

Activation ; Fonctions effectrices

I.

(D'après Tamada, K., *et al.* (2000). *J. Immunol.* 164:4105 ; Zhai, Y., *et al.* (1998). *J. Clin. Invest.* 102:1142 ; Rooney, I. A., *et al.* (2000). *J. Biol. Chem.* 275:14307 ; Wang, J., *et al.* (2001). *J. Immunol.* 167:5099 ; Tamada, K., *et al.* (2002). *J. Immunol.* 168:4832)

Les membres de la famille du TNF et du récepteur du TNF sont des molécules impliquées dans la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire ou l'apoptose et jouent un rôle très important dans la régulation de certaines fonctions du système immunitaire.

Parmi ces molécules, la protéine LIGHT (famille du TNF) a récemment été identifiée et son expression a été observée surtout dans les tissus lymphoïdes (thymus et rate). Des analyses par cytométrie de flux ont montré que LIGHT est exprimée par les cellules dendritiques immatures et par les lymphocytes T activés. Cette protéine peut se fixer sur 3 récepteurs : HVEM, LT β R et TR6.

On se propose d'étudier le rôle de la molécule LIGHT au sein du système immunitaire.

1^{ère} partie

- Dans une 1^{ère} expérience, des cellules T humaines purifiées ont été cultivées avec des cellules dendritiques allogéniques irradiées, en présence de doses croissantes des récepteurs solubles HVEM-Ig, LT β R-Ig, m4-1BB-Ig (protéine contrôle) ou hCTLA4-Ig. La prolifération des lymphocytes T a été mesurée après 3 jours, par incorporation de thymidine ³H (**Figure 1A**).

- Ensuite, des lymphocytes T ont été cultivés en présence d'anticorps anti-CD3, puis ont été lavés et incubés avec la protéine hLIGHT-Ig, en présence ou en absence des récepteurs solubles hVEM-Ig, hLT β R-Ig ou control hIg. La prolifération des lymphocytes T a été mesurée après 3 jours par incorporation de thymidine ³H (**Figure 1B**).

- Enfin, des lymphocytes T ont été cultivés en présence d'anticorps anti-CD3 et de la protéine hLIGHT-Ig pendant 2 jours. La production des cytokines IFN- γ et IL-4 a été mesurée dans les surnageants de culture par ELISA (**Figure 1C**).

Question 1. *Expliquez pourquoi on a utilisé les récepteurs solubles hHVEM-Ig, hLT β R-Ig et hCTLA4-Ig dans l'expérience représentée dans la figure 1A ?*

Question 2. *Que pouvez-vous conclure du(des) rôle(s) de la molécule LIGHT dans cette expérience ? (10 lignes maximum). Illustrez vos conclusions par un schéma.*

