

Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)

Epreuve d'Immunologie Fondamentale – septembre 2004

Durée de l'épreuve : 3 heures

**Vous devez obligatoirement traiter les exercices I et II sur des copies distinctes
et rendre une copie pour chacun des exercices.**

Barème indicatif :

Exercice I noté sur 10 points

Exercice II noté sur 10 points

Exercice I (noté sur 10 points)

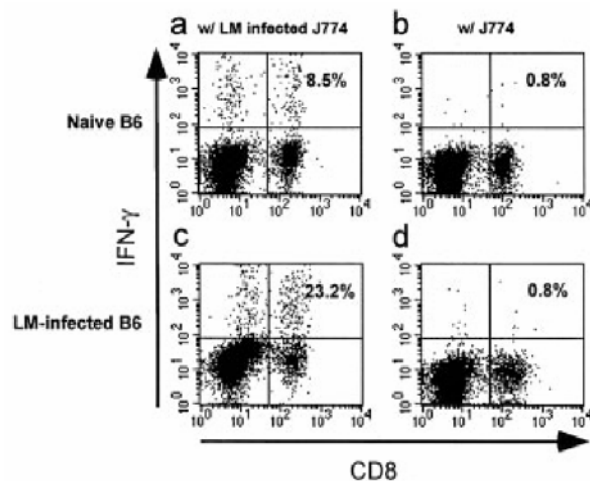
(D'après Berg, R. E. *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2807)

Les auteurs de la présente étude s'intéressent à l'induction de la sécrétion d'IFN γ par les cellules T CD8 $^{+}$ en réponse à l'infection par *Listeria monocytogenes*, une bactérie intracellulaire infectant les macrophages.

Dans une première expérience, par la technique de marquage intracellulaire et analyse en cytométrie de flux, on étudie la production d'IFN γ par des cellules T CD8 $^{+}$ provenant de souris C57BL/6, infectées ou non par *L. monocytogenes*, mises en culture avec des cellules de la lignée de macrophage J774 infectées ou non par *L. monocytogenes* (**Figure 1**).

Figure 1 : Sécrétion d'IFN γ par des cellules T CD8 $^{+}$ naïves ou immunes vis-à-vis de *L. monocytogenes*

Des souris C57BL/6 ont été infectées par *L. monocytogenes*. 5 jours plus tard, la rate de souris infectées (LM-infected B6 ; c & d) et de souris contrôles non infectées (Naive B6 ; a & b) a été prélevée. Les splénocytes ont été mis en culture pendant une nuit en présence de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes* (w/ LM infected J774 ; a & c) ou non infectées (w/ J774 ; b & d). Les cellules ainsi cultivées ont été marquées, en surface par l'anticorps anti-CD8 et dans le cytoplasme par l'anticorps anti-IFN γ et analysées par cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules CD8 $^{+}$ produisant de l'IFN γ est indiqué dans chaque graphe.



Question 1. A l'aide d'un tableau comparatif synthétique, expliquez le principe de la technique de détection de la production d'IFN γ mise en œuvre pour obtenir les résultats présentés à la Figure 1 ainsi qu'une autre technique de détection de la production d'IFN γ , en précisant les avantages ou inconvénients relatifs de ces techniques.

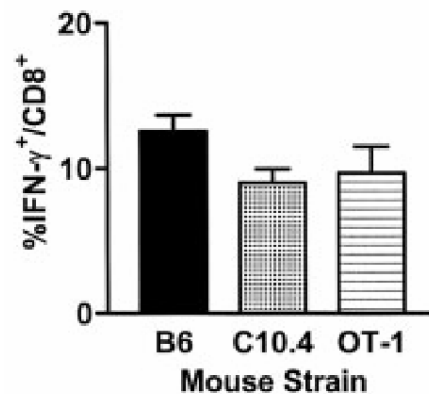
Question 2. Analyser les résultats présentés à la Figure 1. (5 lignes maximum)

Dans une deuxième expérience, on étudie la production d'IFN γ par les cellules T CD8 $^{+}$ de différentes lignées de souris : C57BL/6, C10.4, une lignée transgénique pour un TCR spécifique d'un peptide f-MIVTLF présenté par la molécule de CMH de classe I non classique M3, et OT-1, une lignée transgénique pour un TCR spécifique du peptide SIINFEKL présenté par K b . Les résultats sont présentés à la **Figure 2**.

