Cytokines & Chimiokines

I.

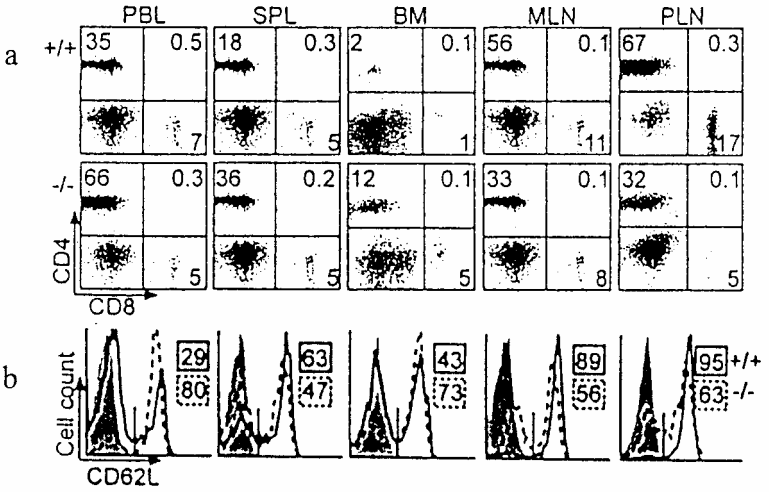
(D'après Förster, R. *et al.* (1999) *Cell* 99:23)

Dans le but d'étudier la régulation de la circulation des leucocytes dans l'organisme, des souris déficientes pour le récepteur CCR7 de chimiokine ont été générées par recombinaison homologue. Dans tous les cas, les animaux mutés sont viables et fertiles. On se propose d'étudier les conséquences de la non fonctionnalité du gène codant pour CCR7 en établissant un phénotype précis des souris mutées, d'attribuer à CCR7 une(des) fonction(s) et d'établir un modèle de régulation des mouvements leucocytaires en particulier au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Chez les souris CCR7-/-, la dissection des principaux organes lymphoïdes secondaires montre des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer de petites tailles alors que les rates sont généralement très volumineuses. Pour étudier la distribution tissulaire des lymphocytes T au sein de ces organes, des expériences de double marquage sont réalisées à l'aide d'anticorps (AC) anti-CD4/anti-CD8 ou anti-CD3/anti-CD62L couplés à des fluorochromes. Les lymphocytes sont isolés à partir du sang ou des organes lymphoïdes de souris de type sauvage (+/+) ou déficientes en CCR7 (-/-). La **Figure 1** montre les résultats des analyses de cytométrie en flux (FACS).

Figure 1
PBL : lymphocyte du sang périphérique ; SPL : rate ; BM : moelle osseuse ; MLN : ganglions lymphatiques mésentériques ; PLN : ganglions lymphatiques périphériques

Il est précisé que seules les cellules $CD3^+$ sont analysées sur la Figure 1b et que les cellules $CD62L^+$ expriment la L-sélectine et sont majoritairement des lymphocytes T naïfs.

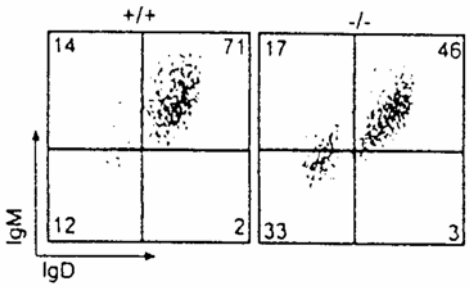


Question 1. Commentez l'ensemble des résultats.

Afin de compléter cette analyse, les cellules extraites des ganglions lymphatiques de souris de type sauvage (+/+) ou déficientes en CCR7 (-/-) sont marquées avec des AC couplés à des fluorochromes et spécifiques des lymphocytes B. L'analyse par FACS du double marquage anti-IgD/anti-IgM de la population cellulaire $B220^+$ est montrée sur la **Figure 2**.

Lorsque l'expérience décrite ci-dessus est renouvelée à partir de cellules extraites de la rate ou du sang, aucune différence significative de marquage n'est observée entre souris de type sauvage ou mutantes CCR7-/-.