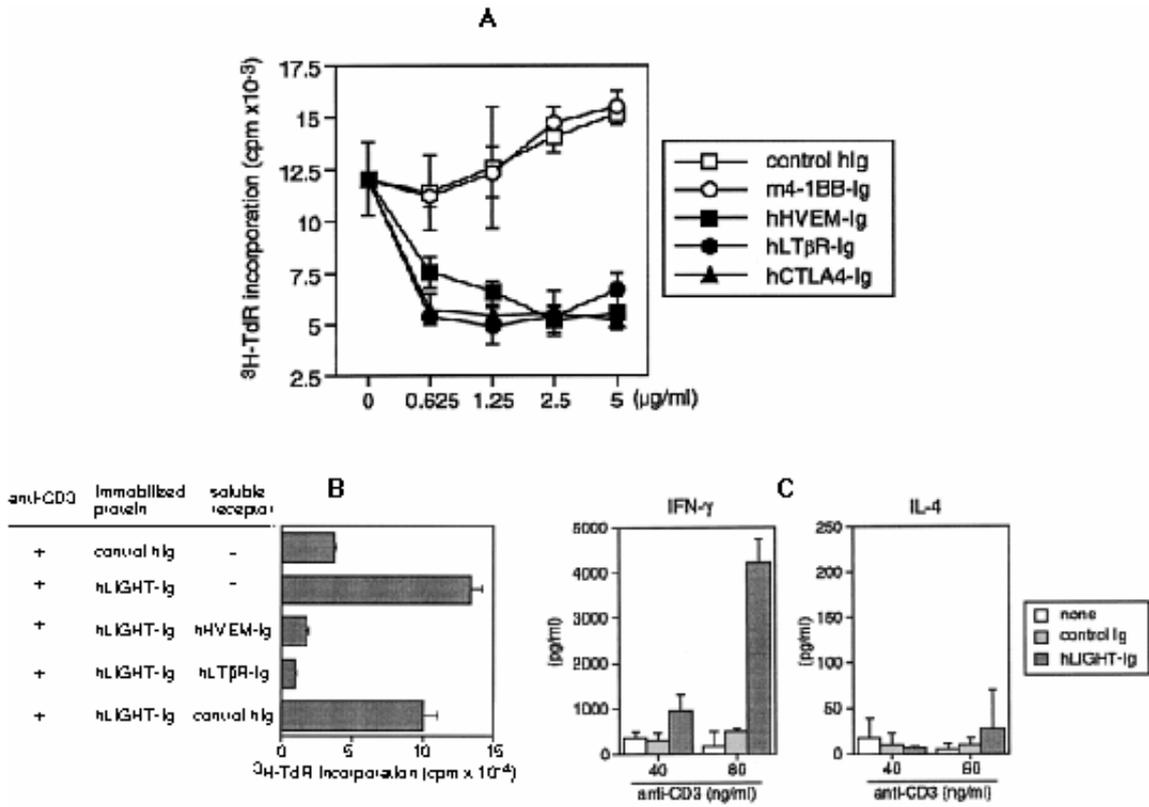


Figure 1

2^{ème} partie

- Des cellules de la lignée HT-29 (cellules humaines de cancer du colon, qui expriment les récepteurs LTβ-R et HVEM) ont été incubées pendant 3 jours en absence (control), ou en présence de la protéine LIGHT seule ou en combinaison avec de l'IFN-γ. Les cellules ont ensuite été marquées avec l'annexine V et l'iodure de propidium et analysées au cytomètre (Figure 2A).

- Les cellules HT-29 ont été transduites par un vecteur rétroviral contrôle (pBABE) ou par un vecteur permettant aux cellules d'exprimer en excès une forme inactive de la molécule TRAF3 (TRAF3 Δ1-339) (dominant négatif). Les cellules transduites ont été incubées en présence de 80 unités/ml d'IFN-γ et de concentrations croissantes de LIGHT et leur viabilité a été mesurée (Figure 2B).

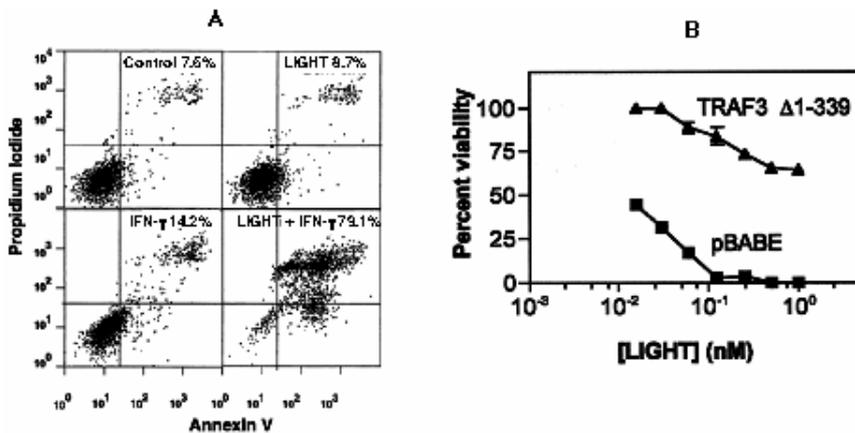


Figure 2

Question 3. Quelles sont les fonctions des molécules de la famille TRAF ? (5 lignes maximum)

Question 4. Que pouvez-vous déduire de ces expériences ? (10 lignes maximum)

- Des souris DBA/2 ont été inoculées par voie sous-cutanée avec des cellules tumorales P815 (mastocytome murin). Après une semaine, ces souris qui ont développé des tumeurs (palpables sous la peau), ont reçu des injections intra-tumorales de PBS, de vecteur permettant l'expression de LIGHT (vecteur LIGHT), ou d'un vecteur contrôle. Après 7 jours, les splénocytes des souris ont été re-stimulés *in vitro* avec des cellules P815 irradiées. L'activité cytotoxique de ces splénocytes a été mesurée (par un test de relargage du chrome 51) en utilisant comme cellules cibles des cellules P815 ou L1210 (lymphome murin) (**Figure 3A**). Parallèlement, le pourcentage de souris ayant développé des tumeurs a été déterminé (**Figure 3B**).

