

Université Pierre et Marie Curie-Paris 6
Epreuve d'Immunologie Fondamentale (septembre 2002)
Durée de l'épreuve : 3 heures

D'après F. Sallusto et al. (1997) *Science* 277, 2005-2007.
C.M. Lloyd et al. (2000) *J.Exp.Med.* 191, 265-274.

La régulation de la migration des leucocytes est un processus complexe qui implique la participation de molécules d'adhésion comme les sélectines et les intégrines, ainsi que des chimiokines et leurs récepteurs.

L'action combinée des molécules d'adhésion et des chimiokines gouverne la migration des cellules du système immunitaire vers différents sites anatomiques (moelle osseuse, thymus, sang, peau, lymph, organes lymphoïdes secondaires...).

Il existe deux catégories de lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes de type « Th1 » et les lymphocytes de type « Th2 ».

Question 1 : Rappelez, à l'aide d'un tableau comparatif synthétique, les caractéristiques principales de ces deux sous-populations de lymphocytes T.

Les cellules « Th1 » et « Th2 » ne migrent pas vers les mêmes tissus. On constate que les sites où ont lieu les réactions allergiques contiennent des cellules « Th2 » en plus de polynucléaires éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB).

On sait par ailleurs que la chimiokine Eotaxine est produite par les cellules épithéliales et les phagocytes. Elle est un chimio-attractant pour les PNE et les PNB qui expriment CCR3, le récepteur de l'Eotaxine.

L'objectif des expériences suivantes est de comprendre par quel mécanisme les lymphocytes « Th2 » sont attirés dans les sites de réactions allergiques cutanées.

Expérience 1 :

Des expériences préliminaires ont permis de démontrer que dans le sang adulte, environ 1% des lymphocytes T expriment CCR3 (ceci n'est pas vrai dans le sang de cordon ombilical)

- A l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CCR3 et anti-CD3 couplés à un fluorochrome, on marque les cellules du sang adulte ou des lignées dérivées de ces cellules, et on analyse par cytométrie de flux quelles cellules sont marquées par ces anticorps. Les résultats sont présentés sur la Figure 1 (cadres A, B et E).
- On utilise deux méthodes pour mesurer les cytokines produites par ces cellules : on dose les cytokines IL-4, IL-5 et IFN- γ dans les surnageants cellulaires par un test ELISA, et la production d'IL-4 et d'IFN- γ par un marquage intracellulaire des cellules des fenêtres R1 et R2 (Figure 1A). Les résultats sont présentés sur la Figure 1 (cadres C, F, G, D et H).