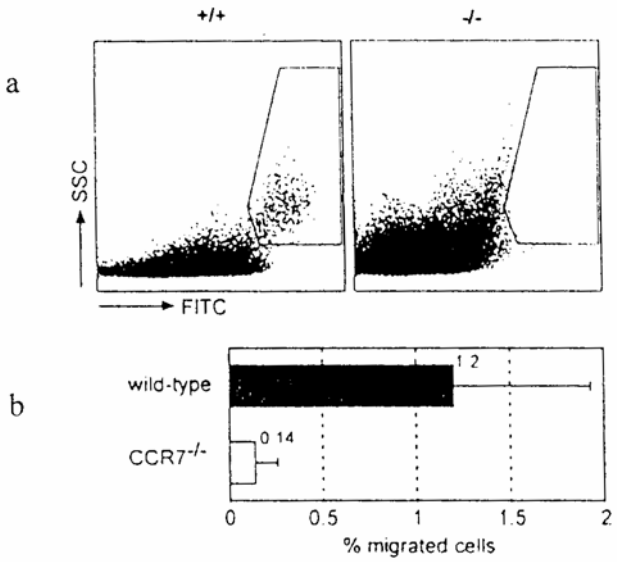
Figure 2



Question 2. Interprétez les résultats obtenus. Que se produit-il dans les ganglions lymphatiques des souris mutantes CCR7-/-? Proposez une (des) expérience(s) qui permettrait(ent) de confirmer ces résultats.

De l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est appliquée à forte concentration sur des portions de l'épiderme du thorax et de l'abdomen de souris de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7 (-/-). Après 24 heures de traitement, les ganglions lymphatiques de drainage sont prélevés (ganglions lymphatiques inguinaux, axillaires et brachiaux) et les cellules extraites des organes sont analysées par FACS. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 3** ; les pourcentages moyens des cellules contenues dans le contour d'intérêt de la **Figure 3a** sont établis avec précision sur la **Figure 3b**.

Figure 3



*Question 3. D'après les propriétés morphologiques des cellules contenues dans le contour d'intérêt de la **Figure 3a** quel est le type cellulaire concerné par l'analyse ? Proposez une expérience permettant de vérifier votre interprétation. Que se passe-t-il chez les souris mutantes CCR7 ?*

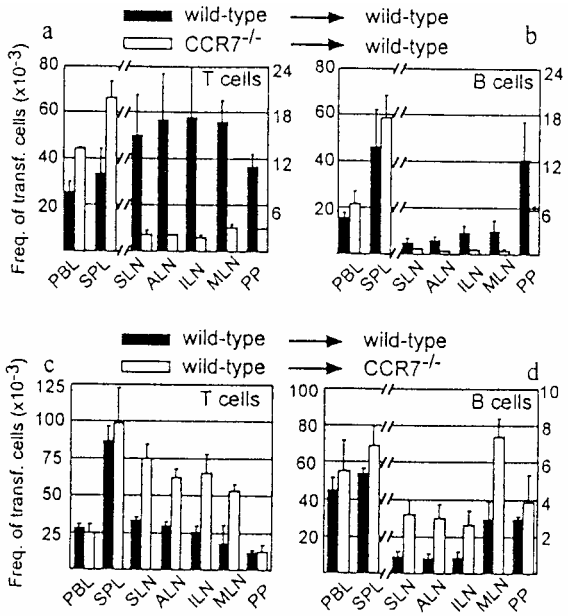
Les lymphocytes T (Thy-1^+) et B naïfs (IgD^+) fluorescents, issus de souris de type sauvage ou mutantes CCR7-/- sont injectés à des animaux de type sauvage (**Figure 4a** et **b**) ; par ailleurs, les lymphocytes T (Thy-1^+) et B naïfs (IgD^+) fluorescents, issus de souris de type sauvage sont injectés à des animaux de type sauvage ou mutants CCR7-/- (**Figure 4c** et **d**). Cinq heures après le transfert cellulaire, les animaux receveurs sont sacrifiés, saignés et leurs principaux organes lymphoïdes secondaires sont prélevés. Les proportions de lymphocytes T et B fluorescents provenant des animaux donneurs sont déterminées par FACS et les résultats de l'analyse sont montrés sur la **Figure 4**.