- La même expérience a été réalisée avec des souris dont on a déplété au préalable les cellules CD4⁺-ou CD8⁺ avant d'injecter le vecteur LIGHT dans les tumeurs. Le diamètre des tumeurs a été mesuré après 21 jours (**Figure 3C**).

- Les souris présentant une régression tumorale suite à l'injection du vecteur LIGHT ont reçu 30 jours après, une seconde injection de cellules P815 ou L1210. Des souris DBA/2 naïves ont été utilisées comme souris contrôles (**Figure 3D**).

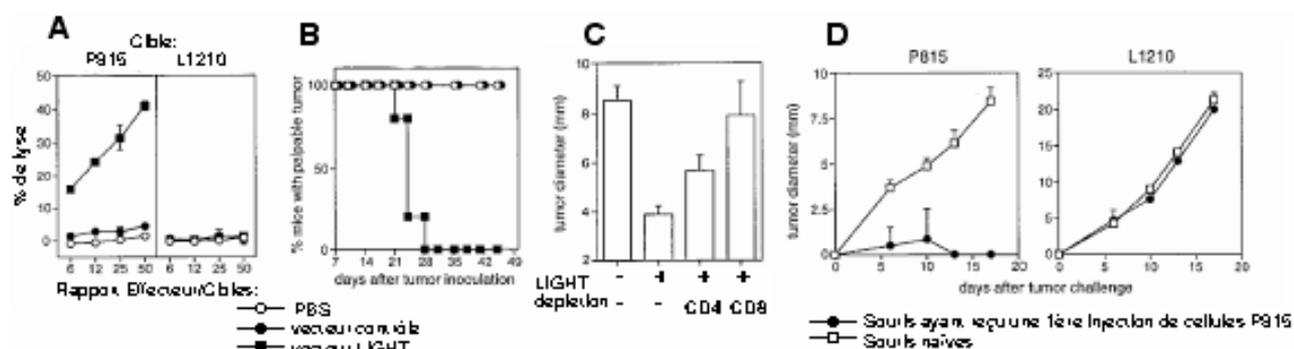


Figure 3

Question 5. Expliquez sous forme d'un schéma le principe d'un test de cytotoxicité et précisez l'importance des contrôles.

Question 6. Interprétez les résultats présentés dans la Figure 3. Quelle est la fonction de LIGHT mise ici en évidence ? (10 lignes maximum)

Question 7. A la lumière des résultats présentés dans les Figures 2 et 3, quels peuvent être les mécanismes d'action de LIGHT ? (10 lignes maximum)

3^{ème} partie

Des souris transgéniques, exprimant la protéine LIGHT sous le contrôle d'un promoteur Ick et d'un enhancer CD2 (permettant une forte expression de LIGHT dans les thymocytes) ont été établies. Les poids et taille des thymus des souris transgéniques (Tg) ont été comparés à ceux des souris de type sauvage (WT) (**Figure 4A**).

Ayant observé chez les souris Tg une diminution de 50% du nombre de thymocytes $CD4^+CD8^+$ (par comparaison avec les souris WT), on a réalisé une expérience de marquage avec l'annexine V et l'iodure de propidium (PI), sur les thymocytes $CD4^+CD8^+$ des souris WT et Tg (**Figure 4B**).