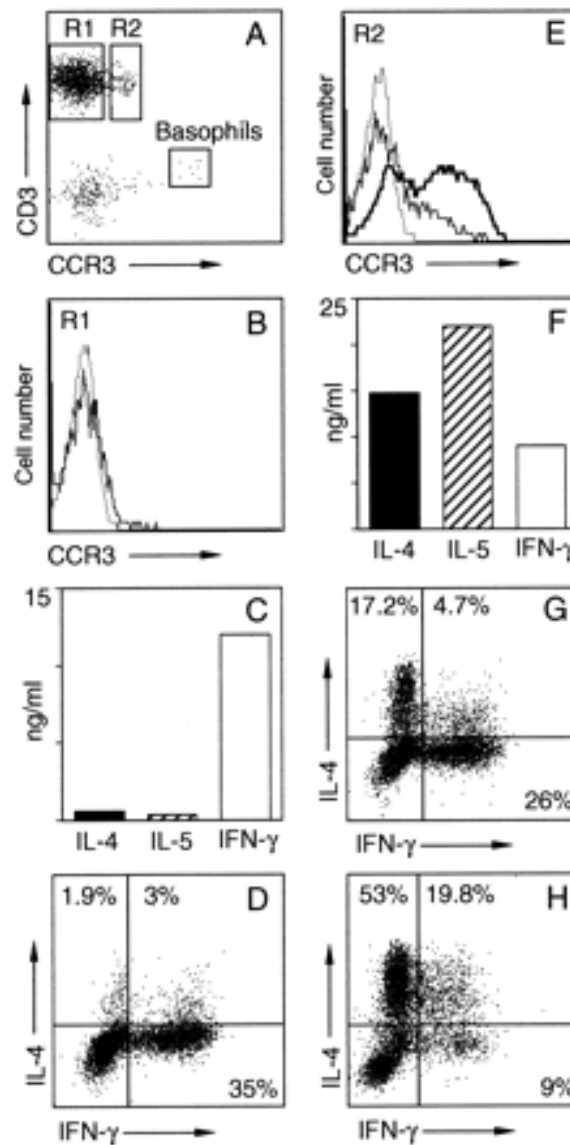


Figure 1

- A. Expression de CD3 et CCR3 par les cellules du sang
- B. Expression de CCR3 par la lignée polyclonale issue des cellules de la fenêtre R1 (lignée R1)
- E. Expression de CCR3 par la lignée polyclonale issue des cellules de la fenêtre R2 (lignée R2)
- C. Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la lignée R1
- F. Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la lignée R2
- D. Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par les cellules de la lignée R1
- G. Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par les cellules de la lignée R2
- H. Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par des cellules triées sur la lignée R2 qui expriment CCR3

- N.B. : Sur les cadrans B et E, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligne grisée). Sur le cadran E, la ligne noire correspond au marquage avec l'anticorps anti-CCR3 pour les cellules étudiées dans le cadran H.

Question 2 : Comment les marquages membranaires et intracellulaires sont-ils effectués ? (5 lignes maximum)

Question 3 : Quelles sont les cellules qui expriment le récepteur CCR3 ? (5 lignes maximum)

Question 4 : Quelles conclusions pouvez-vous tirer de l'ensemble de ces expériences ? (10 lignes maximum)

Expérience 2 :

On cherche à déterminer les facteurs qui induisent l'expression de CCR3. Pour cela, des lymphocytes T naïfs, provenant de sang de cordon ombilical, n'exprimant pas CCR3, sont mis en culture avec de la PHA, un activateur polyclonal des lymphocytes T :

- soit en présence d'IL-12 et d'anticorps anti-IL-4 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules « Th1 »
- soit en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IL-12 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules « Th2 »

Les résultats sont présentés sur la Figure 2 :

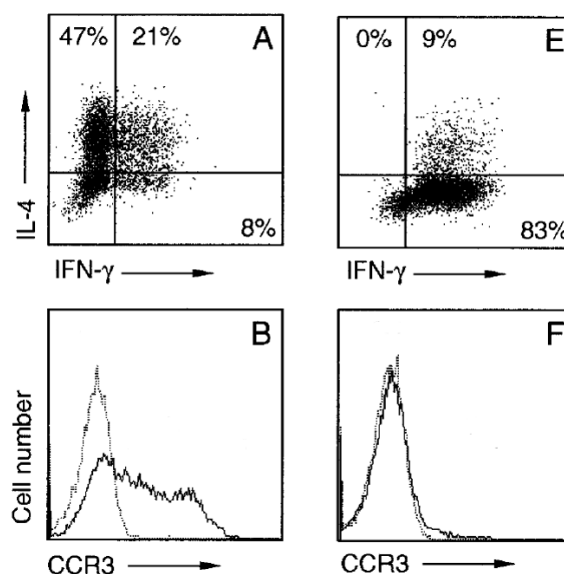


Figure 2

- A.** Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th2
B. Expression de CCR3 par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th2.
E. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th1
F. Expression de CCR3 par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th1

N.B. : Sur les cadrans B et F, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligné grisée).

Question 5 : Quels éléments nouveaux ces expériences apportent-elles ? (8 lignes maximum)

Expérience 3 :

On sait que les cytokines IFN- α et TGF- β peuvent interférer avec la différenciation Th2. On cherche à savoir si ces cytokines vont également interférer avec l'acquisition de l'expression de CCR3.

