



Les technologies motrices de l'immunologie

2ème Partie

Imagerie : Molécules et cellules en action

I. Les progrès de l'imagerie.

II. Cellules et molécules immunitaires en action.



Imagerie : Molécules et cellules en action

I. Les progrès de l'imagerie.

- A. Vers l'imagerie dynamique : la révolution de la fluorescence.**
- B. La microscopie de fluorescence super-résolution.**
- C. Quelques exemples d'imagerie.**
- D. Techniques d'imagerie corps entier.**



A. Vers l'imagerie dynamique : la révolution de la fluorescence.

Germain RN, et al. Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. Nat Rev Immunol. 2006 Jul;6(7):497-507.

Bajénoff M, Germain RN. Seeing is believing: a focus on the contribution of microscopic imaging to our understanding of immune system function. Eur J Immunol. 2007 Nov;37 Suppl 1:S18-33.

Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. Nature. 2008 Apr 3;452(7187):580-9.

Sarris M, Betz AG. Shine a light: imaging the immune system. Eur J Immunol. 2009 May;39(5):1188-202.

Reichardt P, et al. Imaging immunity. Eur J Immunol. 2009 Dec;39(12):3279-82.



1. Evolution des méthodes de microscopie conventionnelles.

a) Microscopie à transmission de lumière.

- **Champ clair.**
- **Champ sombre.**
- **Contraste de phase.**
- **DIC = Differential interference contrast.**

b) Microscopie électronique.

- **Transmission**
- **Balayage.**
- **Microscope électronique 4-D (Zewail) (10^{-15} s, rupture des liaisons).**
- **Cryo-electron tomography.**

Brandt F, et al. The native 3D organization of bacterial polysomes. Cell. 2009 Jan 23;136(2):261-71.

- **Echantillon (synthèse *in vitro*) vitrifiés.**
- **Acquisition sérielle d'images.**
- **Alignement, reconstruction d'image.**
- **Modélisation.**



2. La révolution de la fluorescence.

a) Marqueurs de fluorescence et quantum dots.

■ Molécules organiques (~ 100 atomes)

- Absorption photon → excitation → émission rapide d'un photon à une longueur d'onde.
- FITC Fluoresceine isothiocyanate.
- PE Phycoérythrine.
- CFSE Carboxy-fluoresceine.

■ Quantum dots (~ 10.000 atomes)



b) GFP = Green Fluorescent Protein.

Nienhaus GU, Wiedenmann J. Structure, dynamics and optical properties of fluorescent proteins: perspectives for marker development. Chemphyschem 2009 Jul 13;10(9-10):1369-79

- **1962** Isolement à partir d'une méduse.
- **1994** Clonage, expression (E-coli, C-elegans)
GFP se forme spontanément.
- **1998** Mutagenèse → pics d'émission du bleu au jaune.
- **1997 – 2000** Isolement d'autres anthozoaires (méduses, coraux, anémones de mer).



- **GFP** **238aa Structure en tonneau qui engendre le chromophore fluorescent.**

- **Ingénierie génétique :**
 - **Etiquette et / ou promoteur spécifique.**
 - **Cellule en culture.**
 - **Lignées et organismes.**

- **Biosenseurs**
 - **Ex : mesures d'ions et de métabolites.**



- **Tonneau :**
 - **11 feuillets** **structure conservée.**
 - **X-tyr-gly** **interrompt l'hélice.**

- **Souvent oligomérique → mutagénèse → monomères.**

- **Mutagénèse aléatoire → optimiser la fluorescence.**

- **GFP initiale. Absorption 395 et 475 nm / émission 508 nm.**



- **EGFP (Enhanced GFP)**
- **Des dizaines de variants. Emission jusqu'à ~ 650 nm.**
- **Temps de maturation GFP.**
- **Variants photocommutables.**
- **Au moins 5 protéines imagées simultanément.**



3. La microscopie à fluorescence

- **Épifluorescence à champ large.**
- **GFP et QD**
- **Microscopie confocale.**
- **Microscopie à deux (ou plus) photons (pénétration > 100 μm).**
- **Localisation de molécules fluorescentes dans les cellules ou les tissus vivants.**