Figure 2 : Sécrétion d'IFN γ par les cellules T CD8 $^{+}$ de différentes lignées de souris

Les splénocytes de souris C57BL/6, C10.4 et OT-1 ont été mis en culture pendant une nuit en présence de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes*. Les cellules ainsi cultivées ont été marquées, en surface par l'anticorps anti-CD8 et dans le cytoplasme par l'anticorps anti-IFN γ puis analysées par cytométrie de flux. Les résultats présentés indiquent le pourcentage de cellules T CD8 $^{+}$ produisant de l'IFN γ .

N.B. : on précise que moins de 1% des cellules T CD8 $^{+}$ produisent de l'IFN γ après culture avec des cellules J774 non infectées.



Question 3. Analysez ces résultats. (5 lignes maximum)

Question 4. Quelle information ces deux expériences donnent-elles quant à la nature du signal conduisant à la production d'IFN γ par les cellules CD8 $^{+}$? (5 lignes maximum)

Dans la troisième expérience, les auteurs cherchent à caractériser les facteurs responsables de la production d'IFN γ par les cellules CD8 $^{+}$. Les résultats sont présentés à la **Figure 3**.

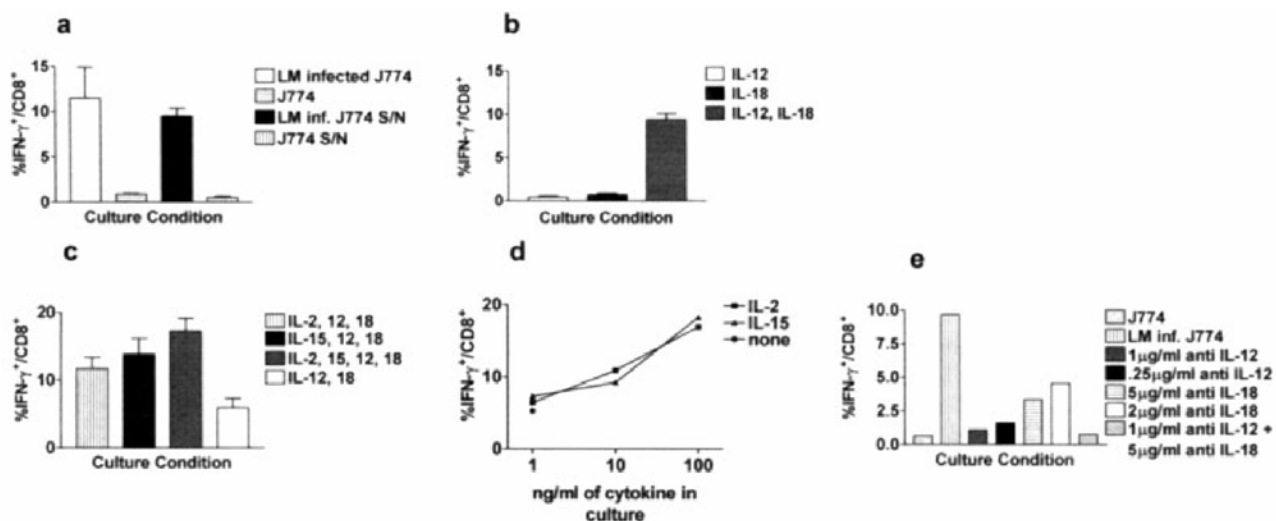


Figure 3 : Rôle des cytokines dans la production d'IFN γ par les cellules T CD8 $^{+}$

- Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes* (LM infected J774) ou non (J774), ou en présence de surnageant de culture de cellules J774 infectées par (LM inf. J774 S/N) ou non (J774 S/N).
- Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de 5 ng/ml d'IL-12, de 10 ng/ml d'IL-18, ou d'une combinaison de ces deux cytokines, chaque fois en présence d'IL-2.
- Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence des différentes combinaisons de cytokines suivantes : 100 ng/ml d'IL-2, 100 ng/ml d'IL-15, 5 ng/ml d'IL-12, et/ou 10 ng/ml d'IL-18.
- Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de 5 ng/ml d'IL-12 et 10 ng/ml d'IL-18, et de concentrations croissantes d'IL-2 ou d'IL-15.
- Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de cellules J774 non infectées (J774), de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes* (LM inf. J774), en présence ou non de combinaisons d'anticorps bloquants anti-IL-12 et/ou anti-IL-18 comme indiqué.

Les graphes a-e indiquent, pour chacune des conditions expérimentales décrites, le pourcentage de cellules T CD8 $^{+}$ produisant de l'IFN γ .

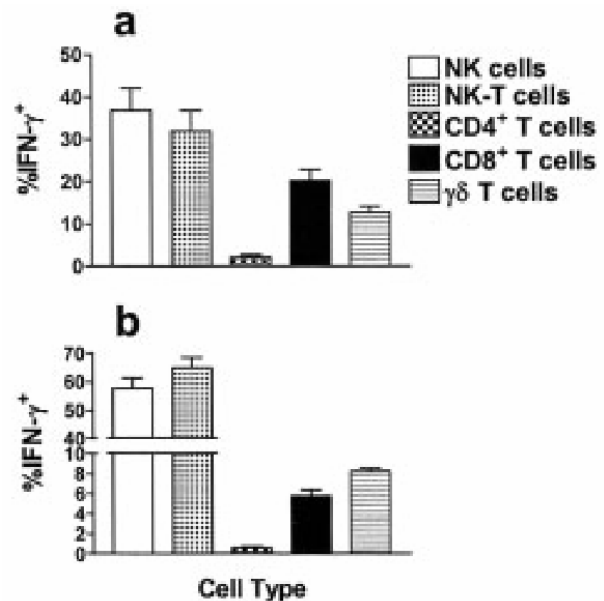
Question 5. Analysez soigneusement chacun des graphes présentés à la Figure 3. (15 lignes maximum)

Question 6. Comment pouvez-vous préciser l'interprétation faite à la Question 3 ? (5 lignes maximum)

Dans l'expérience suivante, on cherche à comparer la production d'IFN γ par différentes populations de cellules de la rate soit *in vitro* en présence d'une combinaison de cytokines, soit *ex vivo* chez des souris infectées par *L. monocytogenes*. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.

Figure 4 : Capacité de production d'IFN γ de différentes populations de la rate

- (a) Des splénocytes de C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de 10 ng/ml d'IL-2, 5 ng/ml d'IL-12 et 10 ng/ml d'IL-18. Le pourcentage de cellules produisant de l'IFN γ a été mesuré par cytométrie de flux pour différentes populations de cellules : lymphocytes NK (NK cells), NK T (NK-T cells), CD4 $^{+}$ (CD4 $^{+}$ T cells), CD8 $^{+}$ (CD8 $^{+}$ T cells) et $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ T cells). Des résultats similaires ont été obtenus en remplaçant la combinaison de cytokines par des cellules J774 infectées par *L. monocytogenes*.
- (b) Des souris C57BL/6 ont été infectées par *L. monocytogenes*. 16 heures après l'infection, les splénocytes ont été isolés et cultivés pendant 3 heures en présence de brefeldin A, une drogue qui bloque le transport des protéines, avant le marquage intracellulaire anti-IFN γ . Les résultats indiquent le pourcentage de cellules produisant de l'IFN γ dans différentes populations.