*Question 4. Dans quel but réalise-t-on ces expériences de transfert ? Interprétez les résultats des **Figure 4a** et **b**.*

*Question 5. Pourquoi réalise-t-on les expériences inverses de transfert décrites sur les **Figure 4c** et **d** ? Quelle conclusion peut-on émettre ?*

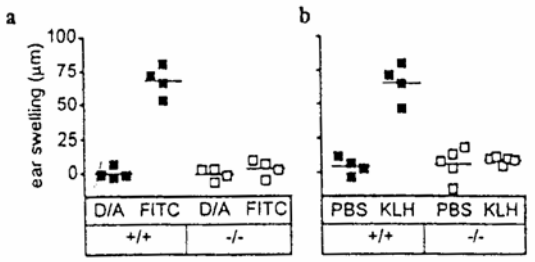
Figure 4

PBL: lymphocytes du sang périphérique ; SPL : rate ; SLN : ganglions lymphatiques submandibullaires ; ALN : ganglions lymphatiques axillaires ; ILN: ganglions lymphatiques inguinaux ; MLN : ganglions lymphatiques mésentériques ; PP : plaques de Peyer.



L'application cutanée d'une forte dose de FITC au niveau du thorax et de l'abdomen de souris de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7 (-/-) est réalisée (expérience a). L'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HR) est d'autre part étudiée en injectant de l'hémocyanine (KLH) par voie sous-cutanée aux animaux de type sauvage ou mutants CCR7-/- (expérience b). Après 4 jours, la réaction est révélée par application d'une faible quantité de FITC (expérience a) ou par l'injection sous-cutanée de KLH (expérience b) dans un territoire cutané différent de celui utilisé lors de l'étape de sensibilisation. On mesure à 24 heures le diamètre de l'érythème et de l'induration. Les résultats obtenus sont décrits sur la **Figure 5**.

Figure 5



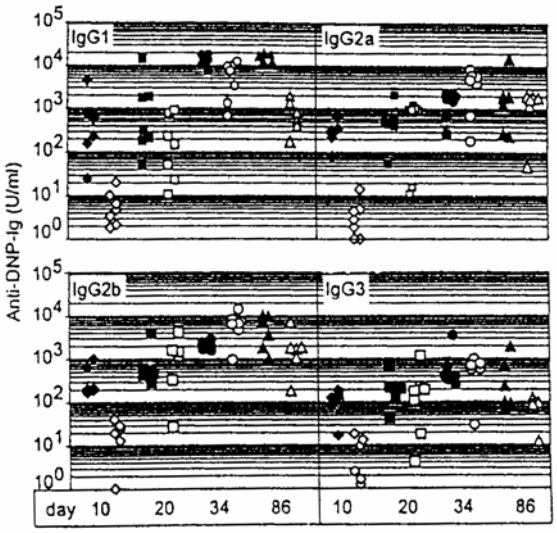
D/A: Dibutylphtalate/Acétone

Question 6. Rappelez brièvement les différentes étapes provoquant l'inflammation locale d'un tissu. Pourquoi réalise-t-on ces expériences ? Que permettent-elles de confirmer ?

Les souris de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7 (-/-) sont immunisées avec 100 µg de DNP-KLH, puis rappelées au bout de 3 semaines avec le même antigène administré en quantité équivalente. La cinétique de la réponse anti-DNP est établie en quantifiant par ELISA les différents isotypes produits dans le sérum des animaux de type sauvage (symboles noirs) ou mutants CCR7-/- (symboles clairs). La **Figure 6** montre le résultat de cette analyse.

Question 7. Interprétez les résultats obtenus. Que peut-on en conclure quant aux rôles attribués au récepteur CCR7 ?

Figure 6 :
Les souris de type sauvage CCR7+/+ (symboles noirs) ou mutants CCR7-/- (symboles blancs) ont été immunisées avec 100 μg/ml de DNP-KLH. Trois semaines après l'immunisation, les souris ont reçu à nouveau la même dose de DNP-KLH et les anticorps spécifiques de la DNP ont été mesurés par ELISA aux différents temps indiqués (temps en jours, après la première immunisation).



II.

(Examen d'Immunologie Fondamentale - septembre 2002. D'après Sallusto, F. *et al.* (1997) *Science* 277:2005 ; Lloyd, C.M. *et al.* (2000) *J.Exp.Med.* 191:265)

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 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, lymphe, organes lymphoïdes secondaires…).

