

Évaluation de l'équilibre bioénergétique des lymphocytes T et de la capacité respiratoire de réserve à l'aide de l'analyse de flux extracellulaire

Auteurs

Jessica Walls et
Natalia Romero
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Le kit de profilage métabolique des lymphocytes T Agilent Seahorse XF est une solution robuste pour l'évaluation complète du métabolisme des lymphocytes T en temps réel. Le métabolisme s'est imposé comme un facteur clé du fonctionnement et du devenir des lymphocytes T. En effet, il a été démontré que la reprogrammation métabolique des lymphocytes T peut être utilisée comme stratégie d'amélioration de l'efficacité antitumorale des thérapies adoptives par lymphocytes T. Le kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF permet la mesure simultanée des activités mitochondriale et glycolytique des populations de lymphocytes T en combinaison avec la mesure de la capacité respiratoire mitochondriale. Un lien a été établi entre ces paramètres, le fonctionnement optimal et la persistance améliorée des thérapies à lymphocytes T. Auparavant, les mesures de la capacité respiratoire mitochondriale à l'aide de FCCP nécessitaient une optimisation de la concentration entre les différents types de cellules, les étapes de différenciation, le donneur et l'état de bonne santé ou l'état pathologique. Le kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF utilise un découpleur amélioré (BAM15) pour des mesures plus précises et cohérentes de la capacité bioénergétique des lymphocytes T, ne nécessitant qu'une optimisation réduite de la concentration relativement au FCCP. De plus, cette note d'application met en lumière l'utilisation du kit pour l'évaluation de l'impact de la composition du milieu durant l'expansion des lymphocytes T, à la suite du flux de tâches d'analyse de la persistance des lymphocytes T en XF. Ce flux de tâches permet une évaluation de la glycolyse, de l'activité et de la capacité mitochondriales de manière simultanée, ce qui offre un profil métabolique complet des lymphocytes T qui peut être intégré au suivi et à l'amélioration de la conception et du développement des thérapies à lymphocytes T.

Introduction

Le développement des immunothérapies à médiation cellulaire a révolutionné la recherche en cancérologie ainsi que l'étude du système immunitaire. L'un des types de thérapie cellulaire les plus prometteurs consiste à modifier génétiquement de nouveaux récepteurs d'antigènes chimériques (CAR) pour cibler les cellules cancéreuses. Il existe des preuves solides suggérant que les propriétés métaboliques des lymphocytes T – c'est-à-dire la manière dont ces lymphocytes satisfont leurs exigences bioénergétiques – jouent un rôle essentiel dans la régulation de leur fonction antitumorale et dictent l'efficacité des immunothérapies à lymphocytes T.¹

Les lymphocytes T subissent une série de modifications de leur phénotype métabolique durant leur activation et leur différenciation en lymphocytes effecteurs et mémoires, ce qui est essentiel pour le maintien de leur fonction.² Les lymphocytes T naïfs sont en état de quiescence, avec de faibles demandes métaboliques apportées principalement par la respiration mitochondriale. La stimulation antigénique provoque la sortie de l'état de quiescence, une augmentation rapide de la captation de nutriments, l'augmentation du métabolisme anabolique et la reprogrammation du métabolisme mitochondrial. Ces modifications métaboliques sont essentielles pour une prolifération et une différenciation rapide des lymphocytes T en vue de produire des cytokines ou des molécules déclenchant la cytotoxicité. Après avoir réussi à effacer le stimulus antigénique, les lymphocytes T mémoires qui restent retournent à un phénotype plus quiescent qui s'appuie principalement sur l'activité mitochondriale et une importante capacité respiratoire de réserve (SRC). Dans des conditions de stimulation chronique ou dans un environnement métabolique restreint, les lymphocytes T peuvent devenir dysfonctionnels d'un point de vue métabolique, un état connu sous le nom d'épuisement, dans lequel ces lymphocytes montrent une capacité bioénergétique mitochondriale et une fonction effectrice décroissante (Figure 1).

En raison du fort impact de la modulation métabolique du devenir et de la fonction des lymphocytes T, la détermination des signatures métaboliques des thérapies CAR-T et des autres thérapies adoptives à lymphocytes T peut jouer un rôle crucial dans la définition de la persistance des lymphocytes T et des fonctions antitumorales. De plus, la modulation et la reprogrammation des voies métaboliques des lymphocytes T peuvent être utilisées comme stratégie d'amélioration de l'efficacité antitumorale de ces lymphocytes.

