

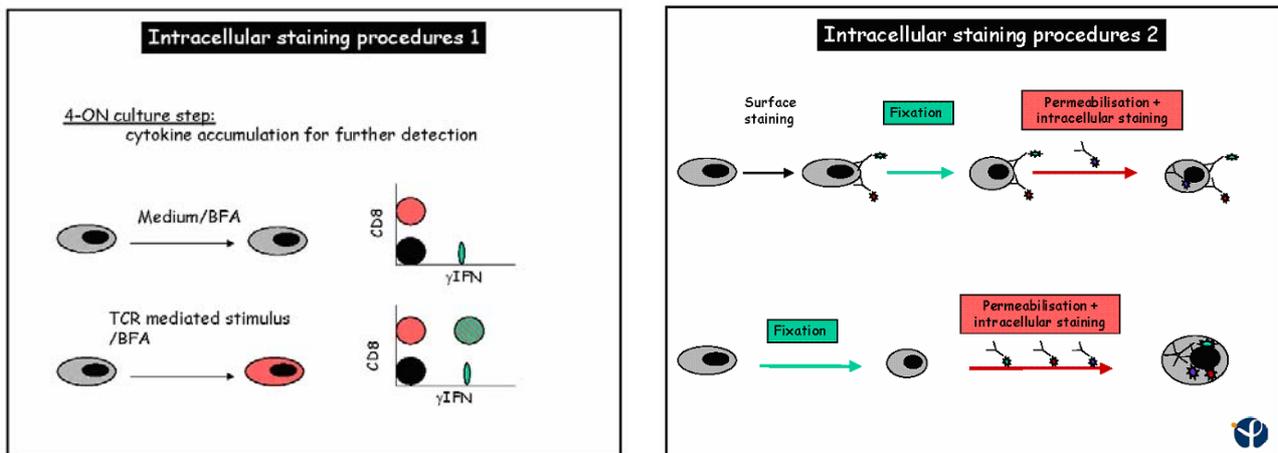
## Techniques d'études des réponses immunitaires

### I. Principes

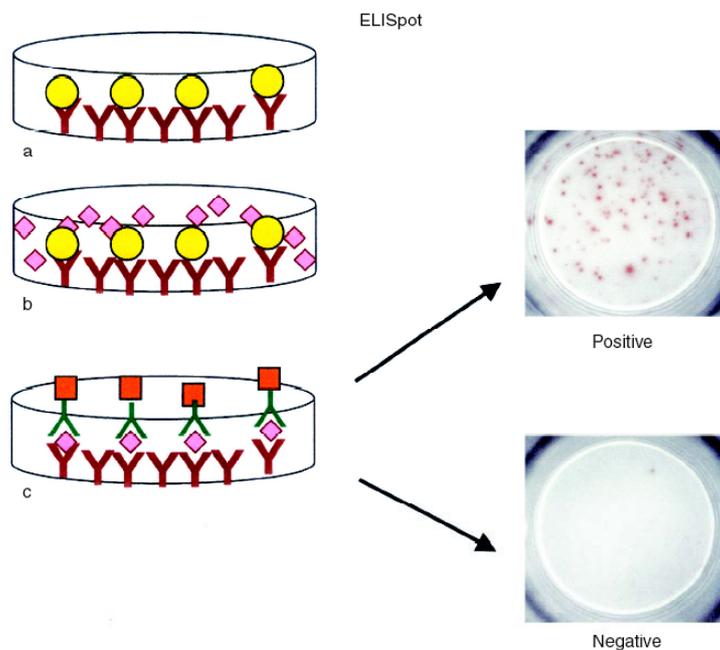
(d'après Hernandez-Fuentes M. P. *et al.* (2003) *J. Immunol. Methods* 196:247 ; éléments du polycopié de TP : The 2<sup>nd</sup> PSU International Teaching Platform on Tumour Immunology and Immunotherapy, Sylvie Garcia, Institut Pasteur)

#### Partie I

##### 1. Détection de cytokines intracellulaires par cytométrie de flux



##### 2. Détection de la production de cytokines par la technique ELISPOT



**Fig. 3. ELISPOT procedure.** (A) Culture wells are coated with the capture antibody and cells are then added. (B) Cultures are incubated for 24–48 h, and the cytokine is produced by the cells. Cells are then removed from the plate, and the cytokine remains bound to the antibody. (C) A detection biotinylated antibody is then added, followed by a conjugate of an enzyme with streptavidin. In the final step, the substrate precipitates where the secondary antibody was bound, forming spots that correspond to cells producing the cytokine.

