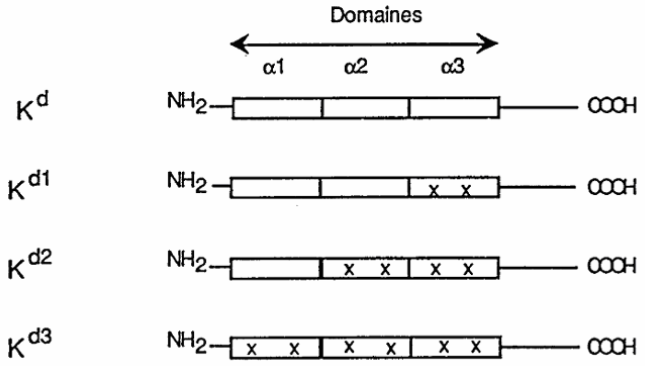
Présentation antigénique; CPA/CMH

I.

Une série de transfections est réalisée à l'aide de différentes constructions dérivées du gène K^d de classe I dans des fibroblastes ($H2^k$). La **Figure 1** présente les différentes molécules pouvant être exprimées.

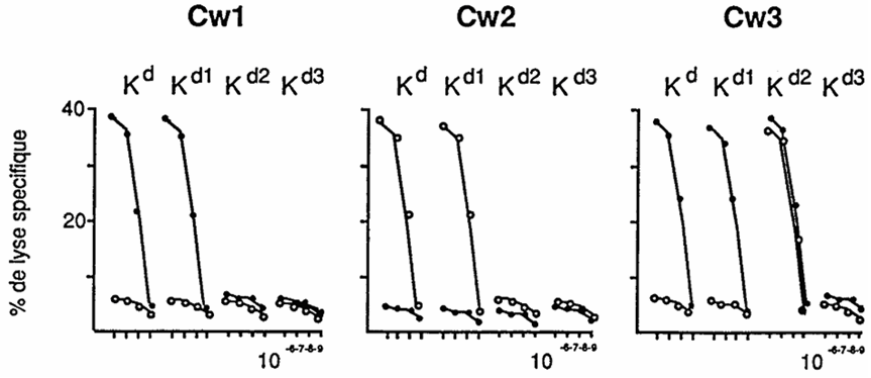
Figure 1



x = substitution en acide aminé

On se propose d'analyser la capacité de trois clones cytotoxiques (Cw1, Cw2, Cw3) à reconnaître les peptides A ou B présentés par les cellules transfectées. Ces deux peptides ne diffèrent que par un seul acide aminé. $2x10^3$ cellules cibles marquées au ^{51}Cr sont incubées avec différentes concentrations de peptide puis $2x10^4$ cellules effectrices sont ajoutées. Après 6 heures d'incubation, les cellules sont centrifugées et la radioactivité contenue dans le surnageant est déterminée. La **Figure 2** montre le pourcentage de lyse spécifique en fonction de la concentration de peptide utilisée :

Figure 2



Concentration des peptides A (●) ou B (○) [log M]

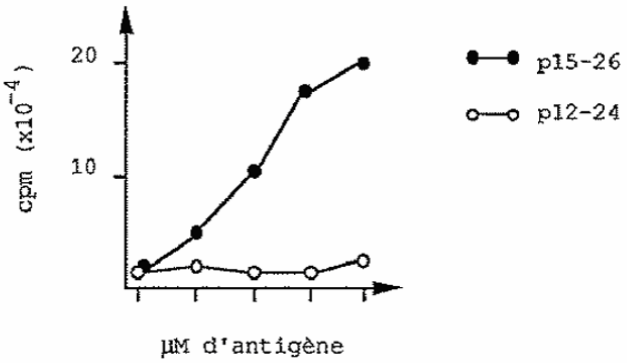
Question 1. Quelle est la spécificité de chaque clone ? Peut-on déterminer la zone d'interaction de l'antigène de classe I avec le peptide ? Expliquer comment la spécificité de reconnaissance du clone Cw3 est modifiée quand la molécule transfectée est K^{d2} ?

Question 2. Si l'on transfecte le gène codant pour la molécule K^d dans des cellules de fibroblastes H-2^- (c'est-à-dire n'exprimant pas de molécule du CMH) aucune cytotoxicité n'est décelable. Pourquoi ?

