

Nouvelles approches d'étude d'expression génique – Applications au système immunitaire

I.

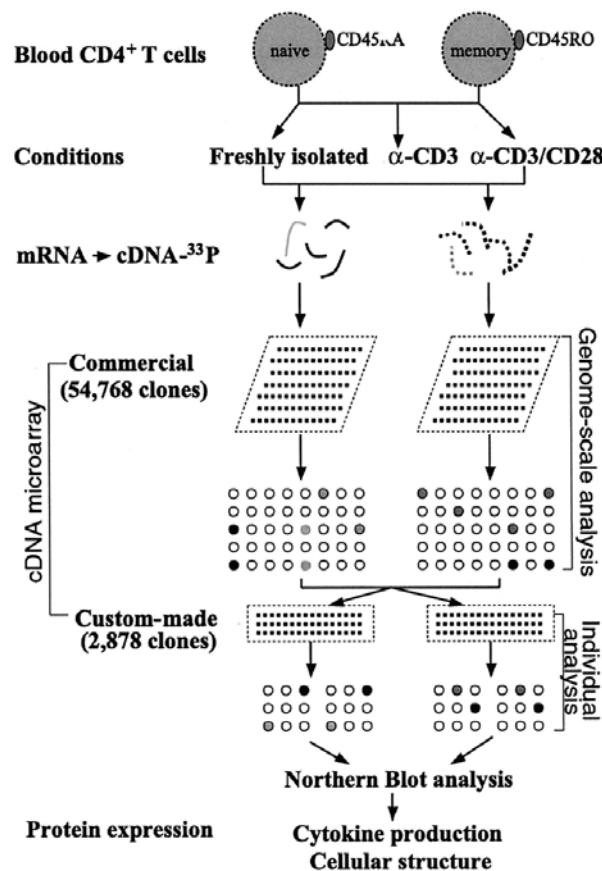
La première partie de cette séance de Travaux Dirigés consistera en une présentation de Jérôme Galon, Chercheur à l'Inserm, (INSERM U255, Centre de Recherches Biomédicales des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris - Tél : 01 53 10 04 10 - jerome.galon@u255.bhdc.jussieu.fr) sur les techniques d'analyses de puces à ADN (*DNA chips*) qui permettent de mesurer et de visualiser très rapidement les différences d'expression entre les gènes et ceci à l'échelle d'un génome complet. Les principes théoriques et pratiques de cette technologie seront abordés suivis de leur application à l'étude des réponses du système immunitaire

II.

(d'après Liu, K. *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:7335)

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent aux bases moléculaires de la réponse immunitaire mémoire en mettant en œuvre la technique des micro-réseaux (*microarrays*) pour un ensemble d'environ 55 000 ADNc. Leur stratégie a consisté à comparer les profils d'hybridation d'ADNc provenant de lymphocytes CD4⁺ du sang, naïfs (CD45RA) ou mémoires (CD45RO), activés dans différentes conditions comme schématisé sur la **Figure 1**.

Figure 1



Conformément à cette stratégie, des lymphocytes du sang de donneurs sains ont été purifiés et triés en sous-populations naïve (CD45RA) et mémoire (CD45RO). Les réponses de prolifération et l'expression des marqueurs de surface CD25 et CD69 sont mesurées après stimulation *in vitro* par un anticorps anti-CD3 seul ou en combinaison avec un anticorps anti-CD28. Les résultats sont résumés sur la **Figure 2**.