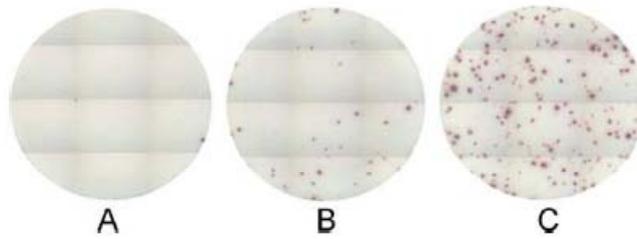


Fig. 1. Wells with different spot counts depicted in the study. (A) Very low spot counts; (B) medium spot counts, and (C) high spot counts.

**Partie II**

1. Etude de la division cellulaire par cytométrie de flux (marquage au CFSE)

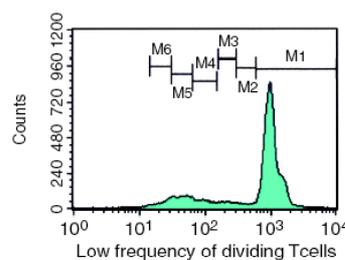
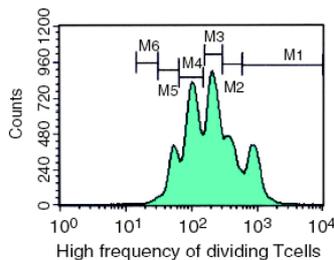
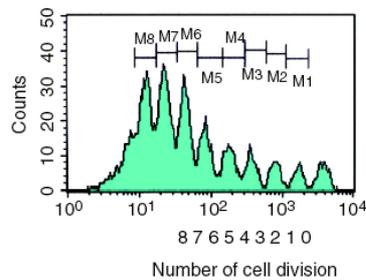
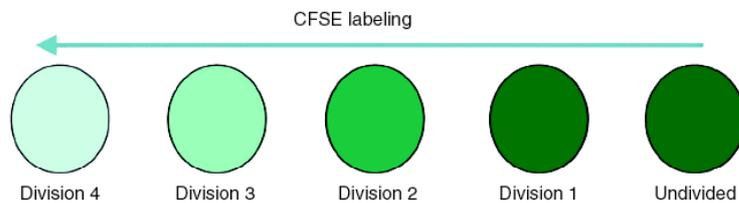
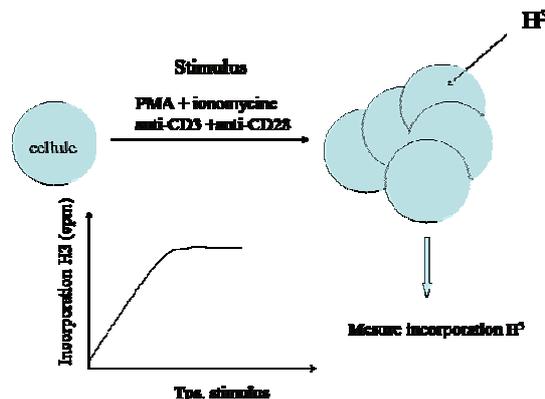