II.

Un clone "auxiliaire" de lymphocyte T (7B7), issu d'une souris BALB/c (H-2^d), est obtenu contre le répresseur du bactériophage lambda. L'activation de ce clone est étudiée à l'aide de peptides dérivés du répresseur dans le test suivant : $5x10^4$ cellules 7B7 sont mélangées à $5x10^4$ cellules présentatrices d'antigènes en présence de différentes concentrations de peptide. Après 24h d'incubation, 50 µl de surnageant sont ajoutés à 10^4 cellules d'un clone T cytotoxique dépendant de l'IL2. L'incorporation de thymidine tritiée est ensuite déterminée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3**.

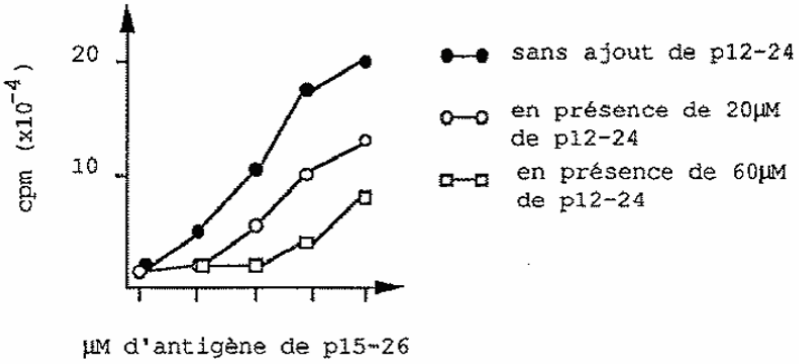
Figure 3



D'autre part, l'activation observée avec le peptide p15-26 est inhibée par un anticorps spécifique de I-A^d mais pas par un anticorps spécifique de I-E^d.

Dans une autre expérience, l'activation par le peptide p15-26 est effectuée en présence du peptide p12-24. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**.

Figure 4



Question 1. Interpréter ces résultats en précisant comment le peptide p12-24 peut inhiber l'activation du clone 7B7 ?

La capacité inhibitrice du peptide p12-24 est testée dans différents systèmes antigéniques de façon analogue à celle décrite ci-dessus. La compilation des résultats est présentée dans le **Tableau 1**. La fixation directe du peptide p12-24 sur les molécules de classe II est déterminée par dialyse à l'équilibre comme présentée sur le **Tableau 2**.

Question 2. Analyser l'ensemble de ces résultats

Tableau 1

Antigène reconnu par le clone T	Elément de restriction	Pouvoir inhibiteur du peptide p12-24
Ovalbumine	$I\text{-}A^{d}$	+
Myoglobine	$I\text{-}E^{d}$	+++
Lysozyme	$I\text{-}A^{k}$	-
Cytochrome c	$I\text{-}E^{k}$	+

Tableau 2

Antigène de classe II	Fixation du peptide
$I\text{-}A^{d}$	+
$I\text{-}E^{d}$	+++
$I\text{-}A^{k}$	-
$I\text{-}E^{k}$	+

III.

A partir d'une souris F1 ($H\text{-}2^{d/k}$) infectée par le virus de l'influenza, divers clones T cytotoxiques, capables de lyser des cellules spléniques $H\text{-}2^{d/k}$ en présence de l'hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza, sont obtenus. La spécificité de ces clones est analysée par des expériences de cytotoxicité à l'aide de deux peptides dérivés de l'hémagglutinine (HA252-271 et HA240-259) en présence ou non d'anticorps anti-K^{k} ou anti-$I\text{-}A^{d}$. Les cellules spléniques $H\text{-}2^{d/k}$ marquées au ^{51}Cr en présence de concentrations variables de peptides sont mélangées aux différents clones T. Après 4 heures d'incubation à 37°C, le pourcentage de lyse spécifique est calculé. Les clones T peuvent être répartis en trois groupes (K, U et G) en fonction de leur spécificité comme illustré dans la **Figure 5**.