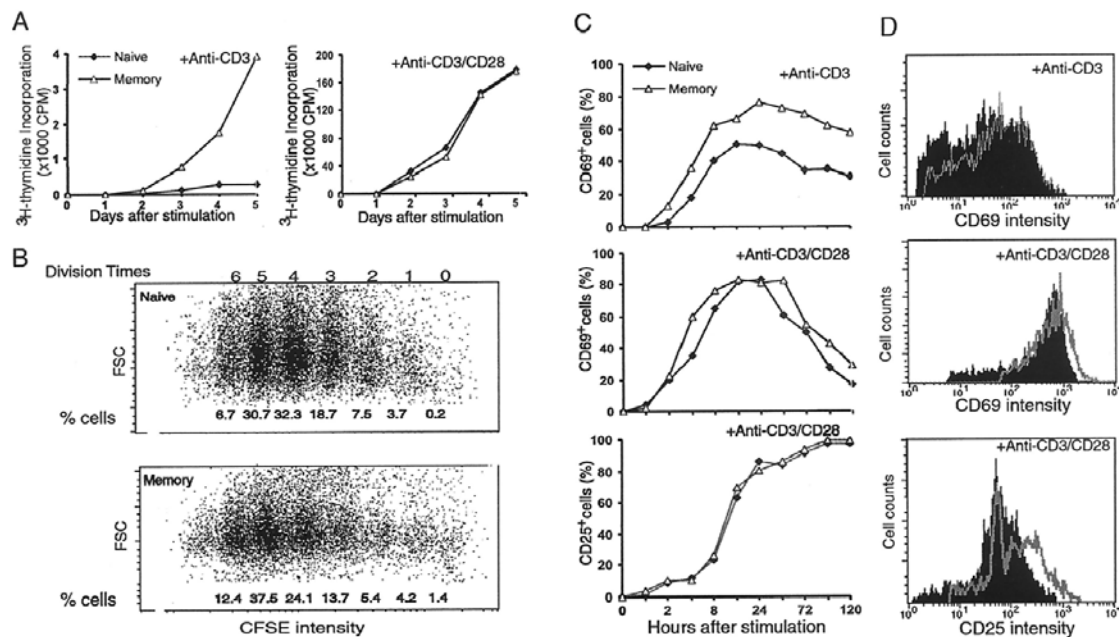


Figure 2 : Mesures de la prolifération et de l'expression de CD69 et CD25 de cellules CD4⁺ naïves ou mémoires après stimulation avec anti-CD3 ou anti-CD3/CD28.

- A. Profils d'incorporation de thymidine tritiée par les cellules CD4⁺ naïves ou mémoires après stimulation *in vitro*.
- B. Pourcentages cellules CD4⁺ naïves ou mémoires parvenues un nombre particulier de divisions après 5 jours de stimulation avec le traitement anti-CD3/CD28. Les cellules ont été stimulées en présence de CFSE pendant 5 jours. Les profils CFSE ont été acquis par FACS et analysés par ModFit. Les temps de division de cellule sont indiqués en haut et le pourcentage des cellules qui se sont divisées n fois (en haut) sont indiqués au bas de la figure.
- C. Pourcentage de cellules CD4⁺ naïves ou mémoire qui expriment CD69 ou CD25 après la stimulation.
- D. Intensité de fluorescence de l'expression de CD69 ou CD25 sur les CD4⁺ naïves ou mémoires. Sont montrées l'intensité de fluorescence de CD69 pour les cellules stimulées pendant 16h avec l'anti-CD3 seul ou l'anti-CD3/CD28 et celle de CD25 pour les cellules stimulées pendant 16h avec l'anti-CD3/CD28. Les surfaces noires correspondent aux cellules naïves ; les surfaces vides correspondent aux cellules mémoires.

- Question 1.** Quel sont les effets prévisibles des traitements avec l'anti-CD3 et l'anti-CD28 ?
- Question 2.** Analyser soigneusement ces résultats. Que permettent d'évaluer la mesure de la prolifération et l'expression des molécules CD25 et CD69 ?
- Question 3.** Aucune expression de CD25 n'est décelée pour les cellules naïves ou mémoires lors d'une stimulation par l'anti-CD3 seul (résultat non montré). Pourquoi ?
- Question 4.** Quelle(s) différence(s) peut-on noter entre les cellules mémoires et naïves quant à leur potentiel de prolifération, et d'expression des marqueurs CD69 et CD25 ?

