhésion moyenne sur la zone anti-CD69 du micro-motif en fonction de la concentration de CsA. (G) Cinétique d'adhésion moyenne sur la zone anti-CD69 du micro-motif en fonction de la concentration de CsA, les cellules n'adhérant pas sur la zone au cours de l'acquisition ont été retirées pour le calcul de la moyenne (seuil = 0,1). (H) Cinétique d'adhésion moyenne sur la zone anti-CD69 du micro-motif en fonction de la concentration de CsA, les cellules adhérant faiblement sur la zone au cours de l'acquisition ont été retirées pour le calcul de la moyenne (seuil = 0,5). n = 1.

2.10. Etude du phénotype des lymphocytes T mémoire activés sur une courte durée

A travers nos expériences sur les micro-motifs, il est apparu qu'une partie seulement des cellules présentait une expression de CD69 après trois heures d'activation. Pour tenter de déterminer si en fonction du phénotype CD4+ ou CD8+ les cellules répondaient différemment nous avons, sur trois donneurs EFS, exploré en cytométrie en flux le phénotype des lymphocytes T mémoire activés pendant trois heures avec du TransAct. Nous nous sommes intéressés aux marqueurs CD4, CD8, CD25 et CD69. En parallèle, nous avons analysé l'expression des mêmes marqueurs sur des cellules T effectrices, ces cellules sont générées à partir de cellules T activées pendant deux jours puis maintenues en culture pendant deux semaines avec de l'IL-2. Ces cellules étant à un stade plus avancé d'activation, elles expriment CD25 au contraire des lymphocytes T mémoire activés sur une courte durée (Figure 46 A). L'expression de CD69 après trois heures d'activation varie d'un donneur à l'autre. Ainsi, après stimulation sur les trois donneurs, nous avons observé une moyenne de 39,7% des cellules T mémoire activées avec un écart-type de 6.4, les résultats pour un seul donneur sont reportés sur la Figure 46 B. Pour étudier s'il existait un biais de réponse à une stimulation courte en fonction du phénotype CD4 ou CD8 les fréquences de cellules CD4+CD69-, CD8+CD69-, CD4+CD69+ et CD8+CD69+ au sein d'un même échantillon activé pendant trois heures ont été mesurées. Les résultats montrent que les proportions de CD4+ et CD8+ ne sont pas significativement différentes parmi les cellules CD69+ et CD69- (Figure 46 C). Il a donc été conclu qu'il n'y avait pas de biais de réponse à une stimulation courte en fonction du phénotype CD4 ou CD8 et qu'une autre caractéristique des cellules influençait la réponse à une stimulation de courte durée.

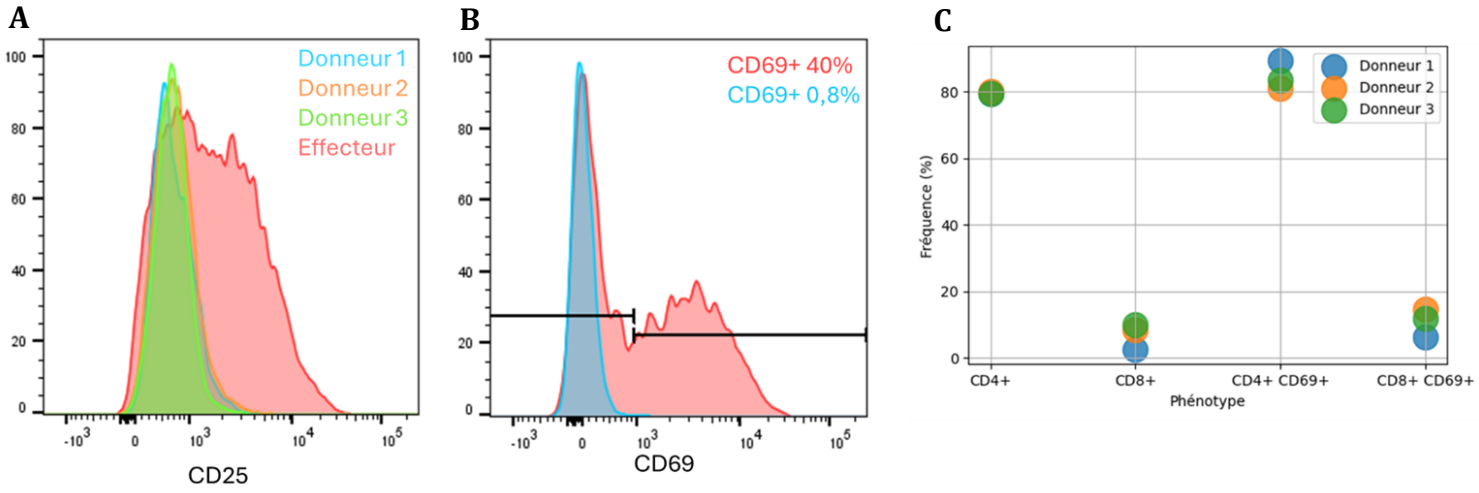


Figure 46 : Phénotype des lymphocytes T mémoire activés sur une durée de 3 heures. (A) Expression de CD25 des cellules T mémoire des trois donneurs comparés aux cellules T effectrices. (B) Expression de CD69 du donneur 3 après stimulation (rouge) comparé à son contrôle non activé (bleu). (C) Proportion de cellules CD4+ et CD8+ en fonction de l'expression de CD69.

3. Perspectives d'applications

3.1. Applicabilité du test d'activation des lymphocytes T mémoire pour un contexte clinique

Deux axes principaux sont à considérer pour l'application du test à une utilisation clinique :

- La précision du test pour évaluer l'état d'activation des cellules T mémoire.
- L'apport que représente ce test pour faciliter la réalisation de tests fonctionnels par les laboratoires hospitaliers.

La précision mesurée avec l'analyse ROC sur les résultats des expériences de doses-réponses à la cyclosporine A est de 0,78. Pour une utilisation clinique, cette précision pourrait ne pas être suffisante, tout du moins pour remplacer les tests existants réalisés en cytométrie. Cependant, pour une utilisation dans des cas d'urgence vitale, comme dans le cas du sepsis où à l'heure actuelle aucun outil de test des fonctions cellulaires n'est accessible, ce test pourrait trouver une forte utilité malgré sa faible précision. Comme le montrent nos résultats, le marqueur fluorescent pour CD69 permet de mieux discriminer l'état d'activation des cellules que l'adhésion. De plus, la mesure par fluorescence permet une précision quantitative non permise par l'adhésion. Ainsi, une solution pour améliorer la précision serait de révéler l'activation par des marqueurs fluorescents et non pas par l'adhésion.

Concernant l'apport pratique de ce test pour les routines des laboratoires hospitaliers, l'idéal serait de pouvoir produire un dispositif tout-en-un, capable de tester l'activation des cellules T mémoire à partir du sang complet des patients. En plus du gain de temps de manipulation des échantillons, un test sur sang complet permettrait de conserver toutes les molécules présentes dans le sang, thérapeutiques ou non, qui pourraient affecter les capacités d'activation des cellules testées. En l'état, le dépôt de sang complet, même dilué avec du PBS, sur les micro-motifs ne permet pas la capture des cellules T car les globules rouges, mille fois plus nombreux que les cellules T dans le sang, créent un encombrement sur la surface empêchant la capture des cellules T par les micro-motifs (Figure 47). Cependant, avec l'ajout d'un système préalable de séparation des globules rouges par microfluidique, tri magnétique ou plus simplement, une lyse des globules rouges, il serait possible pour notre test de capturer, d'identifier, d'activer et de révéler l'activation des cellules T mémoire tout en limitant fortement les manipulations nécessaires. De plus utiliser un dispositif microfluidique qui comprend le test lui-même en plus du système de tri, permettrait de fortement limiter le volume de suspension cellulaire à déposer et donc la quantité de cellules à prélever au patient et à manipuler au laboratoire.