Question 7. Analysez les résultats présentés à la Figure 4. (5 lignes maximum)

Question 8. En estimant qu'une rate compte 100 millions de lymphocytes dont environ 3% sont des cellules NK et 15% sont des cellules T CD8 $^{+}$, calculez les valeurs suivantes :

- proportion de cellules CD8 $^{+}$ produisant de l'IFN γ parmi les lymphocytes
- proportion de cellules NK produisant de l'IFN γ parmi les lymphocytes
- nombre de cellules CD8 $^{+}$ produisant de l'IFN γ par rate
- nombre de cellules NK produisant de l'IFN γ par rate

Question 9. Qu'apportent ces nouvelles observations ? (5 lignes maximum)

Exercice II (noté sur 10 points)

(D'après Tyznik, A. J. *et al.* (2004) *J. Exp. Med.* 199:559)

De nombreuses équipes utilisent des lignées de souris déficientes en molécules de classe II du CMH ou en molécules CD4 comme modèles pour étudier la contribution de la réponse T auxiliaire à la réponse cytotoxique CD8 face à différentes épreuves antigéniques. Dans les expériences ci-dessous, les auteurs, s'intéressant au rôle des lymphocytes T CD4 dans l'établissement d'une réponse immunitaire protectrice contre la bactérie intracellulaire *L. monocytogenes*, font une observation originale chez des souris CD4^{-/-}.

Des souris de type sauvage (Wild-type) ou déficientes en molécules CD4 (CD4^{-/-}) sont infectées avec la bactérie *L. monocytogenes* recombinante, rLmOva, qui exprime le peptide Ova₂₅₇₋₂₆₄ présenté par la molécule H-2 K^b, ainsi que le peptide endogène LLO₁₉₀₋₂₀₁ présenté par la molécule H-2 I-A^b. Après infection, la réponse des splénocytes des souris est étudiée parmi les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ en réponse aux peptides LLO₁₉₀₋₂₀₁ et Ova₂₅₇₋₂₆₄. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5**.

