

*Master de Sciences et Technologies
Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire
Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)*

*UE BMC423
Immunologie Fondamentale (IF2007)
26 février au 24 mars 2007*

Travaux Dirigés

Travaux Dirigés

***IF2007 TD-IF 0 : Méthodologie d'analyse scientifique
Organisation des analyses d'articles***

IF2007 TD-IF 1 : Techniques avancées en immunologie

IF2007 TD-IF 2 : Développement du système immunitaire

IF2007 TD-IF 3 : Structure/Fonction des récepteurs de l'immunité

IF2007 TD-IF 4 : Interface Immunité innée/Immunité adaptative

IF2007 TD-IF 5 : Cytokines & Chimiokines

IF2007 TD-IF 6 : Reconnaissances non-classiques

IF2007 TD-IF 7 : Diversité et sélection des répertoires

IF2007 TD-IF 8 : Sélection et Tolérance

IF2007 TD-IF 9 : Révisions/Questions – Sujet d'examen IF2006 juin

IF2007 TD-IF 0 :
Introduction
Distribution de documents
Méthodologie

IF2007 TD-IF 1 :
Techniques avancées en immunologie

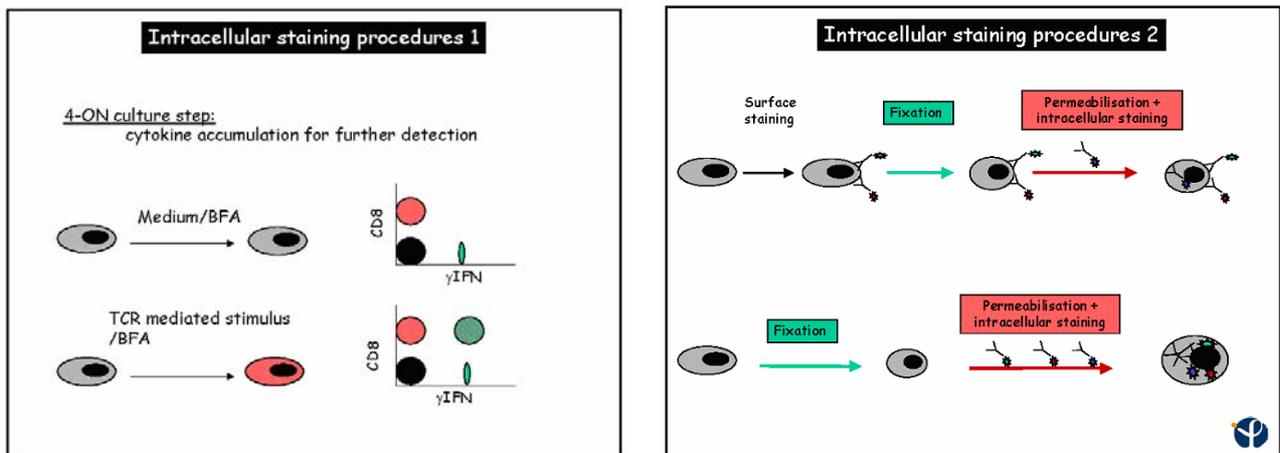
Techniques d'études des réponses immunitaires

I. Principes

(d'après Hernandez-Fuentes M. P. et al. (2003) *J. Immunol. Methods* 196:247 ; éléments du polycopié de TP : The 2nd 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

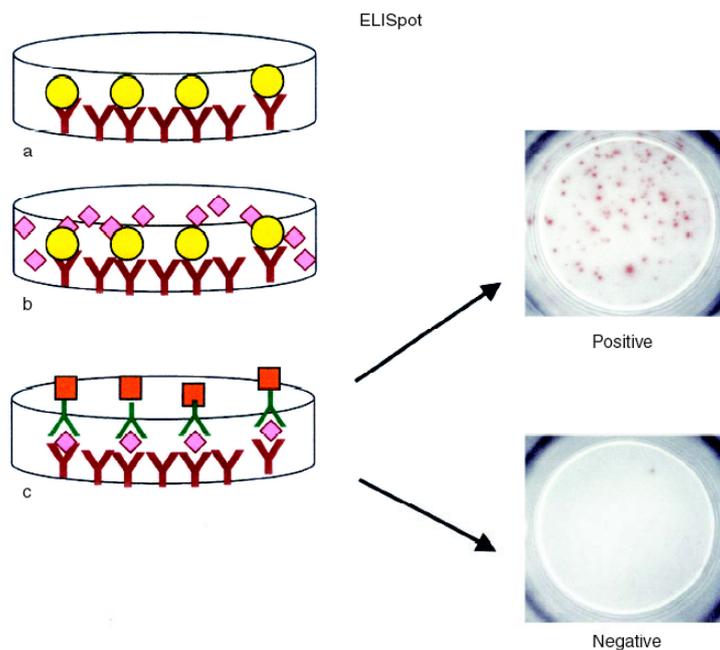


Fig. 3. ELISPOT procedure. (A) Culture wells are coated with the capture antibody and cells are then added. (B) Cultures are incubated for 24–48 h, and the cytokine is produced by the cells. Cells are then removed from the plate, and the cytokine remains bound to the antibody. (C) A detection biotinylated 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.

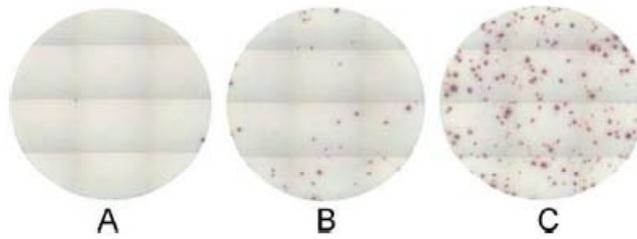


Fig. 1. Wells with different spot counts depicted in the study. (A) Very low spot counts; (B) medium spot counts, and (C) high spot counts.

Partie II

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

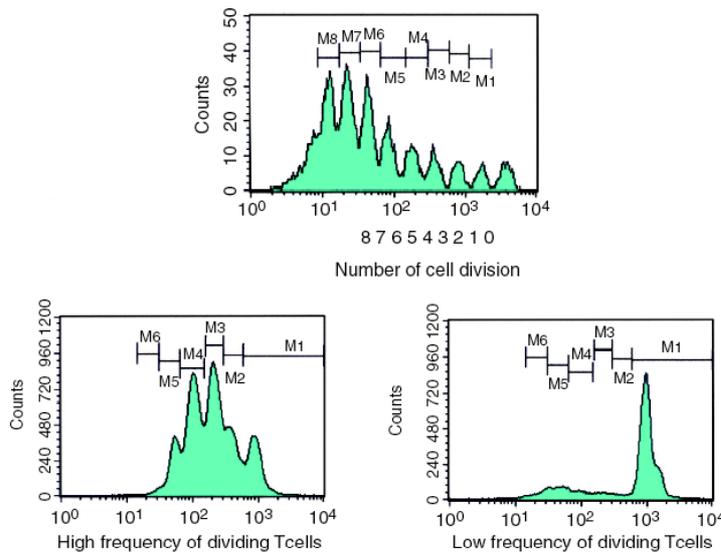
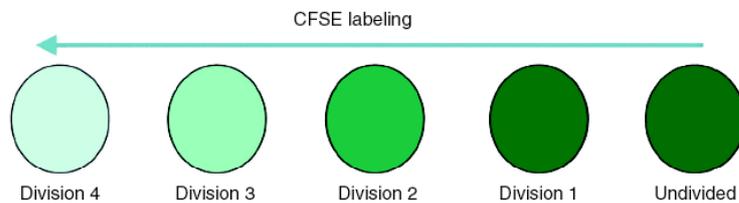
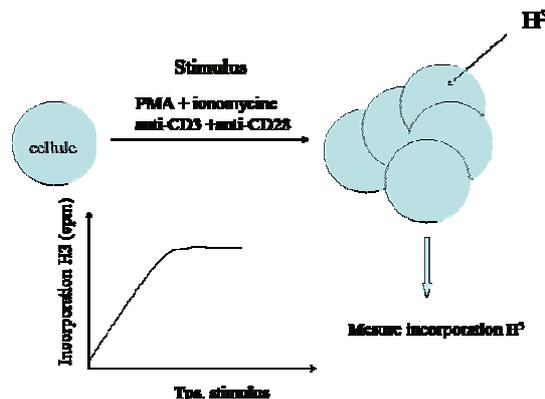


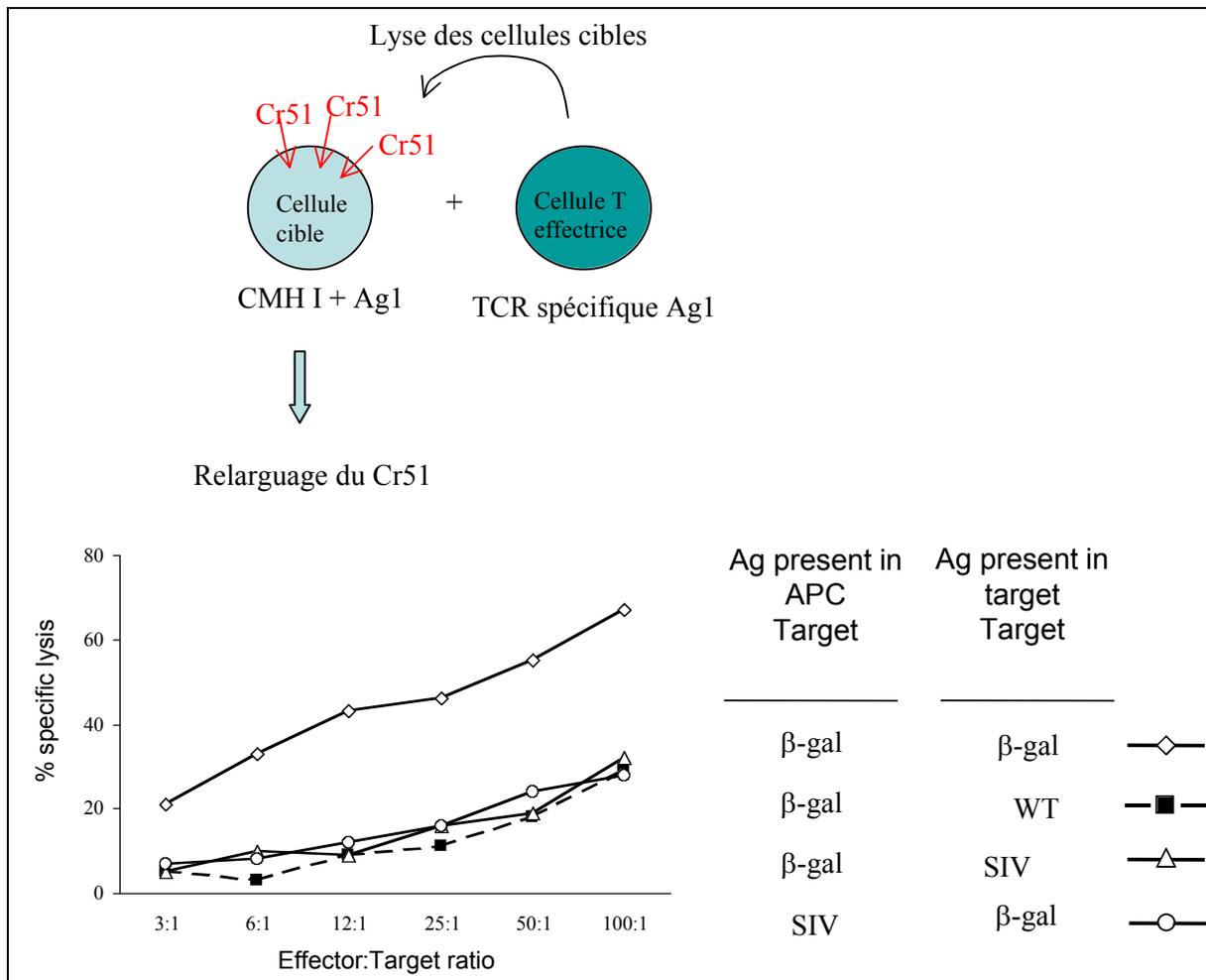
Fig. 4. Flow cytometry analysis of cell division: carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling. Cells are labeled with CFSE prior to culture, and with each division cell fluorescence intensity halves. In T lymphocytes, up to eight cell divisions can accurately be distinguished. Applying methods 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

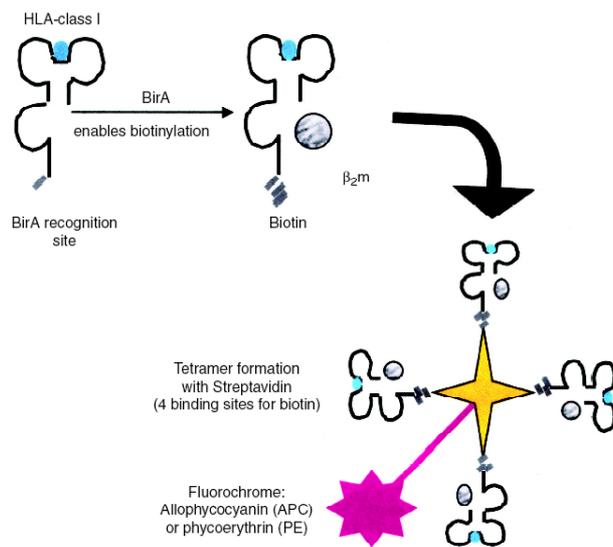


Fig. 6. Flow cytometry analysis of determinant-specific T cells: tetramer-staining. Purified class I MHC molecule-peptide complexes are enzymatically biotinylated by incubation with purified BirA. The heavy-chain fusion protein is folded *in vitro* in the presence of β_2 -microglobulin. The complex is 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 (Cytomégalovirus). 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 γ produit par les cellules a été détecté par 2 techniques (**Figure 1A et B**).

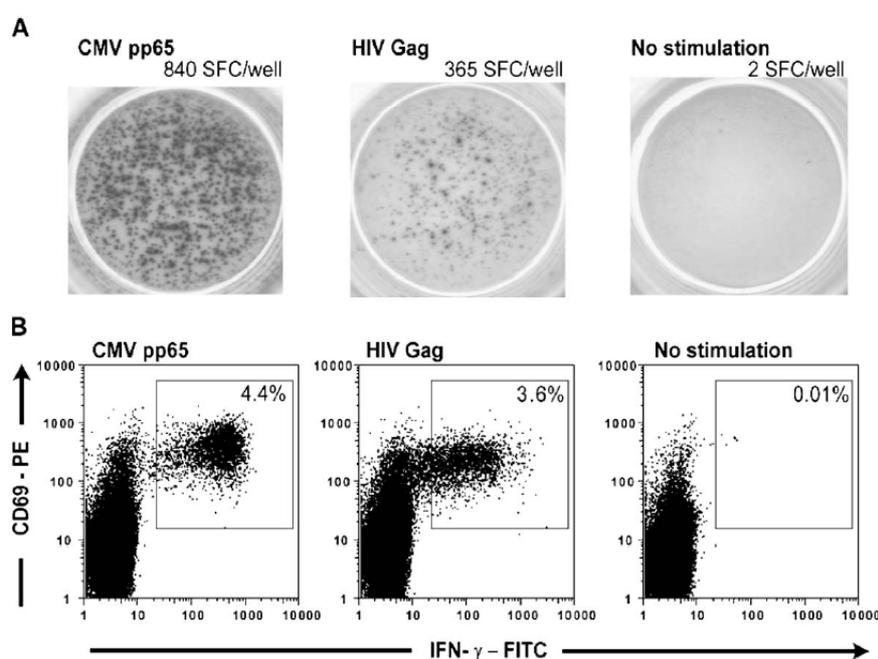


Fig. 1. Responses to CMV pp65 and HIV-Gag (SF2) peptide pools as detected by ELISPOT and CFC assays. The response to no stimulation is also included as a negative control. (A) In the ELISPOT assay, IFN- γ -producing T cells were identified in each well (of a 96-well microtiter plate) as spots with a fuzzy border and a brown color. Triplicate wells of plated PBMC (at a concentration of 2×10^5 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⁺ T cells and then the percentage of CD69⁺ IFN- γ -producing CD3⁺ 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 γ (**Figure 2B**).

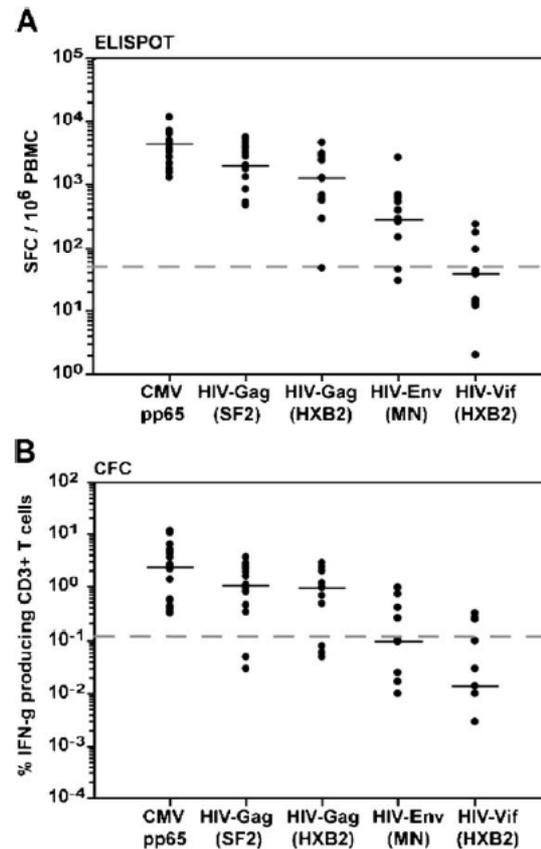


Fig. 2. Magnitude of antigen-specific T cells expressed as (A) SFC/10⁶ PBMC in the ELISPOT assay and (B) the percentage of IFN- γ -producing CD3⁺ T cells in the CFC assay. Only subjects with results obtained using both assays are included. A dashed line indicates the cutoff value for each assay.

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, lymphes, organes lymphoïdes secondaires...).

Il existe 2 catégories de lymphocytes T effecteurs : les lymphocytes de type Th1 qui produisent les cytokines IFN- γ 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- γ par les cellules du sang adulte sont mesurées par 2 méthodes différentes (**Figure 3C, F, G, D et H**).