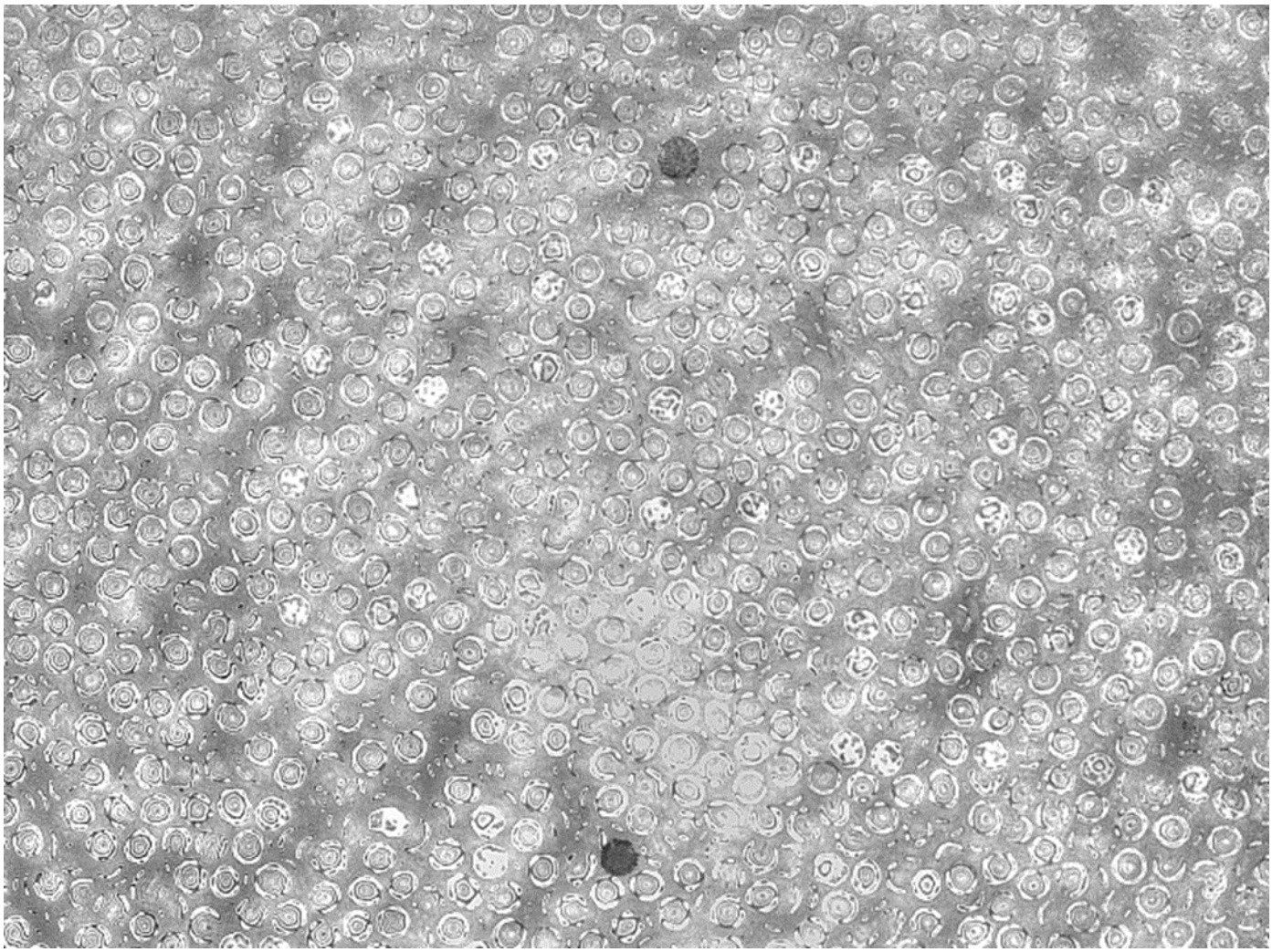


Figure 47 : Image en RICM de sang frais dilué au 1/10 avec du PBS. Le sang dilué a été incubé 3 heures à 37°c puis observé au microscope. Les cellules visibles en transparence sont des globules rouges. Après 3 heures seulement deux cellules ont été capturées sur le pattern.

3.2. Perspectives d'applications du test d'activation des lymphocytes T mémoire

Le test d'activation des lymphocytes T mémoire présenté dans ce manuscrit permet de tester en quelques heures, avec peu de manipulations, la capacité d'activation par l'intermédiaire de l'expression du marqueur d'activation CD69. Il permettrait donc aux laboratoires cliniques de pratiquer beaucoup de tests sur des périodes très courtes et avec peu de personnel, ce qui rend compatible l'usage d'un test fonctionnel avec des pathologies aiguës qui nécessiterait des résultats rapides. De plus sa simplicité d'utilisation pourrait permettre de pratiquer plus largement ces tests, dont l'usage est limité notamment par les ressources humaines disponibles. Ainsi plusieurs situations cliniques d'intérêt pour notre test ont été identifiées. La première application concerne la prise en charge du sepsis puis d'autres applications ont été envisagées pour la qualification des photophérèses extra-corporelle ainsi que pour le diagnostic des déficits immunitaires communs variables. Ces situations sont détaillées ci-dessous ainsi le rôle que pourrait jouer notre test.

Le sepsis est défini comme « dysfonctionnement d'un organe mettant en jeu le pronostic vital, causé par une réponse dysfonctionnelle de l'hôte à l'infection », il est issu d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS). Il survient généralement à la suite d'une infection locale qui induit une réponse immunitaire systémique dérégulée. Il peut également apparaître à la suite d'un trauma. Le choc septique survient lorsque le sepsis se complique d'une hyperlactatémie et d'une baisse de la pression artérielle insensible à la réanimation liquidienne intensive et aux vasopresseurs, entraînant à son tour une hypoxie dans les systèmes organiques. Le sepsis représente 11 millions de décès par an, avec un taux de mortalité de 24,4% à 30 jours et de 32,2% à 90 jours, pour les zones d'Amérique du Nord, d'Australie et d'Europe entre 2009 et 2019. Le choc septique présente des taux de mortalité plus élevés 34.7% à 30 jours et 38.5% à 90 jours, dans les mêmes zones et sur la même période [65]. Le sepsis affecte prioritairement les personnes immunodéprimées mais il touche également les personnes avec un système immunitaire complet et fonctionnel. Les manifestations cliniques du sepsis incluent la fièvre ou l'hypothermie, la tachycardie et la tachypnée. Les examens sanguins montrent une concentration élevée de cytokines pro inflammatoires, un compte de leucocytes supérieur à 12000/µl ou inférieur à 4000/µl [66]. Durant la phase dite hyperimmune la vague de molécules pro inflammatoires, ou tempête cytokinique, active les cellules du système immunitaire inné dont les neutrophiles qui sont les leucocytes les plus représentés dans le sang. Cela induit une perméabilisation des vaisseaux, une augmentation de l'infiltration des leucocytes et éventuellement la dysfonction d'un organe [67] . La phase hyperimmune est rapidement suivie d'une phase hypoimmune précoce caractérisée par une forte production de médiateurs anti-inflammatoires, une baisse de la lyse des pathogènes et une susceptibilité accrue aux infections secondaires. Les médiateurs anti-inflammatoires entrainent une forte déplétion par apoptose des lymphocytes, ce qui facilite la progression de l'infection d'origine ainsi que les infections secondaires. Les lymphocytes et macrophages restants ont un phénotype anti-inflammatoire, M2 pour les macrophages et Th2/Treg pour les lymphocytes T. L'anergie des cellules T induite par le sepsis est un enjeu majeur pour la prise en charge, la baisse de fonctionnalité ainsi que l'apoptose des lymphocytes T jusqu'à la lymphopénie. Cela diminue à court terme les chances de survie car les CD4+ ne jouent plus leur rôle de guidage du système immunitaire par leur production de cytokines. A long terme cela complique également la rémission des patients du fait de la perte conséquente des effectifs du répertoire T. L'état d'immunosuppression chez les survivants peut ainsi devenir chronique. Le score SOFA (Sequenciel Organ Failure Assesment) a été développé au début des années 90 dans l'objectif de prédire la mortalité des patients atteint de sepsis[68]. Il se base sur les résultats des examens du système respiratoire, du système vasculaire, du système nerveux, des reins et du foie pour créer un score et ainsi prédire une mortalité [68]. Cependant le score SOFA n'est capable de diagnostiquer un sepsis qu'au moment de la dysfonction d'un organe[69]. Or la dysfonction d'un organe implique déjà de lourde conséquence sur la santé du patient et diminue ses chances de rémission complète. Une des perspectives d'application majeure pour notre prototype serait de détecter de façon précoce l'anergie des cellules T. Cela pourrait permettre d'anticiper l'immunosuppression et de la compenser précocement en ajustant les prescriptions.

Comme décrit dans la section 1.3.1, la photophérèse extracorporelle est un traitement immunomodulateur utilisé pour modifier l'activité des lymphocytes T, actuellement la qualité de la photophérèse est appréciée par des tests de prolifération durant 3 jours. Or le traitement est réalisé en moins d'une journée et les résultats des tests

de prolifération ne sont disponibles qu'après le traitement. La mesure rapide des capacités de prolifération des lymphocytes T pourrait permettre de ne pas traiter les patients lorsque la photophorèse n'a pas eu l'effet escompté sur les populations de lymphocytes T. Ce traitement est décrit comme très bien toléré [24], il n'y a donc pas d'urgence sur la prise de décision concernant la réinjection des leucocytes traités. Cependant une mesure plus rapide des capacités prolifératives permettrait un gain de temps pour le patient qui n'aurait pas à revenir pour être traité à nouveau en cas de défaut de la photophérèse. Cela permettrait également un gain de temps pour les cliniciens d'une part grâce à l'économie du temps de manipulation des échantillons pour effectuer les tests de prolifération, d'autres part grâce à l'économie du temps d'accueil et de prise en charge des patients en ambulatoire.

Le DICV est un groupe hétérogène d'immunodéficiences primaires caractérisé par une hypogammaglobulinémie et une forte susceptibilité aux infections bactériennes. Les DICV sont des pathologies de gravité moindre par rapport à des immunodéficiences primaires comme le déficit immunitaire combiné sévère (DICS) et sont relativement fréquentes. Elles affectent environ une personne sur 25000 [70]. Elles sont causées par des défauts génétiques ou épigénétiques qui affectent, pour beaucoup, directement les lymphocytes [70] . Les lymphocytes T sont régulièrement affectés par une diminution des populations [71] et une altération de la prolifération[25]. Du fait de leur gravité moindre les cas de DICV sont souvent détectés tardivement alors que des tests fonctionnels pourraient permettre la détection précoce d'une partie de ces pathologies. Ainsi un test d'activation plus rapide et nécessitant moins de compétences et de matériel pourrait permettre un diagnostic plus précoce des DICV par un élargissement de l'usage des tests fonctionnels.

3.3. Perspectives d'applications du test d'activation des cellules CAR-T anti CD19

Aujourd'hui les lymphocytes T CAR sont utilisés en dernière intention pour le traitement des lymphomes B, les patients sont donc dans un état critique au moment de l'injection des lymphocytes T CAR et malheureusement ils décèdent parfois avant. La capacité de prolifération et la persistance dans l'organisme des lymphocytes T CAR sont deux paramètres qui se sont révélés critiques pour la rémission des patients. Ces paramètres sont fortement dépendants de la qualité des cellules prélevées aux patients [72]. Dans l'objectif de contrôler rapidement la capacité d'activation des cellules CAR-T avant l'injection, Lisa Mondange et Valentine Seveau ont développé un test d'activation des lymphocytes T CAR. Ce test se base également sur la micro-impression de protéines mais le stimulant de l'activation utilisé est une protéine CD19 chimérique imprimée. Cependant à l'heure actuelle en France la production des cellules lymphocytes T CAR est uniquement autorisée pour les industriels et pas pour les structures publiques. Or les industriels protègent leur propriété intellectuelle en interdisant toute analyse des lymphocytes T CAR avant l'injection. Il est possible que dans les années à venir des structures publiques puissent produire les lymphocytes T CAR à moindre coût autorisant ainsi une plus grande liberté dans la manipulation et l'analyse des lymphocytes T CAR avant injection.

3.4. Perspectives d'applications pour le criblage thérapeutique

Dans un contexte de recherche pharmaceutique, la mesure rapide de capacités fonctionnelles pourrait permettre d'optimiser le ciblage thérapeutique notamment des petites molécules. Les petites molécules sont bien plus pratiques à administrer et à distribuer que les protéines chimériques comme les anticorps monoclonaux.