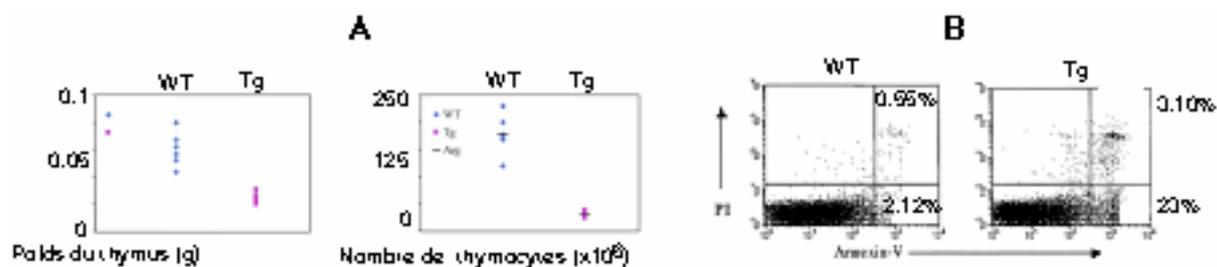


Figure 4

Question 8. Que concluez vous de ces expériences ?

4^{ème} partie

Afin d'étudier les fonctions *in vivo* de la protéine LIGHT, des souris déficientes pour LIGHT (LIGHT^{-/-}) ont été établies. Chez ces souris déficientes, on a constaté que :

- 1) Les tissus lymphoïdes sont normaux (thymus, rate, ganglions et plaques de Peyer)
- 2) La micro-architecture des organes lymphoïdes secondaires est normale
- 3) La capacité des cellules dendritiques à stimuler la prolifération des lymphocytes T est normale et la production d'IFN- γ par ces lymphocytes T est comparable à celle des souris WT

- Le superantigène SEB (entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*) induit une forte expansion puis une déplétion des cellules T-V $\beta 8^+$ $CD4^+$ et $CD8^+$ de façon dépendante du CMH de classe II. Le superantigène SEB a été injecté à des souris de type sauvage (LIGHT^{+/+}) ou déficientes (LIGHT^{-/-}). Après 3 jours, les nombres de cellules totales et les pourcentages de cellules V $\beta 8^+$ ont été déterminés dans les rates (spleen) (**Figure 5A**) et les ganglions (LN) (**Figure 5B**).

- Le peptide E7 (dérivé de la protéine E7 du papillomavirus-16 et présenté par la molécule H-2D^b) a été injecté par voie sous cutanée en présence d'adjuvant, à des souris LIGHT^{+/+} ou LIGHT^{-/-}. Après 7 jours, les cellules des ganglions drainants ont été incubées *in vitro* avec des cellules irradiées de la lignée EL4E7 (cellules de lymphome EL4 exprimant E7) pendant 5 jours. Les activités cytotoxiques ont alors été mesurées en utilisant comme cellules cibles, les cellules EL4E7 ou les cellules EL4 (**Figure 5C**). La production d'IFN- γ dans les surnageants de culture a été quantifiée au cours du temps (**Figure 5D**).