Sur la base des résultats précédents, les auteurs décident d'utiliser les cellules après 16h de stimulation pour l'analyse de l'expression des gènes dans les cellules CD4⁺ mémoires ou naïves. Au niveau génomique global, les cellules CD4⁺ mémoires et naïves expriment un nombre similaire de gènes au

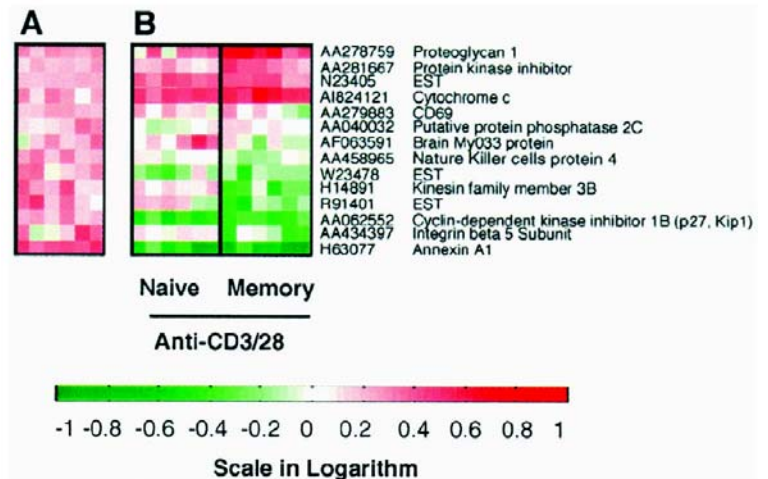
repos (22% et 20%), après stimulation avec l'anti-CD3 seul (28% et 27%) ou après stimulation avec l'anti-CD3 (19% et 20% du nombre total d'ADNc représentés). Il est précisé qu'un gène est jugé s'exprimer lorsque son signal est au moins deux fois supérieur au signal médian pour tous les clones du filtre.

Question 5. *Quelle raison a conduit les auteurs à étudier les cellules après 16h de culture ?*

Dans une première analyse, 14 gènes ont été identifiés comme s'exprimant davantage dans les cellules mémoires qu les cellules naïves comme montré à la **Figure 3A**. Par ailleurs,

Figure 3

- A. Chaque carré représente le ratio des signaux pour les cellules mémoires et les cellules naïves. Les données sont exprimées en échelle logarithmique (-1 correspond à une expression 10 fois moindre ; +1 correspond à une expression 10 fois supérieure). Toutes les valeurs sont supérieures ici à zéro.
- B. Ratio d'expression entre les cellules stimulées avec l'anti-CD3/CD28 pendant 16h par rapport aux cellules au repos pour les cellules CD4⁺ naïves (à gauche) et mémoire (à droite). L'expression est augmentée lors de la stimulation pour quatre 4 gènes (proteoglycan 1, protein kinase inhibitor, cytochrome c, and one EST) et diminuée pour 3 autres (annexin A1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, and one EST).



Question 6. *Commentez ces résultats.*

Au total, 200 gènes ont été identifiés comme s'exprimant différemment dans les cellules CD4⁺ mémoires après stimulation l'anti-CD3/CD28. Les résultats sont montrés sur la **Figure 4** où les gènes ont été groupés en catégories fonctionnelles : régulation transcriptionnelle, récepteurs et signaux de transduction, cytokines et récepteurs, cycle cellulaire, structure et métabolisme, survie cellulaire, inhibiteurs de la prolifération. La **Figure 4A** montre liste les gènes dont l'expression est augmentée ; la **Figure 4B** montre liste les gènes dont l'expression est diminuée. La **Figure 4C** montre la reproductibilité de la mesure en comparant les indices de variation d'expression obtenus dans deux expériences d'hybridation indépendantes. La **Figure 4D** montre la distribution des gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée pour les cellules mémoires et naïves après traitement avec l'anti-CD3 ou l'anti-CD3/CD28.