3.5. Perspectives d'applications pour le multiplexage

Cette perspective d'application actuellement en phase de test au laboratoire vise à mesurer davantage de paramètres que l'expression d'un marqueur d'activation précoce. Pour cela nous voulons ajouter des zones fonctionnelles aux micro-motifs déjà développés pour le test d'activation de lymphocytes T. Ces nouvelles zones pourraient mesurer notamment les cytokines exprimées par les lymphocytes T au niveau de la cellule unique sur le modèle de l'ELISPOT. Cela permettrait d'avoir en un test la cinétique d'activation ainsi que la polarisation fonctionnelle de chaque cellule. La détection des cytokines fixées sur les micro-motifs n'est possible en RICM qu'avec l'utilisation de lame wet-SURF. Il serait également possible comme avec la cyclosporine A de facilement mesurer un effet de doses-réponses par l'exposition à un facteur soluble ou imprimé.

4. Conclusion

L'innovation apportée par ce test d'activation des lymphocytes T mémoire réside dans la production de substrats « intelligents » capables de capturer, d'identifier, d'activer et de révéler l'activation de cellules T mémoire humaines uniquement par l'adhésion des cellules sur des micro-motifs d'anticorps à zones fonctionnelles multiples. Grâce à la lecture en temps réel de l'adhésion des cellules par une technique de microscopie interférentielle, ce test d'activation dispose d'une résolution temporelle de l'ordre de la minute et au niveau de la cellule unique. Ce test, réalisable en trois heures et avec peu de manipulation, permettrait de renforcer l'usage des tests fonctionnels dans un contexte clinique où les contraintes de temps, de ressources humaines et d'accès aux équipements d'analyses sont des enjeux majeurs. Les micro-motifs d'anticorps sont créés avec la méthode LIMAP, réalisée avec le dispositif commercial Primo développé et distribué par l'entreprise Alvéole.

Les travaux de thèse présentés ici ont débuté par la caractérisation des anticorps nécessaires à la bonne capture et activation des cellules T mémoire, notamment pour les anticorps anti-CD45 et anti-CD28 dont l'utilité pouvait être questionnée pour l'activation de cellules T mémoire. En effet, CD45 joue un rôle à la fois de promotion et d'inhibition de l'activation de cellules T, et CD28 a une importance discutée pour l'activation des lymphocytes T mémoire. Il est apparu à travers nos résultats, d'adhésion et d'activation

dans des canaux IBD couverts d'une couche uniforme d'anticorps, que l'anticorps anti-CD45 n'avait pas d'effet sur l'activation des cellules. Il peut donc être conservé car il facilite la capture des cellules et l'adhésion des cellules ; au contraire, l'anticorps anti-CD28 semble être important pour l'activation des cellules T mémoire, il a donc été également conservé.

Les protocoles mis au point par Geoffrey Delhaye au cours de sa thèse comprenaient une incubation des anticorps sur le substrat activé à 4°c durant toute une nuit. Dans l'objectif d'avoir des protocoles réalisables sur des temps plus courts des expériences visant premièrement à comparer l'adsorption des anticorps à 4°c et à 37°c ont été réalisées. Ces expériences ont montré des résultats d'absorption équivalents entre des anticorps incubés une heure à 37° et une nuit à 4°c. Les résultats prometteurs de l'incubation à 37°c nous ont poussés à vouloir caractériser précisément les cinétiques d'adsorption des anticorps mais aussi d'autres molécules à 37°c. Pour cela la microscopie interférentielle a été utilisée pour mesurer en direct l'adsorption de molécules sur les zones activées du substrat. Les adsorptions étudiées concernent les anticorps adsorbés directement sur le substrat activé, la neutravidine adsorbée directement sur le substrat activé, le TransAct adsorbé directement sur le substrat activé et un anticorps biotinylé adsorbé sur de la neutravidine imprimée. Ces expériences visaient à déterminer un temps d'adsorption optimal pour ces molécules à 37°C afin d'optimiser les protocoles de réalisation des micro-motifs.

Dans l'objectif d'améliorer la lecture de l'activation par le micro-motif anti-CD69, nous avons réalisé l'ajout d'un gradient sur cette dernière, dans l'idée que nous pourrions alors avoir une lecture semi-quantitative du niveau d'expression de CD69. Concrètement, il s'agissait de contrôler la zone d'adhésion sur le motif anti-CD69 pour l'associer à un niveau d'expression de CD69 ; plus une cellule exprime CD69, plus elle devrait adhérer aux zones les moins denses en anti-CD69 du gradient. L'analyse du niveau d'adhésion sur la zone anti-CD69 ainsi que la fluorescence des cellules pour CD69 ne montre pas d'amélioration apportée par les gradients pour prédire la fluorescence des cellules pour CD69 avec le niveau d'adhésion des cellules sur les motifs anti-CD69. Cependant, les images de microscopie interférentielle de l'adhésion des cellules sur les gradients montrent que les cellules activées sur les micro-motifs adhèrent premièrement sur les zones les plus denses des gradients. Cela démontre que l'idée qu'une faible expression de CD69 ne permettrait l'adhésion que sur les zones les plus denses du gradient était juste. Néanmoins, les conditions d'analyse et expérimentales n'ont pas permis de mettre en lumière une lecture plus quantitative du niveau d'expression de CD69.

Nous avons par la suite souhaité développer un micro-motif avec une zone fonctionnelle supplémentaire. Nous avons choisi pour cette zone une fonction d'identification des cellules T mémoire avec l'impression d'un anticorps anti-CD45RO. La répétition pour une quatrième impression des protocoles développés par Geoffrey Delhaye n'a pas fourni de résultat satisfaisant dans le sens où les cellules n'adhéraient pas sur la première zone fonctionnelle imprimée, la zone anti-CD45RO. Nous avons alors supposé une dégradation des anticorps imprimés. Ne parvenant pas à identifier une cause précise à cette dégradation, nous avons opté pour une augmentation de la fonctionnalité des anticorps imprimés qui compenserait la dégradation de ceux-ci. Pour cela, nous avons imprimé de la neutravidine sur laquelle était ensuite adsorbé l'anticorps biotinylé anti-CD45RO, orientant ainsi l'anticorps. Ce nouveau protocole a permis d'obtenir une adhésion des

cellules sur la première zone imprimée. Il est à noter un autre problème persistant, celui de l'impression non spécifique des anticorps, limite également les possibilités d'augmentation importante du nombre de zone fonctionnelles. Geoffrey Delhaye a effet démontré au cours de ces travaux de thèse qu'avec un passivation à la BSA entre l'impression deux zones fonctionnelles on obtenait une impression non spécifique d'environ 30%. C'est-à-dire que la densité d'anticorps mesurée dans une zone précédemment imprimée était équivalente à 30% de la densité mesurée dans la zone imprimée.

Une fois le micro-motif à trois zones fonctionnelles au point, nous avons voulu évaluer sa sensibilité pour discriminer des niveaux d'activation moins différents que pour les trois conditions testées jusqu'alors. En effet, les cellules activées sur les micro-motifs étaient comparées à un contrôle négatif, où les cellules étaient déposées sur des micro-motifs non activateurs et donc elles n'exprimaient pas CD69, et à un contrôle positif constitué de cellules préactivées pendant 12 heures et qui avaient donc une forte expression de CD69. Nous avons donc testé la capacité du test à discriminer des cellules T mémoire dont l'activation avait été inhibée avec de la cyclosporine A à différentes doses thérapeutiques. Les analyses sur donneurs EFS de la sensibilité des cellules T mémoire ont montré une différence importante de sensibilité à la cyclosporine A entre les donneurs. Nous avons alors choisi d'effectuer ces expériences de doses-réponse avec un seul donneur. Les résultats montrent que par l'adhésion des cellules sur la zone anti-CD69, notre test était capable de discriminer significativement les cellules inhibées avec la dose thérapeutique la plus forte de cyclosporine A (1µg/ml) du contrôle négatif et des cellules activées sans inhibiteur.

En conclusion le test d'activation des lymphocytes T mémoire humains a démontré une sensibilité suffisante pour différencier des cellules T non activés de cellules activées pendant trois heures sur les micro-motifs et de cellules préactivées pendant douze heures. De plus ce même test est capable de discriminer les cellules T dont l'activation a été inhibée par une dose thérapeutique de cyclosporine A. Ce test, une fois sa production standardisée pour répondre aux exigences de qualité des réactifs hospitaliers, pourrait avoir une utilité clinique immédiate. Il pourrait en effet aider à une meilleure prise en charge dans les situations d'urgences comme dans les cas de sepsis mais aussi il pourrait permettre un usage à plus grande échelle des tests fonctionnel grâce à sa facilité de réalisation.

5. Protocoles

5.1. Micro-motifs

Tous les micro-motifs sont réalisés avec le dispositif Primo V1 couplé à un microscope inversé Nikon TI et un objectif 20x (Nikon CFI S Plan Fluor ELWD 20XC). Également le temps d'exposition au laser UV du dispositif Primo est de 3 minutes pour toutes les impressions. Pour le rinçage des puits nous utilisons, tant qu'il n'y a pas de cellules, un dispositif artisanal qui permet d'amener proche de la surface un tuyau d'arrivée de liquide de rinçage ainsi qu'un tuyau d'aspiration surélevé de 1mm par rapport à l'arrivée. Ce dispositif permet de rincer les puits un par un sans immerger la lame. Le liquide de rinçage

est contenu dans une seringue et est délivré soit par un pousse seringue soit à la main via le tuyau d'arrivée.

5.1.1. Traitement de surface du verre pour la production de substrats avec des micro-motifs de molécules imprimées

Pour la production des substrats nous utilisons des lames de verre de 170 µm d'épaisseurs et de 22x22x0,170mm (Schott Nexterion clean room cleaned, référence : 1472309). Ces lames de verre sont nettoyées en salle blanche par le producteur et sont manipulées uniquement sous une hotte anti-poussière pour les étapes du traitement de surface réalisées au laboratoire. Les boites de lames sont remplies d'azote et enrobées dans du Parafilm après chaque ouverture.

Les lames de verre sont premièrement traitées au plasma (Plasma cleaner PDC-002-CE, Harrick Plasma) sur position haute pendant 30 minutes. Ensuite une solution d'APTS (Sigma-Aldrich référence : 440140) est déposée sur les lames, cette solution d'eau MilliQ contient 1% d'APTS et 0,03% d'acide acétique, l'APTS est ajouté au dernier moment à la solution. La solution est incubée 2 heures à 4°c avec 200µl par lame puis rincée abondamment avec de l'eau MilliQ. Les lames de verre sont ensuite séchées avec un flux d'azote puis elles sont déposées sur une plaque chauffante à 95°c pendant 15 minutes.