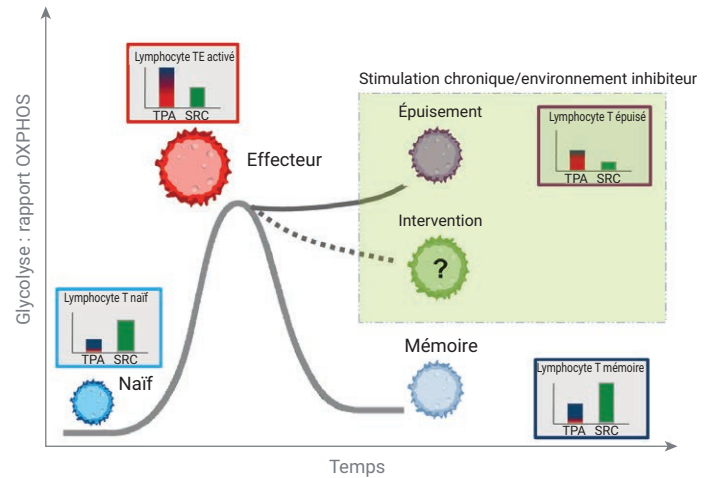


Figure 1. Principes de base du métabolisme des lymphocytes T avec mesure de leurs phénotypes métaboliques, illustrant la relation entre le rapport glycolyse/OXPHOS et le devenir cellulaire, l'aptitude et la fonction. Avec une stimulation chronique ou en présence d'un environnement inhibiteur tel qu'un microenvironnement tumoral, les lymphocytes T peuvent développer un phénotype d'épuisement avec une fonction mitochondriale altérée.

La caractérisation complète des voies bioénergétiques glycolytiques et mitochondriales dans les lymphocytes T à différentes étapes de leur vie, ainsi que des informations à propos des adaptations métaboliques à différents environnements cellulaires ou à des signaux de stress sont des résultats essentiels pour optimiser les thérapies à lymphocytes T et améliorer l'activité antitumorale des produits immunothérapeutiques. Conçu pour examiner simultanément les fonctions glycolytique et mitochondriale dans les cellules vivantes, la technologie Agilent Seahorse XF est l'une des principales plateformes utilisées pour étudier le métabolisme des cellules immunitaires. Elle est un contributeur clé pour la compréhension de l'immunométabolisme et la reconnaissance du rôle fondamental des modifications métaboliques se produisant lors de l'activation des lymphocytes T et de leur différenciation.^{3,4}

Cette note d'application présente le nouveau kit de profilage métabolique des lymphocytes T Agilent Seahorse XF, conçu pour permettre l'acquisition simultanée de mesures robustes de l'activité glycolytique et mitochondriale dans des populations de lymphocytes T, ainsi que la mesure de la capacité respiratoire mitochondriale. Ces mesures offrent une caractérisation complète du profil métabolique des lymphocytes T à partir d'une seule analyse qui peut être utilisée pour établir une corrélation avec une fonction antitumorale diminuée ou augmentée des produits thérapeutiques à lymphocytes T. L'obtention de ces mesures peut être particulièrement précieuse lors des processus de développement thérapeutiques ciblant une amélioration de la persistance des lymphocytes T ou pour éviter une activation à posteriori de l'épuisement métabolique dans un microenvironnement tumoral.

Étude de performance du découpleur mitochondrial utilisé dans les lymphocytes T

L'étude de la fonction mitochondriale des lymphocytes T en utilisant le test de stress mitochondrial cellulaire Agilent Seahorse XF combiné aux analyseurs Agilent Seahorse XF a fourni des connaissances fondamentales sur le métabolisme énergétique des lymphocytes T et de son rôle dans la direction du devenir et de la fonction des lymphocytes T.^{3,4} Le kit de stress mitochondrial cellulaire Agilent Seahorse XF combine une série de réactifs qui permettent la caractérisation complète de la fonction mitochondriale. Plus particulièrement, les injections séquentielles d'un inhibiteur de l'ATP synthase (oligomycine), d'un découpleur mitochondrial (cyanure de carbone *p*-trifluorométhoxyphénylhydrazone, FCCP) et d'un inhibiteur mitochondrial (un mélange de roténone et d'antimycine A [rot/AA]) permettent le calcul du taux de consommation d'oxygène dans les cellules intactes couplé à la production d'ATP mitochondrial (respiration liée à l'ATP), à la respiration maximale découplée ainsi qu'à la SRC, c'est-à-dire la différence entre la respiration basale et la capacité respiratoire maximale. Ces paramètres ont été largement utilisés pour caractériser la fonction mitochondriale de différentes populations de lymphocytes T et pour décrire les processus qui améliorent leur activité antitumorale.⁵⁻⁷ Cependant, malgré l'adoption généralisée de cette analyse dans le domaine du métabolisme immunitaire, son utilisation avec les lymphocytes T présente des difficultés, principalement dues à l'utilisation du découpleur protonophore FCCP.

Il existe plusieurs raisons pour lesquelles l'utilisation du FCCP avec les lymphocytes T (et potentiellement d'autres cellules immunitaires) n'est pas idéale. Premièrement, la concentration optimale du FCCP varie en fonction de multiples facteurs, dont le type de cellule immunitaire, l'état de différenciation, le donneur et le stade de la maladie. Si sa concentration n'est pas titrée ou optimisée pour chaque expérience individuelle, elle peut conduire à une sous-estimation de la capacité respiratoire maximale. Deuxièmement, dans les lymphocytes T naïfs et dans d'autres lymphocytes T différenciés, le taux de consommation d'oxygène (OCR) après exposition au FCCP n'est pas stable, ce qui provoque de grandes variations dans les mesures, et potentiellement une sous-estimation de la capacité respiratoire maximale.