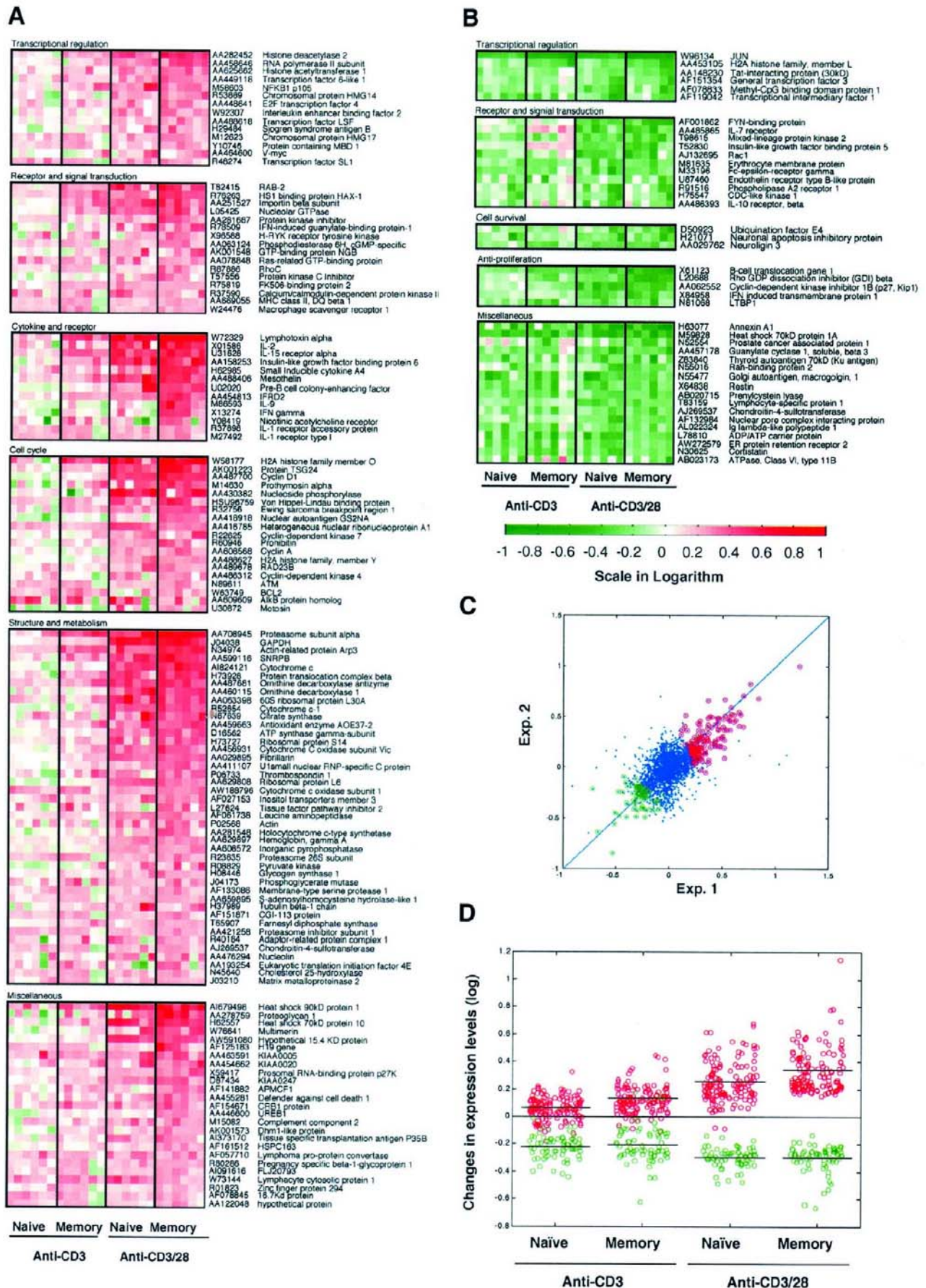
Question 7. *Commenter ces résultats.*

Question 8. *Quelle(s) relation(s) peut-on établir entre les augmentations ou diminutions de l'expression des gènes appartenant aux différentes catégories fonctionnelles représentées et le traitement qu'ont subi les cellules ?*

Question 9. *En quoi le traitement anti-CD3 diffère-t-il du traitement anti-CD3/CD28 ?*

Question 10. *En quoi les cellules mémoires diffèrent-elles des cellules naïves ?*