Des stickers de film PDMS de 250 µm d'épaisseur (Sterne Silicone Performance) et contenant 3 puits de 3 mm de diamètre sont collés sur les lames afin de contenir les liquides qui seront par la suite déposés sur les lames. Pour faciliter la manipulation des lames et permettre leur immersion complète les lames sont également collées par l'extérieur sur une boite de pétri percée. La colle utilisée est une colle photosensible (Norland Optical Adhesive 81) polymérisée sous lumière UV (Kloé UV-KUB 2). Dans les puits est ensuite déposée une solution de 23% de mPEG-SVA(Interchim, MW=5000 Da référence : IO9680), cette solution est préparée dans de l'eau Milli-Q et contient 10mM de tampon carbonate afin d'obtenir un pH égal à 8,5. 10 µl de solution sont déposées par puits puis les lames sont incubées une nuit à 4°c. Le lendemain les puits sont rincés avec 6ml d'eau milli-Q puis passivés avec une solution de PBS-BSA 4% pendant 15 minutes, puis rincé avec 6ml de PBS (Gibco, référence : 14190-094). Les lames sont prêtes pour la réalisation des micro-motifs.

Dans le cas où nous avions besoin de canaux et non pas de puits, les canaux en PDMS sont collés sur la lame de verre après l'étape d'activation au plasma. Les canaux sont traités au plasma pendant 2 minutes sur position basse avant de d'être collés sur les lames de verre. Les lames avec les canaux collés sont ensuite déposées sur une plaque chauffante a 95°c pendant 8 minutes. Les étapes suivantes sont les mêmes à la différence qu'elles sont réalisées dans les canaux.

5.1.2. Micro-motifs à 2 zones fonctionnelles

La première étape consiste à réaliser un motif de molécules fluorescentes mCherry, ce motif permet l'alignement des motifs imprimés ensuite. Les puits sont ensuite rincés avec 6 ml de PBS, passivés pendant 15 minutes avec une solution de PBS-BSA 4% puis rincés à nouveau avec 6ml de PBS.

L'impression du second motif nécessite premièrement l'alignement de la projection du second motif avec le premier motif observé en épifluorescence. Après l'exposition au laser UV le puits est rincé avec 6ml de PBS et les anticorps sont incubés une nuit à 4°c aux concentrations suivant :

- Ac anti-CD45: 50µg/ml (R&D Systems, référence : MAB1430)
- Ac anti-CD3: 100µg/ml (Biolegend, référence : 300438)
- Ac anti-CD28: 100µg/ml (Biolegend, référence : 302934)

Les anticorps sont ensuite rincés avec 6ml de PBS puis la surface est passivée pendant 15 minutes avec une solution de PBS-BSA 4% à température ambiante. La solution de passivation est rincée avec 6ml de PBS.

L'impression du troisième motif s'effectue de la même façon que celle du deuxième motif. L'anticorps anti CD69 (R&D Systems, référence : MAB2359) est incubé à 4°c pendant une nuit à une concentration de 100µg/ml.

5.1.3. Micro-motifs à 3 zones fonctionnelles

De la même façon que pour le micro-motifs à deux zones fonctionnelles, la première étape consiste à réaliser un motif de molécule fluorescente. Ce motif permet l'alignement des motifs imprimés ensuite. Les puits sont ensuite rincés avec 6 ml de PBS, passivés pendant 15 minutes avec une solution de PBS-BSA 4% puis rincés à nouveau avec 6ml de PBS.

Impression du second micro-motif : alignement de la projection du second motif sur le premier motif observé en épifluorescence puis exposition au laser UV. Le puits est rincé avec 6ml de PBS. De la neutravidine a 50µg/ml est incubée 30 minutes à 37°c puis rincée avec 6ml de PBS. L'anticorps anti-CD45RO biotinylé (Biolegend, référence : 304220) est ensuite incubé a 50 µg/ml pendant 1 heure à 37°c. L'anticorps est rincé avec 6 ml de PBS puis le puits est passivé avec une solution de PBS-BSA 4% pendant 15 minutes à température ambiante, rincée avec 6ml de PBS.

Impression du troisième micro-motif : alignement de la projection du troisième motif sur le premier motif observé en épifluorescence puis exposition au laser UV. Le puits est rincé avec 6ml de PBS. Les anticorps anti-CD3/CD28 sont incubés une nuit à 4°c à 100 µg/ml chacun, puis ils sont rincés avec 6ml de PBS. Le puits est ensuite passivé avec une solution de PBS-BSA 4% pendant 15 minutes à température ambiante, rincée avec 6 ml de PBS.

Impression du quatrième micro-motif : Alignement de la projection du quatrième motif sur le premier motif observé en épifluorescence puis exposition au laser UV. Le puits est rincé avec 6ml de PBS. L'anticorps anti-CD69 est incubé a 100 µg/ml pendant 1 heure à 37°c puis rincé avec 6 ml de PBS. Le puits est ensuite passivé avec une solution de PBS-BSA 4% pendant 15 minutes à température ambiante, rincé avec 6 ml de PBS.

La surface est prête pour le dépôt des cellules.

5.2. Culture cellulaire

5.2.1. Préparation des milieux de culture

Nos expériences nécessitent de préparer deux milieux de culture différent :

- Milieu complet : RPMI 1640 (Gibco, référence : 22400089) complémenté avec 10% de SVF (Gibco, référence : A4766801) et 1% de Glutamax (Gibco, référence : 35050061). Une fois complémenté le milieu est filtré avec un filtre de 0,2µm
- Milieu de microscopie : RPMI 1640 complémenté avec 1% de Glutamax, 1% PenStrep (ref) et 2,5% d'HEPES 1M (Gibco, référence : 15630080). La concentration finale d'HEPES est de 50mM. Une fois complémenté le milieu est filtré avec un filtre de 0,2µm

5.2.2. Isolation des PBMC

Les cellules T mémoire déposées sur les micro-motifs sont isolées à partir des PBMC congelés de donneurs EFS (Établissement Français du Sang). Lors de la réception des poches de sang EFS les PBMC sont isolés par un Ficoll. Pour cela 30ml de sang, dilué à 50% avec du PBS, sont déposés dans un Falcon prérempli avec 15ml de milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio, référence : CMSMSL01-01). L'échantillon est ensuite centrifugé à 1000g pendant 30 minutes sans frein. Les PBMC sont ensuite rincés avec du milieu complet puis congelé à -80°c en unité de $20x10^6$ PBMC à $20x10^6$/ml dans une solution de SVF-DMSO (90% et 10% respectivement).

5.2.3. Tri des Lymphocytes T mémoire

La veille du dépôt des cellules sur les micro-motifs une unité de $20x10^6$ de PBMC est décongelée. Pour cela les cellules congelées sont brièvement agitées dans un bain marie a 37°c puis déposées dans 10ml de milieu RPMI 1640 avec rouge phénol, 10% de SVF et 1% de Glutamax (Gibco, référence : 35050061). Les lymphocytes T mémoire sont triés par séparation magnétique, nous utilisons conjointement deux kits de séparation, un séparant les lymphocytes T et l'autre séparant les lymphocytes CD45RA-. Après centrifugation a 200G pendant 5min les cellules sont reprises dans 80µl de tampon Macs (Miltenyi, référence : 130-091-376) et sont ajoutés 20µl de la solution biotin-antibody cocktail du kit d'isolation Pan T cell (Miltenyi, référence : 130-096-535). Les cellules sont vortexés et incubées 5 minutes à 4°c. Ensuite sont ajoutés 40µl de la solution Microbead Cocktail du kit Pan T Cell et 40µl de la solution CD45RA Microbeads (Miltenyi, référence : 130-045-901). Les cellules sont incubées 15 minutes à 4°c. Les cellules sont ensuite déposées dans une colonne (LS Columns ref : 130-042-401) sur un portoir magnétique et éluées avec 3ml de tampon Macs. Ainsi seule les cellules T CD45RA- sont récupérées. La colonne a préalablement été rincé avec 3ml de tampon Macs. Les cellules triées sont reprises dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF et 1% de glutamax a $2x10^6$ cellules/ml.

La culture est alors séparée en deux, la première est incubée a 37°c jusqu'au lendemain. Les cellules de la deuxième sont activées afin d'être utilisées comme contrôle positif. Pour cela des billes couvertes d'anticorps anti CD3 et CD28 (Gibco, référence : 11131D) sont ajoutées à la culture pour la nuit. Le lendemain les billes sont retirées par séparation magnétique.

Pour l'utilisation sur les micro-motifs les cellules sont reprises dans le milieu de culture de microscopie à $4x10^6$ cellules/ml, 1h avant utilisation.

Les cellules utilisées pour les expériences de doses-réponse à la cyclosporine A (Sigma-Aldrich, référence : 30024-25mg) étaient reprises dans le milieu de microscopie avec la cyclosporine A une heure avant leur dépôt sur les micro-motifs.

5.3. Cytométrie

Toutes les analyses de cytométrie sont réalisées avec un cytomètre LSR Fortessa X20 (BD Biosciences, Europe)

Marquage viabilité :

- Prélever échantillon dans tubes cyto (100µl de chaque culture)
- Ajouter 1ml de PBS
- Centrifuger 1000 rpm 5 min
- Reprendre les culots par 100µl de solution de Zombie Violet (dilution au 1/1000 dans du PBS) (sauf tube NM)
- Vortex
- Incubation 15 min à RT au noir
- Ajout 2ml de PBS 2% FBS
- Centrifuger 5 min à 1000 rpm

Marquage de surface :

- Dans les tubes « Mix panel », reprendre par 100µl + 1µl de chaque anticorps suivant :

CD8-VioGreen (BV510) human, référence 130-110-822

CD45RA-FITC human Clone REA562, référence 130-113-927

CD25-PE human Clone REA570, référence 130-113-848

CD3-PerCP-Vio700 (PerCP-Cy5.5) human Clone REA613, référence 130-113-703

CD45RO-PE-Vio770 (PECy7) human Clone REA611, référence 130-114-086

CD69-APC human Clone REA824 référence 130-112-803

CD4-APC-Vio770 (APC-Cy7) human Clone REA623 référence 130-113-785

REA control (S)-VioGreen, REA293, 100 tests référence 130-113-444

REA Control Antibody (S), human IgG1, FITC, REAfinity™, référence 130-113-437

REA control (S)-PerCP-Vio700, 100 tests référence 130-113-441

REA control (S)-PE, REA293, 100 tests référence 130-113-438

REA control (S)-PE-Vio770, REA293, 100 tests référence 130-113-440

REA control (S)-APC, REA293, 100 tests référence 130-113-434

- Dans le tube « Mix iso », ajouter 2µl de chaque anticorps isotypique correspondant à la liste ci-dessus
- Vortexer et incuber 10min au frigo
- Ajout 1ml de PBS+2%SVF à chaque tube
- Centrifuger 5 min à 1000rpm et Reprise dans 500µl de PBS + 2%SVF

5.4. Microscopie

5.4.1. Observation des cellules sur les micro-motifs

Toutes les expériences avec les micro-motifs à deux zones fonctionnelles sont maintenues à 37°c durant l'observation avec l'enceinte thermorégulée montée sur un microscope inversé Zeiss.