De plus, l'utilisation du FCCP dans le test de stress mitochondrial cellulaire XF limite la capacité de l'analyse à fournir les mesures quantitatives de l'activité glycolytique qui correspondent au taux de production d'ATP glycolytique (ATP glyco). Le calcul du taux de production ATP glyco en utilisant les mesures de l'ECAR Seahorse XF (taux d'acidification extracellulaire) nécessite une correction de la contribution du CO₂ qui est estimée à l'aide de mesures d'OCR basales et de mesures d'OCR après ajout de rot/AA.⁸ Cependant, quand le FCCP est utilisé avant le rot/AA dans l'analyse, la contribution du CO₂ peut être sous-estimée, ce qui impacte la quantification de l'activité glycolytique. Ce phénomène est particulièrement important dans les cellules hautement oxydatives, c.-à-d. les cellules dont la production d'énergie repose principalement sur la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS), pour laquelle la contribution du CO₂ à l'ECAR n'est pas négligeable.

Des évaluations simultanées des taux de production d'ATP mitochondrial (ATP mito) et du taux de production d'ATP glyco permettent de caractériser la demande énergétique basale cellulaire (c.-à-d. le taux de production d'ATP cellulaire total) et l'équilibre métabolique basal (c.-à-d. le rapport entre les taux de production d'ATP glyco et d'ATP mito). Ces paramètres sont essentiels pour déterminer la fonction et le devenir des lymphocytes T. Pourtant, ils ne sont pas fournis par le test de stress mitochondrial cellulaire XF, ce qui entraîne une caractérisation incomplète de la bioénergie des lymphocytes T.

Développement du nouveau kit de profilage du métabolisme des lymphocytes T Agilent Seahorse XF

Afin de permettre l'acquisition simultanée de mesures bioénergétiques précises, cohérentes et quantitatives, aussi bien pour l'activité glycolytique que l'activité mitochondriale dans des populations de lymphocytes T, nous avons développé le kit de profilage métabolique des lymphocytes T Agilent Seahorse XF. Ce kit offre des mesures précises de la capacité respiratoire maximale des lymphocytes T en utilisant le découpleur BAM15 ((2-fluorophényl){6-[(2-fluorophényl)amino](1,2,5-oxadiazolo[3,4-e]pyrazine-5-yl)}amine). Le BAM15 est un découpleur novateur qui aurait une activité similaire au FCCP, mais qui présenterait une cytotoxicité moindre et une affinité plus faible pour la membrane plasmique, ce qui induit un champ d'action plus large.⁹

Comme montré dans les figures 2A à 2C (lignes rouges), quand les lymphocytes T naïfs sont testés avec le kit de test de stress mitochondrial cellulaire XF, le taux de modification du niveau d'O₂ durant les trois minutes de la mesure instrumentale après injection de FCCP n'est pas constant ou linéaire, ce qui induit des calculs d'OCR variables et une sous-estimation de la respiration maximale (Figures 2D à 2F, lignes rouges). De plus, il pourrait y avoir une surestimation significative de l'OCR après une injection rot/AA comme indiqué par la comparaison des traces cinétiques obtenues par injection de FCCP ou avec une injection de véhicule (Figure 2D, trace bleue ou rouge). Cependant, quand le découpleur BAM15 est utilisé à la place du FCCP, une augmentation stable de l'OCR est obtenue après l'injection de BAM15 (Figures 2A à 2C, lignes vertes) ce qui induit une détermination plus précise et exacte de la respiration maximale (Figures 2D à 2F, lignes vertes).