Des lymphocytes T de sang de cordon ombilical ont été cultivés en présence d'IL-4 et d'anti-IL-12, avec de l'IFN- α ou du TGF- β . Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

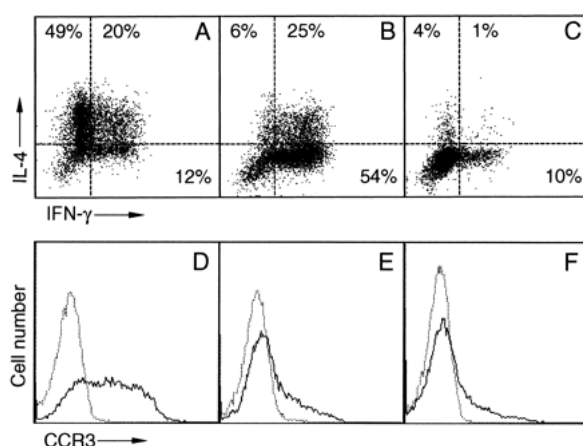


Figure 3

- A. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12
- B. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN- α
- C. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF- β
- D. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12
- E. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN- α
- F. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF- β

N.B. : Sur les cadrans B et F, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligné grisée).

Question 6 : Quels sont les effets respectifs de l'IFN- α et du TGF- β sur l'induction de la polarisation Th1 et Th2, et sur l'acquisition de CCR3 ? (8 lignes maximum)

Question 7 : Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre sachant que l'Eotaxine est sur-exprimée dans les sites de réactions allergiques ? (8 lignes maximum)

Il a également été montré que CCR4, le récepteur de la chimiokine MDC, produite par les macrophages, était exprimé par les lymphocytes Th2 et non pas Th1. On s'intéresse ici aux rôles fonctionnels respectifs des couples Eotaxine/CCR3 et MDC/CCR4 dans le recrutement des lymphocytes Th2 sur les sites de réactions allergiques dans un modèle de maladie respiratoire allergique :

- [illegible]

i.

Day 4

Cell Type	Cells/ml $\times 10^5$
Th1	~2.5
Th2	~4.0

Day 7

Cell Type	Cells/ml $\times 10^5$
Th1	~6.5
Th2	~7.0

ii.

Day 4

Cell Type	% Cells in infiltrate
Th1	~23
Th2	~35

Day 7

Cell Type	% Cells in infiltrate
Th1	~20
Th2	~45

- i. Numération des éosinophiles (barres noires) et basophiles (barres blanches) récupérés dans les BAL des souris BALB/c ayant reçu une injection de cellules effectrices transgéniques polarisées Th1 ou Th2, suivie d'injections quotidiennes par voie aérienne de l'antigène OVA. Les résultats sont donnés aux jours 4 et 7 après l'injection des cellules effectrices.
- ii. Pourcentage d'éosinophiles (barres noires) et basophiles (barres blanches) dans les infiltrats cellulaires observés au niveau des tissus pulmonaires pour les mêmes conditions que ci-dessus (i).

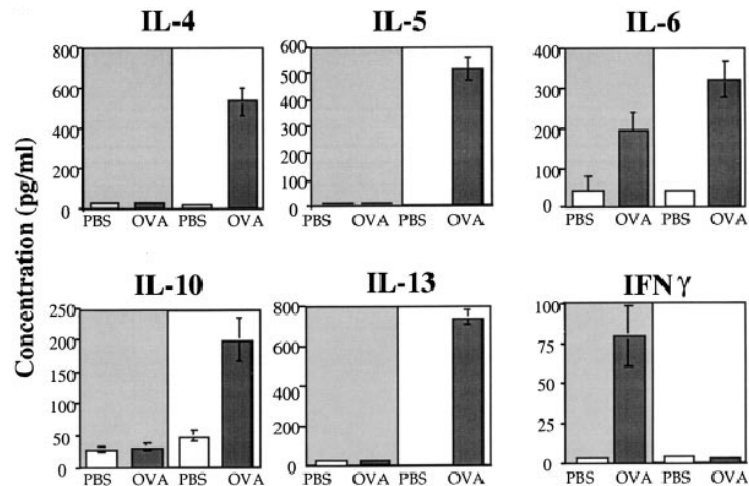


Figure 6

Mesure par ELISA de la production de cytokines dans les BAL des souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 (cadres grisés) ou Th2 (cadres blancs), et ayant subi un challenge avec l'antigène OVA (barres grisées) ou du PBS (barres blanches).

N.B. : Chaque résultat correspond à la moyenne ($\pm$ écart-type) des mesures faites pour un groupe de cinq souris au jour 4 après l'injection des cellules effectrices..