L'observation des cellules en microscopie interférentielle est toujours réalisée sur des cellules vivantes.

L'observation des cellules en épifluorescence est toujours réalisée après fixation des cellules avec une solution de paraformaldéhyde a 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Apres fixation CD69 est marqué avec un anticorps anti CD69 AF647 (Biolegend, référence : 310918) dilué dans vingt fois son volume, comme recommandé par le fournisseur, et le marqueur de viabilité 7AAD (Biolegend, référence : 420403) est utilisé à 2,5µg/ml et est incubé 5min à température ambiante.

Toutes les expériences avec les micro-motifs à trois zones fonctionnelles sont maintenues à 37°c durant l'observation avec le dispositif Okolab montée sur un microscope inversé Zeiss.

Pour l'observation des cellules sur les micro-motifs deux objectifs ont été utilisés :

- x63 Autofocus utilisé pour les acquisitions sur temps long en microscopie interférentielle, en lumière transmise et en épifluorescence. Ouverture numérique maximum 1,25. Pour l'acquisition de la fluorescence des cellules seul cet objectif a été utilisé.
- X63 RICM utilisé pour les acquisitions à un temps unique en microscopie interférentielle, en lumière transmise et en épifluorescence. Ouverture numérique maximum 1.4.

Paramètres d'acquisition :

- Microscopie interférentielle avec x63 autofocus : diode à 50%, 120ms d'exposition, ouverture numérique = 1.
- Microscopie interférentielle avec x63 RICM : diode à 50%, 120ms d'exposition, ouverture numérique = 1.
- Microscopie à épifluorescence pour l'observation de l'expression de CD69 : diode à 20%, 500ms d'exposition, ouverture numérique = 1,25.

- Microscopie à épifluorescence pour l'observation du marqueur de viabilité 7AAD : diode à 20%, 100ms d'exposition, ouverture numérique = 1,25
- Microscopie à épifluorescence pour l'observation de mCherry : 100ms d'exposition, ouverture numérique maximum.
- Microscopie à épifluorescence pour l'observation de BSA-fluoresceine : 100ms d'exposition, ouverture numérique maximum.
- Microscopie à épifluorescence pour l'observation de ProtéineA-AF647 : 100ms d'exposition, ouverture numérique maximum.
- Microscopie à lumière transmise : 100ms d'exposition, ouverture numérique maximum.

5.4.2. Observation des micro-motifs

Les micro-motifs sont observés avec un microscope inversé Zeiss et un objectif x20 (Zeiss Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 référence : 420650-9901-000), cet objectif a une ouverture numérique maximum de 0,8.

Paramètres d'acquisition :

- Observation anticorps d'isotype IgG1 : diode à 50%, 250ms d'exposition, ouverture numérique 0,8. Les anticorps sont marqués avec un anticorps anti IgG1 AF647 (Biolegend, référence : 406618).

- Observation anticorps d'isotype IgG2a : diode à 50%, 50ms d'exposition, ouverture numérique 0,8. Les anticorps sont marqués avec un anticorps anti IgG2a AF488 (Biolegend, référence : 407122).

Les anticorps anti IgG1 et IgG2a sont dilué a 20µg/ml et incubés 1h à température ambiante sur les micro-motifs.

5.4.3. Cinétique d'adsorption

Que ce soit avec la technique wet-SEEC ou non les cinétiques d'adsorption sont mesurées avec un microscope inversé Zeiss et un objectif x63 RICM.

Paramètres d'acquisition : 120ms d'exposition, diode à 50%, ouverture numérique 1.

Les molécules dont l'adsorption a été mesurées ont été déposées directement sous le microscope sur un substrat activé avec un motif de bande de 20µm de large.

5.5. Analyse

Les analyses des images de microscopie ont été réalisées avec les scripts Matlab 9.8.0.1323502 (R2020a) produits par VSDN. Le traitement des images (correction et binarisation) a été réalisé avec le logiciel Fiji [73]

5.5.1. Analyse de l'adhésion

Pour l'analyse les images en microscopie interférentielle sont corrigées par une copie d'elle-même avec un flou gaussien de 40 pixels, appliqué avec Fiji, puis binarisées. Les images issues de notre microscope ne sont pas parfaitement « plates », c'est à dire que l'intensité d'un même objet ne sera pas exactement la même s'il se trouve au centre de l'image ou sur ses bords. La correction des images de microscopie interférentielle vise à normaliser la valeur des objets en divisant l'image par une image du fond sans objet, les cellules en l'occurrence. Cela est indispensable pour la binarisation car il ne sera pas possible de choisir un seuil si les cellules ont des intensités différentes. Pour créer une image de fond sans cellule de façon simple nous avons appliqué un flou gaussien sur une copie de l'image à corriger. Cela revient diminuer le niveau de détail d'une image en ajustant la valeur de chaque pixel sur la valeur moyenne des pixels voisins dans un rayon défini, ici le rayon est de 40 pixels. L'objectif est de retirer le niveau de détail que sont les cellules sur l'image pour ne conserver que la valeur moyenne du fond, c'est à dire uniquement la valeur de l'intensité du substrat immergé illuminé. Cela peut fonctionner uniquement car les cellules occupent une minorité d'espace sur l'image.

En entrée le programme prend l'image en fluorescence des repères d'alignement, les images numériques des micro-motifs et les images de microscopie interférentielle corrigées et binarisées. Le principe du programme décrit ci-dessous est de superposer à l'image de microscopie interférentielle le masque du micro-motif numérique. Le masque est aligné avec l'image en fluorescence des repères d'alignement, premièrement de façon automatique avec les coordonnées des repères puis par correction manuelle si nécessaire. Ce programme permet aussi la mesure de l'adhésion au cours du temps en répétant le processus pour chaque point temporel. Avant l'analyse les films d'image d'adhésion sont alignés avec la fonction SIFT du programme Fiji.

Pseudo-code du programme Matlab pour l'analyse de l'adhésion sur les micro-motifs à 3 zones fonctionnelles :

Programme pour analyser le pourcentage de la cellule étalée sur les micro-motifs.

Initialiser et nettoyer l'environnement de travail :

- Effacer toutes les variables
- Effacer la console
- Fermer toutes les figures

Définir les noms des fichiers et dossiers

Définir l'emplacement du fichier

Définir le type de fichier

Définir le nom du fichier de sortie

Définir les noms des images

Nommer les images de fluorescence, RICM, et les micro-motifs numérique CD45RO, CD3-CD28, et CD69

Définir les seuils et critères pour le test de présence d'une cellule

Définir les seuils d'aire pour les motifs CD45, CD3, et CD69 (0,05%)

Définir le critère de circularité et la distance maximale entre les motifs

Charger et binariser les images

Charger les images de fluorescence, RICM binarisées et les micro-motifs numériques

Définir les positions de référence pour les croix

Demander à l'utilisateur de choisir le cadran à analyser

Calculer les positions x et y pour les croix en fonction du cadran choisi

Alignement du masque du micro-motif CD45RO sur l'adhésion sur le micro-motifs imprimé CD45RO

Afficher l'image fluo et demander à l'utilisateur de cliquer sur deux marqueurs horizontaux

Calculer la norme et l'échelle pour aligner l'image du micro-motif CD45RO

Effectuer un redimensionnement et une translation de l'image du micro-motif CD45RO

Calculer l'angle et effectuer une rotation de l'image du micro-motifs CD45RO

Recadrer l'image alignée du micro-motifs CD45RO

Afficher l'image alignée pour permettre la correction manuelle

Appliquer les corrections manuelles et binariser l'image finale du micro-motif CD45RO

Analyse des cellules accrochées sur le micro-motif CD45RO

Utiliser la fonction `regionprops` pour récupérer les propriétés des régions de l'image binarisée

Sauvegarder les informations obtenues dans un fichier

Mettre à jour les variables contenant les informations des cellules

Tester si les cellules occupent un motif CD45RO en fonction du seuil défini

Alignement des cellules accrochées sur le micro-motif CD3-CD28

Répéter les étapes d'alignement pour le micro-motif CD3-CD28 en utilisant les marqueurs verticaux

Appliquer les corrections manuelles et binariser l'image finale du micro-motif CD3-CD28

Analyse des cellules accrochées sur le micro-motif CD3-CD28

Répéter les étapes d'analyse pour le micro-motif CD3-CD28

Calculer la distance entre les positions des cellules sur les micro-motifs CD45RO et CD3-CD28

Mettre à jour les variables contenant les informations des cellules pour le micro-motif CD3-CD28

Tester si les cellules sont activées sur le micro-motif CD3-CD28 en fonction du seuil défini

Alignement et analyse des cellules accrochées sur le micro-motif CD69

Répéter les étapes d'alignement et d'analyse pour le micro-motif CD69

Calculer la distance entre les positions des cellules sur les micro-motifs CD3-CD28 et CD69

Mettre à jour les variables contenant les informations des cellules pour le micro-motif CD69

Tester si les cellules sont activées sur le micro-motif CD69 en fonction du seuil défini

Statistiques

Calculer les statistiques des cellules accrochées et activées sur les différents micro-motifs

Calculer les pourcentages de cellules accrochées et activées

Calculer les pourcentages d'aire occupée sur chaque micro-motif

Génération des figures et sauvegarde des résultats

Afficher les figures montrant la superposition des micro-motifs et des cellules accrochées

Sauvegarder les figures dans des fichiers

Sauvegarder les données récapitulatives dans un fichier Excel

Sauvegarder les statistiques dans un fichier texte

5.5.2. Analyse de la Fluorescence des cellules

En entrée le programme prend l'image en fluorescence des repères d'alignement, le masque des cellules réalisé sur l'image en lumière transmise des cellules avec le logiciel Cellpose [74] et son model « Cyto 2 », les images de fluorescence des cellules et du fond les images en lumière transmise. Le principe du programme décrit ci-dessous est de superposer à l'image de fluorescence de cellules le masque du micro-motif numérique. Le masque est aligné avec l'image en fluorescence des repères d'alignement. Les cellules mortes (positive pour le marqueur 7AAD) et les doublets sont exclus de l'analyse pendant cette étape car après les lavages nécessaires au marquage et à la fixation toutes les cellules non adhérées ont été lavées, il est donc plus évident d'identifier les cas ou deux cellules sont adhérées sur le même motif.