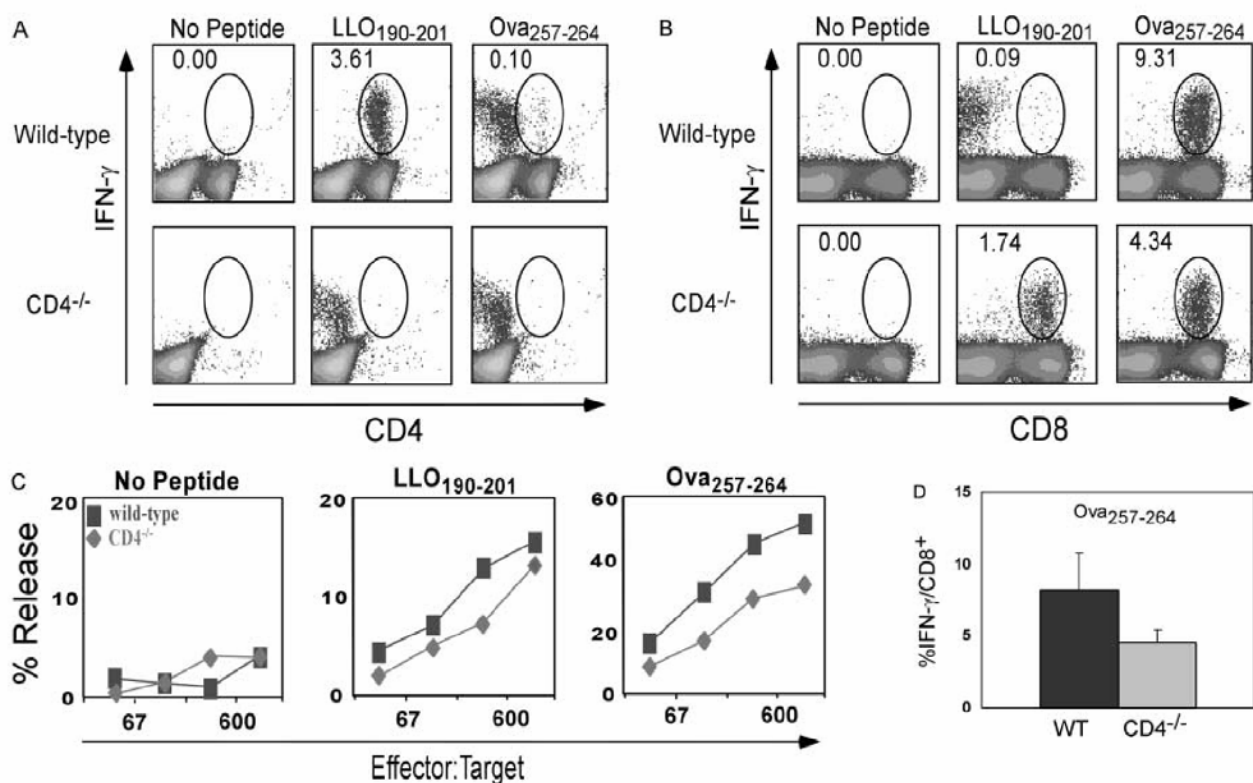


Figure 5 : Réponse primaire de souris de type sauvage et de souris CD4^{-/-} à des épitopes restreints par les molécules de CMH de classes I et II après infection par rLmOva

7 jours après infection, les splénocytes de souris de type sauvage (Wild-type) et CD4^{-/-} ont été stimulés *in vitro* avec les peptides LLO₁₉₀₋₂₀₁, Ova₂₅₇₋₂₆₄, ou pas de peptide (No peptide), puis analysés pour l'expression d'IFN γ intracellulaire par les cellules T CD4⁺ (A) ou CD8⁺ (B). Les nombres indiquent le pourcentage de cellules produisant de l'IFN γ parmi les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺. (C) Lyse spécifique (% Release) de cellules cibles LB27.4 marquées par le ⁵¹Cr et chargées avec les peptides LLO₁₉₀₋₂₀₁, Ova₂₅₇₋₂₆₄, ou sans peptide, par les cellules de rate de souris de type sauvage (■) ou CD4^{-/-} (◆). (D) Pourcentage des cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN γ en réponse au peptide Ova₂₅₇₋₂₆₄ chez des souris de type sauvage ou CD4^{-/-}.

Dans une deuxième expérience, les auteurs étudient, après infection par le virus LCMV, la réponse de souris de type sauvage ou CD4^{-/-} aux peptides de la glycoprotéine de LCMV GP₆₁₋₈₀, restreint par I-A^b, et GP₃₃₋₄₁, restreint par D^b. Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