Il existe deux catégories de lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes de type « Th1 » et les lymphocytes de type « Th2 ».

Question 8. Rappelez, à l'aide d'un tableau comparatif synthétique, les caractéristiques principales de ces deux sous-populations de lymphocytes T.

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 polynucléaires éosinophiles (PNE) et basophiles (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 CCR3, le récepteur de l'Eotaxine.

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

Expérience 1 :

Des expériences préliminaires ont permis de démontrer que dans le sang adulte, environ 1% des lymphocytes T expriment CCR3 (ceci n'est pas vrai dans le sang de cordon ombilical)

- A l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CCR3 et anti-CD3 couplés à un fluorochrome, on marque les cellules du sang adulte ou des lignées dérivées de ces cellules, et on analyse par

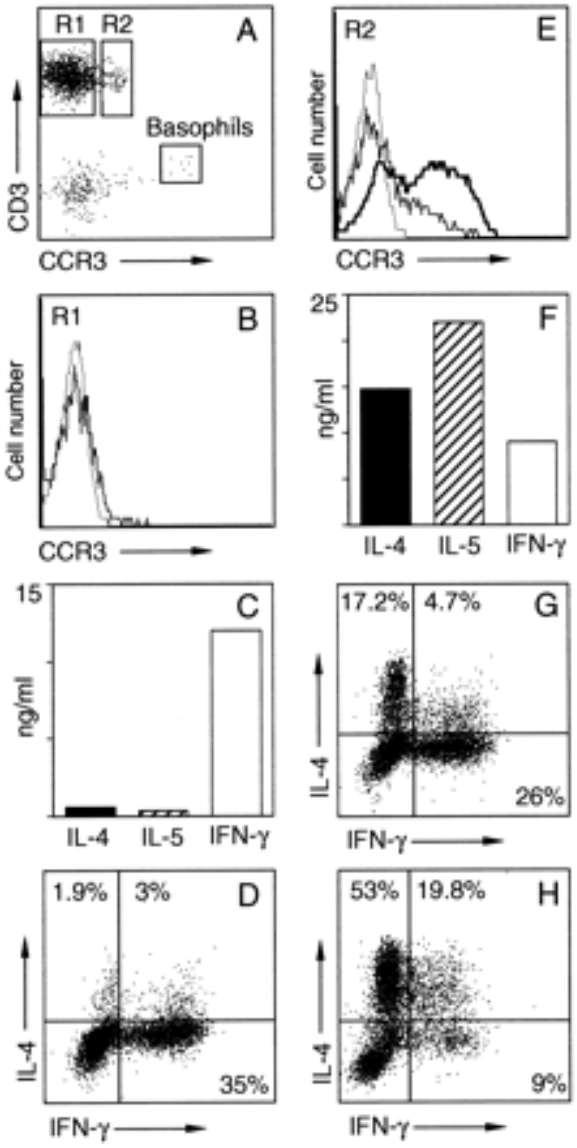
cytométrie de flux quelles cellules sont marquées par ces anticorps. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7** (cadrans A, B et E).

- On utilise deux méthodes pour mesurer les cytokines produites par ces cellules : on dose les cytokines IL-4, IL-5 et IFN-γ dans les surnageants cellulaires par un test ELISA, et la production d'IL-4 et d'IFN-γ par un marquage intracellulaire des cellules des fenêtres R1 et R2 (**Figure 7A**). Les résultats sont présentés sur la **Figure 7** (cadrans C, F, G, D et H).

Figure 7

A. Expression de CD3 et CCR3 par les cellules du sang
B. Expression de CCR3 par la lignée polyclonale issue des cellules de la fenêtre R1 (lignée R1)
E. Expression de CCR3 par la lignée polyclonale issue des cellules de la fenêtre R2 (lignée R2)
C. Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN-γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la lignée R1
F. Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN-γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la lignée R2
D. Production des cytokines (IL-4 et IFN-γ) intracellulaires par les cellules de la lignée R1
G. Production des cytokines (IL-4 et IFN-γ) intracellulaires par les cellules de la lignée R2
H. Production des cytokines (IL-4 et IFN-γ) intracellulaires par des cellules triées sur la lignée R2 qui expriment CCR3

N.B. : Sur les cadrans B et E, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligne grisée). Sur le cadran E, la ligne noire correspond au marquage avec l'anticorps anti-CCR3 pour les cellules étudiées dans le cadran H.