Question 1. Sachant que les clones K1 à K4 sont $CD8^{+}$ et les clones U4, U5 et G1 sont $CD4^{+}$, commenter les résultats présentés en précisant les éléments de restriction des clones T.

Afin d'analyser la capacité de présentation du peptide HA252-271 par les molécules du CMH, la lignée LK35.1 ($I\text{-}A^{d+}$ et K^{k+}) subit certains traitements exposés dans la légende du tableau suivant. Après traitement, les cellules LK35.1 sont utilisées comme cellules cible vis-à-vis des différents clones T dans des expériences de cytotoxicité similaires à celles décrites dans la **Figure 5** ; les résultats sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

Question 2. Interpréter les résultats du tableau. Proposer un schéma de présentation du peptide HA252-271 dérivé de l'hémagglutinine par la cellule LK35.1.

Figure 5

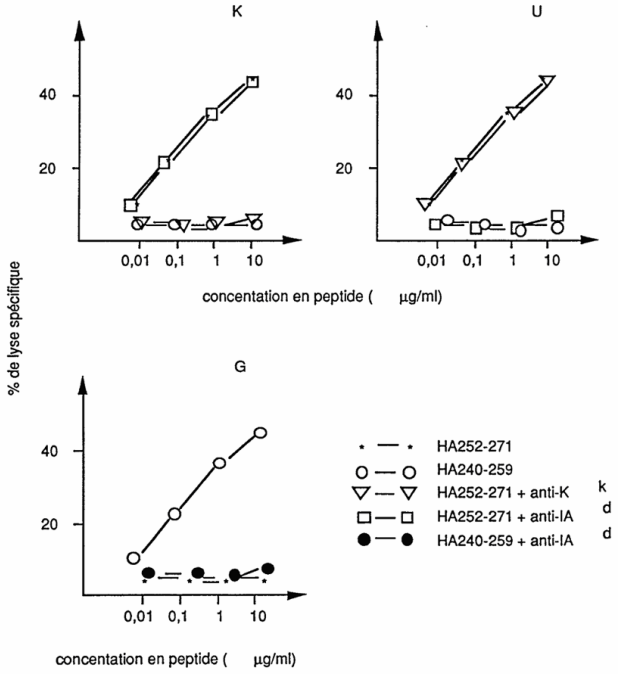


Tableau: % de lyse spécifique

	Cellules cibles						
Cellules effectrices	non-infectées a)	HA252-271 b)	Virus c)	Virus inactivés d)	vecteur SC11 e)	vecteur HA-SC11 f)	vecteur HA252-271 -SC11 g)
K1	0	71	67	3	1	45	48
K2	4	68	63	5	3	34	41
K3	0	66	64	1	1	41	49
K4	0	68	71	1	1	41	50
U4	7	66	71	59	6	12	3
U5	9	49	60	46	5	4	2
G1	3	5	78	66	1	11	1

a) LK35.1 est seulement marquée au ^{51}Cr.
b) LK35.1 est mise en présence du peptide HA252-271.
c) LK35.1 est infectée par le virus de l'influenza
d) LK35.1 est mise en présence du virus inactivé.
e) LK35.1 est transfectée avec le vecteur d'expression SC11
f) LK35.1 est transfectée avec le vecteur d'expression SC11 contenant le gène qui code pour l'hémagglutinine.
g) LK35.1 est transfectée avec le vecteur d'expression SC11 contenant l'oligonucléotide qui code pour le peptide HA252-271

IV.

Une lignée de souris mutantes est obtenue à partir de souris de la lignée consanguine B10.BR (H-2^k). L'impact de cette mutation sur le système immunitaire est recherché.

Les souris B10.BR et mutantes sont immunisées contre l'ovalbumine (OVA). La production d'anticorps contre l'antigène est recherchée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

	Souris B10.BR	Souris mutante
Anticorps anti-OVA	++++	+

Question 1. Commenter.