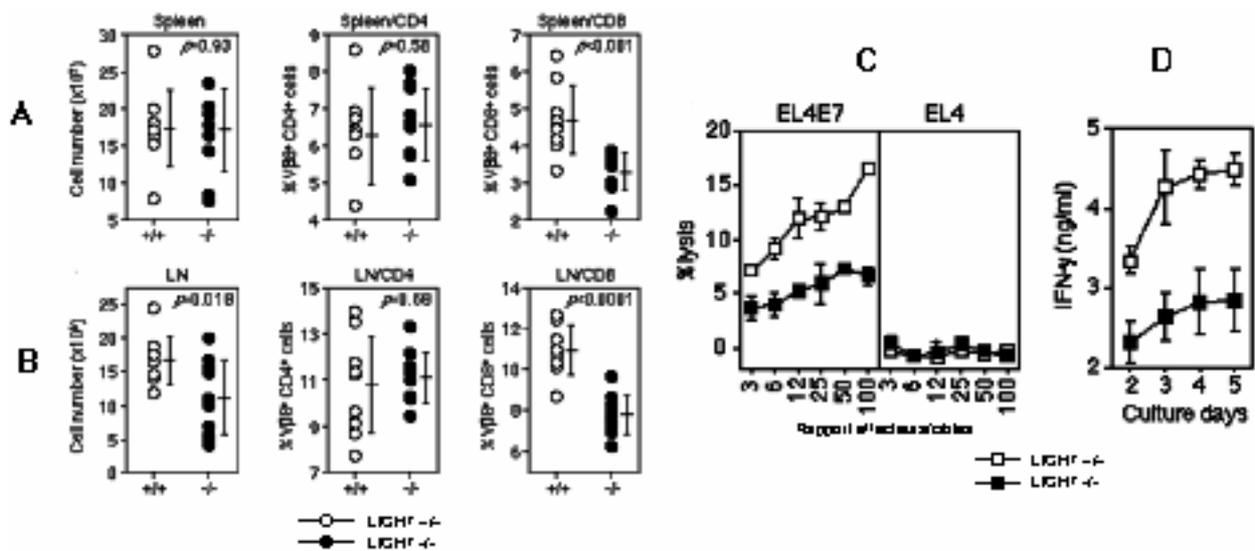


Figure 5

Question 9. Quelles conclusions pouvez-vous tirer de ces expériences ?

Question 10. A votre avis, pourquoi n'obtient-on pas les mêmes résultats *in vitro* et chez les souris LIGHT^{-/-} ? Emettez des hypothèses permettant d'expliquer ces différences.

II.

(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 1).

Question 2. A quoi correspondent les 2 populations cellulaires retrouvées dans la Figure 1A, en absence de stimulation ?

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

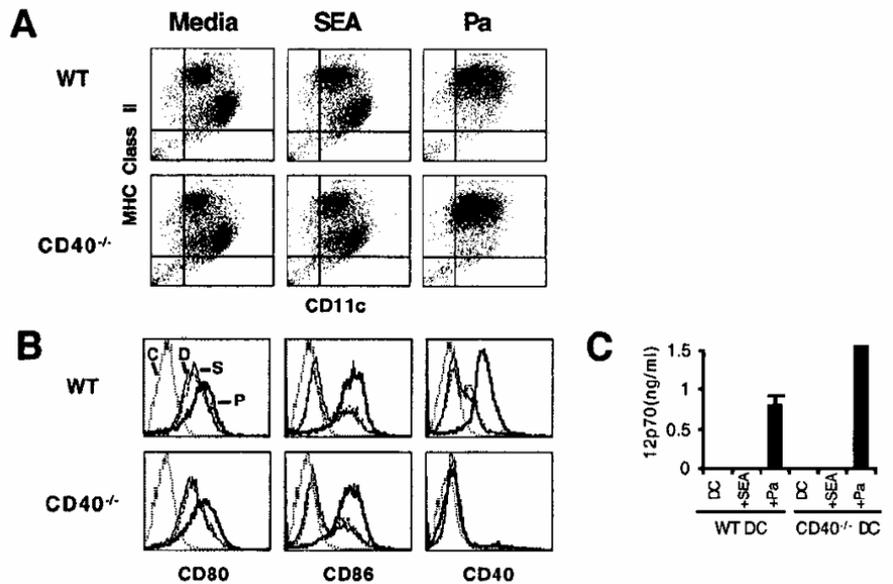
Figure 1 :

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.

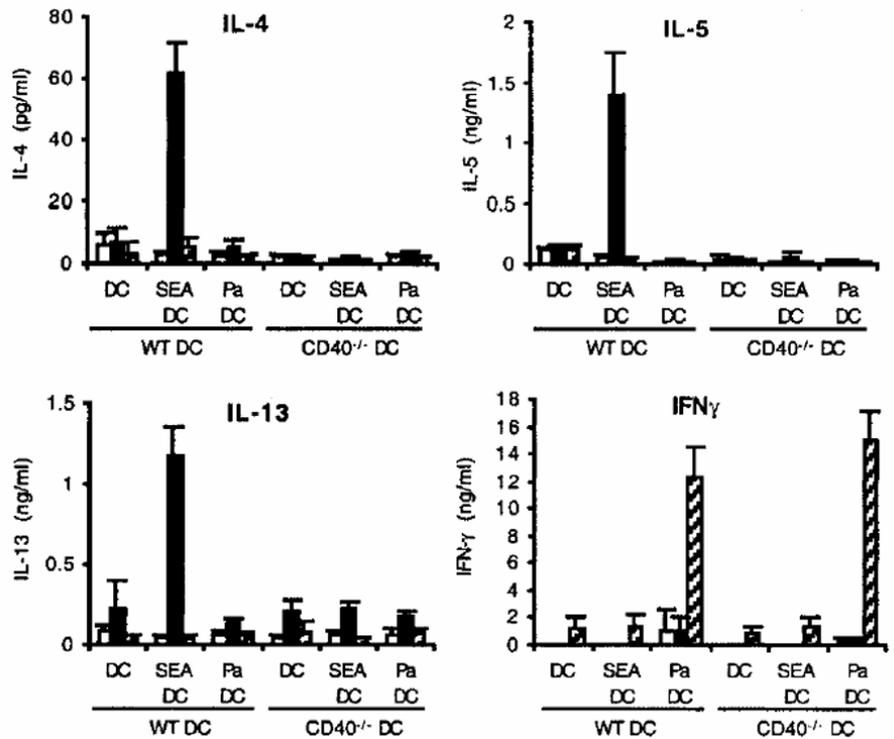
C : Production d'IL-12 mesurée par ELISA