Question 9. Comment les marquages membranaires et intracellulaires sont-ils effectués ?

Question 10. Quelles sont les cellules qui expriment le récepteur CCR3 ?

Question 11. Quelles conclusions pouvez-vous tirer de l'ensemble de ces expériences ?

Expérience 2 :

On cherche à déterminer les facteurs qui induisent l'expression de CCR3. Pour cela, des lymphocytes T naïfs, provenant de sang de cordon ombilical, n'exprimant pas CCR3, sont mis en culture avec de la PHA, un activateur polyclonal des lymphocytes T :

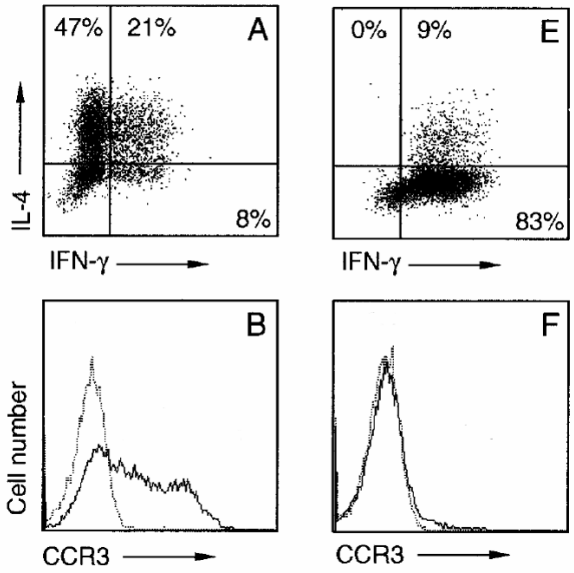
- soit en présence d'IL-12 et d'anticorps anti-IL-4 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules « Th1 »
- soit en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IL-12 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules « Th2 »

Les résultats sont présentés sur la **Figure 8** :

Figure 8

A. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN-γ par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th2
B. Expression de CCR3 par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th2.
E. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN-γ par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th1
F. Expression de CCR3 par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th1

N.B. : Sur les cadrans B et F, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligné grisée).



Question 12. Quels nouveaux éléments ces expériences apportent-elles ?

Expérience 3 :

On sait que les cytokines IFN-α et TGF-β peuvent interférer avec la différenciation Th2. On cherche à savoir si ces cytokines vont également interférer avec l'acquisition de l'expression de CCR3.

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-α ou du TGF-β. Les résultats sont présentés sur la **Figure 9**.

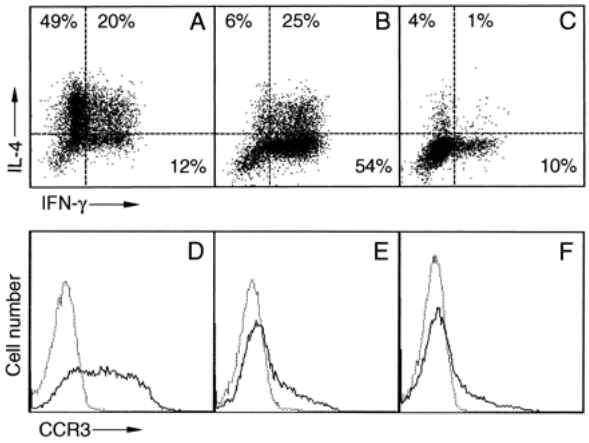
Question 13. Quels sont les effets respectifs de l'IFN-α et du TGF-β sur l'induction de la polarisation Th1 et Th2, et sur l'acquisition de CCR3 ?

Question 14. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre sachant que l'Eotaxine est surexprimée dans les sites de réactions allergiques ?

Figure 9

A. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN-γ par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12
B. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN-γ par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN-α
C. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN-γ par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF-β
D. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12
E. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN-α
F. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF-β

N.B. : Sur les cadrans B et F, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligné grisée).