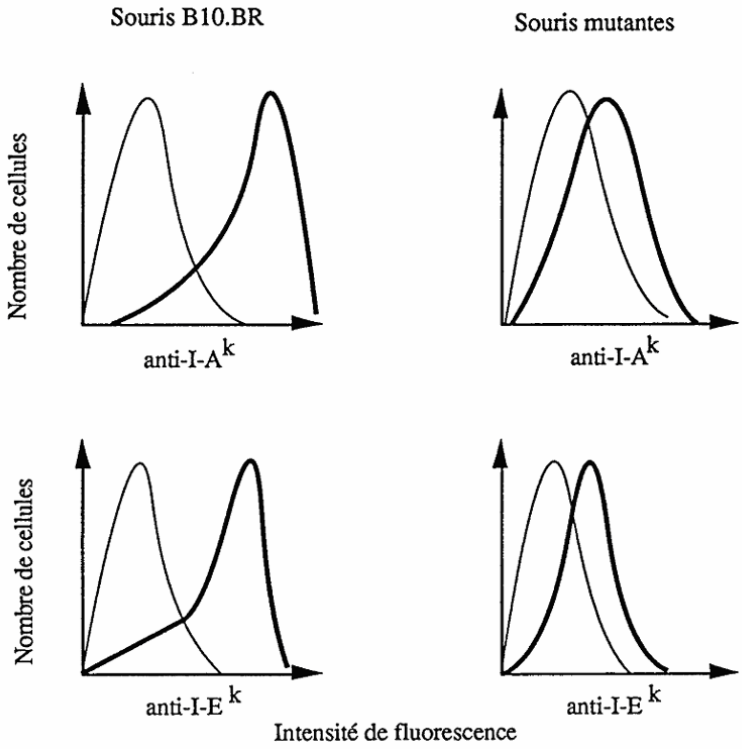
Les cellules spléniques sont isolées à partir des deux types de souris. Grâce à un trieur de cellules, les cellules marquées avec un anticorps anti-IgM fluorescent sont séparées et utilisées dans les trois expériences décrites ci-dessous.

Expérience n°1 : Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps monoclonaux anti-I-A^k ou anti-I-E^k couplés à un fluorochrome et analysées par cytofluorométrie.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

Figure 6 : Fluorescence des cellules spléniques IgM$^+$.

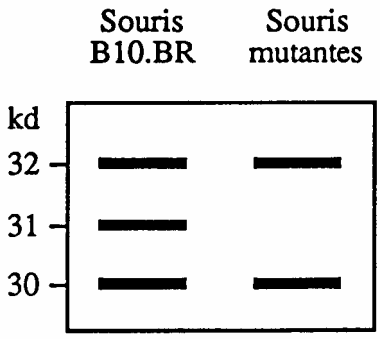
Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'autofluorescence des cellules.



Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine ^{35}S puis lysées. Le lysat est incubé en présence de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé. Les produits immunoprécipités sont ensuite chauffés à 95°C puis déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Après migration électrophorétique, le gel est séché et autoradiographié. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

Figure 7 :

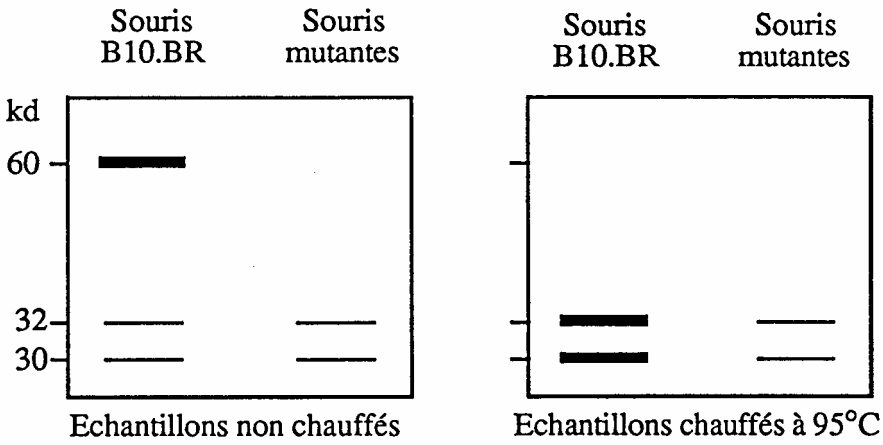
Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.



