

UE Analyse Multiparamétrique

Volume Horaire: 25h

TP: 18h

Cours: 7h

Responsables: Pierre Bobé et Olivier Dellis

Compétences:

Formation aux méthodes d'analyse multiparamétrique des voies de signalisation à l'échelle de la cellule ou des sous-populations cellulaires constitutives d'un organe

Description

Les voies de signalisation étudiées sont celles du récepteur purinergique P2X7 ou du récepteur d'antigène des lymphocytes T (TCR). L'activation du TCR et du P2X7 par leurs ligands respectifs sera évaluée par la mesure de : (1) l'influx calcique, (2) la cinétique de phosphorylation des MAP kinases ERK1/2, (3) le clivage protéolytique de la molécule de homing CD62L, (4) l'ouverture du pore P2X7 non-sélectif, (5) l'externalisation des phosphatidylsérines. Ces mesures d'activation du P2X7 et du TCR seront réalisées sur des lignées de cellules immunitaires humaines et murines (macrophages, leucémies T et B, et sur différentes sous-populations de cellules immunitaires présentes dans des suspensions cellulaires hétérogènes isolées d'organes comme la rate). Les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes B sont les deux sous-populations cellulaires dans lesquelles seront analysées par cytométrie en flux les voies de signalisation induites par l'activation du P2X7 ou du TCR. Par exemple, pour l'étude de la voie de signalisation P2X7/ATP, des suspensions de cellules spléniques provenant de souris C57BL/6 seront stimulées *ex vivo* par de l'ATP puis marquées avec les sondes et les anticorps monoclonaux fluorescents permettant de mettre en évidence l'activation de la voie de signalisation P2X7/ATP ainsi que par des anticorps monoclonaux fluorescents permettant de caractériser le phénotype des cellules. Après marquage, les cellules seront analysées par cytométrie en flux afin de quantifier dans les lymphocytes B et lymphocytes T CD4⁺ certaines étapes de la signalisation de P2X7. La cinétique de phosphorylation des MAP kinases ERK1/2 dans les cellules traitées par de l'ATP ou des anticorps anti-CD3/CD28 sera également analysée par Western blot afin de comparer la rapidité de mise en œuvre et la sensibilité de cette technique classique avec celle de la cytométrie en flux.

Structure des enseignements:

Les cours seront organisés sous forme de conférences (7h)

Les TP (18h) seront organisés en deux groupes de 6 étudiants se formant, en parallèle, aux méthodes d'analyse du rôle du Ca²⁺ dans les voies de signalisation et à l'analyse multiparamétrique des voies de signalisation par cytométrie en flux. Chaque groupe sera subdivisé en 3 binômes.

Lieu des enseignements:

UPSUD - UFR Sciences - Orsay

Nombre d'ECTS:

3