Expérience 4 :

Il a également été montré que CCR4, le récepteur de la chimiokine MDC, produite par les macrophages, était exprimé par les lymphocytes Th2 et non pas Th1. On s'intéresse ici aux rôles fonctionnels respectifs des couples Eotaxine/CCR3 et MDC/CCR4 dans le recrutement des lymphocytes Th2 sur les sites de réactions allergiques dans un modèle de maladie respiratoire allergique :

- Les lymphocytes T d'une souris transgénique pour le TCR-α/β DO11.10 spécifique du peptide 323–339 de l'ovalbumine de poulet (OVA) présenté par I-A^d, sont cultivés en présence d'IL-12 et d'anticorps anti-IL-4 pour obtenir des cellules polarisées de type Th1, ou en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IL-12 pour obtenir des cellules polarisées de type Th2 ;
- 2.10^6 cellules polarisées Th1 ou Th2 sont injectées par voie intraveineuse à des souris BALB/c (H-2^d) ;
- Les souris BALB/c reçoivent alors une injection quotidienne de l'antigène OVA (ou du PBS pour les souris contrôles) par voie aérienne ;
- Les souris sont sacrifiées aux jours 4 ou 7 après le transfert cellulaire et l'intensité de l'inflammation est déterminée dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) et les tissus pulmonaires (cf. **Figure 10**) ;
- Les résultats sont présentés sur les **Figure 11** et **Figure 12**.

Figure 10

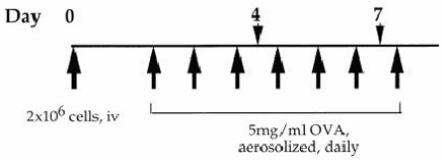


Figure 11 :

i. Numération des éosinophiles (barres noires) et basophiles (barres blanches) récupérés dans les BAL des souris BALB/c ayant reçu une injection de cellules effectrices transgéniques polarisées Th1 ou Th2, suivie d'injections quotidiennes par voie aérienne de l'antigène OVA. Les résultats sont donnés aux jours 4 et 7 après l'injection des cellules effectrices.

ii. Pourcentage d'éosinophiles (barres noires) et basophiles (barres blanches) dans les infiltrats cellulaires observés au niveau des tissus pulmonaires pour les mêmes conditions que ci-dessus (i).

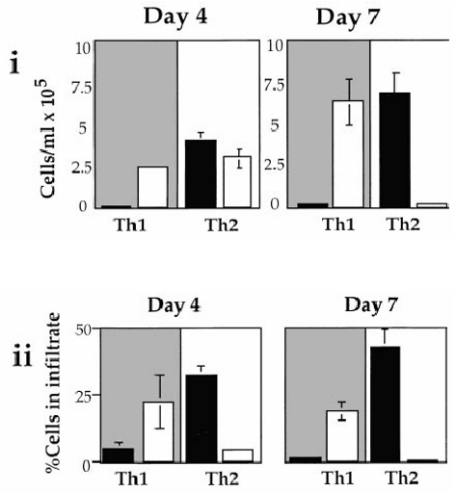
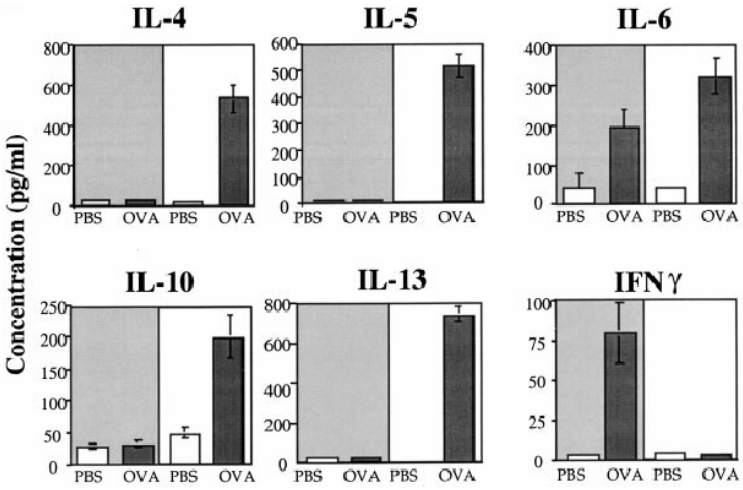


Figure 12 :

Mesure par ELISA de la production de cytokines dans les BAL des souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 (cadrans grisés) ou Th2 (cadrans blancs), et ayant subi un challenge avec l'antigène OVA (barres grisées) ou du PBS (barres blanches).