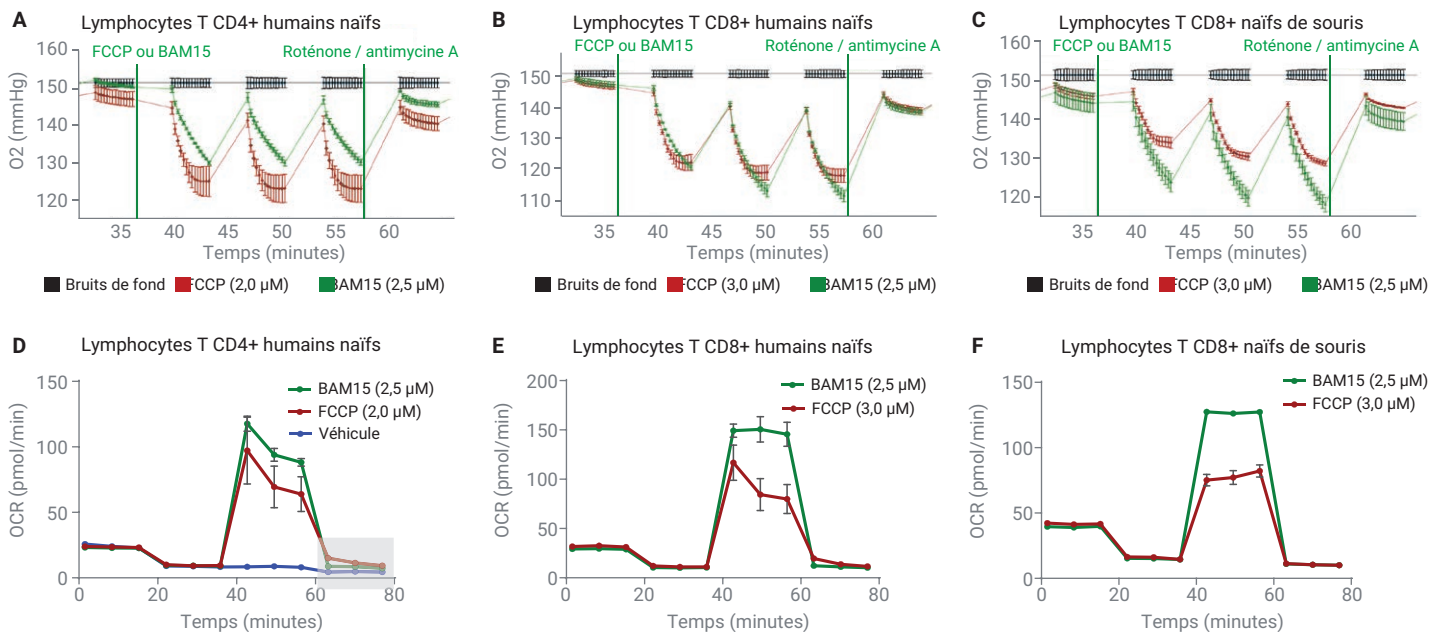
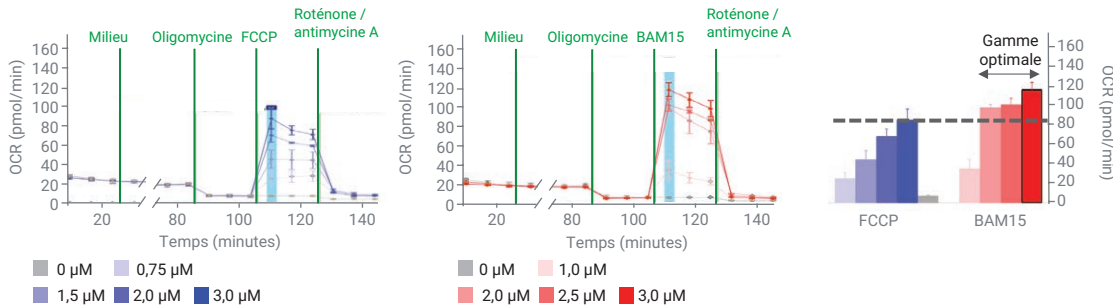


Figure 2. Comparaison des mesures de consommation d'oxygène à l'aide des découpleurs FCCP et BAM15. Toutes les cellules ont été semées à une densité de 2×10^6 cellules/puits dans un milieu d'analyse RPMI Agilent Seahorse XF, à un pH de 7,4 additionné de 10 mM de glucose, de 2 mM de glutamine et de 1 mM de pyruvate. Modifications du niveau d'oxygène extracellulaire dans des cellules humaines naïves CD4⁺ (A), des cellules humaines naïves CD8⁺ (B) et des lymphocytes T CD8⁺ extraits de rate de souris (C) après addition de concentrations optimisées de découpleurs FCCP (lignes rouges) et BAM15 (lignes vertes). Le taux de consommation d'oxygène (OCR) obtenu à l'aide du test de stress mitochondrial cellulaire XF (lignes rouges) ou de l'analyse du kit de profilage métabolique des lymphocytes T (lignes vertes) dans des cellules naïves humaines CD4⁺ (D), des cellules naïves humaines CD8⁺ (E) et les cellules CD8⁺ dérivée de rates de souris (F). Les lignes bleues en 2D correspondent aux conditions dans lesquelles le milieu d'analyse a été injecté à la place du découpleur.

Ces tests préliminaires ont été suivis d'expériences additionnelles à l'aide de CD4⁺ naïfs humains, de CD8⁺ naïfs humains, de CMSP humaines et de lymphocytes T CD8⁺ de rate de souris provenant d'au moins trois donneurs différents par type cellulaire. Dans tous les cas, les titrages avec du FCCP et du BAM15 en parallèle ont été réalisés. Le découpleur BAM15 a permis d'obtenir des respirations maximales plus élevées et des écarts-types plus faibles, relativement

à ceux obtenus avec des concentrations optimales de FCCP (Figures 3A à 3C). Les expériences de titrage ont aussi démontré que la gamme de concentrations optimales de BAM15 est plus large que la gamme obtenue avec le FCCP, ce qui indique un moindre besoin d'optimiser la concentration en découpleur pour chaque échantillon lorsque le BAM15 est utilisé (Figures 3A et 3B, graphiques à barres au milieu).