Expérience n°3 : Les cellules sont marquées à leur surface à l'aide de l'iode 125 puis lysées. La même expérience d'immunoprécipitation que ci-dessus est réalisée. Cependant, les échantillons immunoprécipités sont ou non chauffés à 95°C avant d'être déposés sur le gel. Les résultats sont présentés sur la **Figure 8**.

Figure 8 :

Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

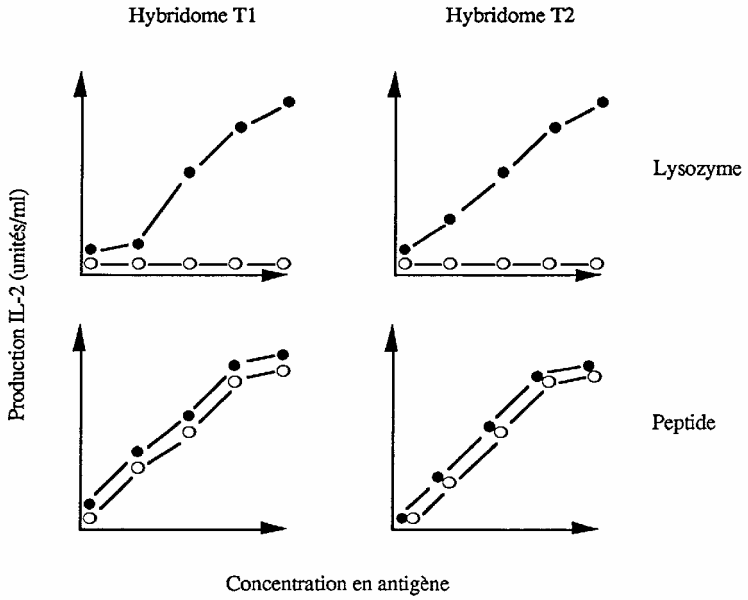


Question 2. Interpréter ces expériences en indiquant notamment pourquoi les cellules IgM^+ ont été sélectionnées.

Deux hybridomes T (T1 et T2) obtenus contre le lysozyme de poulet sont testés pour leur capacité à produire de l'interleukine 2 (IL-2) en réponse à l'antigène. Celui-ci est présenté par des cellules spléniques provenant des deux types de souris. Les hybridomes T1 et T2 reconnaissent respectivement les peptides L46-61 et L112-129 présentés dans un contexte I-A^k. Les résultats sont résumés sur la **Figure 9**.

Figure 9 :

IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).



Question 3. Décrire succinctement un test permettant de mesurer la production d'IL-2.

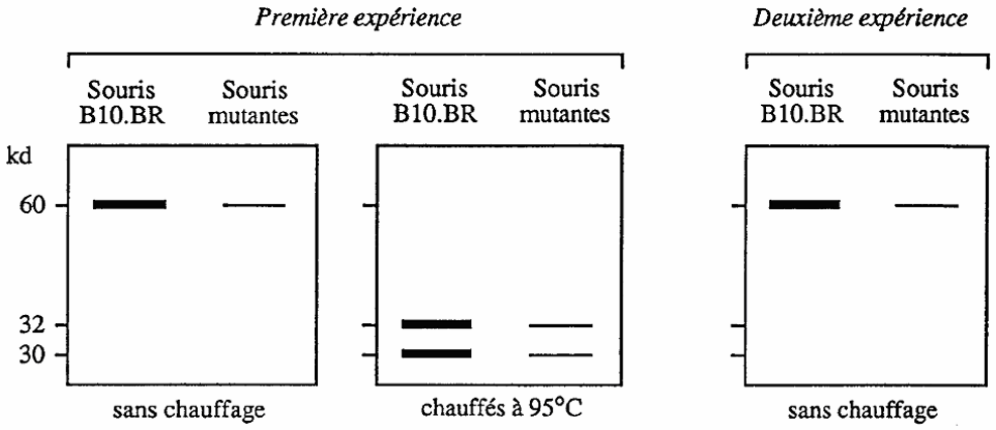
Afin de mieux comprendre l'observation ci-dessus, les expériences suivantes sont réalisées (**Figure 10**) :

- Dans une première expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont marquées à leur surface à l'iode 125 et lysées. Avant immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé, les lysats sont incubés en présence du peptide L46-61. Les échantillons sont ensuite chauffés ou non comme précédemment et déposés sur gel de polyacrylamide.
- Dans la seconde expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont incubées en présence du peptide L46-61 marqué à l'iode 125 puis lysées. Une immunoprécipitation à l'aide

de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k est effectuée. L'échantillon immunoprécipité est déposé sur le gel de polyacrylamide sans chauffage.