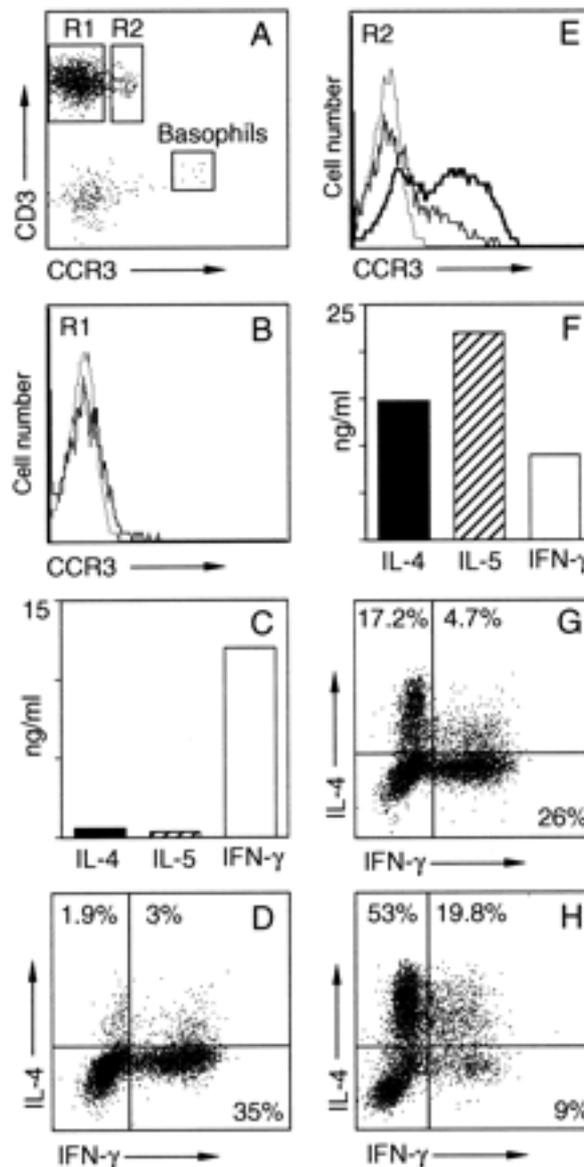


Figure 3

- (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- γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la fenêtre R1 ; (F) : Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la fenêtre R2 ; (D) : Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par les cellules de la fenêtre R1 ; (G) : Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par les cellules de la fenêtre R2 ; (H) : Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) 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 γ sont alors détectées (marquage intracellulaire) ainsi que l'expression de CCR-3 (**Figure 4**)

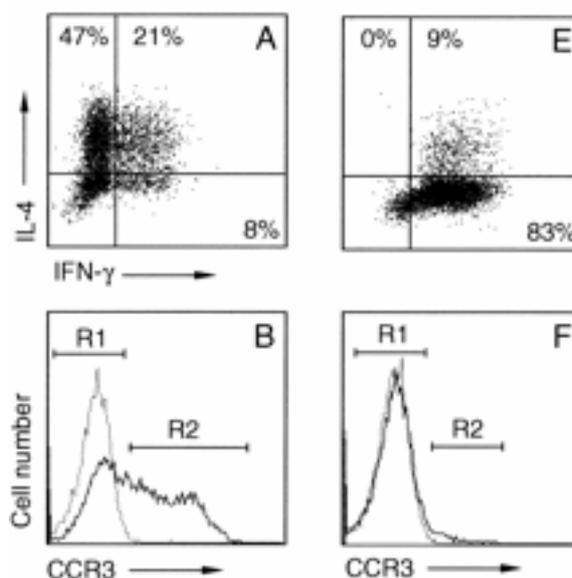


Figure 4

(A) Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ 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- γ 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- 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 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- α ou du TGF- β . Les productions des cytokines IL-4 et IFN γ sont alors détectées (marquage intracellulaire) ainsi que l'expression de CCR-3 (**Figure 5**).

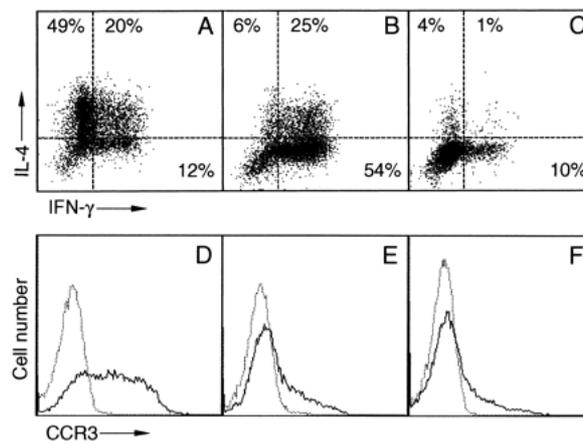


Figure 5

- (A) Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- 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 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- α ; (F) Expression de CCR-3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF- β

- Question 9. 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 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**.

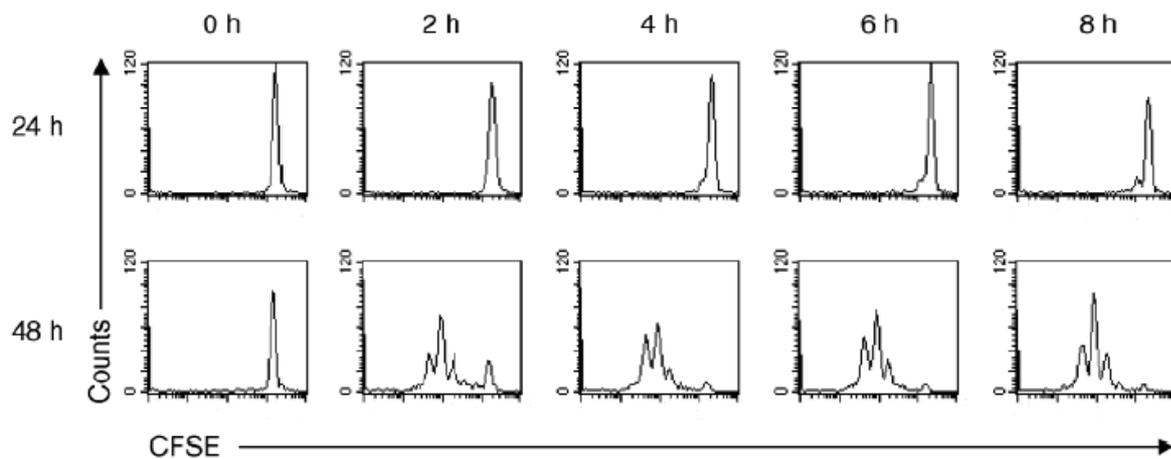


Figure 6

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**).

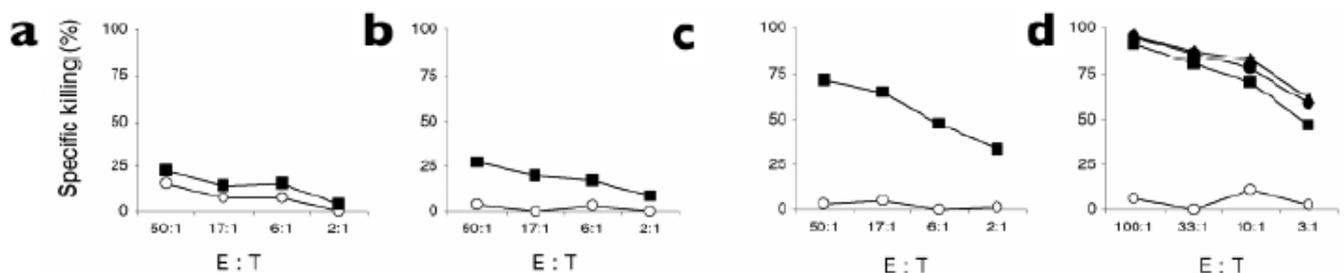


Figure 7

(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 ?

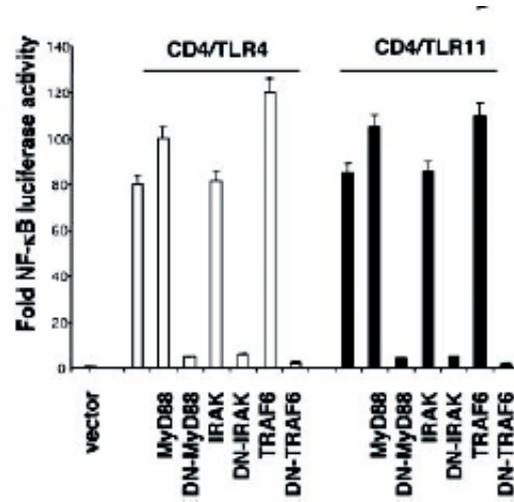
Exercice IV

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- κ B. L'activation de NF- κ 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

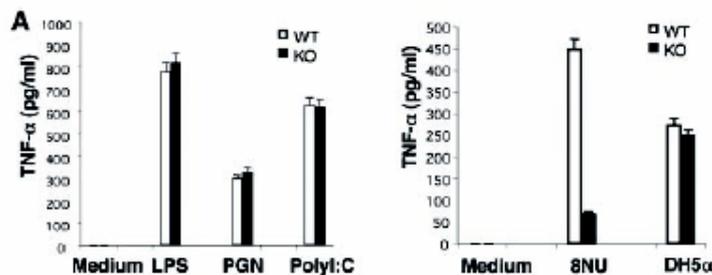
L'activité luciférase a été mesurée dans les cellules 293 exprimant soit la protéine de fusion CD4/TLR4 soit CD4/TLR11. L'expérience a été réalisée dans des cellules de type sauvage, ou dans des cellules exprimant soit MyD88 ou un mutant de MyD88 (DN-MyD88), soit IRAK ou un mutant de IRAK (DN-IRAK), 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^{-/-}). Les macrophages isolés chez des souris de type sauvage ou des souris TLR11^{-/-} 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 α d'E. Coli. Le TNF- α 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 ?*

IF2007 TD-IF 2 :
Développement du système immunitaire

Développement du système immunitaire

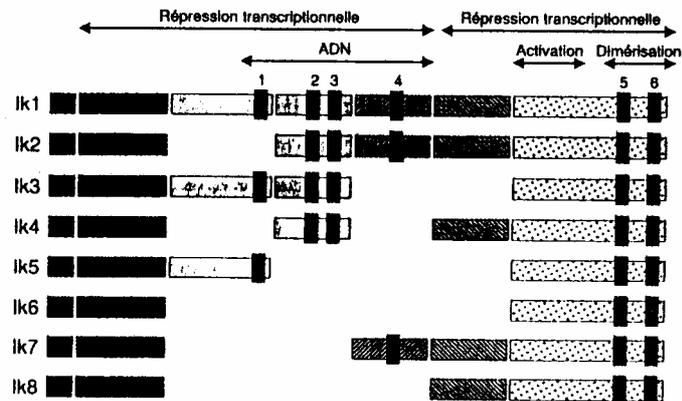
I.

La production continue des cellules des différentes lignées sanguines est assurée par une seule population cellulaire, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques est essentiellement gouvernée par des facteurs intervenant à des stades précis de leur différenciation en différentes cellules du sang. Des expériences de manipulations génétiques, en particulier de perte de fonction, ont permis d'ordonner l'intervention de ces différentes molécules.

Nous vous proposons d'étudier un de ces facteurs de transcription appelé Ikaros et de déterminer son rôle dans la différenciation des CSH et dans la mise en place du système immunitaire. Il existe 6 isoformes Ikaros (Ik1 à Ik6) produites par épissage alternatif du même gène. Ces isoformes sont représentées sur la figure ci-dessous. L'isoforme la plus longue (Ik1) possède 4 motifs à doigts de zinc en position N terminale permettant la liaison à l'ADN et 2 doigts de zinc en position C-terminale impliqués dans les propriétés de dimérisation des différents facteurs Ikaros.

Figure 1 : Représentation schématique des différentes isoformes de la protéine Ikaros

Les limites des exons sont indiquées. Les domaines codant pour les doigts de zinc sont numérotés de 1 à 6. Les doigts F1 à F4 sont responsables de la capacité de liaison à l'ADN. Les doigts F5 à F6 permettent l'association avec les différents membres de la famille Ikaros. La fonction des différents domaines protéiques produits est indiquée.



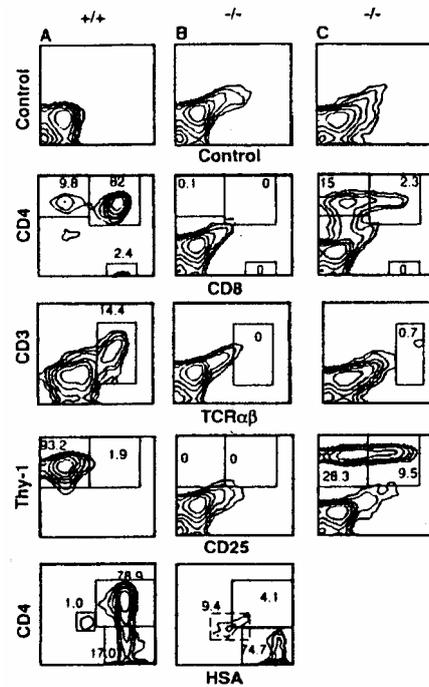
Par manipulation génétique, des souris mutantes synthétisant des molécules Ikaros délétées au niveau des motifs à doigts de zinc nécessaires à leur liaison à l'ADN ont été obtenues. La majorité des souris mutantes meurent entre la première et la troisième semaine de leur vie ; ces souris sont dépourvues de ganglions lymphatiques.

Dans un premier temps, les thymus des souris homozygotes pour la mutation sont analysés. Contrairement aux souris sauvages, les thymus des animaux mutants apparaissent rudimentaires. Bien que les structures épithéliales soient identiques à celles des souris sauvages, le nombre des thymocytes est cependant très réduit (10^5 cellules/ 10^8 cellules). Une analyse par cytométrie en flux est réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques de sous-populations thymiques.

Question 1. Interprétez les résultats obtenus à la Figure 2.

Figure 2 : Flow cytometric analysis of cells in the rudimentary Thymus of Ikaros mutant mice

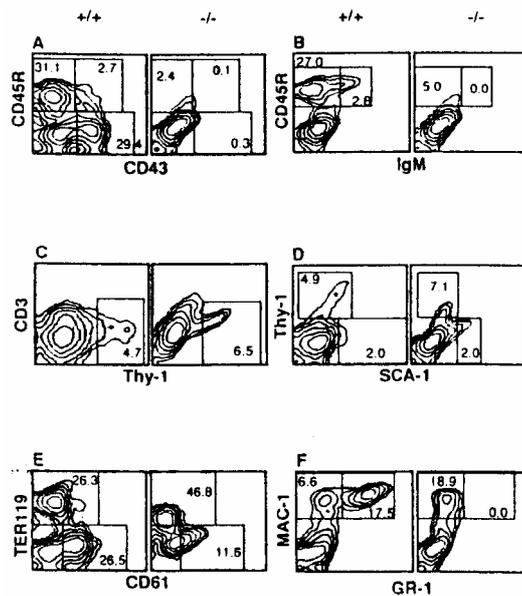
(A) The cell composition of the thymus in wild-type controls (+/+; 2×10^5 cells recovered per thymus) and in Ikaros mutant mice (-/-; B and C) was determined. A maximum of 1×10^5 cells were recovered per thymus in 62 out of 65 mutant animals (irrespective of age); a group of three 2-week-old mutant mice is shown in (B). In 3 out of 65 mutant animals, 0.5×10^6 to 1×10^6 cells were recovered per thymus. From this group of three, the thymus with the most definitive T cell phenotype is shown in (C). Cells were double stained with a pool of FITC- and PE-conjugated isotype controls, anti-CD4^{PE}/anti-CD8^{FITC}, anti-CD3^{PE}/anti-TCR $\alpha\beta$ ^{FITC}, anti-Thy1.2^{PE}/anti-CD25^{FITC}, and anti-CD4^{PE}/anti-HSA^{FITC}. Positive populations are boxed and percentages are indicated. Animals whose cell analysis is shown were 2 weeks of age.



La même étude par cytométrie en flux est réalisée sur les cellules de la moelle osseuse de souris mutantes à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs de différenciation des cellules hématopoïétiques.

Figure 3 : Hematopoietic populations in the bone marrow of Ikaros mutant mice

Bone marrow cells recovered from the two femurs of 2-week old Ikaros mutant mice (-/-; 0.5×10^6 to 1.5×10^6 cells) and of wild-type littermates (+/+; 1×10^7 to 2×10^7 cells) were analyzed with the following combinations of Mabs: anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (A); anti-CD45^{PE}/anti-IgM^{FITC} (B); anti-CD3^{PE}/anti-Thy1.2^{FITC} (C); anti-Thy1.2^{PE}/anti-SCA-1^{FITC} (D); anti-TER-119^{PE}/anti-CD61^{FITC} (E); and anti-Mac-1^{PE}/anti-Gr-1^{FITC} (F). Positive populations are boxed and percentages are shown.



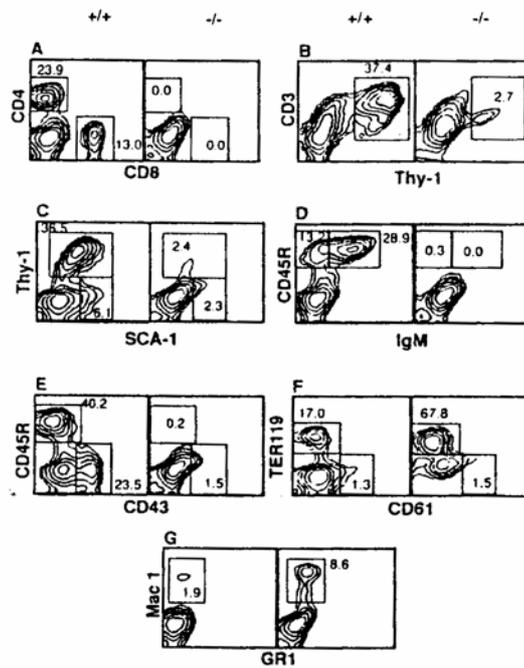
Question 2. Interprétez les résultats obtenus à la Figure 3.

En l'absence de ganglions lymphatiques, la rate reste le seul véritable organe lymphoïde secondaire chez les souris mutantes. Les proportions des différentes populations hématopoïétiques sont analysées par cytométrie en flux.

Question 3. Interprétez les résultats de la Figure 4.

Figure 4 : Hematopoietic populations in the spleen of Ikaros mutant mice

After red blood were lysed with NH₄Cl, cells from the spleen of 2-week-old Ikaros mutant mice (-/-; 3x10⁷ to 10x10⁷ cells per animal) and wild-type littermates (+/+; 4x10⁷ to 10x10⁷ cells per animal) were examined with the following combinations of Mabs: anti-CD4^{PE}/anti-CD8^{FITC} (A); anti-CD3^{PE}/anti-Thy1.2^{FITC} (B); anti-Thy1.2^{PE}/anti-SCA-1^{FITC} (C); anti-CD45^{PE}/anti-IgM^{FITC} (D); anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (E); anti-TER-119^{PE}/anti-CD61^{FITC} (F); and anti-Mac-1^{PE}/anti-Gr-1^{FITC} (G). Positive populations are boxed and percentages are indicated.



Le nombre de cellules NK présentes dans la rate reste faible même chez les souris sauvages (2-5%). Afin d'identifier la présence de ces cellules chez les souris mutantes, des tests de cytotoxicité sont réalisés. Des dilutions de cellules spléniques de souris sauvages ou mutantes sont cultivées en présence d'IL2 pendant 48 à 72 h. Ces conditions de culture permettent de générer des cellules NK activées prêtes à lyser leurs cellules cibles (cellules YAC-1). Les résultats des expériences sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Effector-to-Target Cell Ratio	Percent Lysis* (%)			
	Experiment 1 (Standard Deviation)		Experiment 2 (Standard Deviation)	
	+/+	-/-	+/+	-/-
60:1	59 (6)	1	ND	ND
30:1	48 (4)	2	75 (15)	4
15:1	43 (6)	4 (1)	57 (3)	10
7.5:1	16 (2)	4	29 (4)	2

Spleen cells from wild type (+/+) or Ikaros mutant (-/-) mice were cultured in complete RPMI medium containing 500 U/ml recombinant interleukin-2 for 72 hr and were then cultured in triplicate with 3000 Cr⁵¹-labeled Yac-1 cells in the indicated ratios in a standard 4 hr chromium release assay. Abbreviations: ND, not determined; and CPM, counts per minute.

* Percent lysis = $\frac{[\text{CPM} - \text{spontaneously released CPM}] \times 100}{[\text{Total lysis CPM} - \text{spontaneously released CPM}]}$

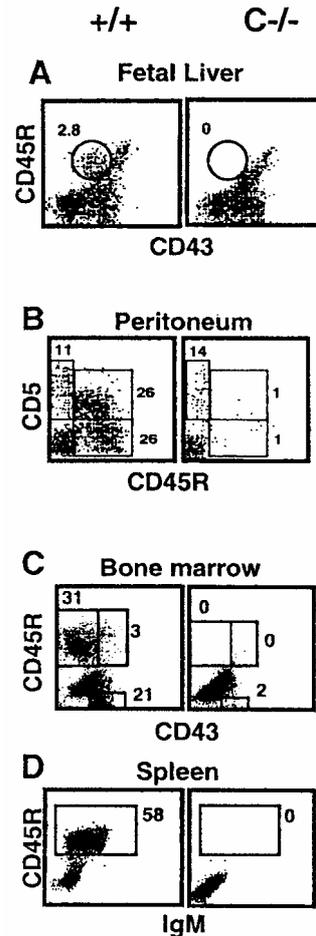
Question 4. Interprétez les résultats. D'après les résultats obtenus, que pouvez-vous déduire du rôle d'Ikaros dans la mise en place des lignages hématopoïétiques ?