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 2).

Figure 2 :

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 3**).

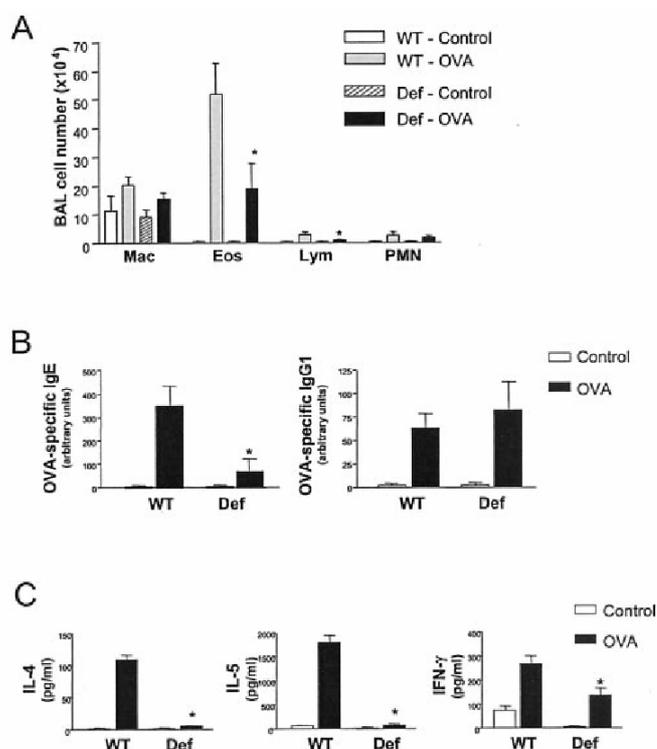
Figure 3 :

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- $\alpha\beta$ 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.

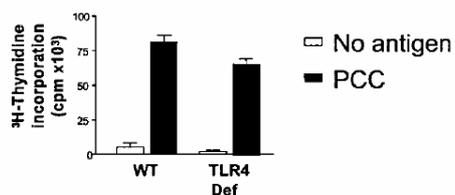
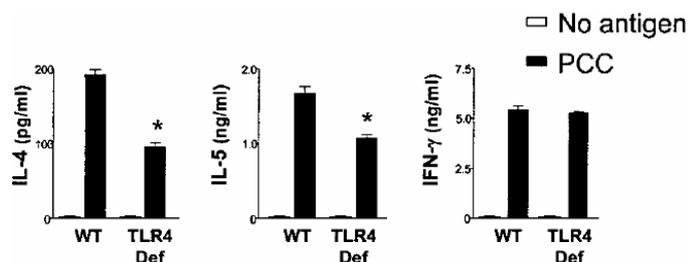
Les lymphocytes T ont ensuite été re-stimulés avec la protéine PCC (PCC) ou non (No antigen) en présence de splénocytes irradiés de souris WT de même haplotype, pendant 48h. La prolifération et la production des cytokines IL-4, IL-5 et IFN- γ des lymphocytes ont été mesurées (**Figure 4**).

Figure 4 :

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

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 4** ?