A Tracés cinétiques de lymphocytes T CD4⁺ humains naïfs et respiration maximale à différentes concentrations



B Tracés cinétiques de lymphocytes T CD8⁺ humains naïfs et respiration maximale à différentes concentrations

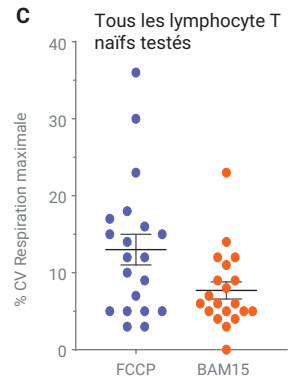
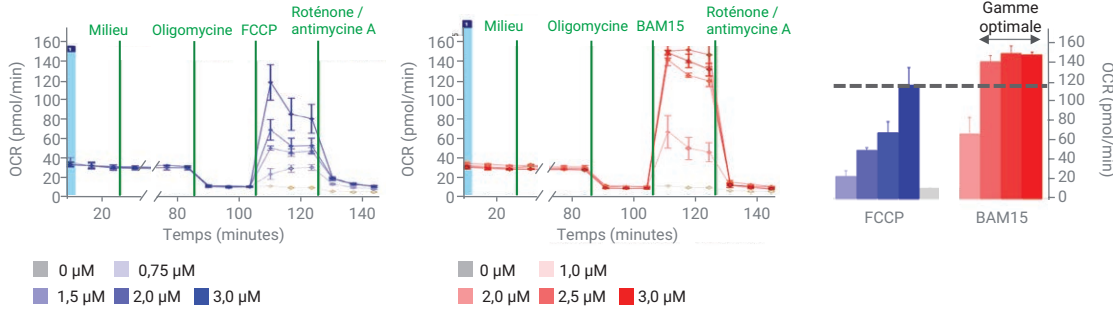


Figure 3. Comparaison des mesures de respiration maximale pour les expériences de titrage de FCCP et BAM15 à l'aide de lymphocytes T humains naïfs CD4⁺ (A) et CD8⁺ (B). Les graphiques en barres du milieu représentent la respiration maximale obtenue pour différentes concentrations de découpleur. (C) CV % de la respiration maximale obtenue pour un panel de lymphocytes T naïfs testés quand les concentrations optimales de FCCP ou 2,5 μ M de BAM15 ont été utilisées.

Les taux de production d'ATP glyco calculés à partir de l'utilisation du kit de profilage du métabolisme des lymphocytes T XF (avec un découpleur BAM15) ont aussi été comparés avec ceux obtenus à partir d'expériences en parallèle à l'aide du kit d'analyses du taux de production d'ATP en temps réel Agilent Seahorse XF. Les résultats ne montrent pas de différences significatives dans les taux de production d'ATP glyco basal obtenus à partir de ces deux kits ou analyses (Figure 4).

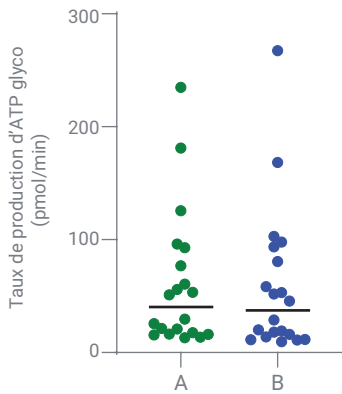


Figure 4. Comparaison des taux de production d'ATP glyco basal dans les lymphocytes T naïfs, calculés à l'aide d'un kit d'analyse du taux de production d'ATP en temps réel Agilent Seahorse XF (B) ou du kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF (A) avec du BAM15 injecté entre les injections d'oligomycine et de rot/AA.

Enfin, un large panel de lymphocytes T a été sélectionné pour évaluer en détail le kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF, allant des humains aux souris et en incluant des donneurs et des stades de différenciation différents. Les expériences de titrage ont été réalisées, et des valeurs d'OCR maximales obtenues pour des concentrations de FCCP optimales ont été comparées avec les valeurs obtenues avec une seule concentration de BAM15 (2,5 μM) pour un panel de lymphocytes T (Figure 5). Dans tous les cas, l'OCR maximal obtenu avec 2,5 μM de BAM15 était d'au moins 90 % la valeur d'OCR maximale obtenue avec une concentration de FCCP optimale pour le même type de cellules. L'OCR maximal obtenu avec 2,5 μM de BAM15 était, en moyenne, 20 % plus élevé que la valeur obtenue avec une concentration optimale de FCCP, ce qui démontre que le réactif BAM15 du kit peut être utilisé avec une valeur fixe de 2,5 μM pour tous les types de lymphocytes T, ou ne nécessite qu'une optimisation minimale.