Un nouveau lot de souris mutantes est obtenu par manipulation génétique. Ces souris mutantes synthétisent des molécules Ikaros délétées du domaine C-terminal codé par l'exon 7 du gène *Ikaros*. Ce domaine contient les motifs à doigts de zinc nécessaires à la dimérisation des molécules Ikaros et des motifs essentiels à l'activation de la transcription. Contrairement aux premières souris mutantes, les souris homozygotes pour cette nouvelle mutation peuvent vivre jusqu'à l'âge de 4 mois.

La présence des lymphocytes B et de leur précurseur est analysée dans les tissus lymphoïdes de fœtus et de souris adultes âgées de 4 mois par double immunofluorescence en cytométrie de flux.

Figure 5: Fetal and adult B cell development in Ikaros C^{-/-} mice

Cells obtained from the embryonic day 16 (E16) fetal liver (A) and peritoneum (B), bone marrow (C), and spleen (D) of 4-week-old Ikaros C^{-/-} mice and wild-type littermates were analysed with the following combinations of Mabs: anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (A); anti-CD5^{PE}/anti-CD45R^{FITC} (B); anti-CD45^{PE}/anti-CD43^{FITC} (C); anti-CD45^{PE}/anti-IgM^{FITC} (D). Positive stained populations are boxed and percentages are shown. Fetal liver pre-B cell precursors (CD45R⁺) and their progeny, peritoneal B-1a B cells (CD5⁺/CD45R⁺), were absent in Ikaros C^{-/-} mice. Bone marrow pro-B cells and splenic B cells were also missing from all C^{-/-} mice tested.

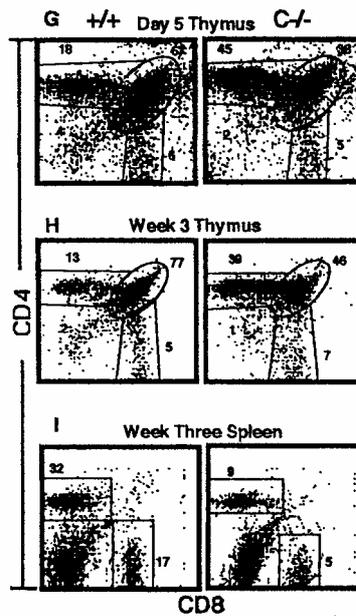


Question 5. Analysez et interprétez les résultats obtenus à la Figure 5.

Les sous-populations thymiques sont analysées par double immunofluorescence en cytométrie de flux à l'aide d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Ces mêmes anticorps sont utilisés sur des cellules spléniques de souris âgées de 3 semaines.

Figure 6

Cytofluorometric analyses of 5-day-old and 3-week old animals is shown (G and H). At 5 days after birth, Ikaros C^{-/-} thymi contain 100- to 300-fold fewer thymocytes than age-matched wild-type thymi. An increase in the proportion of CD4 single positive thymocytes is detected even at this early stage in thymocyte development (G). The increase in the proportion of CD4 single positive thymocytes persists in the adult C^{-/-} thymus in which the total number of thymocytes has reached nearly normal levels (H). Single positive CD4 and CD8 thymocytes are exported to the spleen (I). Thymocytes and splenic populations were stained with FITC- and PE-conjugated isotype control antibodies (data not shown) or anti-CD4-PE and anti-CD8-FITC. Positively stained populations are boxed and percentages are indicated.



Question 6. Analysez et interprétez les résultats présentés à la Figure 6.

La proportion des lymphocytes $T\gamma\delta$ dans différents tissus est également analysée par cytométrie en flux.

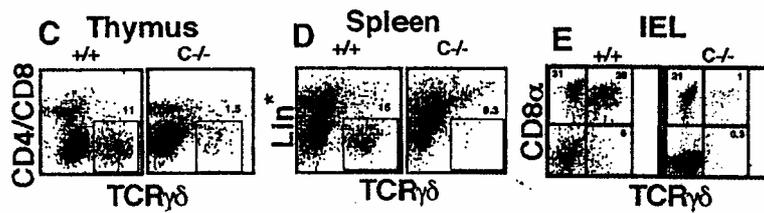


Figure 7

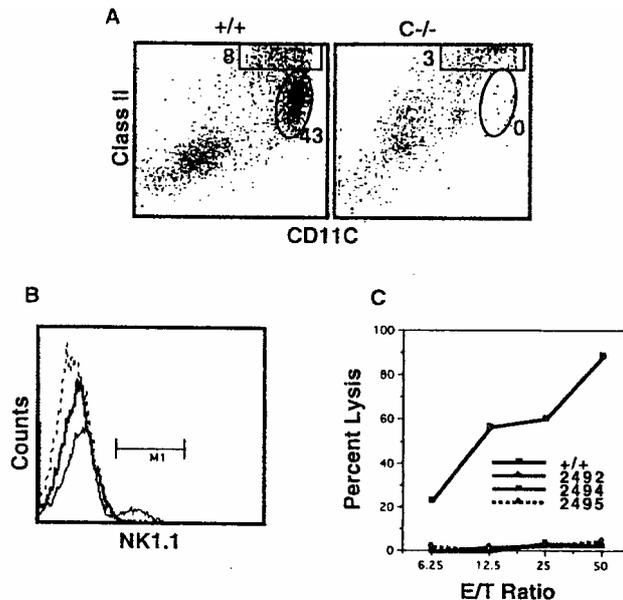
Thymocyte (C) and splenic populations (D) depleted of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells and lineage cells, respectively, were analysed for their $\gamma\delta$ T cell content. $\gamma\delta$ T cells were detected in the thymus of mutant mice but at significantly reduced levels. They were not present in the spleen in any appreciable number. Intestinal intraepithelial lymphocytes (E) were analysed for their $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ composition. The great majority of Ikaros $C^{-/-}$ IELs were $\alpha\beta$ T cells. No appreciable numbers of $\gamma\delta$ T cells were present.

Question 7. *Interprétez les résultats présentés à la Figure 7.*

Les pourcentages des cellules dendritiques thymiques et des cellules NK spléniques sont déterminés par cytométrie en flux chez les souris mutantes et sauvages.

Figure 8

Lineage-depleted splenocytes from Ikaros $C^{-/-}$ and wild-type mice were stained with an antibody to NK1.1, which is expressed on mature NK cells of the C57BL/6 background (A). Among Lin^{-} splenocytes in the wild type, 3%–5% were NK1.1 $^+$. No NK1.1 $^+$ cells were detected in the Ikaros $C^{-/-}$ spleen. The broken line histogram indicates the isotype control, whereas simple and bold line histograms show NK1.1 staining of the respective wild-type and Ikaros $C^{-/-}$ splenocytes. NK cell function in Ikaros $C^{-/-}$ and wild-type controls was tested by culturing splenocytes for 4 days in the presence of 500 U/ml of IL-2 (B). In wild-type mice, these conditions are known to generate activated NK cells that can readily lyse Yac-1 targets. Spleen cells from wild-type mice lysed chromium-labeled Yac-1 over a wide range of effector to target cell ratios. In contrast, spleen cells from Ikaros $C^{-/-}$ mice were unable to lyse NK targets even at the highest effector to target cell ratio. Lineage-depleted thymocytes from Ikaros $C^{-/-}$ and wild-type mice were stained with antibodies to class II and CD11c antigens expressed on mature dendritic APCs (C). $CD11c^+/class II^{MHC}$ APCs were absent from the Ikaros $C^{-/-}$ spleen. Interestingly $CD11c^+/class II^{MHC}$ cells were present. These cells may represent a distinct class or state of maturation of APCs.



Question 8. *Interprétez les résultats présentés à la Figure 8.*

De la même façon, les pourcentages des cellules des lignées érythroïdes et myéloïdes sont analysés dans le foie fœtal ainsi que dans la rate et la moelle osseuse des souris âgées de trois semaines.

Question 9. *Interprétez les résultats présentés à la Figure 9.*

Un anticorps polyclonal dirigé contre le domaine N-terminal des protéines Ikaros est utilisé en Western-blotting sur des extraits nucléaires provenant de cellules thymiques de souris mutantes ou sauvages âgées de 2 à 4 semaines.

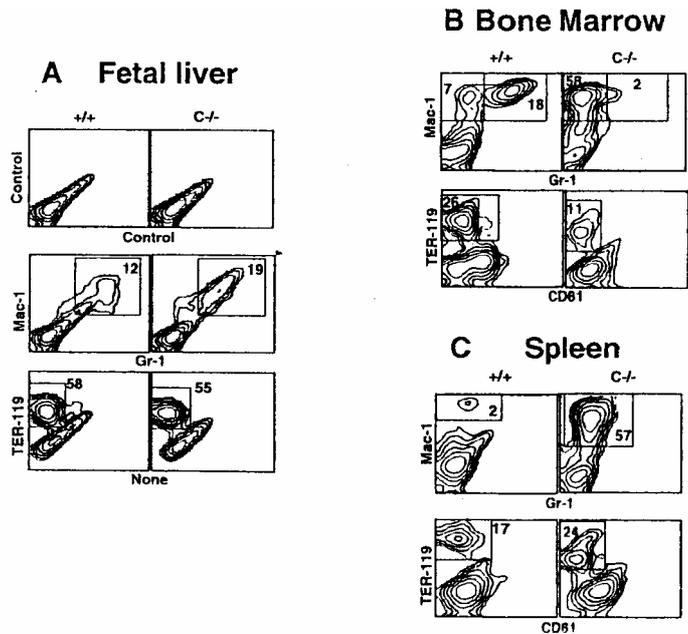


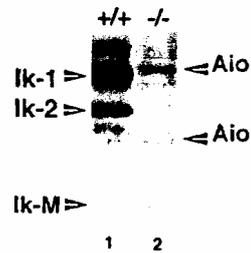
Figure 9

Fetal and Postnatal Waves of Myeloid and Erythroid Differentiation in Ikaros C-/- Mice

Cells obtained from the E16 fetal liver (A) and from the bone marrow (B) and spleen (C) of 3-week-old wild-type and Ikaros C-/- mice were stained with anti-Mac-1-PE/anti-Gr-1-FITC, anti-TER-119-PE, and anti-TER-119-PE/anti-CD61-FITC, respectively. Positively stained populations are boxed and percentages are shown. Similar percentages of granulocyte (Mac-1⁺/Gr-1⁺) cells were detected in the fetal liver of wild-type and Ikaros C-/- mice. The granulocyte population was significantly decreased in the bone marrow of Ikaros mutant mice. The percentage of Mac-1⁺/Gr-1⁻ cells (which includes committed myeloid precursors, mature monocytes, and macrophage) was significantly increased in both the spleen and bone marrow of Ikaros mutant mice. The percentages of committed erythroid precursors (TER-119⁺) were similar in fetal and adult hematopoietic sites of Ikaros C-/- and wild-type mice.

Figure 10

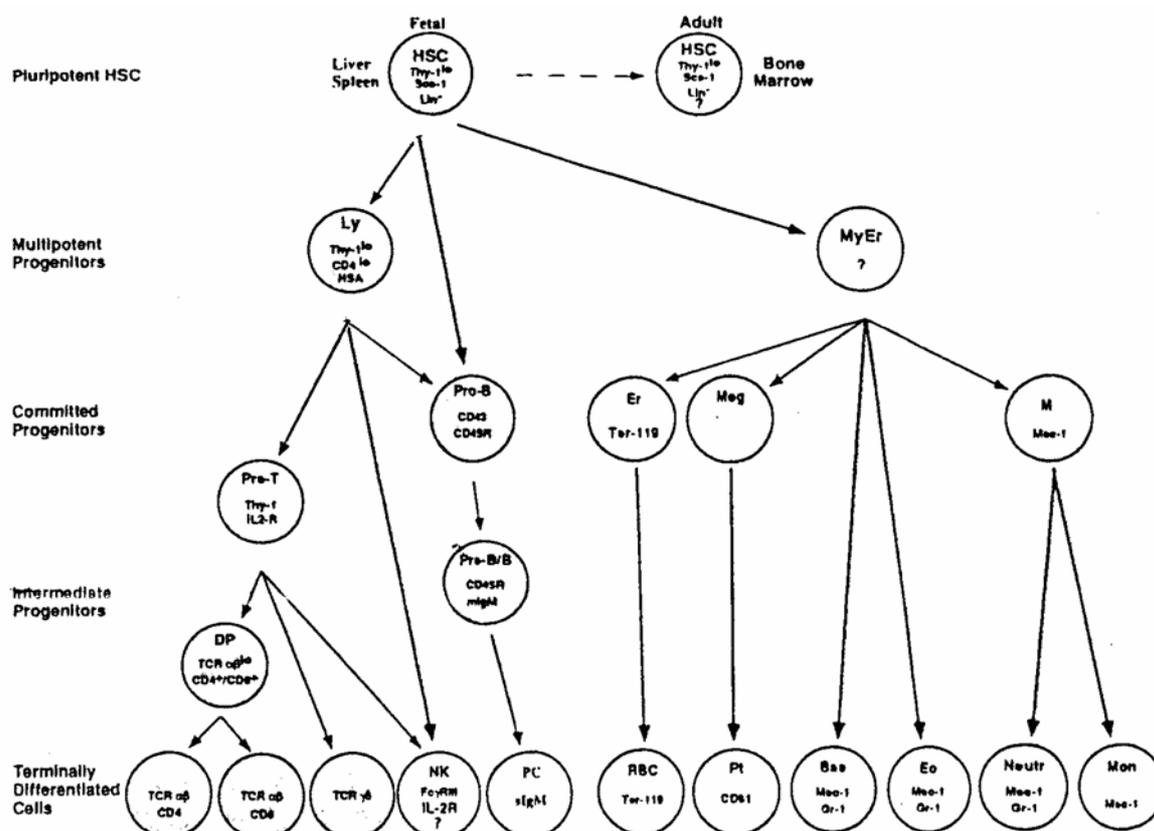
Western blot analysis of nuclear extracts prepared from the thymus of 2- to 4-week-old mice revealed that C-/- mice (lane 2) lack wild-type Ikaros isoforms (Ik-1 and Ik-2) and have a truncated Ikaros protein (Ik-M) that is present in a >100-fold lower concentration than the wild-type Ikaros isoforms (Ik-1 and Ik-2) produced in +/+ mice (lane 1). The antibody used was raised to the N-terminal domain of Ikaros proteins.



Question 10. Analysez les résultats obtenus à la **Figure 10**. A quoi peuvent correspondre les deux bandes (Aio) persistant sur le Western blot des souris mutantes C-/- ?

Question 11. Ces expériences confirment-elles l'hypothèse émise sur le rôle d'Ikaros lors de l'étude des premières souris mutantes ? Comment expliquez-vous la présence d'une différenciation T chez le deuxième lot de souris mutantes ?

Question 12. Indiquez sur le schéma de différenciation des lignées hématopoïétiques ci-dessous, où se situe l'intervention des gènes et des protéines Ikaros.



II.

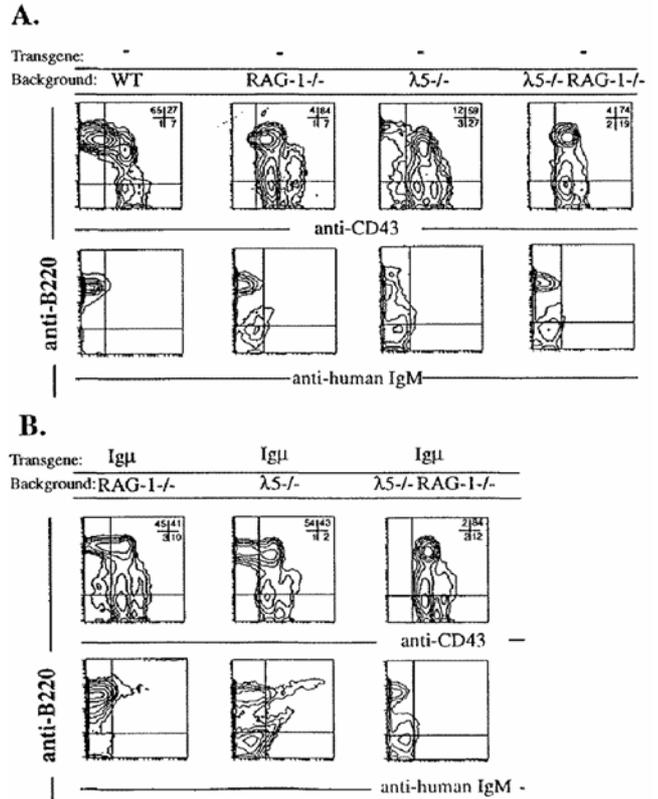
(d'après Papavasiliou, F. *et al.* (1996) *J.Exp.Med.* 184:2025)

Les auteurs de cette étude ont examiné le rôle de différents composants du récepteur pré-BCR dans le développement des cellules B. Ils ont introduit plusieurs transgènes d'immunoglobuline (Ig) dans des souris RAG^{-/-}, $\lambda 5^{-/-}$ et double mutants (RAG^{-/-} $\lambda 5^{-/-}$). Tous les transgènes sont des gènes réarrangés sous contrôle du promoteur VH et de l'enhancer IgH. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes :

Figure 11 : Analyse par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris âgées de 6 à 8 semaines.

- A. Souris sauvages (WT) et mutantes (RAG-/-, λ5-/- et double mutantes RAG-/- λ5-/-).
- B. Souris chez lesquelles on a introduit un transgène codant la forme membranaire de la chaîne μ humaine (Igμ).

Les cellules ont été marquées par des anticorps anti-B220, anti-CD43 et anti-IgM humain (ne reconnaît que IgM humaine). Le pourcentage de lymphocytes présents dans chaque cadran est inscrit en haut et à droite pour les marquages B220/CD43.



- Question 1. *Quel est l'effet de l'introduction du transgène Igμ dans les mutants RAG-/-, λ5-/- et RAG-/- λ5-/- ?*
- Question 2. *Que suggèrent ces expériences quant aux éléments nécessaires à l'expression de la chaîne μ à la surface et quant à son effet sur le développement des cellules B ?*
- Question 3. *Donner les raisons qui ont conduit à l'utilisation des souris mutantes RAG-/-, λ5-/- et double mutantes RAG-/- λ5-/-.*
- Question 4. *D'après les résultats présentés aux Figure 13 et Figure 14 que peut-on conclure quant au rôle des chaînes légères dans l'assemblage, le transport et la fonction du récepteur pré-B ?*

Figure 12 : Analyse de l'expression intracellulaire du transgène Igμ humaine dans les cellules B220+CD43+ de la moelle.

Après marquage avec les anticorps anti-B220 et anti-CD43, les cellules des souris utilisées à la Figure 11 ont été fixées, perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-IgM humain.

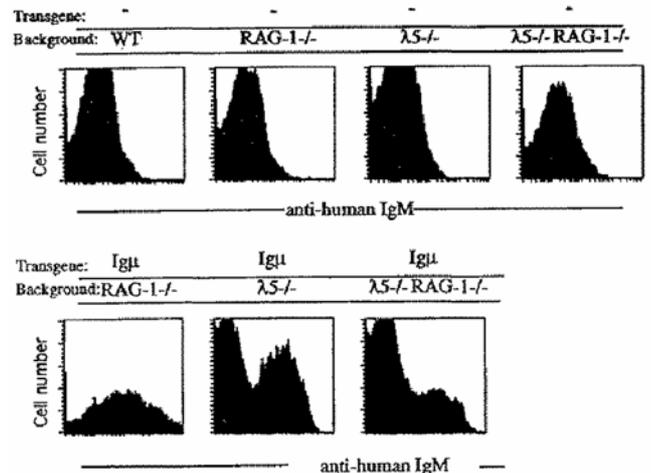


Figure 13 : Analyse du complexe pré-BCR par des expériences d'immunoprécipitation.