Figure 10 :

Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A^k.



Question 4. Interpréter ces résultats en les corrélant avec ceux des expériences précédentes.

Question 5. Proposer un schéma simple rendant compte du défaut de présentation de l'antigène par les cellules de la souris mutante.

V.

(Exercice II, Examen d'Immunologie Fondamentale - juin 2002. D'après MacDonald, A. S. *et al.* (2002) *J. Immunol*., 168:537 ; Dabbagh, K. *et al.* (2002) *J. Immunol*. 168:4524)

Les cellules dendritiques sont indispensables pour initier la réponse immunitaire adaptative en raison de leur grande capacité à phagocyter et dégrader les antigènes, et à présenter les peptides antigéniques sur des molécules de classe I ou II du CMH aux lymphocytes T naïfs.

Question 1. Pourquoi les cellules dendritiques sont-elles très efficaces pour activer des lymphocytes T naïfs ?

Les cellules dendritiques peuvent orienter la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs ou mémoires de type Th1 ou Th2. Dans une première série d'expériences, les auteurs ont différencié des cellules dendritiques à partir de cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou déficientes en CD40 (CD40-/-). Ces cellules dendritiques ont été soit non stimulées (DC) soit stimulées *in vitro*, pendant 18h avec des antigènes solubles d'œufs du parasite *Schistosoma mansoni* (SEA) ou avec la bactérie *Propionibacterium acnes* (PA) avant d'être caractérisées phénotypiquement (**Figure 11**).

*Question 2. A quoi correspondent les 2 populations cellulaires retrouvées dans la **Figure 11A**, en absence de stimulation ?*

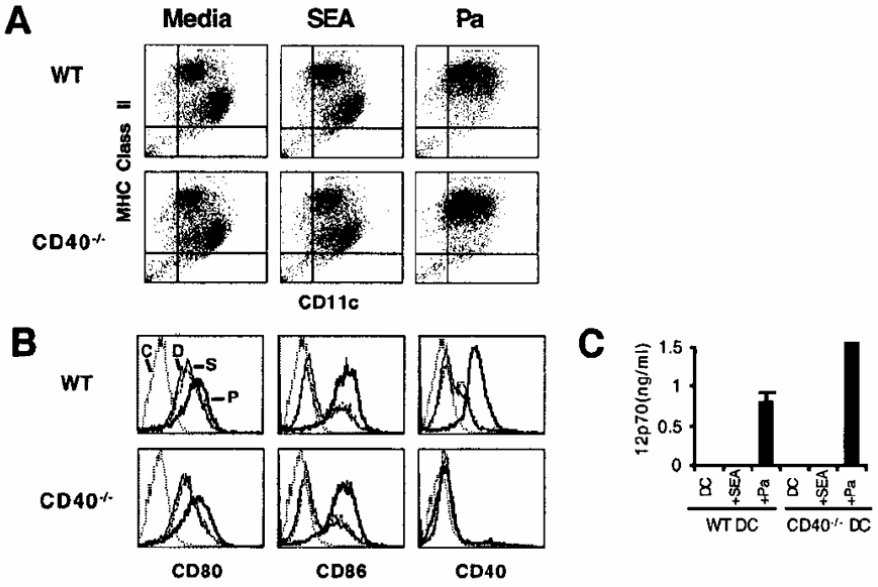
Question 3. Que pouvez-vous conclure de ces résultats ?

Figure 11 :

A : Expression du CMH de classe II et de CD11c à la surface des cellules

B : Expression de CD80, CD86 et CD40
La courbe C correspond au contrôle isotypique, la courbe D aux cellules dendritiques non stimulées, et les courbes S et P aux cellules stimulées par SEA ou PA respectivement.