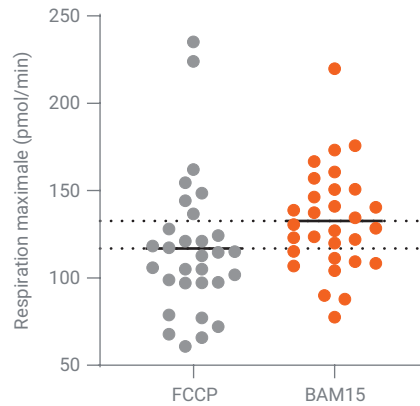


Figure 5. Comparaison de la respiration maximale obtenue avec une concentration optimale de FCCP ou avec 2,5 μM de BAM15 sur un large panel de lymphocytes T, dont des CMSP humaines, des CD4⁺ naïfs, des CD8⁺ naïfs, des CD4⁺ activés, des CD8⁺ activés, des CD8⁺ effecteurs, des CD8⁺ mémoire, et des lymphocytes T naïfs et des CD8⁺ activés de souris (n=3 par type cellulaire).

Application du kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF pour l'optimisation de la persistance des produits thérapeutiques à lymphocytes T

L'un des attributs essentiels à considérer lors de l'évaluation des thérapies CAR-T et des autres thérapies adoptives à lymphocytes T est la signature métabolique des cellules, puisqu'elle joue un rôle crucial pour la définition de la persistance des lymphocytes T et de la fonction antitumorale. En effet, il a été constaté que les cellules CAR-T qui acquièrent un phénotype effecteur avec une grande activité métabolique durant leur expansion *in vitro* ont une faible persistance et une faible activité antitumorale *in vivo*. Cependant, les cellules CAR-T présentant une activité métabolique faible à modérée durant l'expansion *in vitro* et une capacité respiratoire de réserve élevée confèrent une bonne immunité antitumorale, caractérisée par des capacités de prolifération améliorées ainsi que des taux de destruction des cellules tumorales et de production de cytokines augmentés.¹⁰ Plusieurs publications indiquent que les conditions d'expansion durant la fabrication peuvent produire des lymphocytes T avec un phénotype métabolique non désiré qui réduit l'activité *in vivo*. Ces publications montrent également que le conditionnement métabolique des lymphocytes T durant leur expansion peut induire une reprogrammation métabolique qui entraîne une persistance *in vivo* augmentée et une fonction antitumorale améliorée.^{5,11,12}

Conçu pour aider au développement des thérapies à lymphocytes T, le kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF offre une image complète du profilage du métabolisme des lymphocytes T à partir d'une simple analyse qui comprend la demande énergétique basale totale, l'équilibre métabolique basal et la capacité respiratoire de réserve – tous ces paramètres ayant été utilisés précédemment pour décrire les états métaboliques des lymphocytes T, avec une persistance augmentée ou réduite.¹⁰ Par conséquent, il convient parfaitement à l'évaluation et à l'optimisation des conditions d'expansion des lymphocytes T qui permettent d'obtenir le phénotype métabolique désiré pour une persistance des lymphocytes T accrue.

Ici, le kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF a été utilisé pour évaluer comment la composition du milieu de culture cellulaire (RPMI contenant 10 mM de glucose + 10 % de FBS ou de milieu ImmunoCult XF (STEMCELL Technologies)) – ainsi que l'ajout de différentes interleukines (IL-2 ou IL-15) – peut impacter le profil métabolique des produits à lymphocytes T. Des études précédentes ont indiqué que les cellules cultivées dans de l'IL-15 présentent un phénotype moins différencié que les cellules cultivées

dans de l'IL-2.¹³ Dans cette étude, les pan-lymphocytes T ont été activés à partir de différents donneurs humains sains avec des microbilles magnétiques conjuguées avec des anticorps CD3/CD28. Après trois jours, les microbilles magnétiques ont été enlevées, et les cellules cultivées dans les conditions de milieu indiquées (Figure 6). Les cellules ont été maintenues en culture à une densité cellulaire de 1×10^6 cellules/mL, avec un milieu rafraîchi et un volume ajusté tous les trois jours. Les échantillons ont été prélevés au jour 7, 14 et 22 et analysés à l'aide de l'analyse de persistance des lymphocytes T XF au moyen du kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF, selon les conditions recommandées.¹⁴

Tout d'abord, la SRC a été étudiée durant l'expansion cellulaire. Comme illustré dans la Figure 6A, au jour 7, il a été observé une différence de SRC entre les cellules cultivées dans de l'IL-15 ou de l'IL-2, indépendamment des milieux de culture cellulaires utilisés durant cette expansion. La SRC accrue des cellules cultivées dans de l'IL-15 s'accroît au jour 22, particulièrement dans les cellules cultivées dans du milieu ImmunoCult XF optimisé (Figure 6C). Une SRC augmentée est caractéristique d'un phénotype de type mémoire et a été précédemment associée à une persistance accrue.