Des lignées de précurseurs B immortalisées par le virus d'Abelson ont été obtenues à partir de la moelle de souris de type sauvage (WT), mutantes (RAG-/-), (λ 5-/-) et (RAG-/- λ 5-/-) ainsi que de souris mutantes exprimant le transgène Ig μ humain : (m μ RAG-/-), (m μ λ 5-/-) et (m μ RAG-/- λ 5-/-). Les complexes Ig ont été immunoprécipités avec un immunsérum anti-IgM humain et analysés par la technique de Western blot. Les protéines ont été révélées avec des anticorps anti-IgM humain (hIgM); anti-Ig α (Ig α) et anti-Ig β (Ig β). s.f. : forme membranaire; c.f. : forme cytoplasmique. Après surexposition, on voit apparaître sur un blot une bande correspondant à la forme membranaire (s.f.) de la protéine Ig β dans la 1^{ère} piste (m μ λ 5-/-).

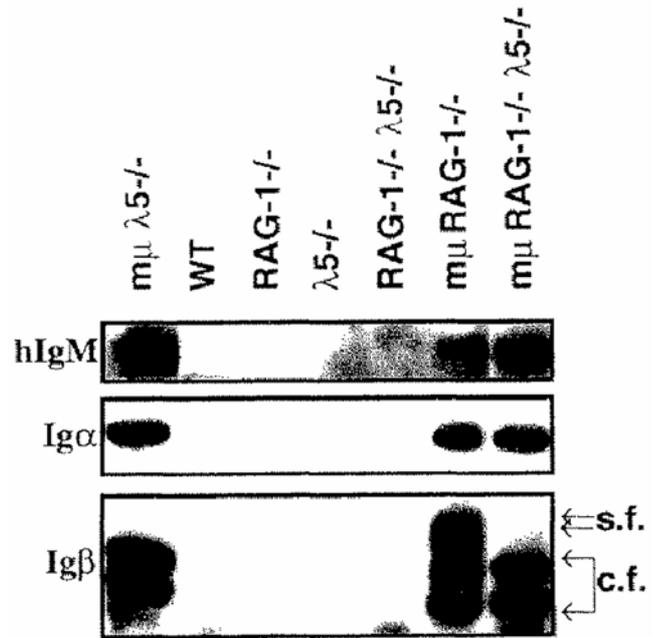
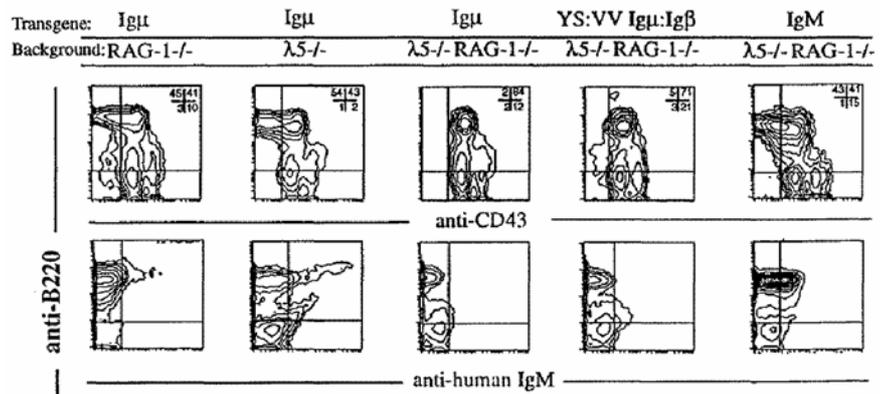


Figure 14 : Analyse par FACS des cellules de la moelle provenant de souris mutantes dans lesquelles on a introduit soit le transgène Ig μ comme précédemment, soit un transgène YS:VV Ig μ :Ig β codant pour une protéine chimérique Ig μ -Ig β , soit un transgène IgM codant pour une immunoglobuline complète (Ig μ /Ig κ).

Voir la légende de la figure 1 pour les détails expérimentaux. N.B. : après introduction des transgènes YS:VV Ig μ :Ig β et IgM, on observe la présence de chaîne μ transgénique dans le cytoplasme des précurseurs de la moelle.



Question 5. Donner un titre qui résume les points essentiels de ces expériences.

IF2007 TD-IF 3 :
Structure/Fonction des récepteurs de l'immunité

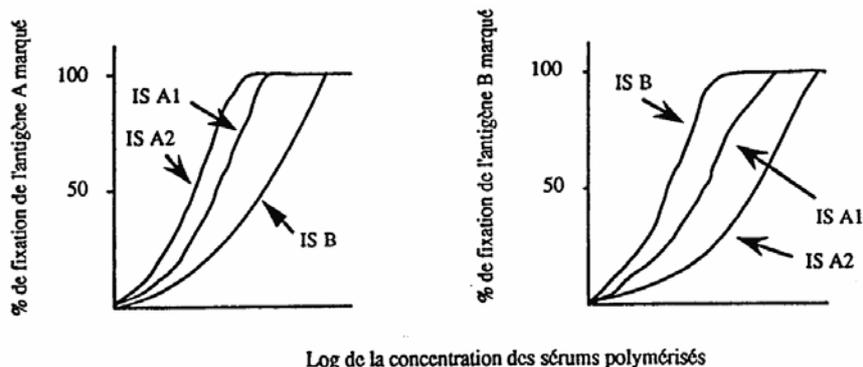
Structure/Fonction des récepteurs de l'immunité

I.

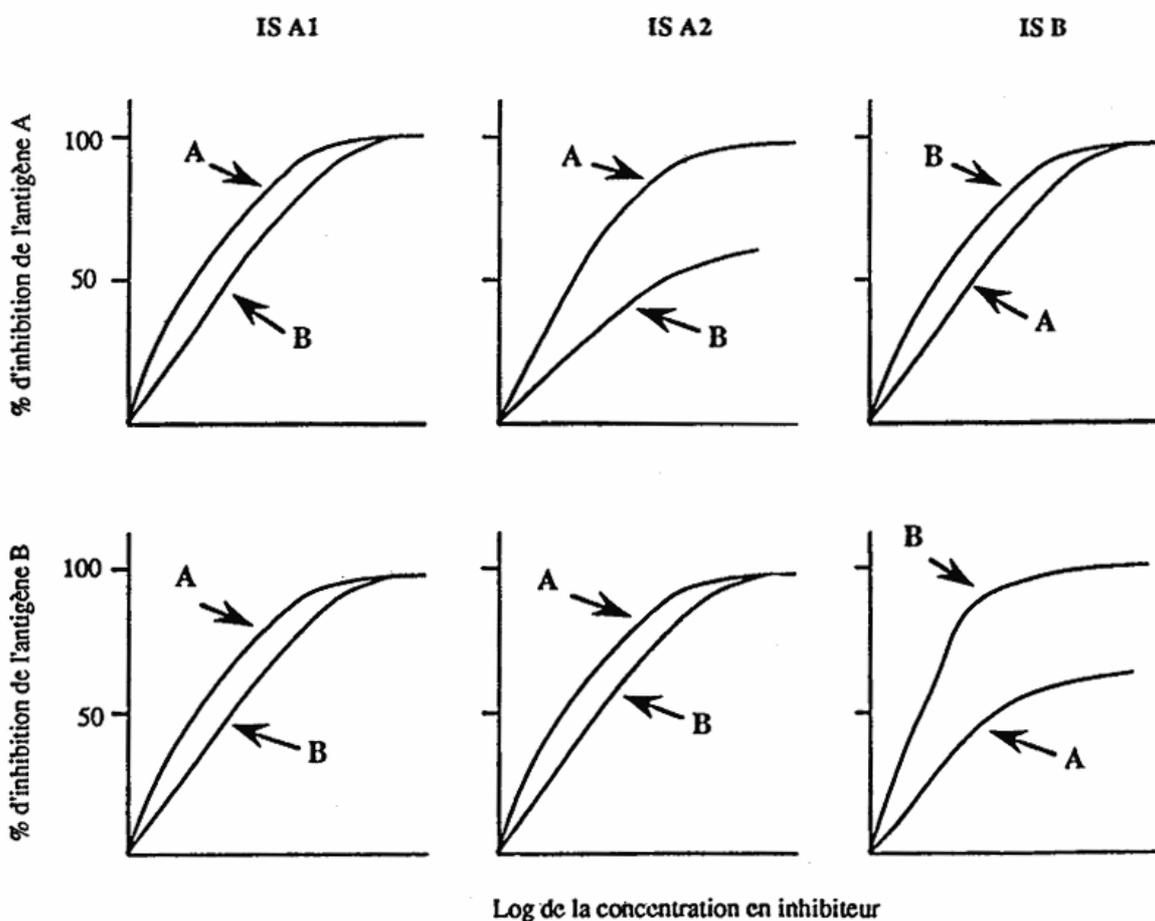
Des immunsérums sont préparés contre deux antigènes A et B :

- deux immunsérums ISA1 et ISA2 sont dirigés contre l'antigène A ;
- un immunsérum ISB est dirigé contre l'antigène B.

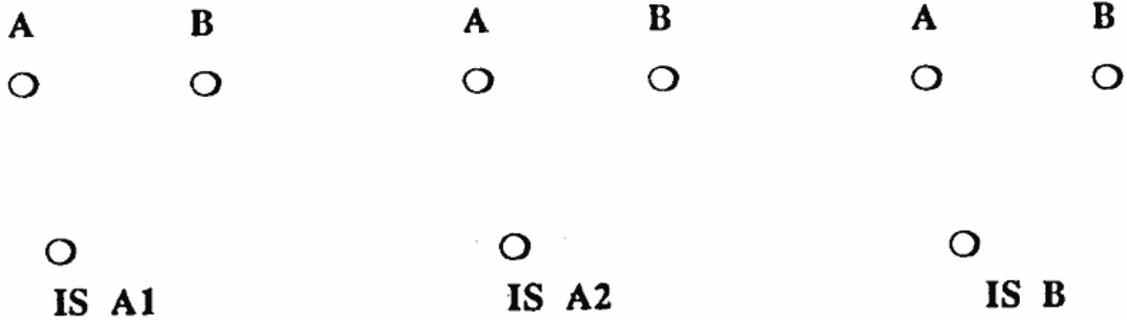
Ces trois immunsérums précipitent en milieu liquide les antigènes A et B. Les courbes de fixation des antigènes marqués sur les sérums insolubilisés sont les suivantes :



L'inhibition de la fixation des antigènes marqués sur les différents immunsérums, par A et B froids, donne les résultats suivants :



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ? Complétez, sur la base de ces conclusions, les schémas suivants (précipitation en milieu gélifié) :



ISB est passé sur une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle l'antigène A est insolubilisé. L'effluent et l'éluat obtenus fixent l'antigène B.

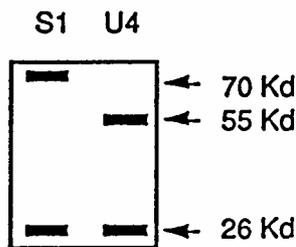
Question 2. Prévoir les courbes d'inhibition de la fixation de B marqué sur les différentes fractions d'anticorps obtenus par A et B froids.

II.

L'hybridome S1 a été obtenu en fusionnant les cellules d'un myélome non sécréteur avec les cellules spléniques d'une souris immunisée contre la phosphorylcholine (PC) couplé à de l'hémocyanine. S1 synthétise un anticorps d'isotype μ, κ . Après un nouveau clonage de l'hybridome S1, 30000 clones sont obtenus, l'un d'eux (U4) est particulièrement étudié.

Les cellules S1 ou U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S . Les immunoglobulines sécrétées sont précipitées par un sérum de lapin anti- κ , puis réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. L'autoradiographie de ce gel est présentée sur la **Figure 1** :

Figure 1



Question 1. Proposer au moins deux hypothèses pour expliquer ces résultats.

La spécificité des immunoglobulines sécrétées par U4 est analysée par des tests d'hémagglutination. Une éventuelle activité anti-PC est recherchée vis-à-vis de la phosphorylcholine couplée aux globules rouges de mouton (PC-GRM). Les titres agglutinants obtenus sont présentés dans le **Tableau 1** :

Tableau 1

Surnageant de culture	GRM	PC-GRM	Hémagglutination de PC-GRM en présence d'un sérum amplificateur	
			Anti-IgM	Anti-IgG1
S1	0*	7	7	7
U4	0	0	0	5

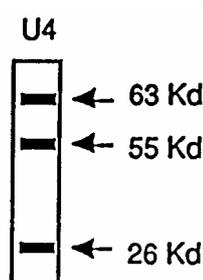
* Titre d'hémagglutination

Question 2. Ces nouvelles données permettent-elles d'étayer l'une des hypothèses formulées précédemment ?

Les cellules U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S , puis lysées. Les immunoglobulines ainsi synthétisées sont précipitées par un anti- κ , réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. La **Figure 2** ci-dessous présente l'autoradiographie obtenue.

Question 3. Comment expliquer la présence des deux chaînes lourdes ? Est-ce compatible avec le caractère monoclonal des hybridomes ?

Figure 2



N.B. : La séquence partielle NH₂-terminale des deux chaînes lourdes est identique au VH de S1.

III.

Une protéine de myélome, de souris BALB/c, appelée TEPC15, et qui possède une spécificité anti-phosphorylcholine (PC), est injectée à une souris de souche A/He. Les splénocytes immuns sont fusionnés aux cellules d'un myélome non sécréteur de souris BALB/c. La spécificité des anticorps monoclonaux anti-T15 est analysée en inhibant l'interaction T15 radioactif/anticorps monoclonaux par d'autres anticorps monoclonaux ou des protéines de myélomes tous d'origine BALB/c (**Tableau 2**).

Tableau 2

Hybridomes anti-T15	Inhibiteurs											
	a	T15	167	603	HPCM2	G1	G3	61	558	104	109	315
	b	κ, α	κ, α	κ, α	κ, μ	$\kappa, \gamma 1$	$\kappa, \gamma 3$	κ, α	λ, α	λ, μ	κ, α	λ, α
c	PC	PC	PC	PC	PC	PC	Lev	Lev	Dex	Lev	TNP	
S1 60	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	
S1 04	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
2E8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

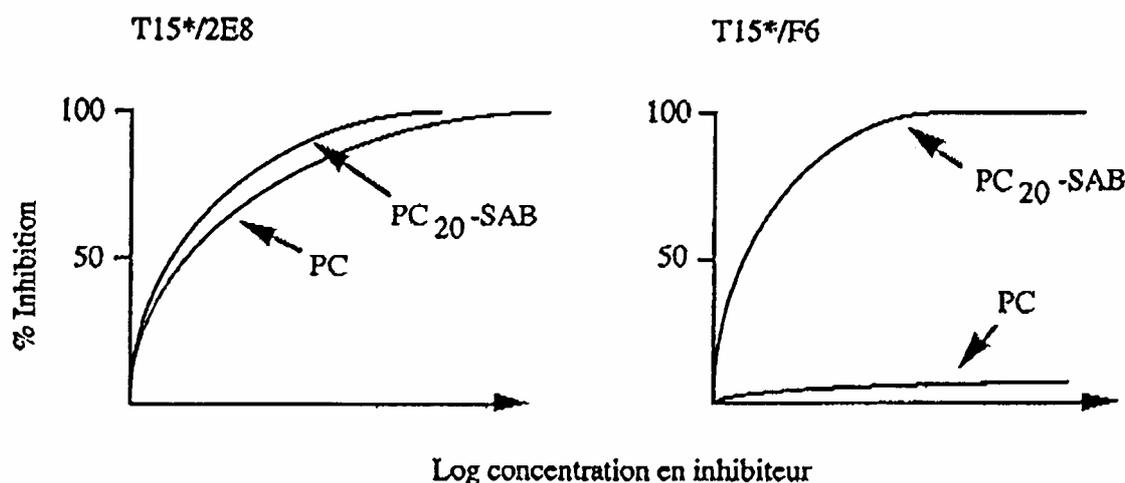
a: Nomenclature des inhibiteurs,
 b: Isotype des chaînes légère et lourde,
 c: Nature de l'antigène reconnu
 PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.
 + = inhibition, - = pas d'inhibition.

Question 1. Quelle peut être la spécificité de chaque anticorps monoclonal ?

L'interaction T15 radioactif/anticorps 2E8 ou anticorps F6 est étudiée en présence de l'antigène PC ou de ce dernier couplé à la sérum albumine bovine (PC₂₀-SAB). La Figure 3 résume les caractéristiques de ces inhibitions.

Question 2. Interpréter ces résultats.

Figure 3



Les quatre anticorps monoclonaux ont été utilisés pour tenter d'inhiber des plages d'hémolyses locales (PFC) obtenues en mélangeant *in vitro* des cellules de souris BALB/c anti-PC, de la PC couplée à des globules rouges de mouton et du complément. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3

Anticorps inhibiteurs	Nombre de PFC anti-PC/rate
-	120 000
S1 60	115 000
S1 04	117 000
2E8	800
F6	950

Question 3. Ces résultats sont-ils en accord avec la spécificité supposée de chaque hybridome ?

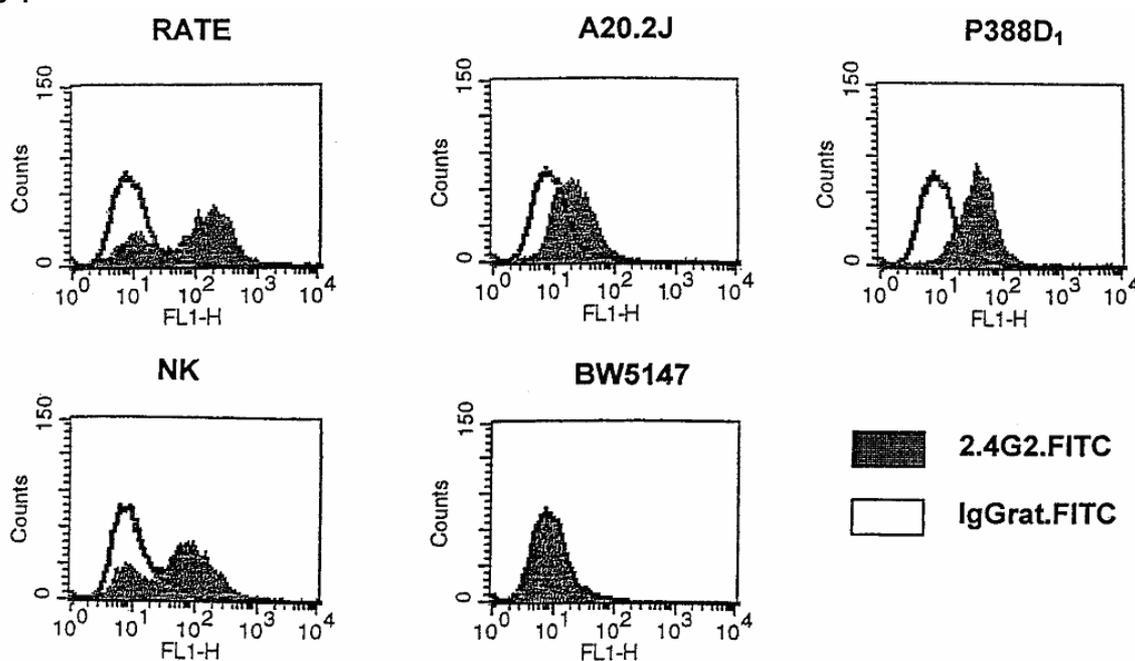
IV.

Il existe, chez la souris, deux types de récepteurs $Fc\gamma$ liant les complexes immuns à IgG, les $RFc\gamma II$ et $RFc\gamma III$ qui sont codés par deux gènes distincts. Les $RFc\gamma II$ et $RFc\gamma III$ sont des glycoprotéines transmembranaires qui présentent une forte identité de séquence dans les régions extracellulaire et transmembranaire mais pas dans les régions cytoplasmiques.