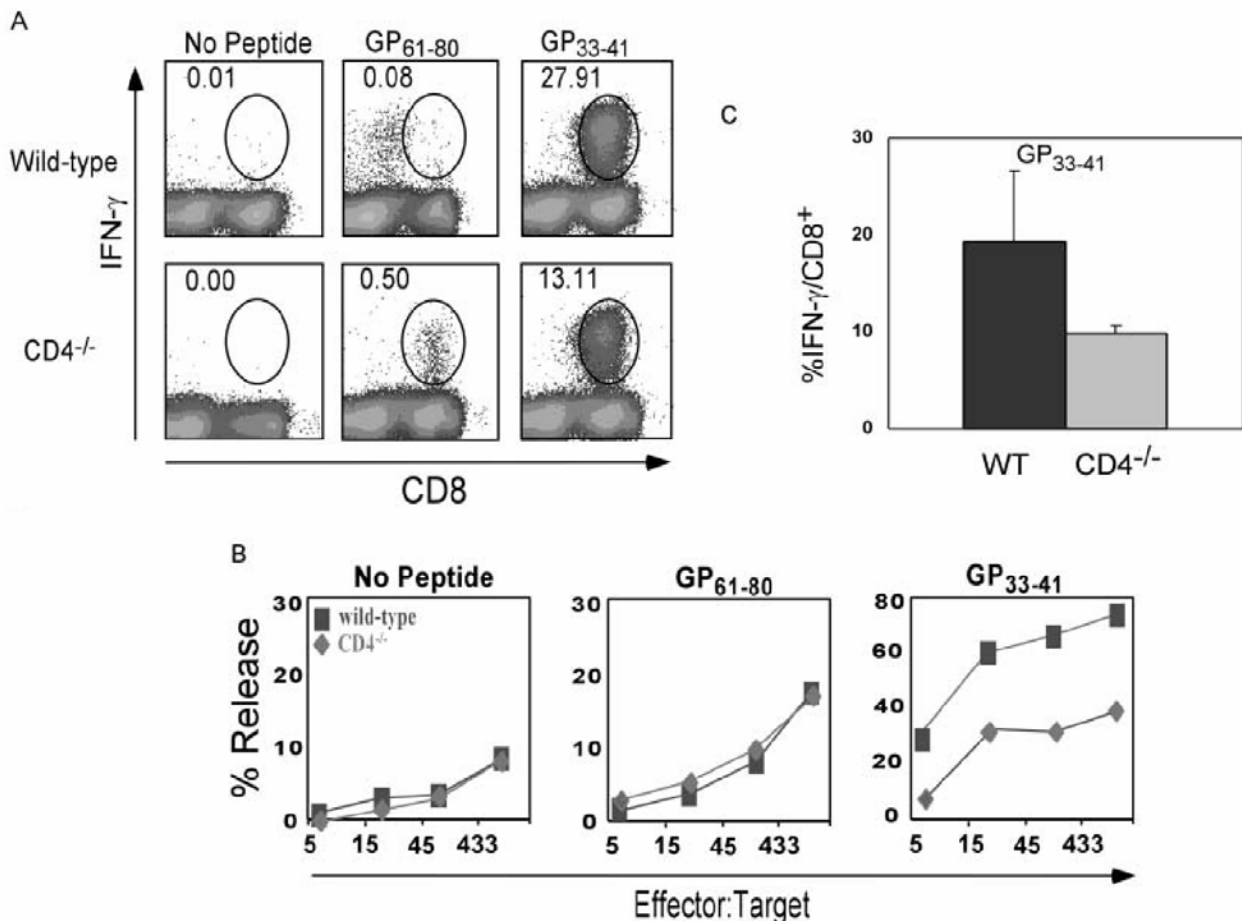


Figure 6 : Réponse primaire de souris de type sauvage et de souris CD4^{-/-} à des épitopes restreints par les molécules de CMH de classes I et II après infection par le LCMV

La réponse des cellules T CD8⁺ de souris de type sauvage (Wild-type) ou CD4^{-/-} a été étudiée 8 jours après infection par le LCMV. (A) Analyse, par marquage intracellulaire, de la production d'IFN γ par les cellules T CD8⁺ après restimulation *in vitro* en présence des peptides GP₆₁₋₈₀, GP₃₃₋₄₁, ou sans peptide (No peptide). (B) Lyse spécifique (% Release) de cellules cibles LB27.4 marquées par le ⁵¹Cr et chargées avec les peptides GP₆₁₋₈₀, GP₃₃₋₄₁, ou sans peptide, par les cellules de rate de souris de type sauvage (■) ou CD4^{-/-} (♦). (C) Pourcentage des cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN γ en réponse au peptide GP₃₃₋₄₁ chez des souris de type sauvage ou CD4^{-/-}.