4. La microscopie deux ou multiphotons

- **Permet d'imager des tissus « profonds ».**
- **Faible phototoxicité (temps d'imagerie plus longs).**
- **Signaux harmoniques de 2^{ème} et 3^{ème} génération.
(visualisation de la matrice extracellulaire).**
- **Imagerie multicanaux (différents types de cellules et de structure).**



- **Laser (Ti: Saphyre) pulsé 700 – 1000 nm.**
- **OPO = Unité de pompage du laser : 1000 – 1600 nm.
(génération des harmoniques).**
- **Réglage automatique de l'unité de pompage (5 secondes).**
- **EOM = Electronic Oscillator Modulator.
Ouverture et fermeture du faisceau (millisecondes).
(Desctruction contrôlée des tissus 5 μ x 5 μ)**
- **Camera CCD ultra-rapide, rayon divisé en 64 faisceaux.**



5. Analyses mécaniques par AFM (Atomic Force Microscopy)

Chaudhuri O, et al. Combined atomic force microscopy and side-view optical imaging for mechanical studies of cells. Nat Methods. 2009 May;6(5):383-7.

- **Propriétés mécaniques des cellules.**
- **Forces d'adhésion entre cellules.**
- **Observation simultanée d'une réorganisation du cytosquelette pendant la mesure de la force de contraction d'une cellule.**

Hosseini BH, et al. Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Oct 20;106(42):17852-7.



6. In vitro → ex vivo → in vivo

- **Molécules et agrégats moléculaires isolés.**
- **Agrégats moléculaires construits.**
- **Cellules et tissus isolés, fixés.**
- **Cellules isolées vivantes (cytométrie de flux, séparation magnétique, micromanipulation).**
- **Tissus vivants.**
- **Chirurgie de dérivation.**
- **Tissus proches de la surface dans l'organisme entier.**
- **Organisme entier.**



7. Les problèmes d'objectivation et de quantification.

- **Interprétation fonctionnelle.**
- **Limitations statistiques.**
- **Modélisation des structures imagées, reconnaissances des formes.**
- **Suivi dynamique en 3-D.**
- **Modèles morpho-dynamiques (4-D)**



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —

Professeur Philippe Kourilsky

Année 2009-2010

B. Microscopie de fluorescence super-résolution

Huang B, Bates M, Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy. Annu Rev Biochem. 2009;78:993-1016.

Lippincott-Schwartz J, Manley S. Putting super-resolution fluorescence microscopy to work. Nat Methods. 2009 Jan;6(1):21-3.

Hell SW. Microscopy and its focal switch. Nat Methods. 2009 Jan;6(1):24-32.



Émile Verdet (1869) ; Ernst Karl Abbe (1873) ; Lord Rayleigh (1896)

- **Image de deux objets distants de d : Limite par la diffraction.**
 - taches de ~ 200 nm.
 - distance de ~ 400 nm à 700 nm.

- **1990 – 2000 : amélioration de résolution ($d \sim 7 \times$) par la focalisation (champ lointain, champ proche).**

- **2000 : Elimination de la barrière de diffraction ; confiner les états moléculaires fluorescents plutôt que la lumière.**



- **Série d'objets ($d < 200$ nm) de couleurs différentes.
Problème de filtration, pas de diffraction (cf. GFP).**

- **Même couleur : off / on ; étaler dans le temps par commutations de la fluorescence.**

- ➔ **une douzaine de techniques, dont STED, PALM, STORM et leurs dérivées.**



1. Etats alternatifs des fluorophores

avec excitation et / ou quenching par des faisceaux appropriés.

■ Transitions optiques avec variables communes.

- **Intensité du rayon (puissance du laser / surface).**
- **Durée de vie des états induits (plusieurs logs).**

■ Durée de vie longue → plus de temps pour photoactiver.