N.B. : Chaque résultat correspond à la moyenne (± écart-type) des mesures faites pour un groupe de cinq souris au jour 4 après l'injection des cellules effectrices.



Question 15. A l'aide d'un tableau comparatif, analysez soigneusement ces résultats ; en particulier, mettez en évidence les différences observées chez les souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 ou Th2.

Expérience 5 :

Chez les souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 ou Th2, on mesure, au niveau des infiltrats pulmonaires, l'expression des chimiokines Eotaxine et MDC, ainsi que celle de leur récepteur CCR3 et CCR4 (**Figure 13C**). Par ailleurs, les proportions de cellules Th2 exprimant CCR3 ou CCR4 au niveau des tissus pulmonaires présentant une réaction allergique sont déterminées (**Figure 13D**).

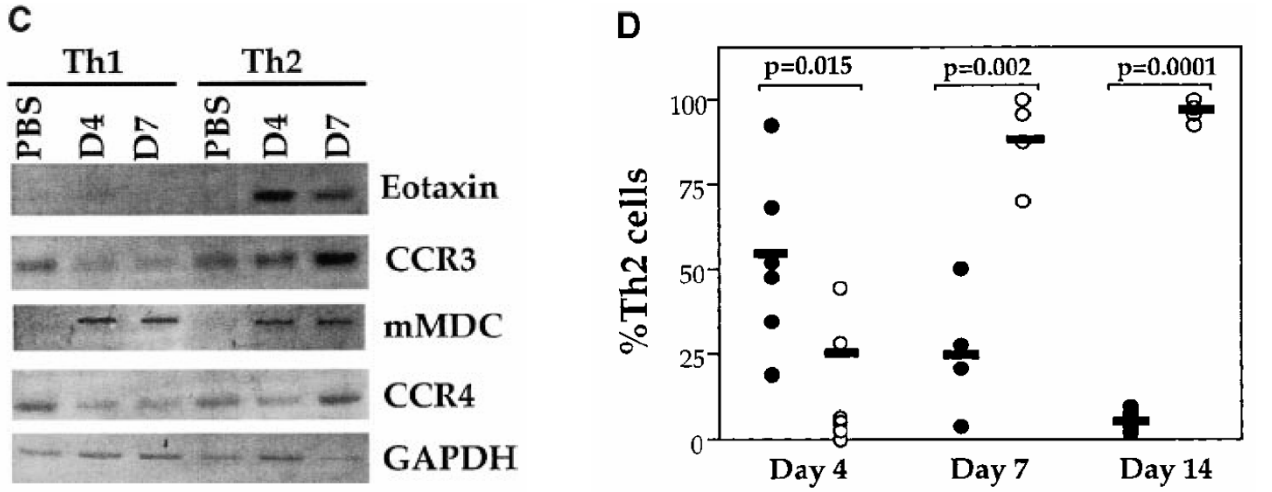


Figure 13

C. L'expression des récepteurs CCR3 et CCR4, et de leur ligand respectif, Eotaxine et MDC, a été déterminée par PCR sur l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN de poumons de trois souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 ou Th2. Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport à l'expression du gène domestique GAPDH.

D. Les proportions de cellules Th2 exprimant CCR3 (cercles pleins) ou CCR4 (cercles vides) au niveau des tissus pulmonaires présentant une réaction allergique ont été déterminées par comptage des cellules présentes aux niveau des infiltrats pulmonaires marquées par l'anticorps anti-clonotypique KJ126 dirigé contre le TCR DO10-11 et exprimant CCR3 ou CCR4.

Question 16. Analysez ces résultats.

Question 17. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre quant au rôle respectif des chimiokines Eotaxine et MDC ?