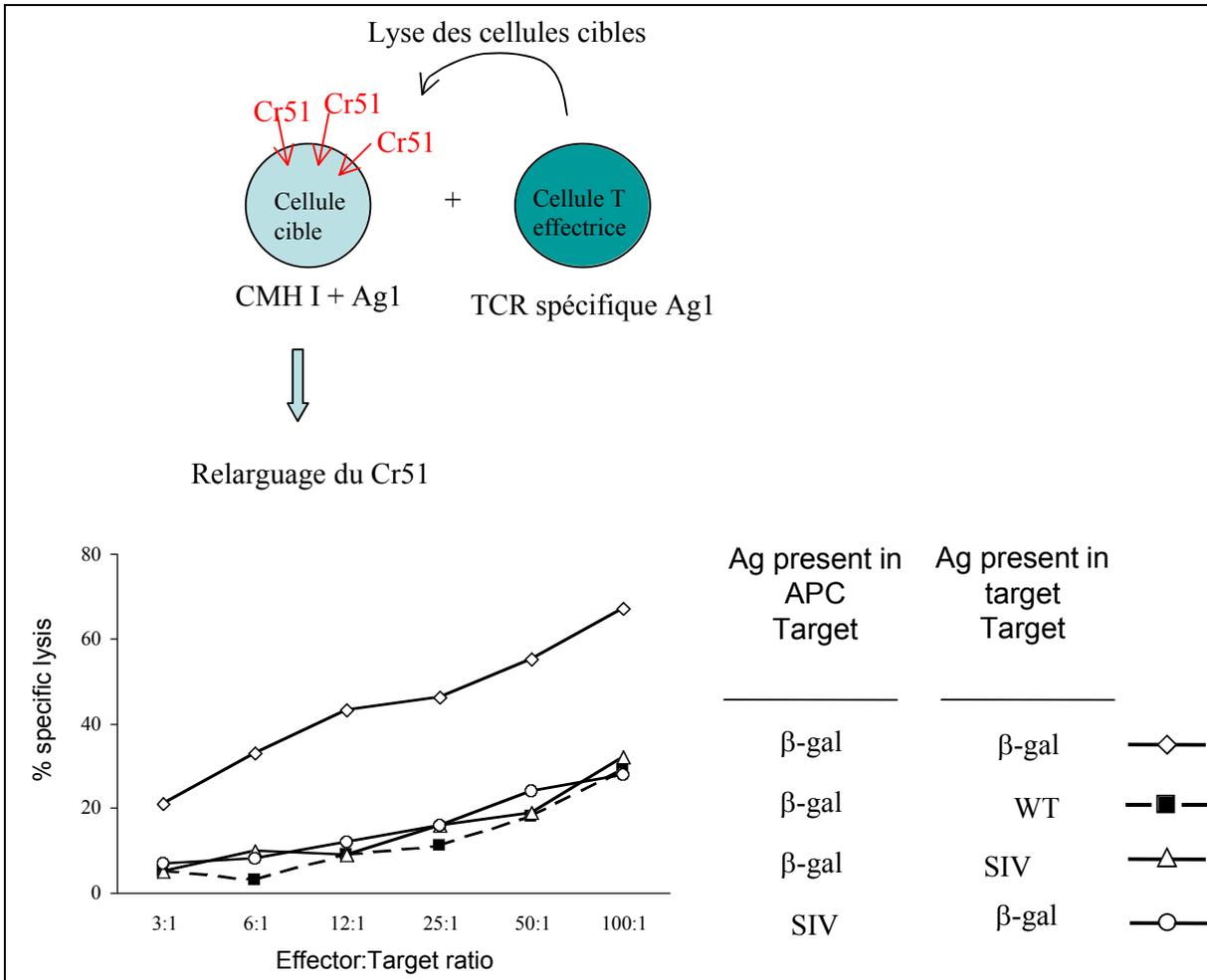
Fig. 4. Flow cytometry analysis of cell division: carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling. Cells are labeled with CFSE prior to culture, and with each division cell fluorescence intensity halves. In T lymphocytes, up to eight cell divisions can accurately be distinguished. Applying methods to calculate exact number of cells, we can find out the number of precursors. By relating precursors to the number of cells seeded a frequency can be obtained. The advantage of this method is that two populations of cells can be studied simultaneously, as long as they can be identified with different surface markers.

2. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée

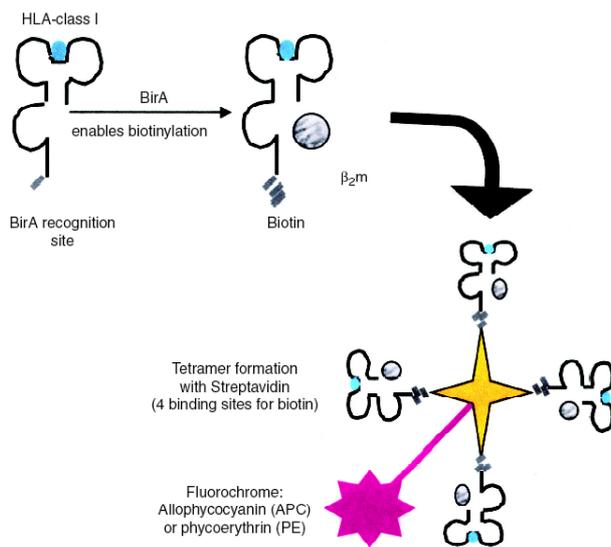


**Partie III**

1. Tests fonctionnels d'analyse des lymphocytes T CD8+ (CTL)



2. Analyse des lymphocytes T CD8+ par cytométrie de flux après marquage par les tétramères



**Fig. 6. Flow cytometry analysis of determinant-specific T cells: tetramer-staining.** Purified class I MHC molecule-peptide complexes are enzymatically biotinylated by incubation with purified BirA. The heavy-chain fusion protein is folded *in vitro* in the presence of  $\beta_2$ -microglobulin. The complex is then multimerized by mixing the biotinylated protein with phycoerythrin- or allophycocyanin -labeled streptavidin at specific molar ratios. Multimeric peptide-MHC complexes are able to bind more than one T-cell receptor on a specific T cell and, thus, have slower dissociation rates, which allows the identification by flow cytometry of T cells specific for the peptide-MHC molecule complex.

## II. Applications

### Exercice I

(d'après Karlsson A.C. *et al.* (2003) *J. Immunol. Methods* 283:141)

L'objectif de cette étude est de comparer les techniques ELISPOT et CFC (Cytokine Flow Cytometry) pour mesurer les réponses cellulaires T spécifiques d'antigènes des protéines virales du VIH ou du CMV (Cytomégalo virus). L'étude porte sur des patients chroniquement infectés par le VIH.