→ intensité moindre

- **Source moins puissante.**
- **Surface plus étendue.**



2. Topologie de l'image

- **Balayage ordonné de l'échantillon.**
 - **STED = Stimulation émission déplétion.**

- **Analyse d'événements stochastiques.**
 - **PALM = Photoactivation localization microscopy.**
 - **STORM = Stochastic optical reconstruction microscopy.**

- **Caméra à très haut débit d'acquisition.**

- **Résolution < 20 nm.**



3. Difficultés

- **Mode stochastique : molécules trop proches simultanément « on ».**
- **Balayage : optique sophistiquée, interprétation plus sûre.**
- **Espaces vides : ralentit STED, pas PALM et STORM.**
- **Commutation réversible et répétée : « fatigue » des fluorophores.**
- **Linéarité et non linéarité vs. intensité d'activation et émission de photons.**

4. Prudence !

- **Bruit de fond, autofluorescence.**
- **Marquage par anticorps fluorescents : taille des anticorps.**
- **Localisation répétée des mêmes molécules : biais dans les distributions.**
- **Fixation : artefacts, altération des propriétés des fluorophores.**
- **Représentation des données : graphes ou images ? Standards de publications?**
- **Confirmations par d'autres voies.**



5. L'avenir de la nanoscopie

- **Fluorophores capables de commutations nombreuses.**
- **Vitesse des caméras.**
- **Plusieurs couleurs.**
- **Optique (plusieurs lentilles).**
- **Amélioration des performances.**
 - **Localisation $< \text{nm}$ (PALM, STORM).**
 - **Analyse inframoléculaire (STED).**



C. Quelques exemples d'imagerie cellulaire fonctionnelle

1. Flux calciques

- **Signalisation et accroissement de Ca^{++} intracellulaire.**
- **Indicateurs de calcium chimiques (Fura-2 ; Indo-1) ou génétiques.**
 - **Mutants de la GFP. Liaison par calmoduline → FRET**

2. Distributions intracellulaires d'ARN

Tyagi S. Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells. Nat Methods. 2009 May;6(5):331-8.

3. Bio-senseurs

Berg J. et al. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. Nat Methods. 2009 Feb;6(2):161-6.

Frommer WB, et al. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. Chem Soc Rev. 2009 Oct;38(10):2833-41.



4. Les nanotubes

Sowinski S, et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. Nat Cell Biol. 2008 Feb;10(2):211-9. FIG 2

- **Cellules T humaines 13 % connectées après 16h.**
- **Contacts longs et séparation.**
- **Stables pour 30 mn et plus.**
- **Pas de transfert de signaux calciques.**
- **Trafic VIH – 1, prion.**



Chauveau A, et al. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 23;107(12):5545-50. FIG 5

- **Les cellules NK humaines forment des nanotubes avec jonction.**
- **Contact préalable de > 10 mn.**
- **NK humaines / P815 \pm MICA (NKG2D).**
- **Signalisation par DAP1O : non essentielle.**
- **Accumulation de MICA à la jonction (environ 5000) + DAP1O et VAV-1**



- **Des signaux peuvent transiter le long des nanotubes.**

- **lyse : ~ 10 min synapse conventionnelle (~ 83 %)**
 - ~ 40 min à distance par nanotube (~ 5.5 %)
 - ~ 55 min par retour le long du nanotube (~ 12 %)

- **Microsynapses liées aux nanotubes. Ciblage des cellules les plus motiles ?**



D. Techniques d'imagerie corps entier

- **PET Tomographie par émission de positrons (1 – 2 mm)**
- **IRM Imagerie par résonance magnétique (25 – 100 μ m) (lent).**
- **Bioluminescence.**

1. Poisson-zèbre

Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. Nature. 2010 Mar 4;464(7285):112-5. FIG 4

2. Souris : bioluminescence

Contero A, et al. High-throughput quantitative bioluminescence imaging for assessing tumor burden. *Methods Mol Biol.* 2009;574:37-45.

Rabinovich BA, et al. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 23;105(38):14342-6.

3. Souris : IRM

Kang SS, McGavern DB. Inflammation on the mind: visualizing immunity in the central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;334:227-63.

Branca RT, et al. Molecular MRI for sensitive and specific detection of lung metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 23;107(8):3693-7.

4. Souris : PET

Lehmann S, et al. Longitudinal and multimodal in vivo imaging of tumor hypoxia and its downstream molecular events. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 18;106(33):14004-9.

Nguyen QD, et al. Positron emission tomography imaging of drug-induced tumor apoptosis with a caspase-3/7 specific [18F]-labeled isatin sulfonamide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 22;106(38):16375-80.