Pseudo-code du programme Matlab pour l'analyse de la fluorescence des cellules adhérées sur des micro-motifs.

Programme pour analyser l'intensité de fluorescence des cellules

Initialiser et nettoyer l'environnement de travail :

- Effacer toutes les variables
- Effacer la console
- Fermer toutes les figures

Définir les chemins des fichiers et les noms des fichiers de sortie

Définir le répertoire où se trouvent les images

Définir le type de fichier image

Définir le nom du fichier de sortie pour les données de fluorescence

Nommer les images pour l'intensité de fluorescence, le fond de fluorescence, le masque et l'image corrigée de transmission

Charger et traiter les images

Charger l'image de fluorescence et l'image de fond

Soustraire l'image de fond de l'image de fluorescence pour obtenir l'image de fluorescence absolue

Charger l'image du masque et la binariser

Charger l'image de transmission corrigée

Analyser les propriétés des régions dans l'image binarisée (masque)

Utiliser `regionprops` pour extraire les propriétés des régions définies par le masque dans l'image de fluorescence absolue (aire, intensité moyenne, circularité, etc.)

Stocker ces informations dans des structures de données

Pour chaque cellule détectée :

- Extraire les coordonnées du centre de la cellule
- Calculer la somme des intensités de fluorescence pour chaque cellule

Filtrer les cellules en fonction de leur circularité (supprimer les cellules avec une circularité inférieure à un seuil)

Mettre à jour les variables contenant les informations des cellules après filtration

Afficher l'image de transmission avec les cellules numérotées pour permettre une inspection visuelle

Suppression manuelle des cellules non pertinentes

Demander à l'utilisateur de supprimer manuellement les cellules correspondant à des artefacts ou des formes indésirables

Mettre à jour les informations des cellules après suppression manuelle

Créer et afficher des histogrammes des intensités de fluorescence

Créer et afficher un histogramme de la somme des intensités de fluorescence pour les cellules

Sauvegarder cet histogramme sous forme d'image

Créer et afficher un histogramme de la moyenne des intensités de fluorescence pour les cellules

Sauvegarder cet histogramme sous forme d'image

Sauvegarder les données dans un fichier Excel

Supprimer les fichiers Excel existants avec le même nom s'ils existent

Créer une table récapitulative des données des cellules (numéro, coordonnées, somme et moyenne des intensités)

Enregistrer la table dans un nouveau fichier Excel

5.5.3. Association des donnés d'adhésion et de fluorescence des cellules.

Afin de contrôler la mesure de l'expression de CD69 par l'adhésion la mesure de l'expression de CD69 en épifluorescence est utilisée. Il est donc nécessaire d'identifier chaque cellule en fonction de sa position sur le quadrillage que forment les micro-motifs imprimés pour lui associer les deux mesures. Le programme permettant d'associer à chaque cellule ses valeurs d'adhésion et sa valeur de fluorescence pour CD69 prend en entrée les résultats des mesures de fluorescence des cellules, les résultats des mesures d'adhésion et les images de fluorescence des repères d'alignement. Le principe de ce programme est d'utiliser les coordonnées des cellules pour associer les mesures de fluorescence avec celles d'adhésion. Pour cela le programme utilise les images en fluorescence des repères d'alignement et les coordonnées relevées pendant les mesures de fluorescence et d'adhésion.

Pseudo-code pour le programme Matlab qui associe les données d'adhésion et de fluorescence des cellules :

Initialiser et nettoyer l'environnement de travail :

- Effacer toutes les variables
- Effacer la console
- Fermer toutes les figures

Définir les chemins des fichiers et les noms des fichiers de sortie

Définir le répertoire des données de fluorescence

Définir le répertoire des données RICM

Définir les extensions des fichiers (fichiers texte et images)

Définir les noms des fichiers pour les données de fluorescence, RICM, et le fichier d'analyse

Nommer les images pour la fluorescence et le RICM

Définir le signe pour la rotation des coordonnées

Charger les données des fichiers Excel et les images correspondantes

Charger les tables de données de fluorescence et RICM à partir des fichiers Excel

Charger les images de fluorescence et de RICM à partir des fichiers image

Extraire les coordonnées des cellules à partir des tables de données

Afficher les images et obtenir les coordonnées des marqueurs

Afficher l'image RICM et demander à l'utilisateur de cliquer sur deux marqueurs horizontaux

Afficher l'image de fluorescence et demander à l'utilisateur de cliquer sur deux marqueurs horizontaux

Tracer les marqueurs et les cellules détectées sur les images avant transformation

Calculer l'angle de rotation et appliquer la rotation aux coordonnées

Calculer les vecteurs entre les marqueurs pour les images RICM et fluorescence

Calculer l'angle entre les vecteurs en utilisant le produit scalaire

Appliquer la rotation aux coordonnées des cellules de fluorescence

Tracer les marqueurs et les cellules après rotation

Appliquer la translation aux coordonnées des cellules

Calculer les translations en x et y entre les marqueurs des images RICM et fluorescence

Appliquer la translation aux coordonnées des cellules de fluorescence

Tracer les marqueurs et les cellules après translation

Attribution des cellules de fluorescence aux cellules RICM

Initialiser une matrice pour stocker les distances entre les cellules RICM et fluorescence

Pour chaque cellule RICM, calculer la distance à chaque cellule de fluorescence

Trouver les cellules de fluorescence les plus proches de chaque cellule RICM

Si la distance est inférieure à un seuil, attribuer la cellule fluorescence à la cellule RICM correspondante

Extraire les intensités moyennes, sommes d'intensité par cellule, et sommes d'intensité par micro-motif pour les cellules fluorescence

Attribuer ces valeurs aux cellules RICM correspondantes

Sauvegarder les données attribuées dans un fichier Excel

Supprimer le fichier Excel précédent s'il existe

Ajouter les nouvelles colonnes d'intensité moyenne, somme d'intensité par cellule, et somme d'intensité par micro-motif à la table RICM

Enregistrer la table mise à jour dans un nouveau fichier Excel

Afficher les cellules RICM avec les cellules de fluorescence attribuées superposées

5.5.4. Analyse de la fluorescence des micro-motifs

Pour mesurer la densité d'anticorps imprimés il faut mesurer l'intensité de fluorescence de l'anticorps secondaire utilisé pour révéler l'anticorps imprimé. En entrée le programme prend les images en fluorescence des micro-motifs marqués avec des anticorps secondaires, les images de fond correspondantes et les images numériques des micro-motifs. Le principe de ce programme est d'utiliser comme masque les images numériques des micro-motifs pour créer un masque, de l'aligner sur les images en fluorescence et d'effectuer les mesures.

Pseudo-code du programme Matlab qui analyse la fluorescence des micro-motifs à deux zones fonctionnelles :

%% Programme pour analyser les intensités de fluorescence des cellules sur les motifs anti CD45/CD3/CD28 et anti CD69

Initialiser et nettoyer l'environnement de travail :

- Effacer toutes les variables
- Effacer la console
- Fermer toutes les figures

Définir les chemins des fichiers et les noms des fichiers de sortie

Définir le répertoire où se trouvent les images

Définir le type de fichier

Définir les noms des fichiers de sortie pour les données fluo CD45/CD3/CD28 et CD69

Définir les noms des images et des micro-motifs

Nommer les images pour les différents canaux (IgG1, IgG2) et leurs fonds respectifs

Nommer les micro-motifs pour l'accrochage et l'activation

Charger et binariser les images des micro-motifs

Charger les images des micro-motifs pour l'accrochage et l'activation

Binariser les images des micro-motifs avec un seuil adapté

Charger les images de fluorescence et les images de fond pour IgG1 et IgG2

Soustraire les images de fond des images de fluorescence pour obtenir les images finales

Afficher et aligner les images avec les marqueurs

Afficher l'image de fluorescence et demander à l'utilisateur de cliquer sur deux marqueurs extérieurs

Afficher l'image binarisée du micro-motif et demander à l'utilisateur de cliquer sur deux marqueurs extérieurs

Calculer l'angle de rotation nécessaire et appliquer la rotation sur les images binarisées

Calculer le changement d'échelle entre les images et redimensionner les images binarisées

Ajuster les dimensions des images binarisées pour correspondre à celles des images de fluorescence

Appliquer une translation sur les images binarisées pour les aligner avec les images de fluorescence

Correction manuelle de l'alignement

Afficher les images superposées et permettre à l'utilisateur de corriger l'alignement manuellement

Binariser les images finales après correction

Analyse des intensités de fluorescence pour les régions des micro-motifs

Utiliser `regionprops` pour extraire les propriétés des régions des images binarisées (aire, intensité moyenne, circularité, etc.)