Les lymphocytes de donneurs VIH+ ont été purifiés et stimulés en présence de peptides (15 acides aminés) correspondant à différentes protéines du VIH (protéines Gag, Env et Vif) ou d'un peptide correspondant à la protéine pp65 du CMV. L'IFN $\gamma$  produit par les cellules a été détecté par 2 techniques (**Figure 1A et B**).

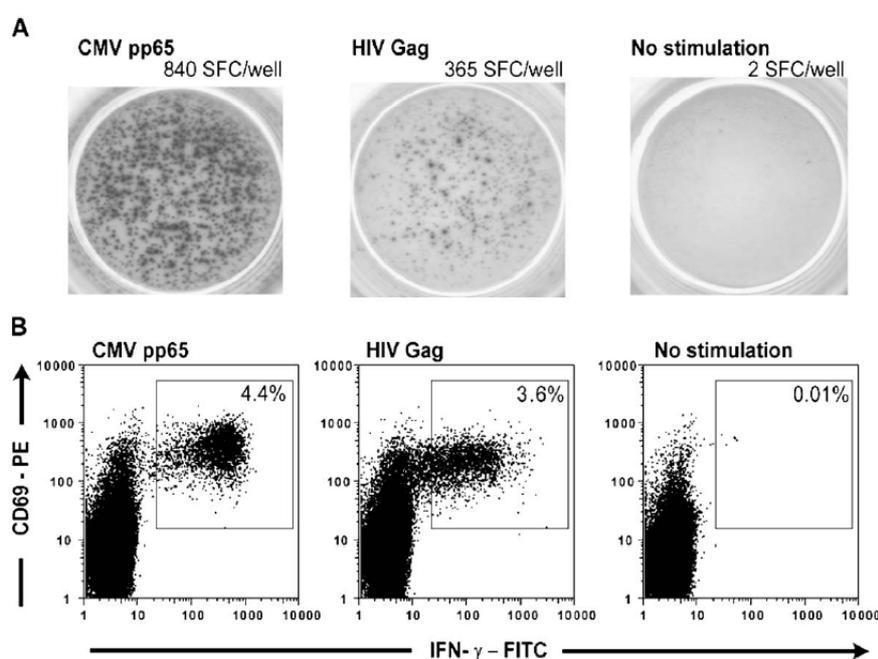


Fig. 1. Responses to CMV pp65 and HIV-Gag (SF2) peptide pools as detected by ELISPOT and CFC assays. The response to no stimulation is also included as a negative control. (A) In the ELISPOT assay, IFN- $\gamma$ -producing T cells were identified in each well (of a 96-well microtiter plate) as spots with a fuzzy border and a brown color. Triplicate wells of plated PBMC (at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/well along with antigens and controls) were analyzed and the mean is referred to as SFC/well. (B) In the CFC assay, data were first gated on viable CD3<sup>+</sup> T cells and then the percentage of CD69<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -producing CD3<sup>+</sup> T cells was obtained.

Figure 1

**Question 1.** Expliquez à l'aide de schémas comment ont été réalisées les 2 expériences présentées dans la figure 1.

**Question 2.** Commentez les résultats obtenus

Pour comparer les résultats, les données de l'ELISPOT ont été exprimées en « Spot Forming Cell » SFC/ $10^6$  lymphocytes (**Figure 2A**), et les données de CFC en pourcentages de lymphocytes T CD3+ producteurs d'IFN $\gamma$  (**Figure 2B**).