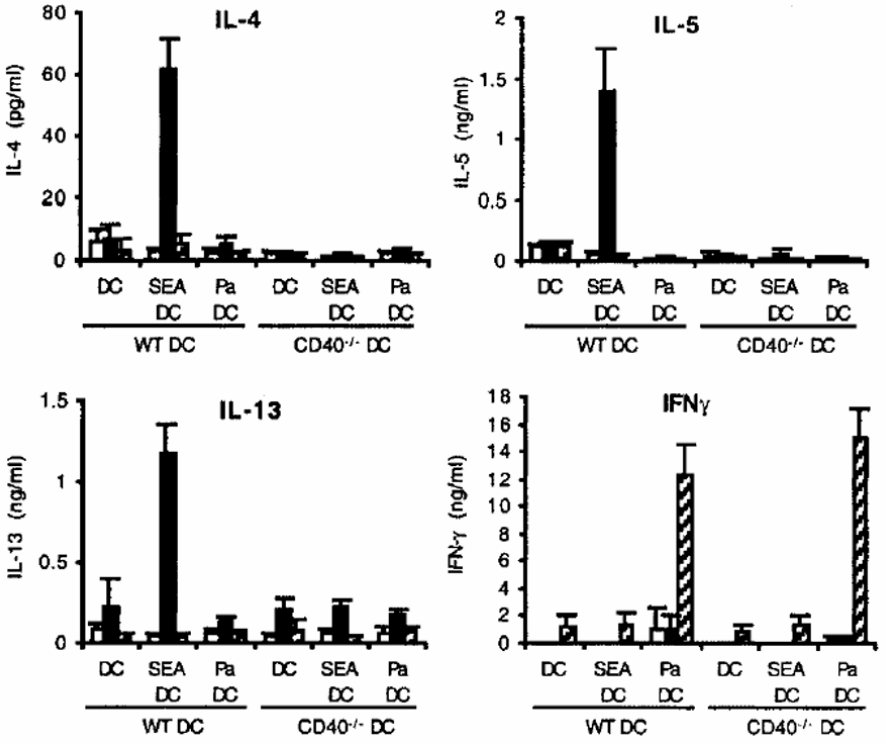
C : Production d'IL-12 mesurée par ELISA



Les auteurs ont ensuite différencié *in vitro* des cellules dendritiques à partir de cellules de moelle osseuse des souris WT ou CD40-/- ayant reçu des injections de SEA ou de PA. Ces cellules dendritiques ont été injectées par voie intra-péritonéale à des souris de type sauvage. Après 7 jours, les lymphocytes de ces souris ont été mis en culture, pendant 3 jours, en absence (☐), ou en présence de SEA (■) ou PA (▨). Les productions de cytokines ont été mesurées dans les surnageants de culture, par un test ELISA (**Figure 12**).

Figure 12 :

Pour chaque série sont figurées les concentrations d'interleukines produites en absence (☐), ou en présence de SEA (■) ou PA (▨).



Question 4. Quel est le rôle respectif des différents pathogènes dans l'induction des réponses T auxiliaires chez les souris WT? Quel est le rôle de CD40 ? Quelles hypothèses permettent d'expliquer les résultats ?

Dans une deuxième série d'expériences, les auteurs ont immunisé par voie intrapéritonéale aux jours 1 et 14, des souris WT ou déficientes en TLR4 (« *Toll-like receptor 4* ») (TLR4-Def) avec de

l'ovalbumine (OVA) en présence d'adjuvant. Comme expérience contrôle (Control), l'adjuvant seul a été injecté. On précise que la préparation d'adjuvant est dépourvue de LPS.

Les souris ont été ensuite re-stimulées par 3 administrations intra-nasales d'OVA, et les fluides broncho-alvéolaires (BAL), le plasma et les ganglions drainant les poumons ont été collectés. Différents tests ont été effectués sur ces prélèvements (**Figure 13**).