Stocker ces informations dans des structures de données

Pour chaque cellule détectée :

- Extraire les coordonnées du centre de la cellule
- Calculer la somme des intensités de fluorescence pour chaque cellule

Filtrer les cellules en fonction de leur circularité (supprimer les cellules avec une circularité inférieure à un seuil)

Répéter ces étapes pour les cellules détectées sur le micro-motif CD69

Afficher les images annotées et supprimer manuellement les cellules non pertinentes

Afficher les images des cellules détectées avec leur numéro

Permettre à l'utilisateur de supprimer manuellement les cellules correspondant à des artefacts ou à des formes indésirables

Mettre à jour les informations des cellules après suppression manuelle

Calculer les statistiques des cellules détectées

Pour chaque cellule sur le micro-motif CD69, calculer le rapport entre l'aire mesurée et l'aire théorique (en fonction du diamètre)

Classer les cellules en fonction de ce rapport et déterminer leur type

Créer des matrices récapitulatives avec les informations des cellules (type, coordonnées, aire, somme des intensités, moyenne des intensités)

Générer des histogrammes des intensités de fluorescence

Afficher des histogrammes pour les moyennes d'intensité et les sommes d'intensité pour les cellules sur les motifs CD45/CD3/CD28 et CD69

Enregistrer les histogrammes sous forme d'images

Sauvegarder les données dans des fichiers Excel

Ouvrir un fichier Excel et écrire les informations récapitulatives des cellules pour les motifs CD45/CD3/CD28

Ouvrir un deuxième fichier Excel et écrire les informations récapitulatives des cellules pour le motif CD69

Fermer les fichiers Excel après écriture

Pour calculer la densité d'anticorps imprimés sur la surface nous avons utilisé la formule suivante :

$$\sigma = \frac{I.h.Na}{Rac.\alpha.M}$$

- I = intensité mesuré corrigé par le bruit de fond.
- h = hauteur du canal de calibration = 48 µm.
- Na = Nombre d'Avogadro.
- Rac = Ratio de molécules fluorescentes par anticorps secondaire.
- α = Pente de la courbe de calibration.
- M = Masse molaire de l'anticorps secondaire en $g.mol^{-1}$.
- σ = Densité d'anticorps sur la surface en $molécules.\mu m^2$.

Les courbes de calibration sont établies pour chaque anticorps secondaire. Les anticorps sont dilués à quatre concentrations (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml et 20 µg/ml) et déposés dans des canaux de PDMS de 40µm de haut. Les canaux sont ensuite imagés en

épifluorescence et les intensités mesurées sont utilisées pour construire les courbes de calibration (Figure 48).

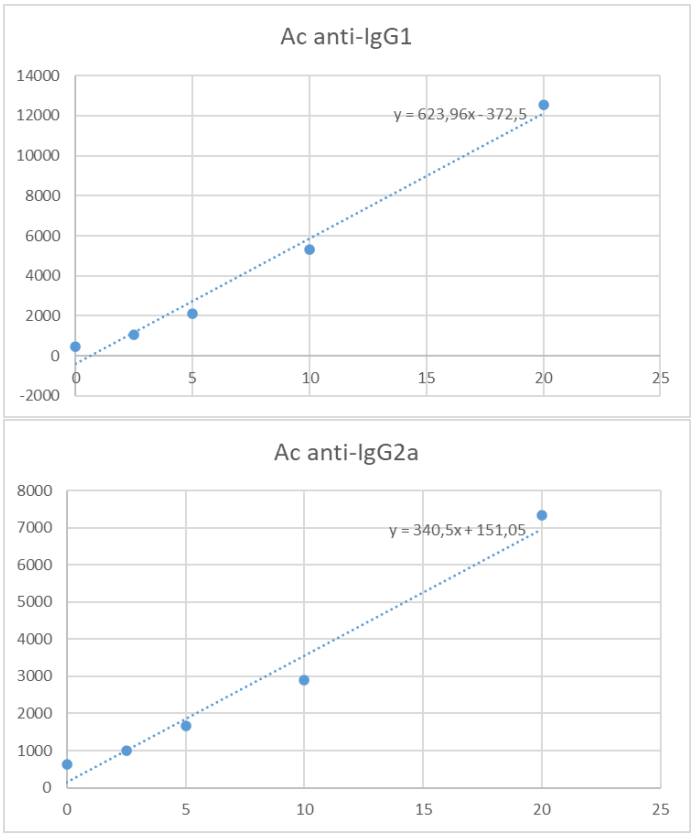


Figure 48 : Courbe de calibration des anticorps secondaires anti-IgG1-AF647 et anti-IgG2a-AF488. Paramètres d'acquisition pour l'anticorps anti-IgG1 : objectif x 20, diode à 50%, 250ms d'exposition, ouverture numérique = 0,8. Paramètres d'acquisition pour l'anticorps anti-IgG2a : objectif x 20, diode à 50%, 50ms d'exposition, ouverture numérique = 0,8.

6. Bibliographie

1. Murphy, K., Weaver, C., and Janeway, C. (2017). Janeway's immunobiology 9th edition. (Garland Science).

2. Restifo, N.P., and Gattinoni, L. (2013). Lineage relationship of effector and memory T cells. Curr Opin Immunol *25*, 556–563. https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.09.003.

3. Farber, D.L. (2009). Biochemical Signaling Pathways for Memory T cell Recall. Semin Immunol *21*, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.02.003.

4. Croft, M., Bradley, L.M., and Swain, S.L. (1994). Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. J Immunol *152*, 2675–2685.

5. Inaba, K., Metlay, J.P., Crowley, M.T., Witmer-Pack, M., and Steinman, R.M. (1990). Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. Int Rev Immunol *6*, 197–206. https://doi.org/10.3109/08830189009056630.

6. Netea, M.G., Quintin, J., and van der Meer, J.W.M. (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. Cell Host Microbe *9*, 355–361. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006.

7. Mueller, D.L., Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1989). Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. Annu Rev Immunol *7*, 445–480. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.002305.

8. Bhattacharyya, N.D., and Feng, C.G. (2020). Regulation of T Helper Cell Fate by TCR Signal Strength. Front Immunol *11*, 624. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00624.

9. Flynn, K., and Müllbacher, A. (1996). Memory alloreactive cytotoxic T cells do not require costimulation for activation in vitro. Immunol Cell Biol *74*, 413–420. https://doi.org/10.1038/icb.1996.71.

10. Suresh, M., Whitmire, J.K., Harrington, L.E., Larsen, C.P., Pearson, T.C., Altman, J.D., and Ahmed, R. (2001). Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory. J Immunol *167*, 5565–5573. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5565.

11. Kim, S.K., Schluns, K.S., and Lefrançois, L. (1999). Induction and visualization of mucosal memory CD8 T cells following systemic virus infection. J Immunol *163*, 4125–4132.

12. Borowski, A.B., Boesteanu, A.C., Mueller, Y.M., Carafides, C., Topham, D.J., Altman, J.D., Jennings, S.R., and Katsikis, P.D. (2007). Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation. J Immunol *179*, 6494–6503. https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6494.

13. Shinichiro, F., Weijun, Z., and Usherwood, E.J. (2008). Control of Memory CD8+ T Cell Differentiation by CD80/CD86-CD28 Costimulation and Restoration by IL-2 during

the Recall Response - PMC.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2954438/.

14. Ndejembi, M.P., Teijaro, J.R., Patke, D.S., Bingaman, A.W., Chandok, M.R., Azimzadeh, A., Nadler, S.G., and Farber, D.L. (2006). Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway. J Immunol *177*, 7698–7706. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7698.

15. Li, B., Chan, H.L., and Chen, P. (2019). Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges. Curr Med Chem *26*, 3009–3025. https://doi.org/10.2174/0929867324666170804143706.

16. Huo, J.-L., Wang, Y.-T., Fu, W.-J., Lu, N., and Liu, Z.-S. (2022). The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. Front. Immunol. *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956090.

17. Kundu, S., Fan, K., Cao, M., Lindner, D.J., Zhao, Z.J., Borden, E., and Yi, T. (2010). Novel SHP-1 inhibitors tyrosine phosphatase inhibitor-1 and analogs with preclinical anti-tumor activities as tolerated oral agents. J Immunol *184*, 6529–6536. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903562.

18. Halford, Z., Coalter, C., Gresham, V., and Brown, T. (2021). A Systematic Review of Blinatumomab in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: Engaging an Old Problem With New Solutions. Ann Pharmacother *55*, 1236–1253. https://doi.org/10.1177/1060028020988411.

19. June, C.H., O'Connor, R.S., Kawalekar, O.U., Ghassemi, S., and Milone, M.C. (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. Science *359*, 1361–1365. https://doi.org/10.1126/science.aar6711.

20. Ahmad, A., Uddin, S., and Steinhoff, M. (2020). CAR-T Cell Therapies: An Overview of Clinical Studies Supporting Their Approved Use against Acute Lymphoblastic Leukemia and Large B-Cell Lymphomas. Int J Mol Sci *21*, 3906. https://doi.org/10.3390/ijms21113906.

21. Wiseman, L.R., and Faulds, D. (1999). Daclizumab: a review of its use in the prevention of acute rejection in renal transplant recipients. Drugs *58*, 1029–1042. https://doi.org/10.2165/00003495-199958060-00006.

22. Klatzmann, D., and Abbas, A.K. (2015). The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol *15*, 283–294. https://doi.org/10.1038/nri3823.

23. Mardiney III, M., Brown, M.R., and Fleisher, T.A. (1996). Measurement of T-cell CD69 expression: A rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. Cytometry *26*, 305–310. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19961215)26:4<305::AID-CYTO11>3.0.CO;2-V.

24. Hsieh, A., and Cortes, B. (2018). Photophérèse extracorporelle. Rev Med Suisse *600*, 699–702.

25. Resnick, E.S., Moshier, E.L., Godbold, J.H., and Cunningham-Rundles, C. (2012). Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. Blood *119*, 1650–1657. https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-377945.

26. Ganesan, N., Ronsmans, S., and Hoet, P. (2023). Methods to Assess Proliferation of Stimulated Human Lymphocytes In Vitro: A Narrative Review. Cells *12*, 386. https://doi.org/10.3390/cells12030386.

27. Lindemann, M. (2014). Ex vivo assessment of cellular immune function - applications in patient care and clinical studies. Tissue Antigens *84*, 439–449. https://doi.org/10.1111/tan.12454.

28. Ramirez-Alejo, N., and Santos-Argumedo, L. (2014). Innate Defects of the IL-12/IFN-γ Axis in Susceptibility to Infections by Mycobacteria and Salmonella. J Interferon Cytokine Res *34*, 307–317. https://doi.org/10.1089/jir.2013.0050.

29. Brunner, K.T., Mauel, J., Cerottini, J.C., and Chapuis, B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. Immunology *14*, 181–196.

30. Kiesgen, S., Messinger, J.C., Chintala, N.K., Tano, Z., and Adusumilli, P.S. (2021). Comparative analysis of assays to measure CAR T cell–mediated cytotoxicity. Nat Protoc *16*, 1331–1342. https://doi.org/10.1038/s41596-020-00467-0.

31. Karimi, M.A., Lee, E., Bachmann, M.H., Salicioni, A.M., Behrens, E.M., Kambayashi, T., and Baldwin, C.L. (2014). Measuring cytotoxicity by bioluminescence imaging outperforms the standard chromium-51 release assay. PLoS One *9*, e89357. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089357.