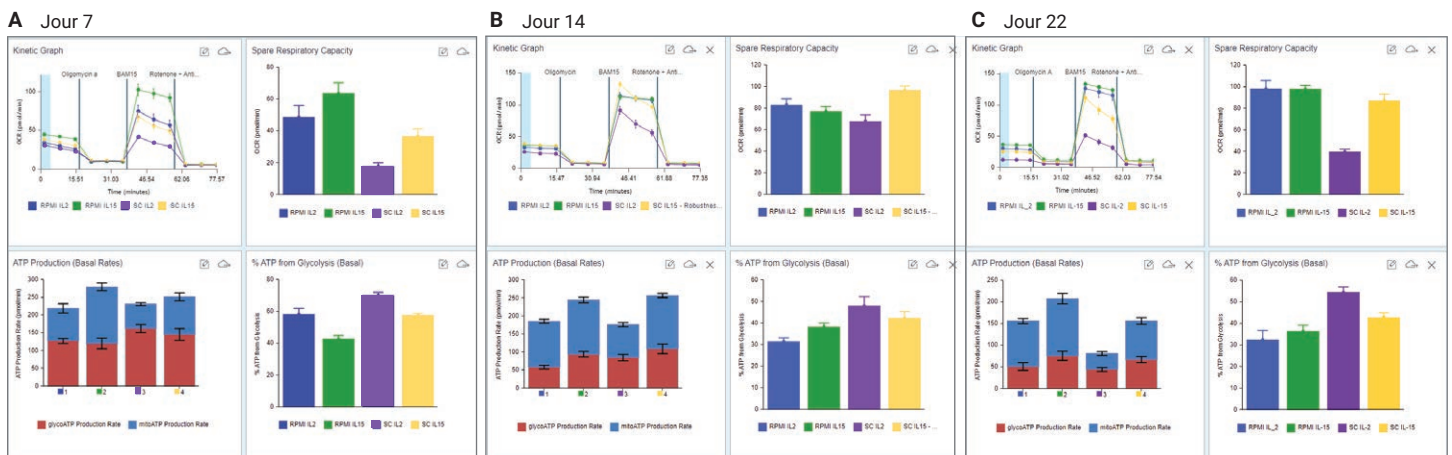


Figure 6. Impact des conditions d'expansion cellulaire sur les mesures du métabolisme des lymphocytes T. Les pan-lymphocytes T du sang périphérique humain ont été activés avec l'activateur CD3/CD28 pour cellules humaines Dynabeads dans un milieu d'expansion pour cellules T ImmunoCult XF et cultivées à 37 °C dans un incubateur à 5 % CO₂. Deux jours après l'activation, les Dynabeads ont été enlevées, les cellules séparées en 4 groupes et remises en suspension à 1×10^6 cellules/mL dans les 4 milieux qui suivent : Bleu : RPMI avec ajout de 2 mM de glutamine, 10 % de FBS et de IL-2 (300 U/mL) ; Vert – RPMI avec ajout de 2 mM de glutamine, 10 % de FBS et IL-15 (10 ng/mL) ; Violet – Milieu ImmunoCult XF avec ajout de IL-2 (300 U/mL) ; Jaune – Milieu ImmunoCult XF avec ajout de IL-15 (10 ng/mL). Les échantillons ont été prélevés et analysés aux jours 7, 14 et 22 après l'activation. Les données rapportées pour chaque jour comprennent les tracés cinétiques d'OCR (en haut, à gauche), la SRC (en haut, à droite) les taux de production d'ATP (en bas à gauche) et le pourcentage d'ATP provenant de la glycolyse (en bas à droite).

L'étape suivante a consisté en l'examen de résultats supplémentaires obtenus par cette analyse pour mieux caractériser et améliorer les conditions d'expansion, qui sont le taux de production d'ATP basal provenant de la glycolyse et des mitochondries (Figure 6, les deux graphiques du bas dans chaque encadré). Les cellules cultivées dans un milieu ImmunoCult XF contenant de l'IL-15 ont un équilibre métabolique plus oxydatif (% d'ATP inférieur provenant de la glycolyse) relativement au milieu contenant de l'IL-2 (Figure 6, graphique en bas à droite de chaque encadré, barres jaunes relativement aux barres violettes). De plus, les cellules cultivées et différenciées dans des milieux RPMI présentent une demande métabolique plus élevée (un taux de production

d'ATP basal total plus élevé) que les cellules cultivées et différenciées dans un milieu ImmunoCult XF, quelle que soit l'interleukine utilisée (Figure 6, graphique en bas à gauche de chaque encadré). La demande métabolique accrue est associée à un phénotype de lymphocytes T effecteurs. En fait, quand l'expression des marqueurs de surface CCR7-A et CD45RO-A a été analysée à l'aide du cytomètre en flux Agilent NovoCytte Advanteon, il a été observé que les cellules cultivées dans du milieu ImmunoCult XF ont conservé un rapport de population mémoire centrale CCR7-A⁺/CD45RO-A⁺ plus élevé comparé aux cellules cultivées dans un RPMI enrichi en phénotype mémoire effecteur (Figure 7).