Question 10. A l'aide d'un schéma synthétique, rappelez les grandes lignes du développement lymphocytaire T, en particulier l'importance des molécules de CMH de classes I et II pour la différenciation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺.

Question 11. Analyser soigneusement les résultats présentés sur les Figure 5 et Figure 6. (15 lignes maximum)

Question 12. En quoi ces résultats sont-ils en contradiction avec votre réponse donnée à la Question 10. (5 lignes maximum)

Afin de préciser le mode de présentation du peptide LLO₁₉₀₋₂₀₁ aux cellules T CD8⁺, les auteurs étudient la production d'IFN γ par ces cellules, après stimulation par des cellules n'exprimant que des molécules du CMH de classe I ou II. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

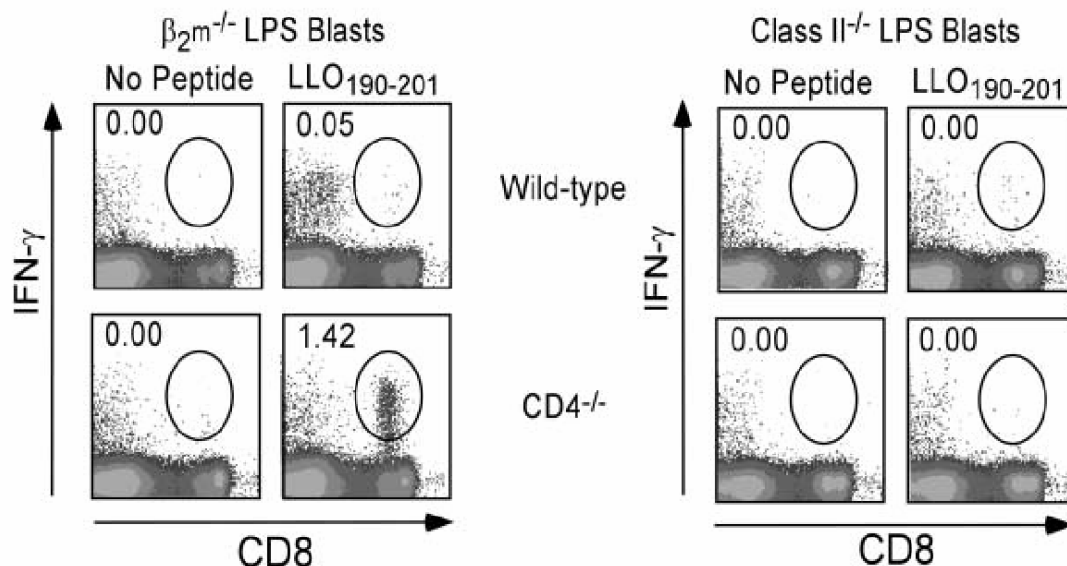


Figure 7 : Réponse des cellules T CD8⁺ au peptide LLO₁₉₀₋₂₀₁ chez les souris de type sauvage ou CD4^{-/-}

7 jours après l'infection par rLmOva, les splénocytes des souris de type sauvage (Wild-type) ou CD4^{-/-} ont été restimulés par des cellules présentatrices déficientes en β_2m ($\beta_2m^{-/-}$ LPS Blasts) ou en molécules du CMH de classe II (Class II^{-/-} LPS Blasts), activées par le LPS et chargées avec le peptide LLO₁₉₀₋₂₀₁. Un marquage intracellulaire anti-IFN γ a été effectué pour déterminer le pourcentage de cellules spécifiques du peptide LLO₁₉₀₋₂₀₁ parmi les cellules T CD8⁺.

Question 13. Analyser les résultats présentés sur la Figure 7. (5 lignes maximum)

Question 14. Ces résultats expliquent-ils la contradiction, relevée à la Question 12, relativement à la différenciation des cellules T chez les souris CD4^{-/-} par rapport à la situation décrite chez les souris de type sauvage ? (8 lignes maximum)