On analyse l'expression et la nature de ces récepteurs sur les cellules du système immunitaire de la souris. On utilise des cellules de rate, différentes lignées cellulaires : lignée de macrophages (P388D1), de cellules B (A20.2J), de cellules T (BW5147), et des cellules NK obtenues par culture de cellules de rate pendant 5 jours en présence d'IL2.

Dans une première expérience, on réalise un test d'immunofluorescence avec un anticorps monoclonal de rat anti- $RFc\gamma II$ et anti- $RFc\gamma III$ (2.4G2) ou avec une IgG monomérique contrôle couplés à de la fluorescéine. L'analyse des suspensions cellulaires au FACS donne les résultats présentés dans la Figure 4.

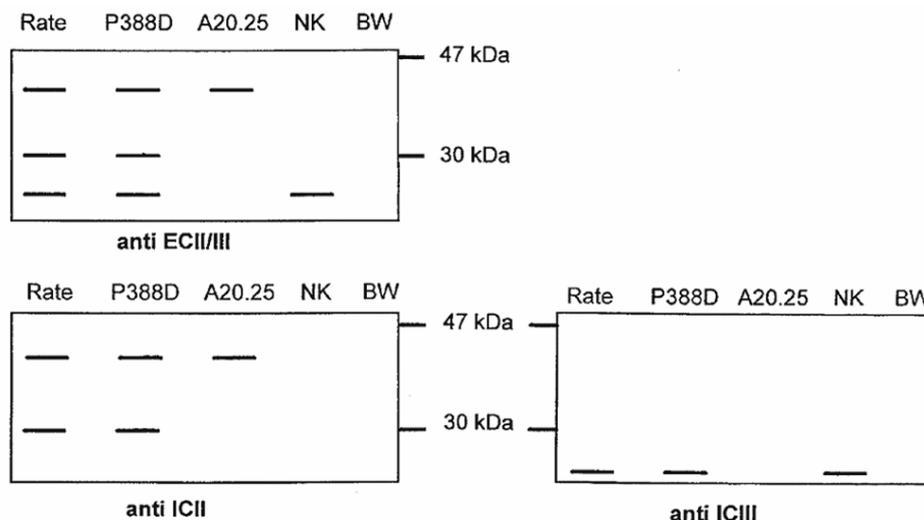
Figure 4



Question 1. Que concluez-vous ?

On réalise ensuite une expérience de Western blot. Pour cela, on immunoprécipite, à l'aide de l'anticorps 2.4G2, les RFc γ II et RFc γ III à partir d'extraits membranaires préparés par traitement des cellules au détergent triton X100. On traite les immunoprécipités par la PNGase, une enzyme qui hydrolyse les groupements N-glycosylés et on réalise une migration des échantillons dans un gel d'acrylamide en présence de SDS. On transfère les protéines sur un filtre de nitrocellulose. On fait ainsi migrer trois gels contenant la même série d'échantillons. On incube ensuite chacun des filtres soit avec des anticorps de lapin dirigés contre le domaine extracellulaire des RFc γ II et RFc γ III (anti-ECII/III), soit avec des anticorps de lapin dirigés contre les régions cytoplasmiques des RFc γ II (anti-ICII) ou des RFc γ III (anti-ICIII). On révèle les anticorps fixés sur les trois filtres à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase et d'un système de révélation approprié. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 5**.

Figure 5



Question 2. *Comment interprétez-vous ces résultats ?*

V.

On prépare une suspension cellulaire par traitement de cellules de rate de souris C57BL/6 par un mélange d'anticorps monoclonaux anti-Thy1.1 et de complément.

Question 1. *Quel(s) type(s) cellulaire(s) cette suspension contient-elle ?*

Question 2. *Comment l'évaluer rapidement (en quelques heures) ?*

On prépare selon ce protocole des suspensions cellulaires à partir de rates de souris B6 (+/+) ou de souris B6 invalidées pour le gène codant pour le RFc γ de type II (-/-). On cultive des cellules en présence d'anticorps de chèvre anti-IgM (qui réagit avec le BCR) entiers (anti-IgM) ou de leurs fragments Fab'2 (Fab'2 anti-IgM) ou de LPS. On mesure la prolifération cellulaire après 48 heures de culture par incubation des cellules pendant 16 heures avec de la thymidine ^3H qui s'incorpore à l'ADN des cellules en phase S. On obtient les résultats suivants (l'anticorps 2.4G2 est un anticorps monoclonal de rat anti-RFc γ II et RFc γ III de souris) :

	Rate RFc γ II ^{+/+}	cpm [³ H]±SD	Rate RFc γ II ^{-/-}
Contrôle	800 ±100		700 ±200
Fab'2 anti-IgM (20 µg/ml)	4000 ±800		5000 ±900
IgG anti-IgM (30 µg/ml)	500 ±100		6000 ±1000
IgG anti-IgM (30 µg/ml) + 2.4G2 (1,5 µg/ml)	3800 ±800		5000 ±700
LPS	14000 ±1200		12000 ±1200

Question 3. *Quelles conclusions tirez-vous quant au rôle des RFc γ II sur la prolifération cellulaire provoquée par l'agrégation du BCR ?*

VI. Vrai ou Faux ? [pour information]

- **Vrai ou Faux :** Une molécule anticorps a un type donné de site anticorps.
- **Vrai ou Faux :** Différentes molécules d'anticorps peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Différents récepteurs T peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Les immunoglobulines et les récepteurs des cellules T présentent des analogies structurales.
- **Vrai ou Faux :** Un haptène peut stimuler la production d'anticorps mais ne peut pas se combiner à des anticorps.
- **Vrai ou Faux :** La classe prédominante lors d'une réponse secondaire est IgM.
- **Vrai ou Faux :** Dans une immunoglobuline, la région "charnière" relie les chaînes légères aux chaînes lourdes.
- **Vrai ou Faux :** La région VH est deux fois plus longue que la région VL.
- **Vrai ou Faux :** Le site anticorps se compose principalement de la chaîne légère.
- **Vrai ou Faux :** Les molécules IgG1 et IgG2 sont définies par les différences de séquences en acides aminés dans les chaînes légères.
- **Vrai ou Faux :** Une cellule B peut présenter différentes molécules anticorps à sa surface.
- **Vrai ou Faux :** La spécificité des cellules T cytotoxiques est généralement restreinte aux antigènes d'histocompatibilité de classe II.
- **Vrai ou Faux :** Des facteurs génétiques autres que ceux liés aux gènes codant pour les immunoglobulines interviennent lors d'une réponse immunitaire.

IF2007 TD-IF 4 :
Interface Immunité innée/Immunité adaptative

Interface Immunité innée/Immunité adaptative

I. Les récepteurs Toll

(d'après Takeuchi, O. *et al.* (1999) *Immunity* 11:443 ; Kawai, T. *et al.* (1999) *Immunity* 11:115 ; Hemmi, H. *et al.* (2000) *Nature* 408:740 ; Muzio, M. *et al.* (2000) *J.Immunol.* 164:5998)

Pour se défendre contre les microorganismes, les vertébrés disposent de systèmes de défense immunitaire innée qui pré-existent chez tous les individus et qui sont activés dans les minutes qui suivent l'infection.

La reconnaissance des pathogènes se fait en partie grâce à des récepteurs « Toll » présents sur les cellules du système immunitaire qui reconnaissent spécifiquement des composants bactériens (lipopolysaccharide LPS, lipoarabinomannan LAM, lipopeptides, peptidoglycane ou ADN) et des composants fongiques.

On se propose d'étudier les mécanismes d'action de certains récepteurs Toll, et leur rôle dans les réponses immunitaires innées.

1^{ère} partie

Dans une 1^{ère} expérience, des sous-populations de leucocytes humains – lymphocytes T et B, lymphocytes Th1 et Th2, monocytes, polynucléaires (PMN), cellules dendritiques (DC), et cellules tueuses naturelles (NK) – ont été préparées et mises en culture *in vitro* en absence ou en présence des stimulus indiqués pendant 3 heures. L'ARN total des cellules a été extrait et des « Northern Blot » ont été réalisés pour détecter les transcrits des récepteurs Toll 1 à 5 (TLR 1 à 5) (Figure 1).

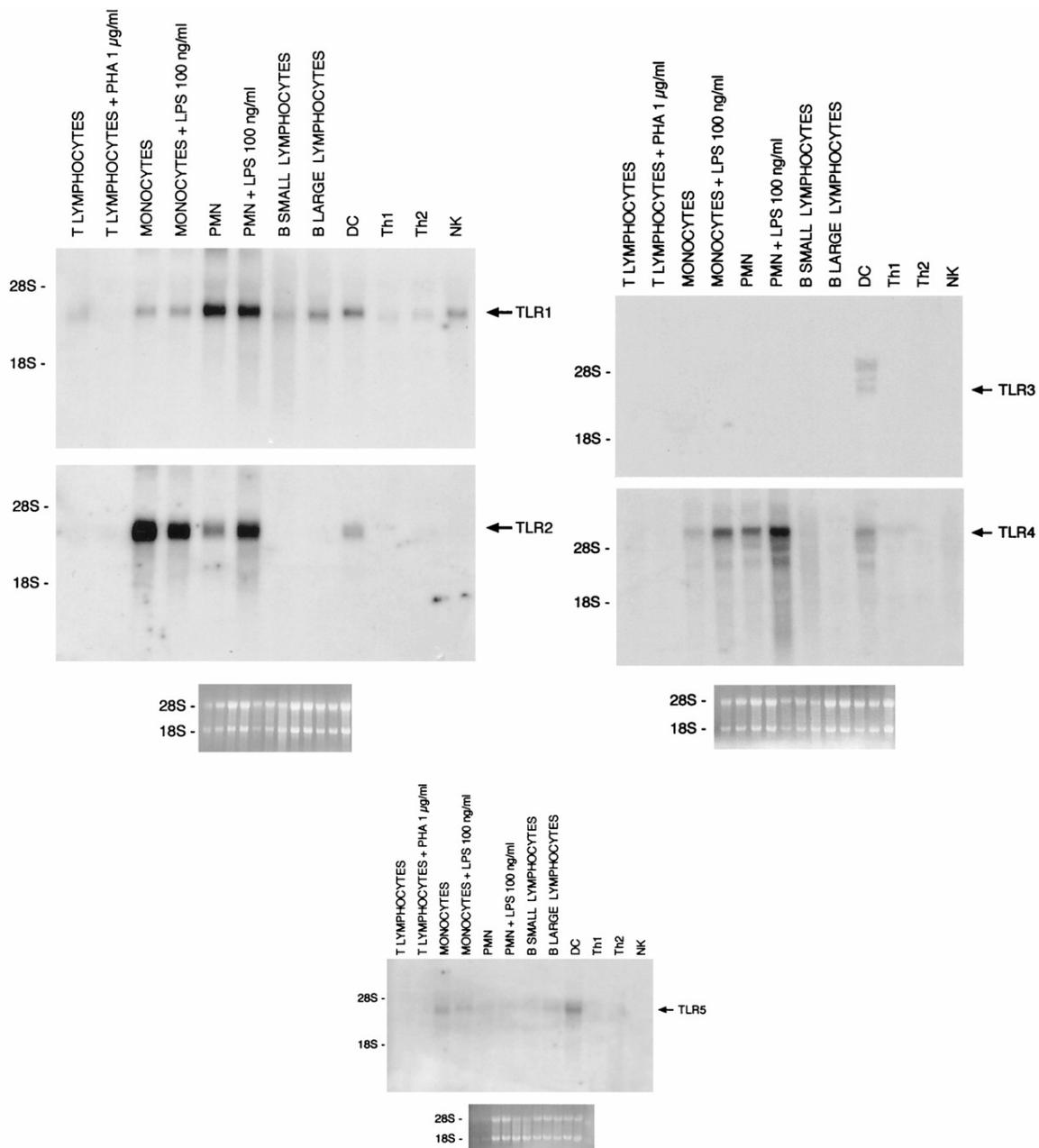


Figure 1 : Expression de TLR1 à 5 dans différentes cellules du système immunitaire.

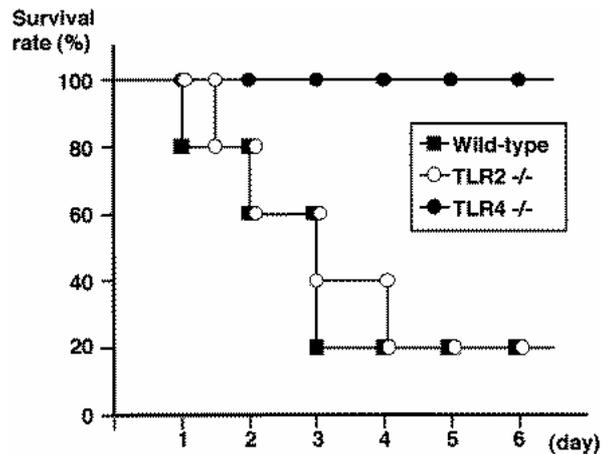
Question 1. Que pouvez-vous conclure de l'expression des récepteurs Toll par les différents types cellulaires ? Pourquoi a-t-on traité certains types cellulaires par la PHA ou le LPS ? Quels sont les effets de la stimulation des cellules par la PHA ou le LPS sur l'expression de ces récepteurs ?

2^{ème} partie

Pour étudier *in vivo* le rôle des récepteurs Toll 2 et 4 (TLR2 et TLR4), des souris de type sauvage (wild-type), déficientes pour TLR2 (TLR2^{-/-}) ou pour TLR4 (TLR4^{-/-}) ont reçu des injections de fortes doses de LPS (qui induisent un choc endotoxique entraînant normalement la mort des animaux de type sauvage), et leur survie a été observée (Figure 2).

Figure 2 :

Les souris ont reçu une injection de 1 mg de LPS par voie intrapéritonéale. La mortalité des animaux a été suivie pendant 6 jours.

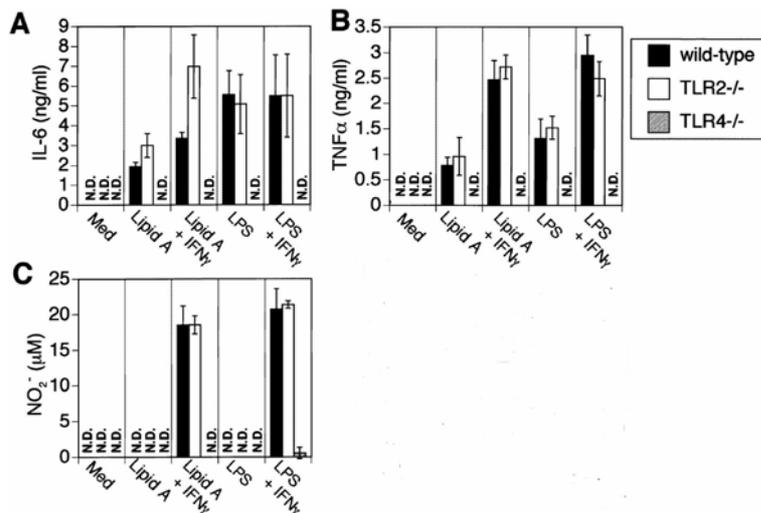


Question 2. Quelle conclusion tirez-vous de cette expérience ?

Des macrophages provenant de souris de type sauvage, de souris TLR2-/- ou de souris TLR4-/- ont été mis en culture en absence ou en présence d'IFN γ , et traités avec 1 ng/ml de LPS dérivé de *Salmonella minnesota* ou de lipide A dérivé de *E. coli*, pendant 24 heures. Les productions d'IL-6, d'oxyde nitrique (NO $_2^-$) et de TNF- α ont été mesurées dans les surnageants de culture (Figure 3).

Figure 3 :

(ND : non détecté)

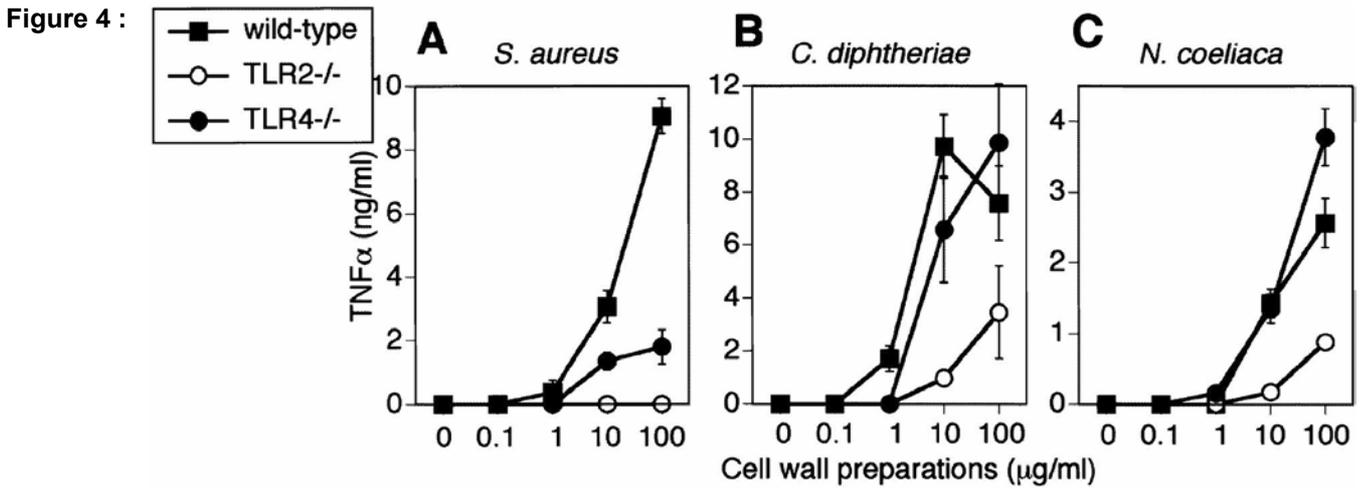


Question 3. Pourquoi a-t-on dosé les concentrations d'IL-6, de TNF- α et d'oxyde nitrique ? Rappelez les rôles de ces molécules dans la réponse immunitaire innée.

Question 4. Quel est l'effet de l'IFN γ ?

Question 5. Quels sont les rôles respectifs des récepteurs TLR2 et TLR4 dans les réponses au LPS et au lipide A ?

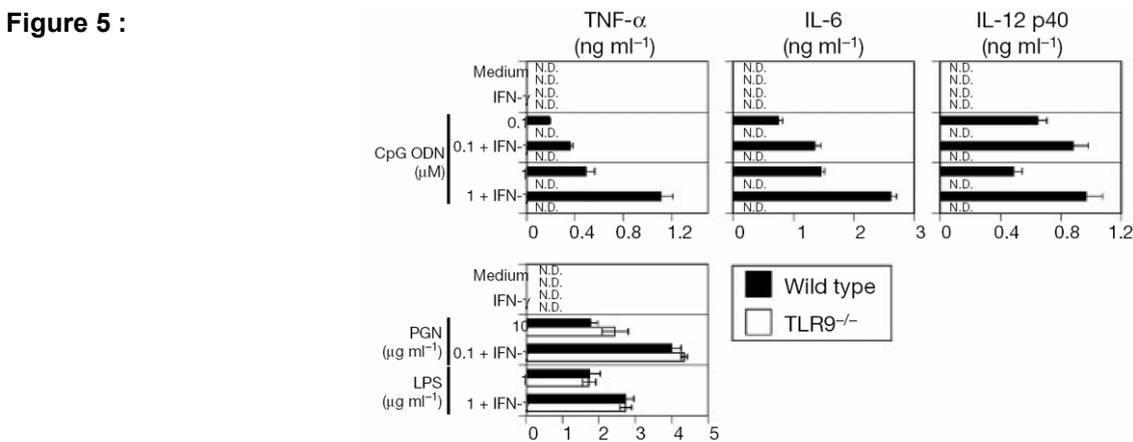
La réponse à des composants de bactéries à gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* et *Nocardia coeliaca*) a été étudiée. Pour cela, des macrophages provenant de souris de type sauvage, de souris TLR2-/- ou de souris TLR4-/- ont été mis en culture pendant 24 heures en absence ou en présence de concentrations croissantes des composants de bactéries gram +. La production de TNF- α a été mesurée dans les surnageants de culture (Figure 4).