Figure 4

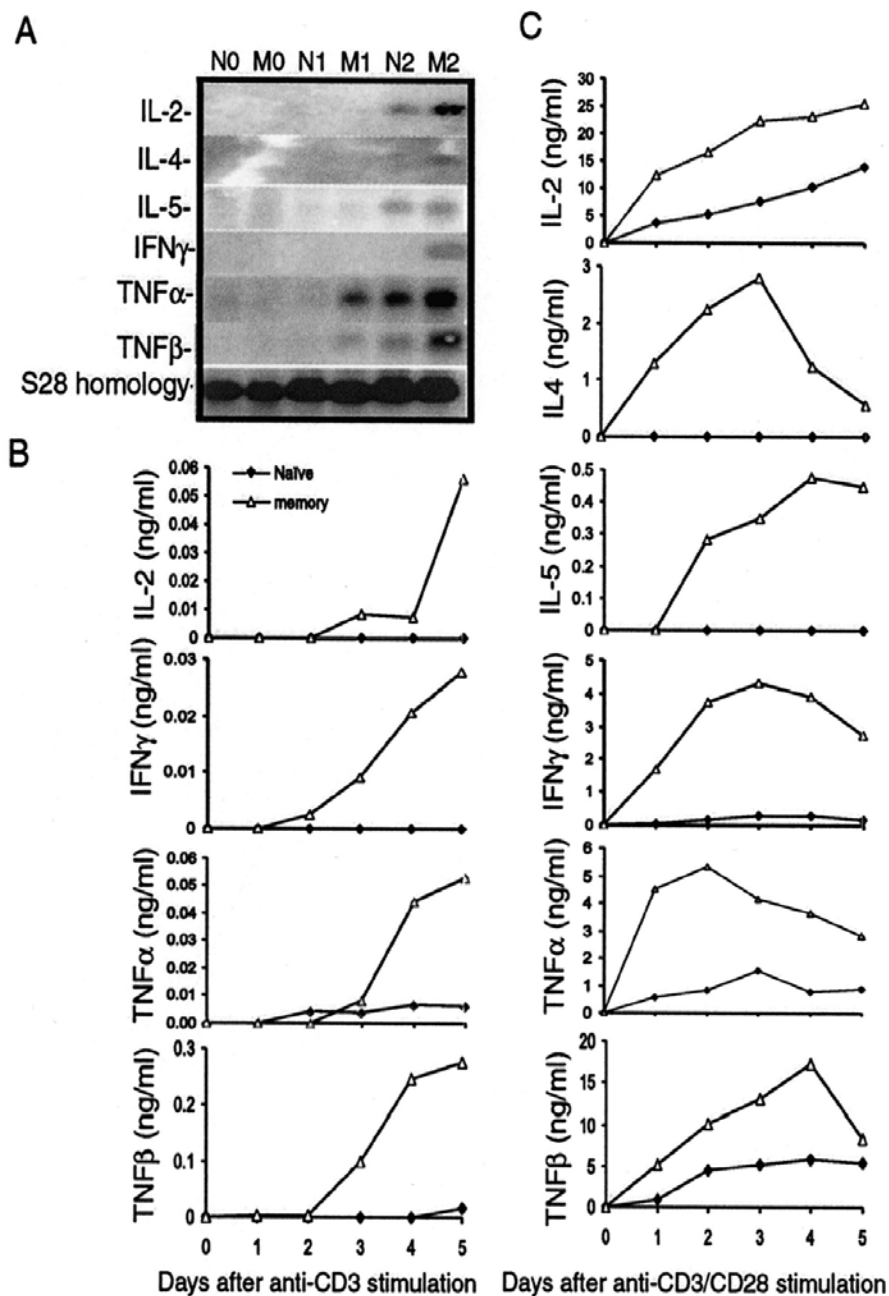


Les auteurs s'intéressent enfin à l'expression des cytokines par les cellules CD4⁺ mémoires et naïves après stimulation par l'anti-CD3 ou l'anti-CD3/CD28. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5**.

Figure 5 : Profils d'expression des cytokines des cellules CD4⁺ mémoires et naïves après stimulation avec l'anti-CD3 ou l'anti-CD3/CD28.

A. Analyse par la technique de Northern de l'expression des gènes de cytokines. L'ARNm a été isolé des cellules au repos CD4⁺ mémoires (M0) ou naïves (N0), ou après stimulation pendant 16h avec l'anti-CD3 (M1 et N1) et l'anti-CD3/CD28 (M2 et N2). L'ADNc « S28 homology » sert de standard. B et C, Cytokine expressions mesurées de cellule supernatants stimulés avec Anti-CD3.

B/C. Mesure par la technique ELISA de l'expression des cytokines dans les surnageants de culture des cellules stimulées avec l'anti-CD3 (B) ou l'anti-CD3/CD28 (C) au cours du temps.



Question 11. Analyser ces résultats.

Question 12. Quelle relation peut-on établir entre ces derniers résultats et les résultats d'analyse génomique globale ?