Question 8 : A l'aide d'un tableau comparatif, analysez soigneusement ces résultats ; en particulier, mettez en évidence les différences observées chez les souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 ou Th2.

Expérience 5 :

Chez les souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 ou Th2, on mesure, au niveau des infiltrats pulmonaires, l'expression des chimiokines Eotaxine et MDC, ainsi que celle de leur récepteur CCR3 et CCR4 (Figure 7C). Par ailleurs, les proportions de cellules Th2 exprimant CCR3 ou CCR4 au niveau des tissus pulmonaires présentant une réaction allergique sont déterminées (Figure 7D).

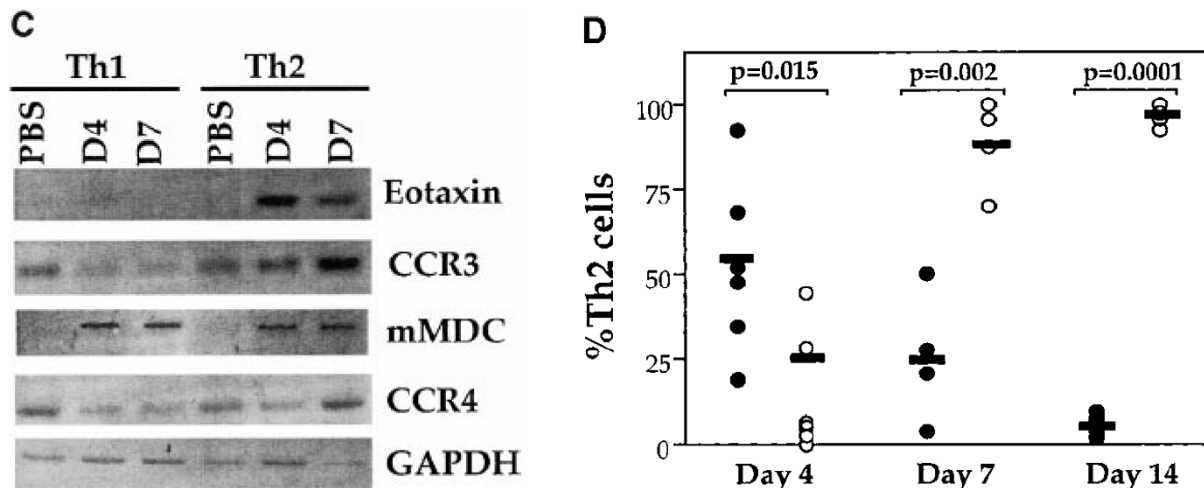


Figure 7

- C. L'expression des récepteurs CCR3 et CCR4, et de leur ligand respectif, Eotaxine et MDC, a été déterminée par PCR sur l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN de poumons de trois souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 ou Th2. Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport à l'expression du gène domestique GAPDH.
- D. Les proportions de cellules Th2 exprimant CCR3 (cercles pleins) ou CCR4 (cercles vides) au niveau des tissus pulmonaires présentant une réaction allergique ont été déterminées par comptage des cellules présentes aux niveaux des infiltrats pulmonaires marquées par l'anticorps anti-clonotypique KJ126 dirigé contre le TCR DO10-11 et exprimant CCR3 ou CCR4.

Question 9 : Analysez ces résultats. (10 lignes maximum)

Question 10 : Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre quant au rôle respectif des chimiokines Eotaxine et MDC ? (5 lignes maximum)

Expérience 6 :

Dans une dernière série d'expériences, des souris ayant reçu une injection de cellules polarisées Th2 ou Th1 reçoivent, 30 minutes avant chaque injection quotidienne d'antigène OVA, une injection d'anticorps anti-Eotaxine ou anti-MDC ou d'anticorps témoin :

- Le pourcentage de cellules $CD4^+$ reconnues par l'anticorps KJ126⁺ est évalué aux jours 4 et 7. On notera que le nombre de cellules $CD4^+$ total dans les infiltrats reste constant. Les résultats sont présentés sur la Figure 8 A et B.
- Chez les souris ayant reçu une injection de cellules polarisées Th2, le nombre d'éosinophiles au niveau des infiltrats pulmonaires ainsi que les niveaux de production d'IL-4 et IL-5 dans les BAL sont mesurés