Question 6. Commentez les résultats de cette expérience. Quelles conclusions faites-vous sur la spécificité des récepteurs toll ?

Un autre récepteur Toll a été identifié par la suite, il s'agit de TLR9. Les auteurs ont étudié *in vivo* le rôle de ce récepteur, en utilisant des souris déficientes pour TLR9 (TLR9 $^{-/-}$). Les macrophages de souris de type sauvage (wild type) ou de souris TLR9 $^{-/-}$ ont été mis en culture en absence ou en présence d'IFN γ , et traités avec de l'ADN bactérien (CpG ODN), du LPS ou du peptidoglycane (PGN). Les productions de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-12 ont été mesurées dans les surnageants de culture (Figure 5).

La survie des souris TLR9 $^{-/-}$ en réponse à une injection d'une forte concentration d'ADN bactérien a également été évaluée (Figure 6).



Question 7. Décrivez les résultats obtenus. Quels éléments nouveaux apportent ces 2 expériences ?

3^{ème} partie

Les auteurs ont ensuite identifié les mécanismes moléculaires intracellulaires intervenant lors de l'activation de TLR2 et TLR4. Pour cela, des macrophages provenant de souris de type sauvage, de souris TLR2^{-/-} ou de souris TLR4^{-/-} ont été traités pendant 20 minutes avec 1 ng/ml de LPS provenant de *S. minnesota* (LPS) ou avec 10 µg/ml de PGN provenant de *S. aureus*. Les cellules ont été lysées, les lysats immunoprécipités avec un anticorps anti-IRAK1 et l'activité kinase de la protéine IRAK a été mesurée *in vitro* (auto). Parallèlement, un western blot anti-IRAK a été réalisé (WB) (Figure 7A et B).

L'activation de NF-κB dans des extraits nucléaires a ensuite été déterminée à différents temps après le traitement par le LPS ou le PGN, en réalisant une expérience de retard de migration sur gel (Figure 7C et D).

Question 8. Décrivez la technique de retard de migration sur gel. Pourquoi était-il recommandé d'effectuer un Western blot anti-IRAK ? Interprétez les résultats obtenus dans la Figure 7.

Des auteurs ont décrit que des souris déficientes en MyD88 ne répondent pas au LPS, ni à aucun composant bactérien comme par exemple, le PGN, les lipoprotéines ou l'ADN hypométhylé bactérien.

Ainsi, des macrophages provenant de souris déficientes en MyD88, qu'ils soient stimulés par le LPS ou le lipide A ne produisent pas d'IL-6, pas de TNF-α, et pas d'oxyde nitrique.

Les macrophages provenant de souris de type sauvage ou de souris MyD88^{-/-} ont été traités pendant 10, 20 et 60 minutes avec 2 µg/ml de lipide A. Les cellules ont ensuite été lysées, les lysats immunoprécipités avec un anticorps anti-IRAK et l'activité kinase de la protéine IRAK a été mesurée *in vitro* (Auto). Parallèlement, un western blot anti-IRAK a été réalisé (WB) (Figure 8).

Figure 7 :

(C et D) : les extraits nucléaires des cellules ont été incubés avec une sonde spécifique contenant un site de fixation pour NF-κB. Les complexes inductibles contenant NF-κB sont indiqués par les flèches.

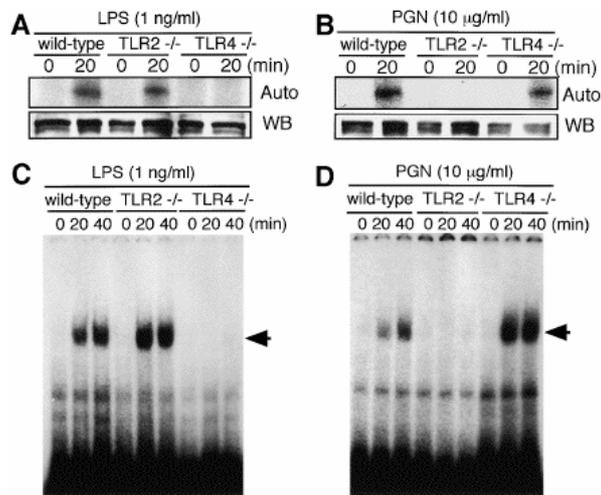
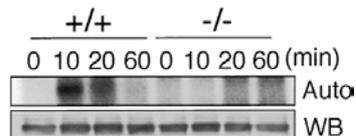


Figure 8 :



Question 9. En utilisant vos connaissances et les résultats de ces expériences, faites un schéma récapitulatif de la voie de transduction des récepteurs Toll (cf. Figure 9 et Figure 10).

Figure 9 :

Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000) *Nature* 406:782.

Figure 2 Signalling pathways activated by TLRs in vertebrates and in *Drosophila*. The TLRs have an intracellular domain that is homologous with that of the IL-1 receptor, and is known as TIR. TIR binds to a homologous domain in an adaptor protein, MyD88, which also contains a death domain; this interacts with a death domain in the serine kinase IRAK. IRAK interacts with an adaptor known as TRAF6. TRAF6 links to the MAP 3-kinase TAK-1, through an adaptor TAB2. TAK-1 is involved in the activation of the transcription factor NF- κ B through the activation of I κ B kinases, and in the activation of the AP-1 transcription family members Jun and Fos, by way of additional MAP kinases. Both AP-1 transcription family members and NF- κ B are required for the transcription of immune response genes. TRAF6 is known to act through more than one pathway. For example, the adaptor ECSIT (evolutionarily conserved intermediate in Toll pathways) bridges TRAF6 to the MAP 3-kinase MEKK-1. The *Drosophila* Toll pathway is similar to that of the vertebrate TLRs. Toll links to an adaptor tube, the functional homologue of MyD88. Tube binds the kinase Pelle, a homologue of IRAK. A number of other homologues of the vertebrate pathways are found in *Drosophila*, including dTRAF and dECSIT, although it is not yet clear where precisely they fit to the signalling pathway. Similarly, additional *Drosophila* genes, including *ird4*, *ird6* and *ird8*, have been found through genetic screens, although precisely how they fit into the toll signalling pathway is not yet known. Finally, Cactus is a homologue of I κ B, whereas Dif and Relish are homologues of NF- κ B. See the text for a more complete description of the signalling pathway.

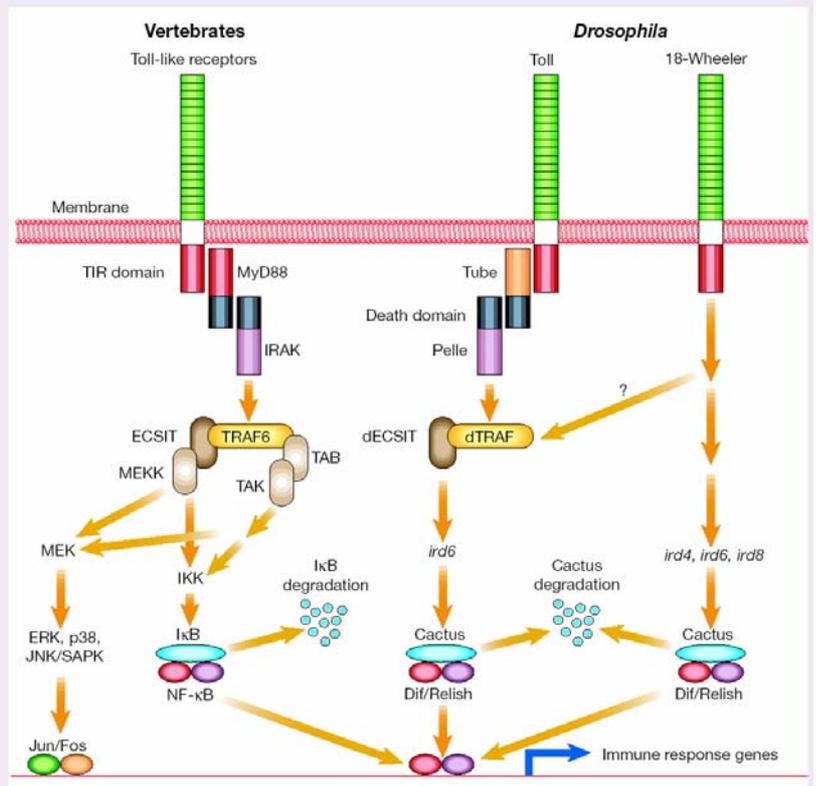


Figure 10 :

Imler, J.-L., and Hoffmann, J. A. (2003) *Nature Immunol.* 4:105.

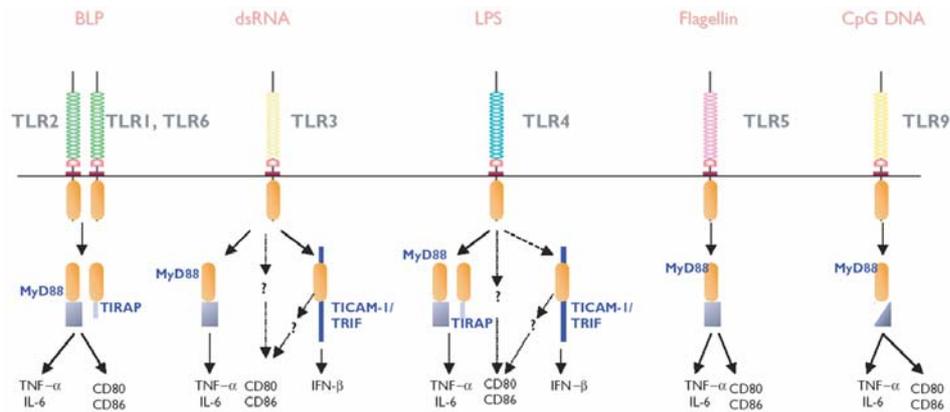


Figure 1. TLRs use different combinations of TIR domain adaptors to activate cellular responses. TLRs are activated by microbial-derived molecules and induce the inflammatory cytokines TNF- α and IL-6, as well as the costimulatory molecules CD80 and CD86 on DCs. Note that TLR2 associates with TLR1 or TLR6 to mediate activation by triacetylated or diacetylated bacterial lipopeptides (BLP), respectively. Up-regulation of cytokines involves MyD88 and TIRAP when cells are stimulated through TLR2 or TLR4, and MyD88 only in the case of stimuli acting through TLR3, TLR5 or TLR9. TLR3 can induce the antiviral cytokine IFN- β via association with TICAM-1. TLR4 can also induce IFN- β , suggesting that it may signal through TICAM-1 as well. Upregulation of CD80 and CD86 on DCs by TLR3 and TLR4 is mediated by a MyD88-independent pathway. It is not yet clear if this pathway involves TICAM-1. The TIR domains in the receptors and adaptors are represented in orange.

II.

(D'après Lund, J. M., et al. (2004) *PNAS* 101:5598)

Les infections virales chez les mammifères mettent en jeu les voies d'activation de l'immunité innée impliquant notamment les TLR (*Toll-like receptors*).

Question 1. Rappelez les caractéristiques fonctionnelles des TLR. (5 lignes maximum)

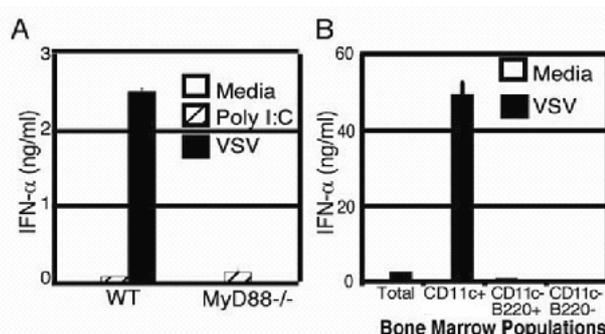
La présente étude s'intéresse à la voie d'activation mise en jeu en réponse à l'infection par des virus à ARN simple-brin comme le VSV (*vesicular stomatitis virus*) et le virus de la grippe (*influenza*). Dans une première expérience, les auteurs mesurent par ELISA la production d'IFN- α par des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88 $^{-/-}$) cultivées en présence de VSV ou de PolyI:C, un ARN double-brin synthétique. Dans un deuxième temps, une expérience similaire est réalisée à partir de populations de moelle osseuse triées comme indiqué. Les résultats sont montrés sur la **Figure 11**. Par ailleurs, des cellules de moelle osseuse incubées en présence d'ARN simple brin synthétique produisent des quantités comparables d'IFN- α à celles observées pour VSV chez les souris WT et MyD88 $^{-/-}$.

Figure 11

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88 $^{-/-}$) ont été cultivées en présence de VSV ou de PolyI:C, un ARN double-brin synthétique, ou sans stimulus (Media). Après 18h de culture, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA.

B : La même expérience est réalisée à partir de populations triées de moelle osseuse (Total ; CD11c $^{+}$ B220 $^{-}$; CD11c $^{-}$ B220 $^{+}$; CD11c $^{-}$ B220 $^{-}$).

N.B : La faible production d'IFN- α observée en réponse à polyI:C est néanmoins significative.



Question 2. A l'aide d'un tableau comparatif, rappelez le principe de l'ELISA et d'une autre technique permettant de mesurer la production de cytokines.

Question 3. Analysez ces résultats en comparant les voies d'activation mises en jeu par les ARN double-brin et simple-brin. (5 lignes maximum)

Question 4. Quelle population pensez-vous être activée par le VSV ? (5 lignes maximum)

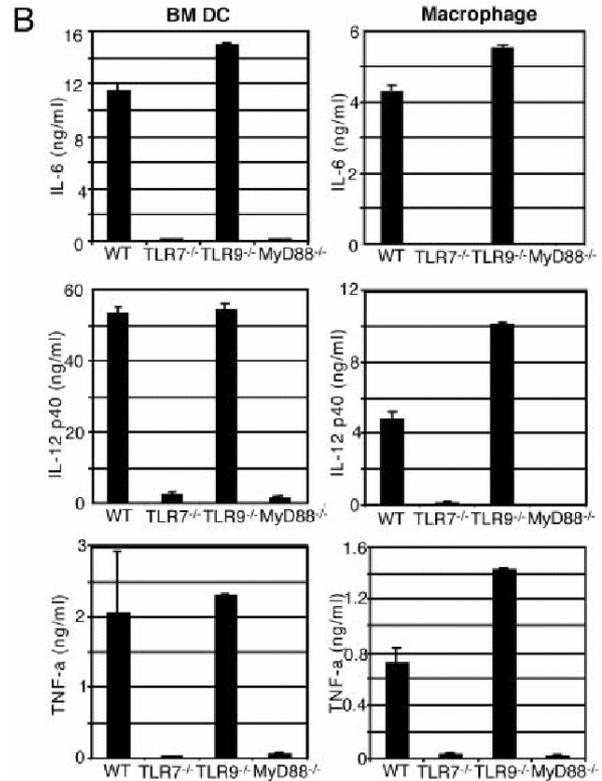
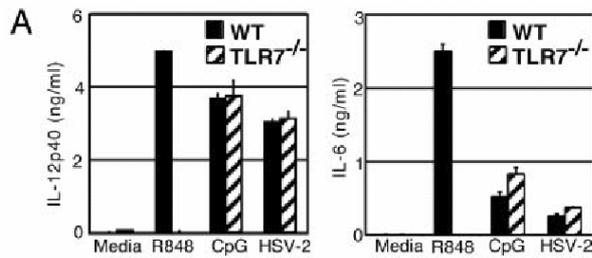
De nombreux TLR sont exprimés par les cellules dendritiques. Etant donné que le mode d'infection du VSV implique un mécanisme d'endocytose, les auteurs ont porté leur attention sur TLR7 et TLR9 qu'on retrouve au niveau des endosomes. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse ou de macrophages à différents stimulus a été étudiée chez des souris de type sauvage, Myd88 $^{-/-}$, ou invalidées pour TLR7 (TLR7 $^{-/-}$) ou TLR9 (TLR9 $^{-/-}$) (**Figure 12**).

Question 5. Analysez et commentez ces résultats. (5 lignes maximum)

Figure 12

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour TLR7 (TLR7^{-/-}) ont été cultivées en présence de R848 (un ligand synthétique de TLR7), d'ADN CpG ou de HSV2 (un virus à ADN) ou sans stimulus (Media). Après 18h de culture, l'IL-12 et l'IL-6 produites ont été mesurées dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules dendritiques de moelle osseuse (BM DC) et des macrophages de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, invalidées pour le gène TLR9 (TLR9^{-/-}), ou MyD88^{-/-} ont été cultivées en présence de R848. Après 48h de culture, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.



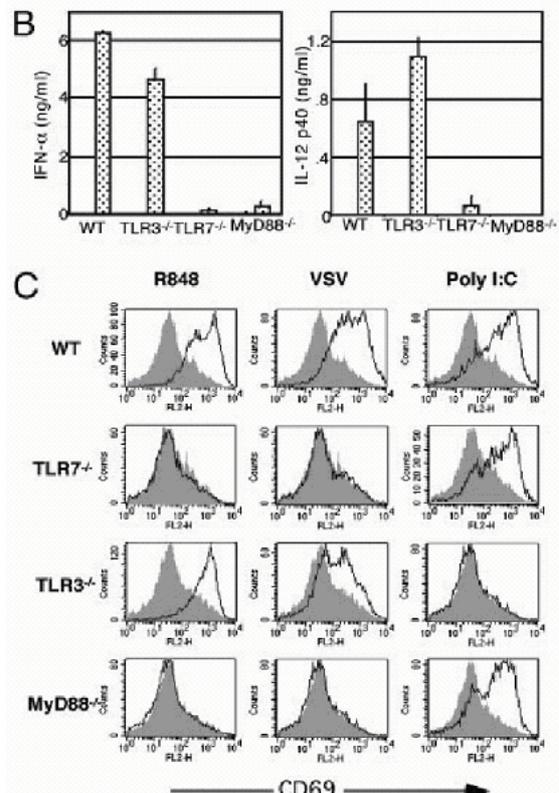
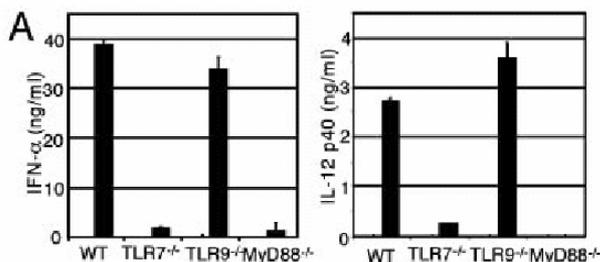
Les auteurs étudient ensuite le rôle de TLR7 pour la production d'IFN- α en réponse aux virus VSV et influenza. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse a été étudiée chez des souris de type sauvage, TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR3^{-/-} ou Myd88^{-/-} (Figure 13).

Figure 13

A : Des cellules dendritiques de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-} ou MyD88^{-/-} ont été infectées par le virus VSV. Après 18h, l'IFN- α et l'IL-12 produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT), TLR3^{-/-} (invalidées pour le gène TLR3), TLR7^{-/-} ou MyD88^{-/-} ont été cultivées en présence de virus influenza. Après 18h, l'IFN- α et l'IL-12 produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.

C : Des splénocytes de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, TLR3^{-/-} ou MyD88^{-/-} ont été cultivés en présence de R848, de virus VSV ou de Poly:I:C. Après 18h de culture, les cellules sont analysées par cytométrie de flux avec un anticorps anti-CD69. Les histogrammes montrent le profil d'expression des cellules B220⁺. Les profils ombrés correspondent au témoin sans stimulus.



Question 6. Qu'apportent ces nouveaux résultats ? (10 lignes maximum)

Après liaison sur son récepteur membranaire, la particule virale VSV pénètre par endocytose ; après fusion avec un lysosome, l'environnement acide entraîne la fusion de la membrane virale avec la membrane du lysosome et la nucléocapside virale est libérée dans le cytosol. Afin de préciser la localisation cellulaire où a lieu l'activation de TLR7 par VSV, les auteurs étudient l'activation de cellules dendritiques de souris de type sauvage par VSV en présence de chloroquine, un inhibiteur de l'acidification des lysosomes (**Figure 14**).