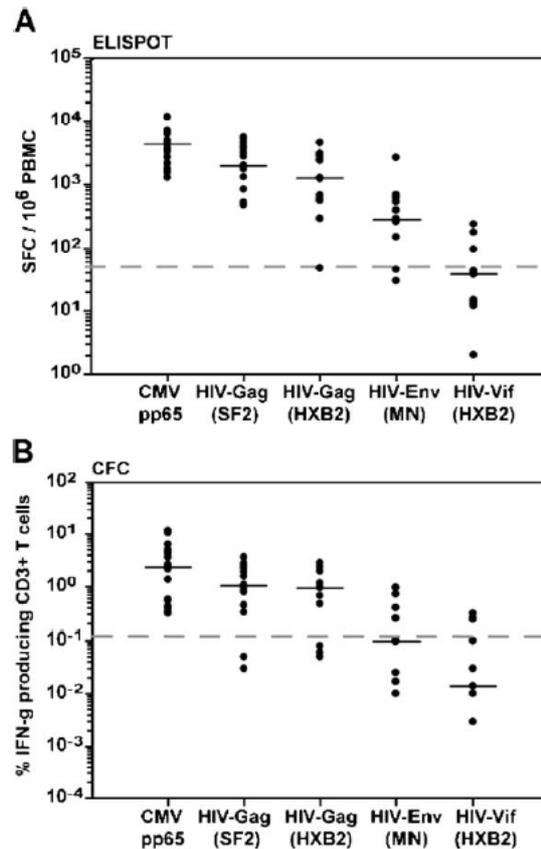


Fig. 2. Magnitude of antigen-specific T cells expressed as (A) SFC/10<sup>6</sup> PBMC in the ELISPOT assay and (B) the percentage of IFN- $\gamma$ -producing CD3<sup>+</sup> T cells in the CFC assay. Only subjects with results obtained using both assays are included. A dashed line indicates the cutoff value for each assay.

Figure 2

Question 3. Quelles sont les différences mises en évidence dans ces expériences ?

## Exercice II

Etude de l'expression sélective du récepteur de l'Eotaxine : CCR3, par les lymphocytes T de type Th2.

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 molécules appelées 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 2 catégories de lymphocytes T effecteurs : les lymphocytes de type Th1 qui produisent les cytokines IFN- $\gamma$  et IL-12, activent les phagocytes et protègent des infections microbiennes intracellulaires et les lymphocytes de type Th2 qui produisent les cytokines IL-4 et IL-5, sont impliqués dans les réponses immunitaires faisant intervenir les IgE, les polynucléaires éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB), protègent des infections parasitaires et jouent un rôle dans l'allergie.

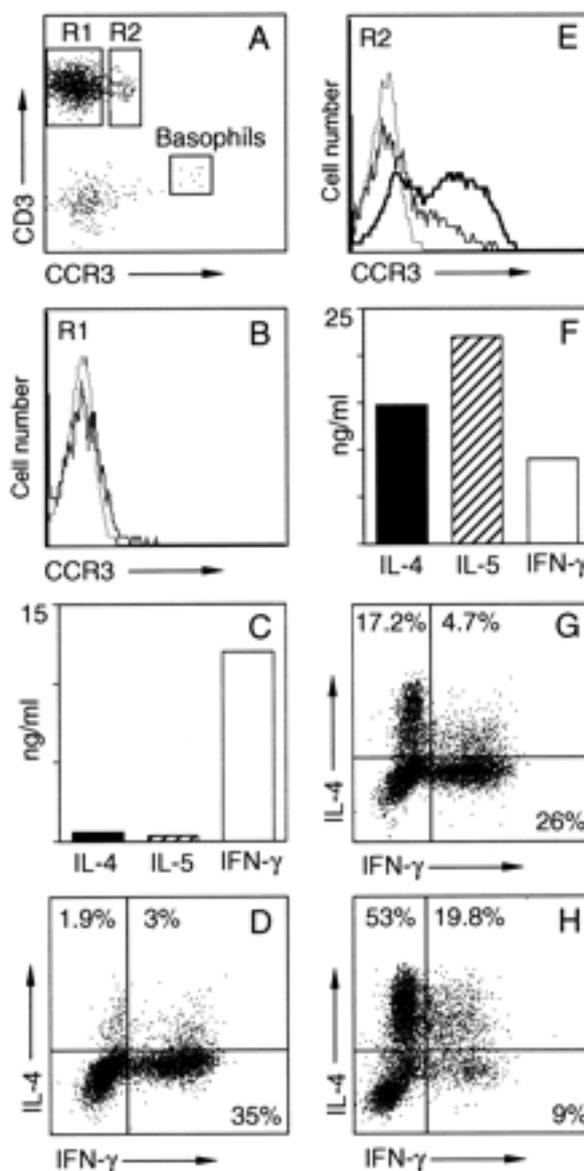
Les cellules Th1 et Th2 ne migrent pas vers les mêmes tissus. On constate que les sites où ont lieu les réactions allergiques contiennent des cellules Th2 en plus de PNE et de PNB. On sait par ailleurs que la chimiokine Eotaxine est produite par les cellules épithéliales et les phagocytes. Elle est un chimio-attractant pour les PNE et les PNB qui expriment CCR-3, le récepteur de l'Eotaxine.

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

#### Expérience 1 :

Des expériences préliminaires avaient permis de démontrer que dans le sang adulte, environ 1% des lymphocytes T expriment CCR-3 (ceci n'est pas vrai dans le sang de cordon ombilical)

Les cellules du sang adulte sont incubées avec des anticorps monoclonaux anti-CCR3 et anti-CD3 (marqueur des lymphocytes T) couplés à un fluorochrome. Les cellules sont ensuite analysées au FACS (**Figure 3A, B et E**). Les productions des cytokines IL-4, IL-5 et IFN- $\gamma$  par les cellules du sang adulte sont mesurées par 2 méthodes différentes (**Figure 3C, F, G, D et H**).