32. Zhu, J., Wang, X., Xu, X., and Abassi, Y.A. (2006). Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. J Immunol Methods *309*, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.10.018.

33. Rodrigo, E., López-Hoyos, M., Corral, M., Fábrega, E., Fernández-Fresnedo, G., San Segundo, D., Piñera, C., and Arias, M. (2012). ImmuKnow as a diagnostic tool for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. Liver Transpl *18*, 1245–1253. https://doi.org/10.1002/lt.23497.

34. Robert, P., Canault, M., Farnarier, C., Nurden, A., Grosdidier, C., Barlogis, V., Bongrand, P., Pierres, A., Chambost, H., and Alessi, M.-C. (2011). A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. J Immunol *186*, 5273–5283. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003141.

35. Yang, Y., Griffin, K., Li, X., Sharp, E., Young, L., Garcia, L., Griswold, J., and Pappas, D. (2023). Combined CD25, CD64, and CD69 Biomarker in 3D-Printed Multizone Millifluidic Device for Sepsis Detection in Clinical Samples. Anal. Chem. *95*, 12819–12825. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01797.

36. Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods *294*, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008.

37. Rubio, V., Stuge, T.B., Singh, N., Betts, M.R., Weber, J.S., Roederer, M., and Lee, P.P. (2003). Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. Nat Med *9*, 1377–1382. https://doi.org/10.1038/nm942.

38. Sindhi, R., Ashokkumar, C., Higgs, B.W., Levy, S., Soltys, K., Bond, G., Mazariegos, G., Ranganathan, S., and Zeevi, A. (2016). Profile of the Pleximmune blood test for transplant rejection risk prediction. Expert Review of Molecular Diagnostics *16*, 387–393. https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1139455.

39. Curtis, A.S. (1964). THE MECHANISM OF ADHESION OF CELLS TO GLASS. A STUDY BY INTERFERENCE REFLECTION MICROSCOPY. J Cell Biol *20*, 199–215. https://doi.org/10.1083/jcb.20.2.199.

40. Limozin, L., and Sengupta, K. (2009). Quantitative reflection interference contrast microscopy (RICM) in soft matter and cell adhesion. Chemphyschem *10*, 2752–2768. https://doi.org/10.1002/cphc.200900601.

41. O, T., Zh, H., and Mp, V. (2010). New modeling of reflection interference contrast microscopy including polarization and numerical aperture effects: application to nanometric distance measurements and object profile reconstruction. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids *26*. https://doi.org/10.1021/la902504y.

42. Ducret, A., Valignat, M.-P., Mouhamar, F., Mignot, T., and Theodoly, O. (2012). Wet-surface-enhanced ellipsometric contrast microscopy identifies slime as a major adhesion factor during bacterial surface motility. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 10036–10041. https://doi.org/10.1073/pnas.1120979109.

43. Ausserré, D., and Valignat, M.-P. (2006). Wide-field optical imaging of surface nanostructures. Nano Lett *6*, 1384–1388. https://doi.org/10.1021/nl060353h.

44. Ausserré, D., and Valignat, M.-P. (2007). Surface enhanced ellipsometric contrast (SEEC) basic theory and lambda/4 multilayered solutions. Opt Express *15*, 8329–8339. https://doi.org/10.1364/oe.15.008329.

45. Rasedujjaman, M., Affannoukoué, K., Garcia-Seyda, N., Robert, P., Giovannini, H., Chaumet, P.C., Theodoly, O., Valignat, M.-P., Belkebir, K., Sentenac, A., et al. (2020). Three-dimensional imaging with reflection synthetic confocal microscopy. Opt Lett *45*, 3721–3724. https://doi.org/10.1364/OL.397364.

46. Lee, J.S., Hill, R.T., Chilkoti, A., and Murphy, W.L. (2020). 1.4.5 - Surface Patterning. In Biomaterials Science (Fourth Edition), W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, and M. J. Yaszemski, eds. (Academic Press), pp. 553–573. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00037-4.

47. Xu, T., Petridou, S., Lee, E.H., Roth, E.A., Vyavahare, N.R., Hickman, J.J., and Boland, T. (2004). Construction of high-density bacterial colony arrays and patterns by the ink-jet method. Biotechnol Bioeng *85*, 29–33. https://doi.org/10.1002/bit.10768.

48. Holden, M.A., Jung, S.-Y., and Cremer, P.S. (2004). Patterning enzymes inside microfluidic channels via photoattachment chemistry. Anal Chem *76*, 1838–1843. https://doi.org/10.1021/ac035234q.

49. Huang, N., Li, C.W., and Chan, B.P. (2018). Multiphoton 3D Microprinting of Protein Micropatterns with Spatially Controlled Heterogeneity – A Platform for Single Cell

Matrix Niche Studies. Advanced Biosystems *2*, 1800053. https://doi.org/10.1002/adbi.201800053.

50. Bat, E., Lee, J., Lau, U.Y., and Maynard, H.D. (2015). Trehalose glycopolymer resists allow direct writing of protein patterns by electron-beam lithography. Nat Commun *6*, 6654. https://doi.org/10.1038/ncomms7654.

51. Ng, E., Gopal, A., Hoshino, K., and Zhang, X. (2011). Multicolor microcontact printing of proteins on nanoporous surface for patterned immunoassay. Appl Nanosci *1*, 79–85. https://doi.org/10.1007/s13204-011-0009-0.

52. Jeon, N.L., Dertinger, S.K.W., Chiu, D.T., Choi, I.S., Stroock, A.D., and Whitesides, G.M. (2000). Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems. Langmuir *16*, 8311–8316. https://doi.org/10.1021/la000600b.

53. Strale, P.-O., Azioune, A., Bugnicourt, G., Lecomte, Y., Chahid, M., and Studer, V. (2016). Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption. Adv Mater *28*, 2024–2029. https://doi.org/10.1002/adma.201504154.

54. Luo, X., Seveau de Noray, V., Aoun, L., Biarnes-Pelicot, M., Strale, P.-O., Studer, V., Valignat, M.-P., and Theodoly, O. (2020). Lymphocytes perform reverse adhesive haptotaxis mediated by LFA-1 integrins. J Cell Sci *133*, jcs242883. https://doi.org/10.1242/jcs.242883.

55. Delhaye, G. (2021). Micro-impression d'anticorps pour des applications diagnostics et thérapeutiques en immunologie clinique.

56. Butler, J.E. (2000). Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. Methods *22*, 4–23. https://doi.org/10.1006/meth.2000.1031.

57. Rezahosseini, O., Møller, D.L., Knudsen, A.D., Sørensen, S.S., Perch, M., Gustafsson, F., Rasmussen, A., Ostrowski, S.R., and Nielsen, S.D. (2020). Use of T Cell Mediated Immune Functional Assays for Adjustment of Immunosuppressive or Anti-infective Agents in Solid Organ Transplant Recipients: A Systematic Review. Front. Immunol. *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567715.

58. Fulcher, D., and Wong, S. (1999). Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. Immunology & Cell Biology *77*, 559–564. https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00870.x.

59. Angulo, R., and Fulcher, D.A. (1998). Measurement of Candida-specific blastogenesis: Comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. Cytometry *34*, 143–151. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980615)34:3<143::AID-CYTO4>3.0.CO;2-I.

60. Nielsen, S.D., Afzelius, P., ErsbØll, A.K., Nielsen, J.O., and Hansen, J.-E.S. (1998). Expression of the activation antigen CD69 predicts functionality of in vitro expanded peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors and HIV-infected patients. Clin Exp Immunol *114*, 66–72. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00685.x.

61. Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., Abrignani, S., Addo, R., Akdis, M., Andrä, I., Andreata, F., Annunziato, F., Arranz, E., et al. (2021). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). Eur J Immunol *51*, 2708–3145. https://doi.org/10.1002/eji.202170126.

62. Flores, C., Fouquet, G., Moura, I.C., Maciel, T.T., and Hermine, O. (2019). Lessons to Learn From Low-Dose Cyclosporin-A: A New Approach for Unexpected Clinical Applications. Front Immunol *10*, 588. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00588.

63. Narula, A., Murthy, M., Patrulu, K., and Saxena, V. (2004). Routine Cyclosporine concentration - C2 level Monitoring. Is it helpful during the early post Transplant Period? Med J Armed Forces India *60*, 326–328. https://doi.org/10.1016/S0377-1237(04)80003-0.

64. Mandrekar, J.N. (2010). Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. Journal of Thoracic Oncology *5*, 1315–1316. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d.

65. Bauer, M., Gerlach, H., Vogelmann, T., Preissing, F., Stiefel, J., and Adam, D. (2020). Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019— results from a systematic review and meta-analysis. Critical Care *24*, 239. https://doi.org/10.1186/s13054-020-02950-2.

66. Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., Reinhart, K., Turnbull, I.R., and Vincent, J.-L. (2016). Sepsis and septic shock. Nat Rev Dis Primers *2*, 16045. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45.

67. Lm, H., Ta, N., Sb, N., Jg, Y., Ew, O., H, G., Mj, P., Kd, B., Jv, S., and Pa, W. (2005). Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. Shock (Augusta, Ga.) *24*. https://doi.org/10.1097/01.shk.0000170353.80318.d5.

68. Lambden, S., Laterre, P.F., Levy, M.M., and Francois, B. (2019). The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. Crit Care *23*, 374. https://doi.org/10.1186/s13054-019-2663-7.

69. Nesseler, N., Matthay, M.A., Seguin, P., and Nesseler, N. Choc septique : définitions, épidémiologie, monitorage et principes thérapeutiques.

70. Yazdani, R., Habibi, S., Sharifi, L., Azizi, G., Abolhassani, H., Olbrich, P., and Aghamohammadi, A. (2020). Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management. J Investig Allergol Clin Immunol *30*, 14–34. https://doi.org/10.18176/jiaci.0388.

71. Azizi, G., Rezaei, N., Kiaee, F., Tavakolinia, N., Yazdani, R., Mirshafiey, A., and Aghamohammadi, A. (2016). T-Cell Abnormalities in Common Variable Immunodeficiency. J Investig Allergol Clin Immunol *26*, 233–243. https://doi.org/10.18176/jiaci.0069.

72. Nair, R., and Westin, J. (2020). CAR T-Cells. Adv Exp Med Biol *1244*, 215–233. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41008-7_10.

73. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source

platform for biological-image analysis. Nat Methods *9*, 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.

74. Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., and Pachitariu, M. (2021). Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. Nat Methods *18*, 100–106. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x.