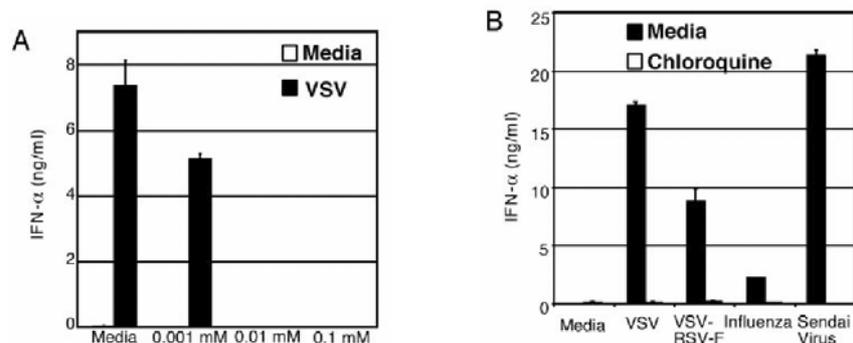


Figure 14

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage ont été prétraitées pendant 2h en présence de milieu seul (Media) ou de concentrations croissantes de chloroquine comme indiqué. Les cellules ont alors été infectées par le virus VSV. Après 18h, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage prétraitées pendant 2h en présence de milieu seul (Media) ou de chloroquine (0,1 mM) ont été stimulées par les virus VSV, VSV-RSV-F, Influenza ou Sendai. Après 18h, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA. VSV-RSV-F est un virus VSV recombinant exprimant la protéine F du virus RSV (*respiratory syncytial virus*) qui permet la pénétration du virus par fusion avec la membrane plasmique de manière indépendante du pH ; VSV-RSV-F exprime toujours la protéine G de VSV impliquée dans la pénétration du virus par la voie lysosomale dépendante du pH. Le virus Sendai est un autre virus à ARN simple-brin qui pénètre exclusivement par fusion avec la membrane plasmique.

Question 7. Analysez soigneusement ces résultats. (5 lignes maximum)

Question 8. A l'aide d'un schéma récapitulatif, résumez la voie TLR activée par les virus à ARN simple-brin.

IF2007 TD-IF 5 :
Cytokines & Chimiokines

Cytokines & Chimiokines

I.

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

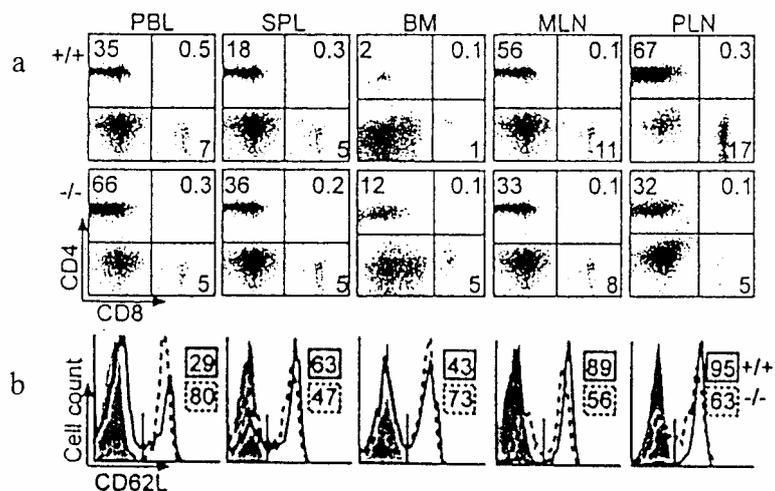
Dans le but d'étudier la régulation de la circulation des leucocytes dans l'organisme, des souris déficientes pour le récepteur CCR7 de chimiokine ont été générées par recombinaison homologue. Dans tous les cas, les animaux mutés sont viables et fertiles. On se propose d'étudier les conséquences de la 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 sauvages (+/+) 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.

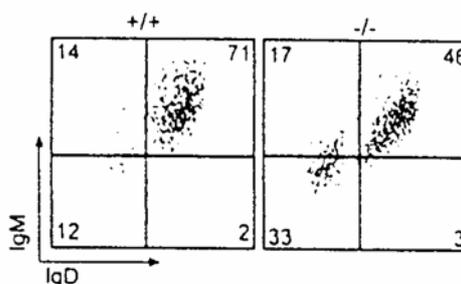


Question 1. Commentez l'ensemble des résultats.

Afin de compléter cette analyse, les cellules extraites des ganglions lymphatiques de souris sauvages (+/+) 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 sauvages ou mutantes CCR7^{-/-}.

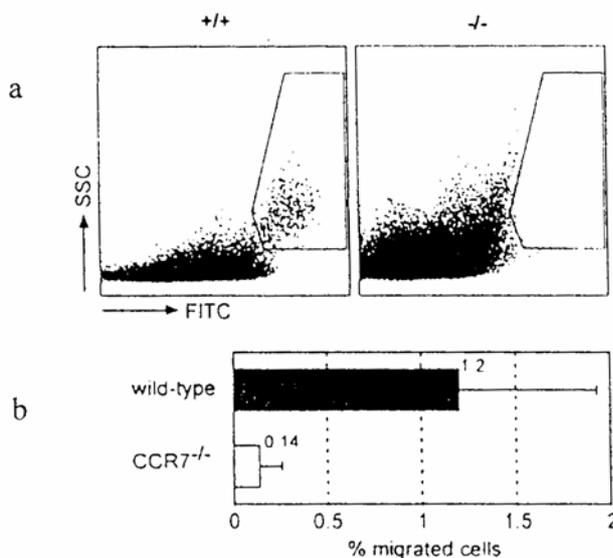
Figure 2



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 sauvages (+/+) 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^{-/-} ?*

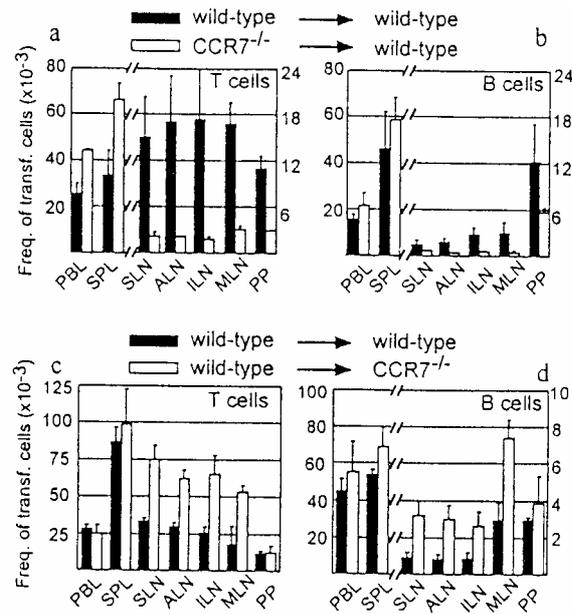
Les lymphocytes T (Thy-1⁺) et B naïfs (IgD⁺) fluorescents, issus de souris sauvages ou mutantes CCR7^{-/-} sont injectés à des animaux sauvages (**Figure 4a et b**) ou mutantes CCR7^{-/-} (**Figure 4c et d**). Cinq heures après le transfert cellulaire, les animaux receveurs sont sacrifiés, saignés et 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 ?

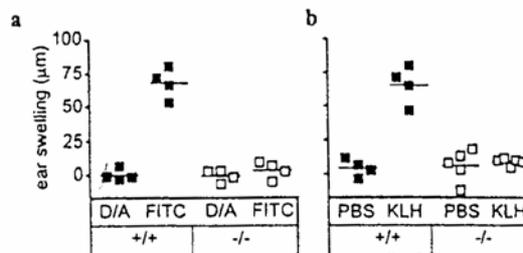
Figure 4

PBL: lymphocytes du sang périphérique; SPL: rate; SLN: ganglions lymphatiques submandibulaires; 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 sauvages (+/+) 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 sauvages 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



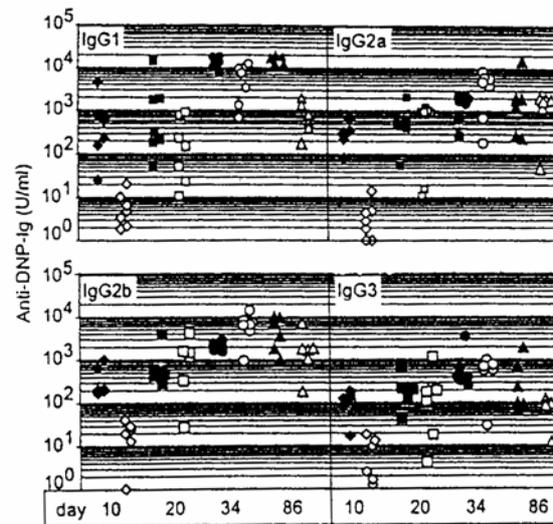
D/A: Dibutylphthalate/Acétone

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 sauvages (+/+) 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 sauvages (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



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, lymphes, 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)

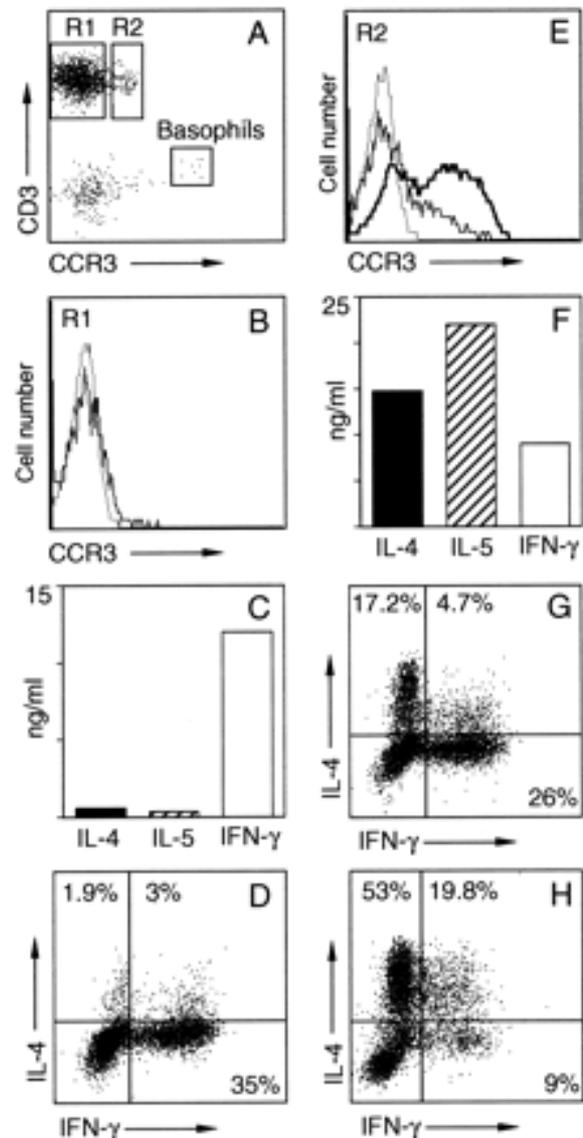
- A l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CCR3 et anti-CD3 couplés à un fluorochrome, on marque les cellules du sang adulte ou des lignées dérivées de ces cellules, et on analyse par cytométrie de flux quelles cellules sont marquées par ces anticorps. Les résultats sont présentés sur la Figure 7 (cadres 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 (cadrons 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 fenêtré R1 (lignée R1)
- E. Expression de CCR3 par la lignée polyclonale issue des cellules de la fenêtré 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 cadrons 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 »

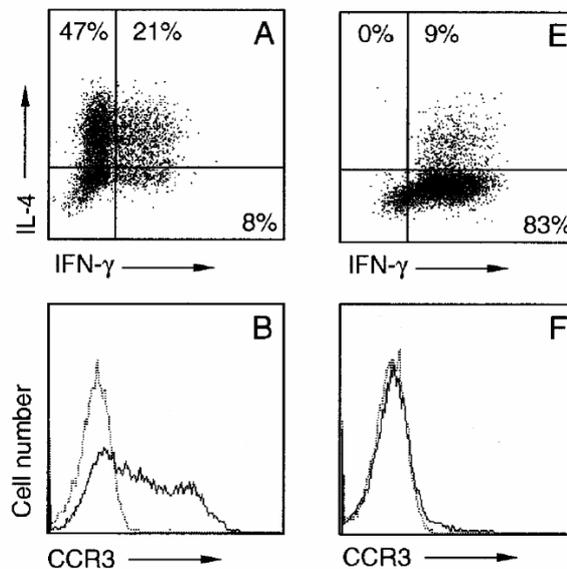
- soit en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IL-12 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules « Th2 »

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 éléments nouveaux 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.

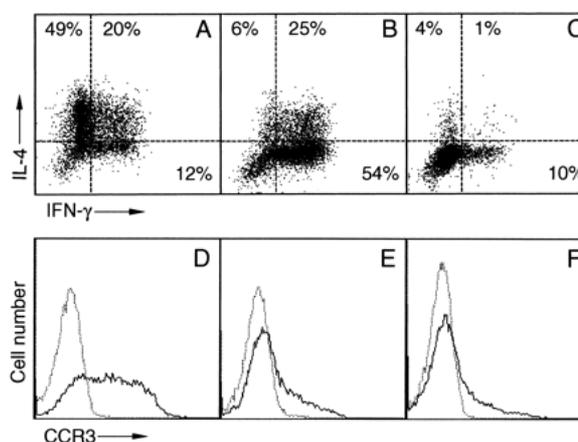
Question 13. *Quels sont les effets respectifs de l'IFN- α et du TGF- β sur l'induction de la polarisation Th1 et Th2, et sur l'acquisition de CCR3 ?*

Question 14. *Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre sachant que l'Eotaxine est sur-exprimée 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- γ
- 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- γ
- 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 ;
- $2 \cdot 10^6$ 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

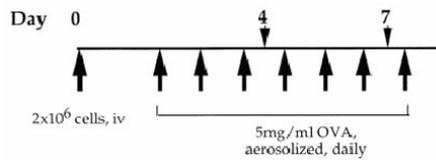


Figure 11

- 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).

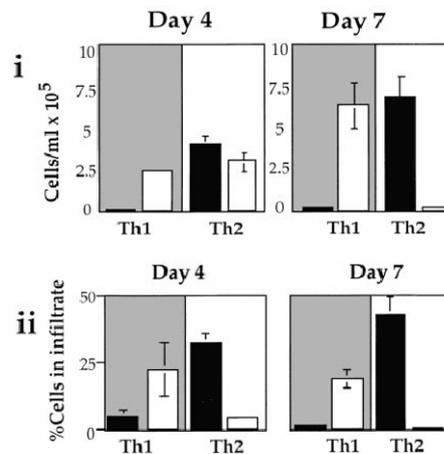
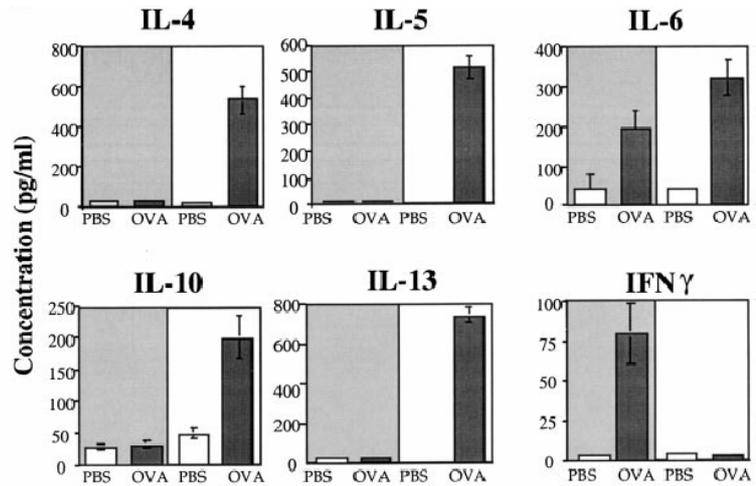


Figure 12

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).

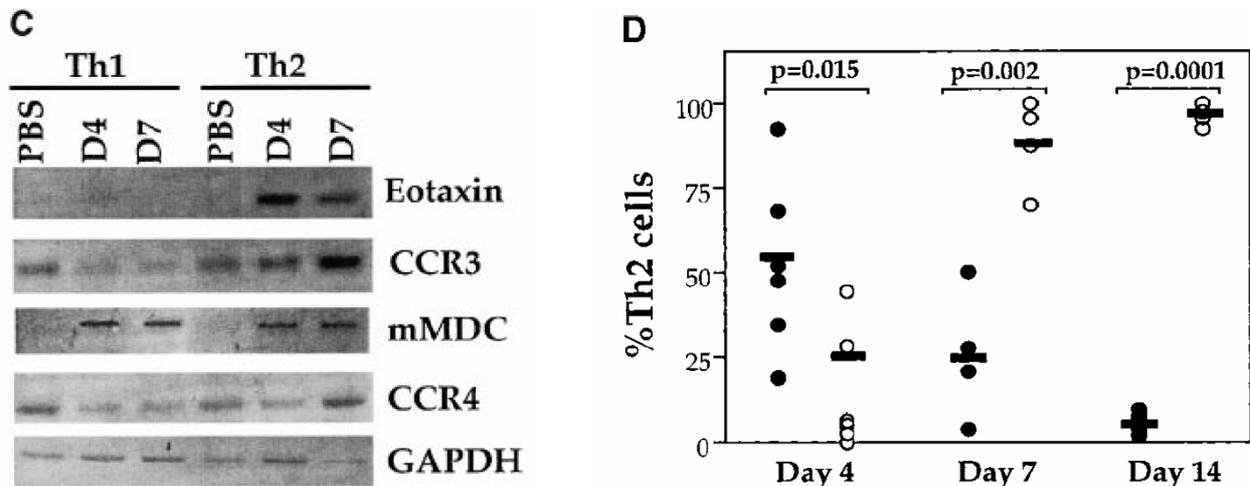


Figure 13

- 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

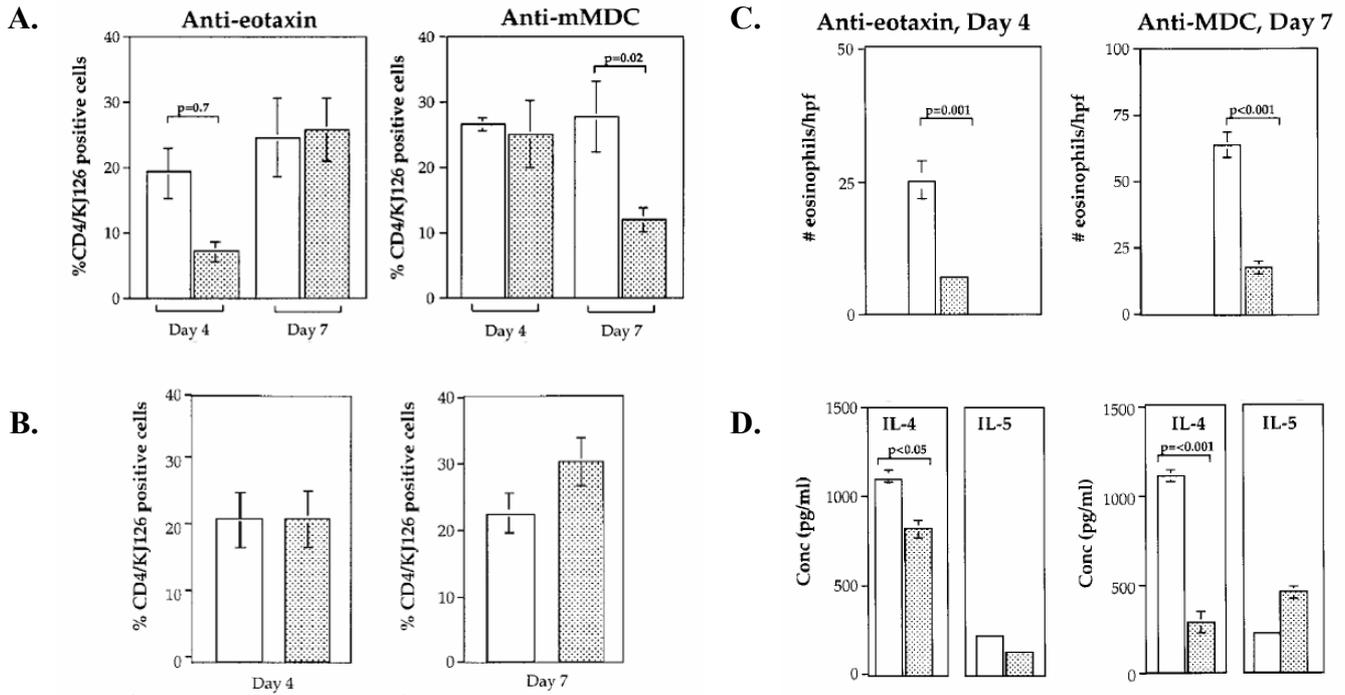


Figure 14

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 ?