**Figure 3**

- (A) : Expression de CD3 et CCR-3 par les cellules du sang ; (B) : Expression de CCR-3 par les cellules de la fenêtre R1 ; (E) : Expression de CCR-3 par les cellules de la fenêtre R2 ; (C) : Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- $\gamma$  (mesurée par test ELISA) par les cellules de la fenêtre R1 ; (F) : Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- $\gamma$  (mesurée par test ELISA) par les cellules de la fenêtre R2 ; (D) : Production des cytokines (IL-4 et IFN- $\gamma$ ) intracellulaires par les cellules de la fenêtre R1 ; (G) : Production des cytokines (IL-4 et IFN- $\gamma$ ) intracellulaires par les cellules de la fenêtre R2 ; (H) : Production des cytokines (IL-4 et IFN- $\gamma$ ) intracellulaires par des cellules triées qui expriment CCR-3

**Question 4.** Quelles sont les cellules qui expriment le récepteur CCR-3 ?

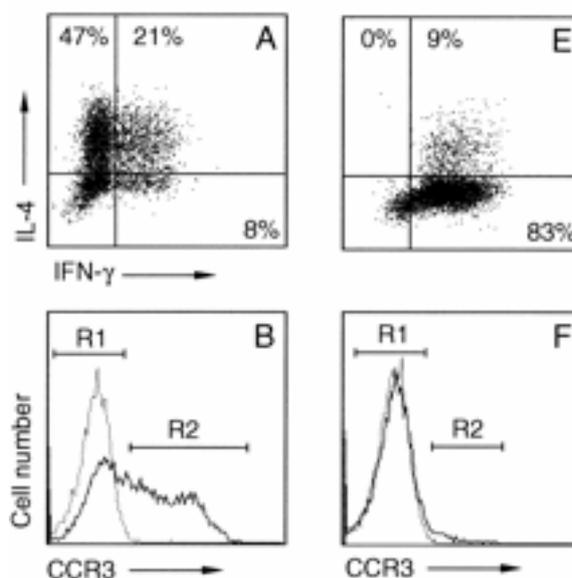
Question 5. *Rappelez les principes du test ELISA en sandwich*

Question 6. *Comment sont effectués les marquages membranaires et intracellulaires ?*

Question 7. *Quelles conclusions pouvez-vous tirer de l'ensemble de ces expériences ?*

Expérience 2 :

On cherche à déterminer les facteurs qui induisent l'expression de CCR-3. Pour cela, des lymphocytes T naïfs (provenant de sang de cordon ombilical) n'exprimant pas CCR-3 sont mis en culture avec de la PHA, soit en présence d'IL-12 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules Th1, soit en présence d'IL-4 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules Th2. Les productions des cytokines IL-4 et IFN $\gamma$  sont alors détectées (marquage intracellulaire) ainsi que l'expression de CCR-3 (**Figure 4**)



**Figure 4**

**(A) Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- $\gamma$  par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th2 ; (B) Expression de CCR-3 par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th2**

**(E) Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- $\gamma$  par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th1 ; (F) Expression de CCR-3 par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th1**

Question 8. *Quels éléments nouveaux apportent ces expériences ?*

Expérience 3 :

On sait que les cytokines IFN- $\alpha$  et TGF- $\beta$  peuvent interférer avec la différenciation Th2. On cherche à savoir si ces cytokines vont également interférer avec l'acquisition de l'expression de CCR-3. 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- $\alpha$  ou du TGF- $\beta$ . Les productions des cytokines IL-4 et IFN $\gamma$  sont alors détectées (marquage intracellulaire) ainsi que l'expression de CCR-3 (**Figure 5**).

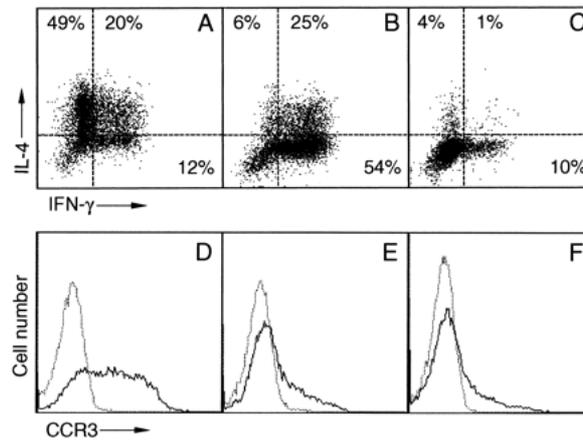


Figure 5

- (A) Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- $\gamma$  par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12 ; (B) Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- $\gamma$  par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN- $\alpha$  ; (C) Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- $\gamma$  par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF- $\beta$  ; (D) Expression de CCR-3 par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12 ; (E) Expression de CCR-3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN- $\alpha$  ; (F) Expression de CCR-3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF- $\beta$

- Question 9. Quels sont les effets respectifs de l'IFN- $\alpha$  et du TGF- $\beta$  sur l'induction de la polarisation Th1 et Th2, et sur l'acquisition de CCR-3 ?
- Question 10. Sachant que l'Eotaxine est surexprimée dans les sites de réactions allergiques, que pouvez-vous conclure sur les conséquences de cette expression ?