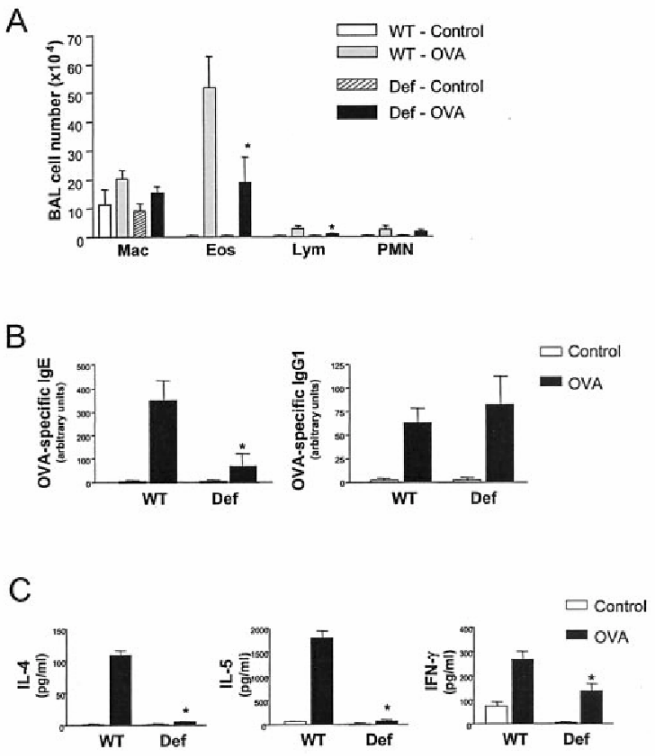
Figure 13 :

A. Nombre total de phagocytes (Mac), d'éosinophiles (Eos), de lymphocytes (Lym) et de polynucléaires (PMN) dans le BAL des souris WT et TLR4-Def.

B. Taux plasmatiques d'IgE et d'IgG1 anti-OVA

C. Productions d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN-γ par les cellules des ganglions

N. B. : Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives entre les souris WT et Def, pour un même paramètre.



Question 5. Analysez soigneusement ces résultats et émettez une ou plusieurs hypothèses quant au rôle de TLR4.

Question 6. A quoi peut-on attribuer le défaut de production d'IgE chez les souris TLR4-Def immunisées avec OVA ?

L'expérience suivante a consisté à étudier *in vitro* la capacité des cellules dendritiques des souris WT ou TLR4-Def stimulées avec la protéine cytochrome C de pigeon (PCC) à activer des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs. Des cellules T $CD4^+$ exprimant un TCR-αβ transgénique spécifique d'un complexe CMH-peptide PCC ont été incubées pendant 10 jours en présence de cellules dendritiques de souris WT ou TLR4-Def préalablement stimulées avec PCC.

Les lymphocytes T ont ensuite été re-stimulés avec la protéine PCC (PCC) ou non (No antigen) en présence de splénocytes irradiés de souris WT de même haplotype, pendant 48h. La prolifération et la production des cytokines IL-4, IL-5 et IFN-γ des lymphocytes ont été mesurées (**Figure 14**).

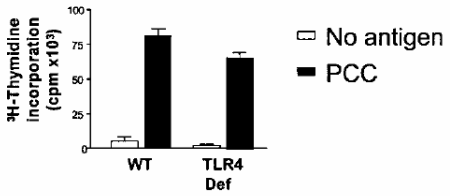
Figure 14 :

A. Prolifération des lymphocytes mesurée par incorporation de thymidine ^{3}H

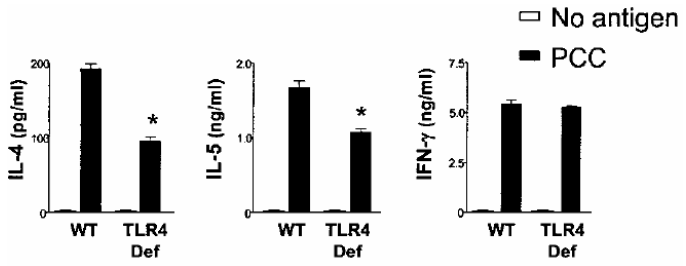
B. Productions de cytokines mesurées par ELISA

Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives entre les souris WT et TLR4-Def, pour un même paramètre.

A.



B.



Question 7. Sous la forme d'un schéma récapitulatif, indiquez pour chaque étape de l'expérience les événements cellulaires mis en jeu.

*Question 8. Quelle information supplémentaire vous apporte la comparaison des expériences présentées à la **Figure 14** ?*