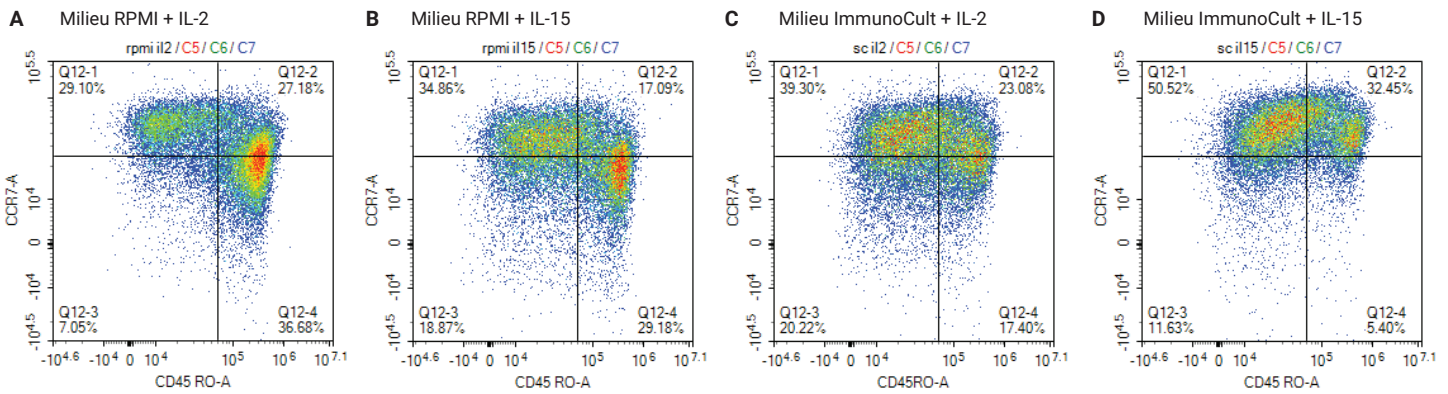


Figure 7. Analyse de cytométrie en flux des marqueurs cellulaires de surface CCR7-A et CD45RO-A avec des échantillons au jour 22 cultivés dans différents milieux comme indiqués sur les graphiques. 2 mM de glutamine et 10 % de FBS ont été ajoutés au milieu RPMI.

Conclusion

Ce document présente une analyse optimisée pour la caractérisation complète du profil métabolique des lymphocytes T. L'analyse combine l'utilisation d'un analyseur XF avec le kit de profilage métabolique des lymphocytes T XF, ce qui offre un découpleur optimisé qui permet des mesures robustes de la respiration maximale et de la capacité respiratoire de réserve des lymphocytes T, avec une optimisation de concentration du découpleur minimale. De plus cette analyse permet aux utilisateurs d'obtenir des informations quantitatives concernant l'activité glycolytique dans le même échantillon cellulaire, ainsi qu'une mesure spécifique de la demande bioénergétique basale cellulaire.

Afin d'améliorer la capacité à développer et prédire l'efficacité de la thérapie à lymphocytes T, il est nécessaire d'utiliser une combinaison d'outils et d'analyses orthogonales qui fournissent un ensemble de données complètes pour caractériser les produits thérapeutiques à cellules CAR-T. Il est clair que la caractérisation métabolique des lymphocytes T est l'un des attributs essentiels qui doit être analysé pour améliorer la persistance et la capacité antitumorale des produits à lymphocytes T. L'analyse XF de la persistance des lymphocytes T fournit des résultats multiparamétriques qui permettent une caractérisation complète du profil métabolique de ces lymphocytes à partir d'un même échantillon et peut être incorporée en tant qu'analyse de routine pour optimiser la conception et la fabrication de produits thérapeutiques dérivés des lymphocytes T.

Références

1. Chang C. H.; Pearce, E. L. *Nature Immunology* **2016**, 17, 364–368. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fni.3415>.
2. Sukumar *et al.* *Current Opinion in Immunology* **2017**, 46, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.011>.
3. Wei *et al.* *Frontiers in Immunology* **2021**, 12, 717014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717014>.
4. Voss *et al.* *Nature Reviews Immunology* **2021**, 21, 637–652. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00529-8>.
5. Geiger *et al.* *Cell* **2016**, 167, 829–842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>.
6. Kawalekar *et al.* *Immunity* **2016**, 44, 380–390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.021>.
7. Scharping *et al.* *Immunity* **2016**, 45, 374–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009>.
8. Natalia, R. Quantifying Cellular ATP Production Rate Using Agilent Seahorse XF Technology. *Livre blanc Agilent Technologies*, numéro de publication **5991-9309FR**.
9. Kenwood *et al.* *Molecular Metabolism* **2014**, 3, 114–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2013.11.005>.
10. Rostamian *et al.* *Cancer Letters* **2021**, 500, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.12.004>.
11. Hermans *et al.* *PNAS* **2020**, 117(11), 6047–6055. <https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1920413117>.
12. Geltink *et al.* *Nature Metabolism* **2020**, 2, 703–716. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0256-z>.
13. Alizadeh *et al.* *Cancer Immunol. Res.* **2019**, 7(5), 759–772. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0466>.
14. Guide Utilisateur du Kit de profilage métabolique des lymphocytes T Agilent Seahorse XF. *Agilent Technologies*, numéro de publication **5994-3493FR**.

<http://www.agilent.com/chem/xfpro>

Pour la recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins de diagnostic.

RA44573.6858796296

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 8 février 2022
5994-4494FR