### Exercice III

(d'après van Stipdonk M.J.B. *et al.* (2001) *Nature Immunology* 2:423)

L'objectif de cette étude est de déterminer le temps de stimulation antigénique nécessaire pour stimuler et permettre la prolifération et la différenciation de lymphocytes T CD8+.

Les cellules T CD8+ naïves sont obtenues de souris transgéniques dont le TCR est spécifique pour le peptide OVA(257-264). Les cellules T CD8+ prélevées chez ces souris ont été marquées au CFSE, puis cultivées en présence de CPA (cellules présentatrices d'antigènes) présentant le peptide OVA(257-264) sur le CMH de classe I. Après un temps de culture de 0, 2, 4, 6 et 8h, les cellules TCD8+ ont été transférées dans d'autres puits de culture sans APC, et analysées en cytométrie de flux après 24 ou 48h. Les résultats sont présentés dans la **Figure 6**.

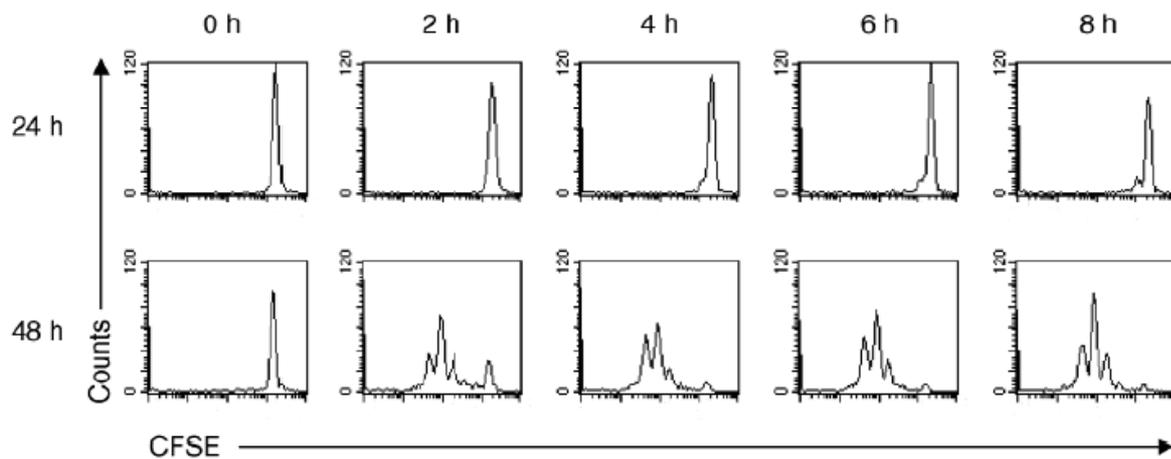


Figure 6

**Question 11.** Quelles sont les différences observées aux temps 24h et 48h ? Quelles conclusions tirez-vous de cette expérience ?

Les auteurs ont par la suite étudié la différenciation des cellules T CD8+ en cellules effectrices. Les cellules T CD8+ ont été isolés des souris transgéniques, stimulés avec les APC présentant le peptide OVA(257-264) sur le CMH de classe I pendant 8h, puis transférées dans des puits de culture sans APC. Après 24h (**Figure 7a**), 48h (**Figure 7b**), ou 72h (**Figure 7c**), les lymphocytes T ont été incubées avec des cellules cibles EL4 exprimant le peptide OVA(257-264), préalablement marquées au Cr51 (carrés noirs). Les pourcentages de lyse ont alors été déterminés (**Figure 7**).