Expérience 6 :

Dans une dernière série d'expériences, des souris ayant reçu une injection de cellules polarisées Th2 ou Th1 reçoivent, 30 minutes avant chaque injection quotidienne d'antigène OVA, une injection d'anticorps anti-Eotaxine ou anti-MDC ou d'anticorps témoin :

- Le pourcentage de cellules $CD4^+$ reconnues par l'anticorps $KJ126^+$ est évalué aux jours 4 et 7. On notera que le nombre de cellules $CD4^+$ total dans les infiltrats reste constant. Les résultats sont présentés sur la Figure 14**A** et **B**.
- Chez les souris ayant reçu une injection de cellules polarisées Th2, le nombre d'éosinophiles au niveau des infiltrats pulmonaires ainsi que les niveaux de production d'IL-4 et IL-5 dans les BAL sont mesurés

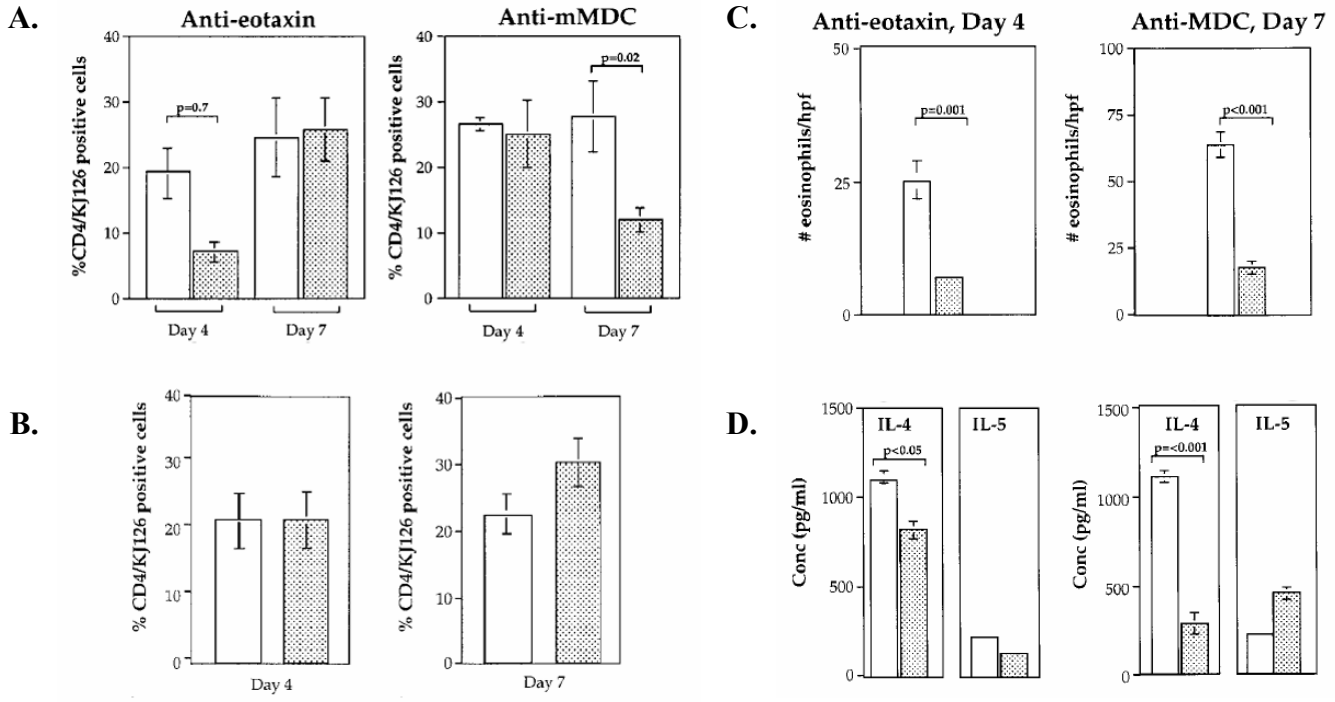


Figure 14

A-B. Pourcentage de cellules $CD4^+$ spécifiques de l'antigène OVA présentes dans les infiltrats pulmonaires de souris traitées avec un anticorps anti-Eotaxine ou anti-MDC (barres hachurées) ou un anticorps contrôle (barres blanches) après transfert de cellules polarisées Th2 (A) ou Th1 (B).

C-D. Nombre d'éosinophiles par champ histologique (hpf) dans les infiltrats pulmonaires (C) et production de cytokines dans les BAL (D) de souris traitées avec un anticorps anti-Eotaxine, au jour 4, ou avec un anticorps anti-MDC, au jour 7 après transfert de cellules polarisées Th2 (barres hachurées). Les barres blanches correspondent au traitement avec l'anticorps contrôle.

Question 18. Analysez ces résultats.

Question 19. Ces derniers résultats vous permettent-ils de préciser vos hypothèses ?