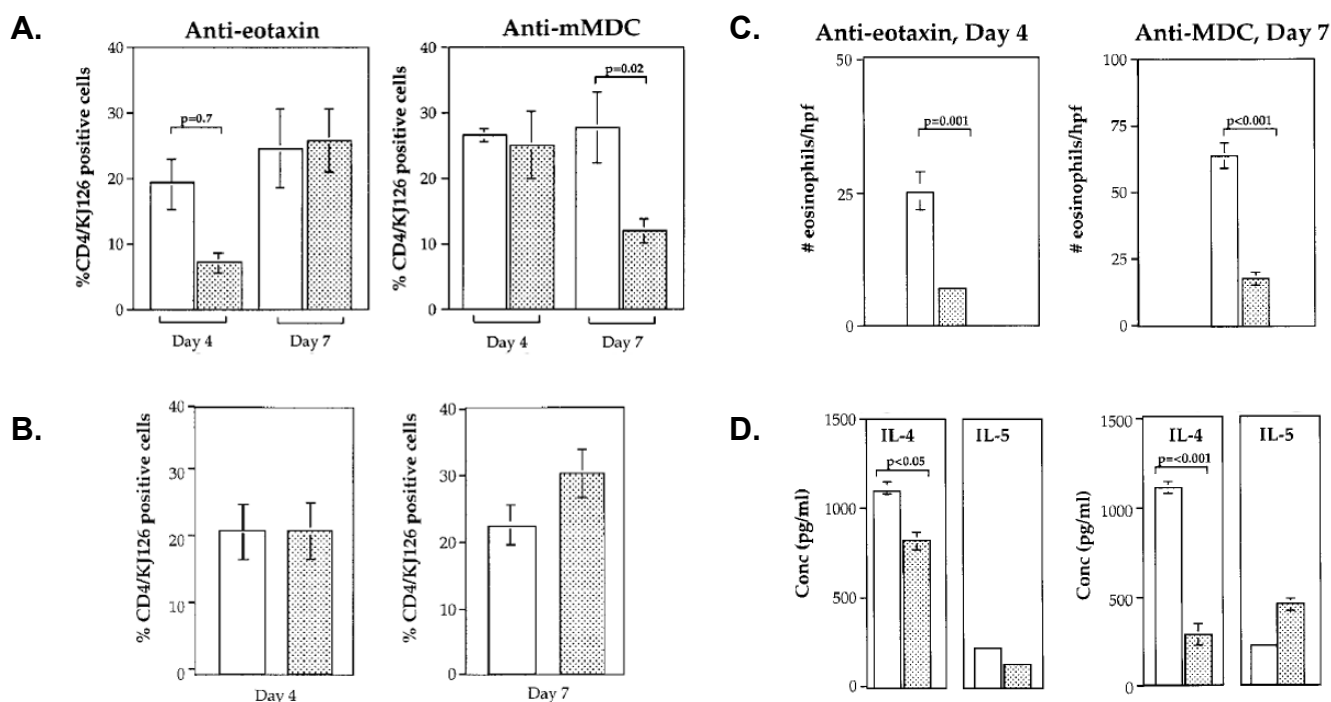


Figure 8

- A-B.** Pourcentage de cellules $CD4^+$ spécifiques de l'antigène OVA présentes dans les infiltrats pulmonaires de souris traitées avec un anticorps anti-Eotaxine ou anti-MDC (barres hachurées) ou un anticorps contrôle (barres blanches) après transfert de cellules polarisées Th2 (A) ou Th1 (B).
- C-D.** Nombre d'éosinophiles par champ histologique (hpf) dans les infiltrats pulmonaires (C) et production de cytokines dans les BAL (D) de souris traitées avec un anticorps anti-Eotaxine, au jour 4, ou avec un anticorps anti-MDC, au jour 7 après transfert de cellules polarisées Th2 (barres hachurées). Les barres blanches correspondent au traitement avec l'anticorps contrôle.

Question 11 : Analysez ces résultats. (10 lignes maximum)

Question 12 : Ces derniers résultats vous permettent-ils de préciser vos hypothèses ? (10 lignes maximum)