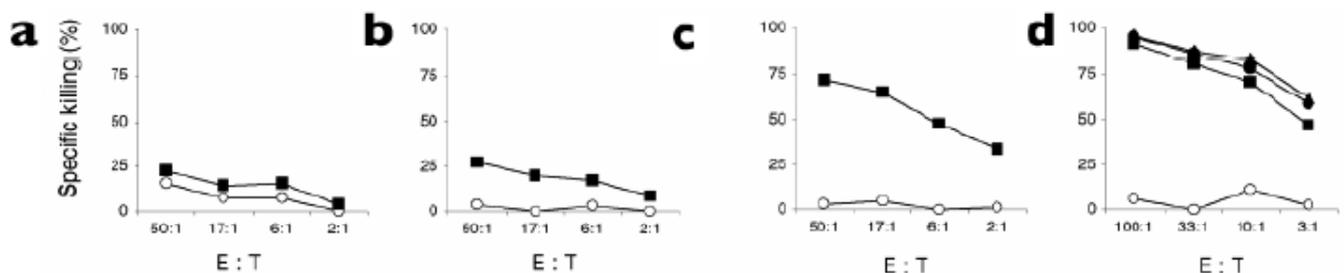


Figure 7

(a), (b) et (c) : ronds ouverts : cellules T non stimulées par les APC, carrés noirs : cellules stimulées.  
 (d) : Cellules T stimulées pendant 0h (ronds ouverts), 2h (ronds noirs), 8h (triangles noirs) ou plus de 8h (carrés noirs) avec les APC, puis transférées dans des puits de culture sans APC. Après 72h de culture, les cellules ont été collectées et la cytotoxicité mesurée sur les cellules cibles EL-4 OVA.  
 (E:T rapport cellules effectrices/cellules cibles).

**Question 12.** Schématisez l'expérience réalisée

**Question 13.** Quelles informations complémentaires ces résultats apportent-ils ?

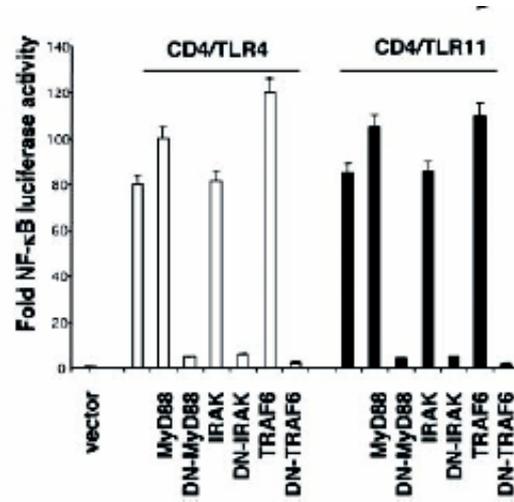
### Exercice IV

Les auteurs de la présente étude ont cloné un nouveau membre de la famille des « Toll-like receptor ». Il s'agit du TLR11, qui est exprimé spécifiquement par le foie et les reins. Pour étudier la fonctionnalité du TLR11, les auteurs ont surexprimé une protéine de fusion CD4/TLR11 (TLR11 est ainsi constitutivement activé) dans des cellules 293 qui ont été transfectées de façon stable avec

un plasmide permettant l'expression du gène reporter luciférase sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'activation de NF- $\kappa$ B dans ces cellules a été déterminée ainsi que dans des cellules 293 surexprimant la protéine de fusion CD4/TLR4. Les résultats sont montrés sur la **Figure 8**.

**Figure 8**

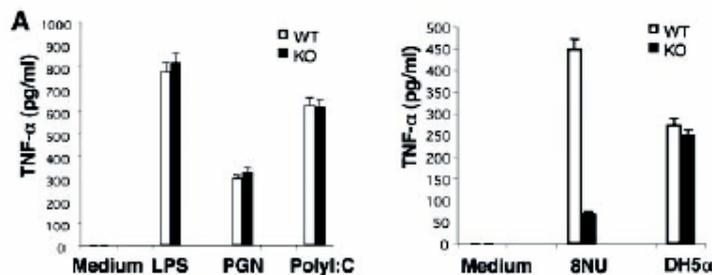
L'activité luciférase a été mesurée dans les cellules 293 exprimant soit la protéine de fusion CD4/TLR4 soit CD4/TLR11. L'expérience a été réalisée dans des cellules de type sauvage, ou dans des cellules exprimant soit MyD88 ou un mutant de MyD88 (DN-MyD88), soit IRAK ou un mutant de IRAK (DN-IRAK), soit TRAF6 ou un mutant de TRAF6 (DN-TRAF6).



**Question 14.** *Interprétez cette expérience (5 lignes maximum). A l'aide d'un schéma, décrivez la voie de transduction du signal activée par TLR11.*

Des souris déficientes pour TLR11 ont été obtenues (TLR11<sup>-/-</sup>). Les macrophages isolés chez des souris de type sauvage ou des souris TLR11<sup>-/-</sup> ont été stimulés *in vitro* avec plusieurs ligands, dont le LPS, le PGN (peptidoglycane), le polyI:C (mime l'ARN double brin) ou par les souches 8NU ou DH5 $\alpha$  d'E. Coli. Le TNF- $\alpha$  produit par les macrophages a été mesuré dans les surnageants de culture (**Figure 9**).

**Figure 9**



**Question 15.** *D'après cette expérience, quel(s) est (sont) le(s) ligand(s) de TLR11 ? Pourquoi ?*