IF2007 TD-IF 6 :
Reconnaissances non-classiques

Reconnaisances non-classiques

I.

(d'après Kunzmann, V. *et al.* (2000) *Blood* 96:384)

Les cellules malignes plasmocytaires causent une maladie appelée myélome multiple. C'est une maladie des os parce que les tumeurs se développent dans la moelle osseuse. Au fur et à mesure que les masses tumorales s'étendent, elles entraînent des érosions locales de l'os et l'apparition sur les radiographies de lésions osseuses multiples.

Question 1. Quelles modifications concernant l'hématopoïèse et la composition sérique en immunoglobuline observe-t-on chez les patients atteints de myélome multiple ?

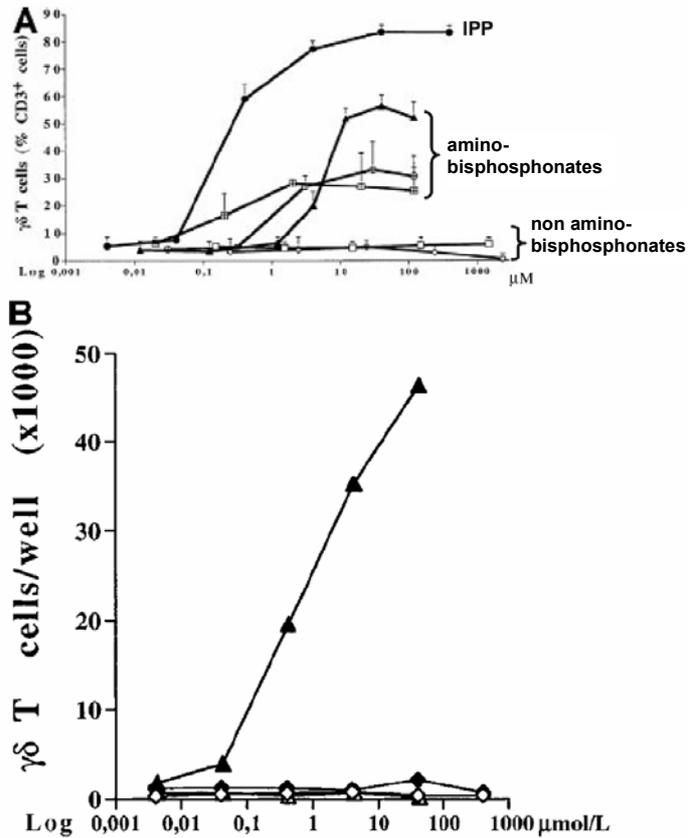
Question 2. Quelles sont les manifestations cliniques généralement observées chez ces patients ?

Les bisphosphonates sont un traitement de choix pour les maladies qui impliquent une résorption osseuse excessive ; ils ont été notamment montrés efficaces dans la prévention de l'ostéolyse chez des patients atteints de myélome multiple. Les bisphosphonates sont des analogues synthétiques de pyrophosphates endogènes. Cependant, les mécanismes d'inhibition de la résorption osseuse par les bisphosphonates ne sont pas connus. Les expériences présentées ci-dessous s'attachent à préciser leur mode d'action.

Il existe des relations structurales entre les bisphosphonates et certains ligands identifiés des lymphocytes T $\gamma\delta$. Sur la base de cette observation, la capacité de stimulation des lymphocytes T $\gamma\delta$ par les bisphosphonates a été évaluée. Les résultats sont présentés à la **Figure 1**.

Figure 1

- A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés avec des concentrations croissantes de différents bisphosphonates en présence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le pourcentage de cellules T $\gamma\delta$ parmi les cellules CD3⁺ a été mesuré en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C δ couplés à des fluorochromes. Comme contrôle positif, les cellules ont été stimulées avec IPP, un stimulateur des cellules T $\gamma\delta$ isolés des mycobactéries.
- B. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés avec des concentrations croissantes de chlodronate (non amino-bisphosphonate) ou de pamidronate (amino-bisphosphonate), en présence ou en absence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le nombre absolu de cellules T $\gamma\delta$ dans chaque culture a été mesuré.
 ◇ : chlodronate ; ◆ : chlodronate + IL-2 ;
 ▲ : pamidronate ; ▲ : pamidronate + IL-2.

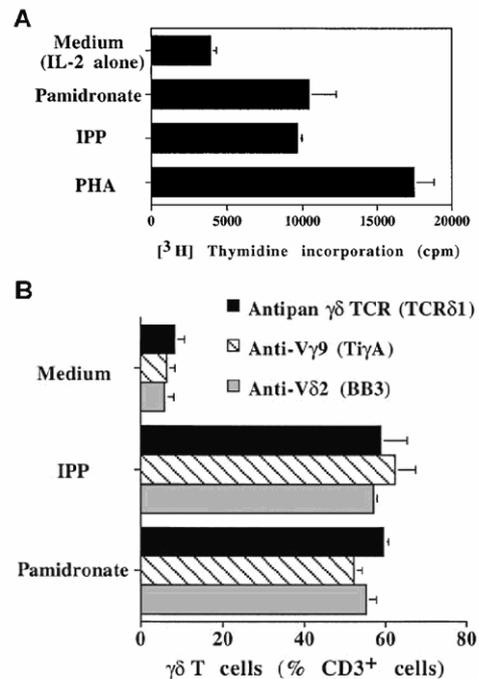


Question 3. *Interprétez les résultats de cette expérience. On notera qu'aucune autre population cellulaire parmi les PBMC ne prolifère dans les conditions de l'expérience. (8 lignes maximum)*

Dans une deuxième expérience, l'expression de V γ 9 et V δ 2 à la surface de lymphocytes T $\gamma\delta$ activés par le pamidronate, l'IPP ou la PHA a été évaluée. Les résultats sont présentés à la **Figure 2**.

Figure 2

- A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en l'absence (Medium) ou en présence de 4 μ M d'IPP, 4 μ M de pamidronate ou 4 μ g/ml de PHA, en présence d'IL-2. Après 4 jours, la prolifération des cellules a été déterminée par incorporation de thymidine tritiée.
- B. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en l'absence (Medium) ou en présence de 4 μ M d'IPP ou de pamidronate, en présence d'IL-2. Après 7 jours, les cultures ont été analysées en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C δ (Anti- $\gamma\delta$ TCR), anti-V γ 9 ou anti-V δ 2.



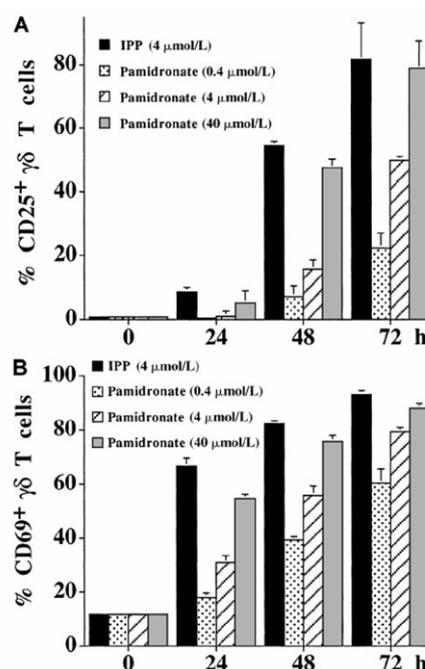
Question 4. Qu'apportent les résultats de cette expérience ? (5 lignes maximum)

Dans une autre expérience, l'activation des cellules T $\gamma\delta$ par le pamidronate en l'absence d'IL-2 a été évaluée par la mesure de l'expression de CD25 et CD69, deux marqueurs d'activation des lymphocytes T. Les résultats sont présentés dans la **Figure 3**.

Question 5. Analyser ces résultats. En particulier, discutez du rôle de l'IL-2 dans la prolifération ou l'activation des cellules T $\gamma\delta$ par le pamidronate. (8 lignes maximum)

Figure 3

Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en présence de 4 μ M d'IPP ou de 0,4, 4 et 40 μ M de pamidronate, en l'absence d'IL-2. L'expression de CD25 (A) ou CD69 (B) a été déterminée à 0, 24, 48 et 72h de culture par double marquage avec les anticorps anti-C δ et anti-CD25(A) ou anti-CD69 (B).

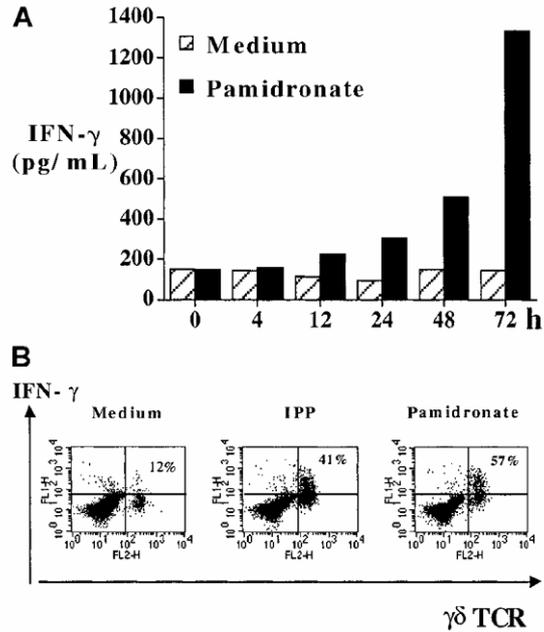


La production d'IFN γ par les cellules T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 4**.

Figure 4

Des PBMC ont été incubés en absence (Medium) ou en présence de 40 μ M d'IPP ou de 40 μ M de pamidronate, en l'absence d'IL-2.

- (A) La production d'IFN γ a été mesurée par ELISA au cours du temps pour les cellules incubées en absence ou en présence de pamidronate.
- (B) L'expression d'IFN γ intracellulaire par les cellules T $\gamma\delta$ a été déterminée après 72h de culture par double marquage avec les anticorps anti-C δ et anti-IFN γ .



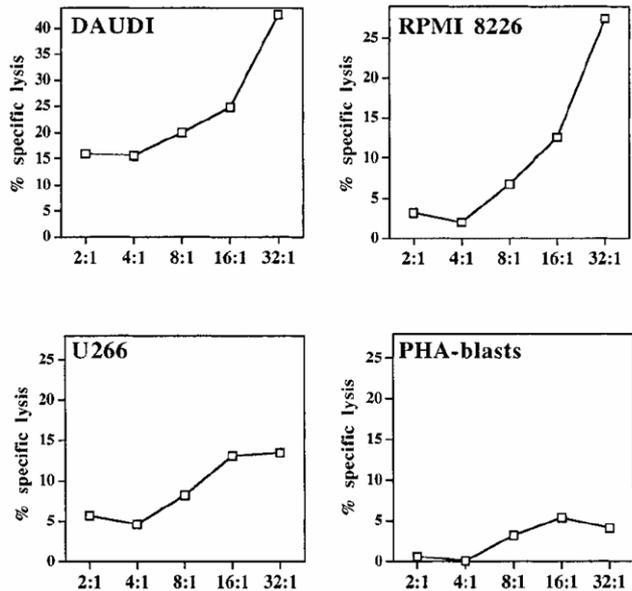
Question 6. Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 4B. (5 lignes maximum)

Question 7. Analysez ces résultats. (8 lignes maximum)

La capacité de cytolyse *in vitro* d'une lignée T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée vis-à-vis de différentes lignées tumorales. Les résultats sont présentés dans la Figure 5.

Figure 5

La cytotoxicité d'une lignée T $\gamma\delta$ activée par le pamidronate a été testée vis-à-vis de cellules de la lignée de lymphome DAUDI, des lignées de myélome RPMI 8826 et U266 ou de PBMC allogéniques activés par la PHA, préalablement chargés en Cr⁵¹. La capacité de lyse a été mesurée pour différents ratios effecteur:cible.



Question 8. Analysez ces résultats. En particulier, vous indiquerez de quelle(s) expérience(s) contrôle(s) vous auriez souhaités disposer afin de préciser votre interprétation. (5 lignes maximum)

Pour finir, des cellules de moelle osseuse de 24 patients atteints de myélome multiple ont été cultivées en milieu seul (Medium), en présence d'IPP ou de pamidronate, en présence d'IL2. Pour

une proportion significative de patients (14/24), on observe une augmentation de l'expression de CD25 par les cellules T $\gamma\delta$ en présence de pamidronate et d'IPP. Le nombre de cellules plasmocytaires vivantes après culture a été déterminé et exprimé en pourcentage du nombre de cellules cultivées en milieu seul. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Activité anti-plasmocytaire de l'IPP et du pamidronate chez des patients atteints de myélome multiple

Treatment	Plasma cells (%)	P
Medium (n = 24)	100	—
IPP (n = 24)	87.0 ± 28.4	.0345
Pamidronate (n = 24)	65.9 ± 38.4	.0002
Pamidronate (patients with activation of BM- $\gamma\delta$ T cells) (n = 14)	54.8 ± 28.8	.0001

n : nombre de patients ; p : valeur de signification du test de Student par rapport à la culture en milieu seul.

Question 9. *Quelle information complémentaire cette expérience apporte-t-elle ? Quelle perspective d'application thérapeutique peut-on envisager. (8 lignes maximum)*

Question 10. *A l'aide d'un tableau comparatif vous indiquerez en quoi la reconnaissance des lymphocytes T $\gamma\delta$ diffère de celle des lymphocytes T $\alpha\beta$.*

II.

(D'après Yamada T. *et al.* (2004) *Blood* 172: 2401-2406)

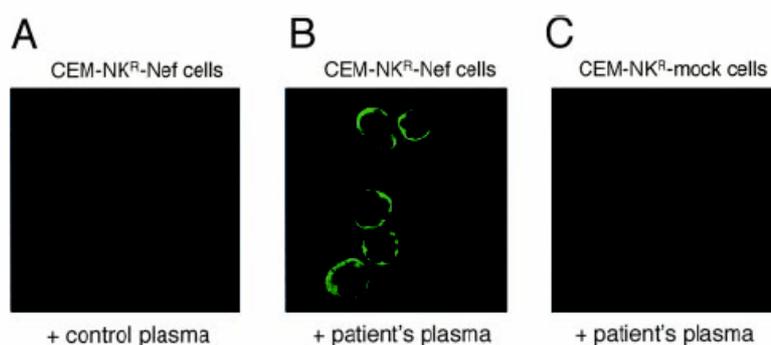
La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC « Ab-dependent cellular cytotoxicity ») et les activités cytotoxiques des lymphocytes T sont deux mécanismes qui jouent un rôle important dans la protection contre les infections virales. Dans le cas de l'infection par le VIH, l'ADCC peut inhiber la réplication virale et l'infection cellule à cellule en tuant les cellules infectées par le VIH avant la maturation des particules virales.

La protéine virale Nef est une protéine accessoire impliquée dans la pathogenèse de l'infection à VIH. Cette protéine peut être exprimée à la surface des cellules infectées. Les auteurs de cette étude ont montré qu'un peptide de Nef, très conservé et exprimé à la surface de cellules infectées, pouvait servir d'épitope pour une réponse anticorps. De plus, il a été montré que le taux plasmatique d'anticorps dirigés contre ce peptide chez les patients infectés est corrélé avec la progression de la maladie.

Pour élucider les mécanismes de cette corrélation, les auteurs ont réalisé les expériences suivantes :

Des cellules CEM-NK^R exprimant la protéine virale Nef (CEM-NK^R-Nef cells) ont été incubées avec du plasma provenant d'un donneur sain (control plasma) ou d'un donneur (patient's plasma) infecté par le VIH (donneur LTNP 5). Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-Ig humaine couplé à la fluorescéine. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale (**Figure 6**).

Figure 6 :



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Des cellules CEM-NK^R-Nef préalablement marquées au Cr⁵¹ ont été incubées pendant 30 min à 37°C en présence de plasma provenant des patients LTNP 2, 5 et 6 (« Long-Term Non Progressors », qui sont des patients infectés par le VIH chez lesquels la maladie évolue lentement), ou en présence de plasma provenant de donneurs sains. Ces sérums ont été préalablement chauffés pendant 30 min à 56°C.

Des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) provenant de donneurs sains ou de patients infectés par le VIH (dont les caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 2**) ont ensuite été ajoutés aux cellules CEM-NK^R-Nef, pendant 4 heures, à 37°C.

L'émission de rayons γ dans les surnageants a ensuite été comptée avec un compteur gamma et les résultats de lyse spécifique des cellules sont déterminés (**Figure 7**).

Tableau 2

Table I. Patient profiles

Patient	Age	Sex	CD4 ⁺ Count (cells/ μ l)	CD8 ⁺ Count (cells/ μ l)	NK Cell Count (cells/ μ l)	% NK Cell in FBMC	HIV RNA (copies/ml) ^a	Antiretroviral Drugs ^b
P1	37	M	754	996	155	8.0	<400	d4T + 3TC + NFV
P2	32	M	63	214	20	3.7	770	d4T + 3TC + NFV
P3	45	M	204	620	220	12.6	<400	AZT + ddC + IDV
P4	37	M	638	1034	102	5.7	<400	d4T + 3TC + NFV
P5	35	M	372	877	73	5.0	2200	AZT + ddC + IDV

^a Amplicor HIV monitor test (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ).

^b AZT, zidovudine; d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; ddC, zalcitabine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir.

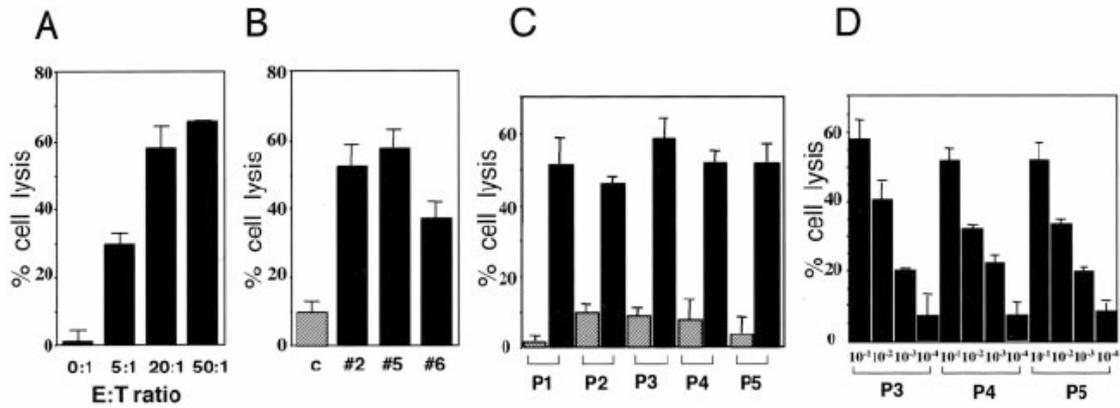


Figure 7 :

Les pourcentages de lyse spécifique sont calculés : $100 \times (\text{comptage échantillon} - \text{comptage relarguage spontané}) / (\text{comptage maximum} - \text{comptage relarguage spontané})$. A. Lyse spécifique en présence de différents ratios de PBMC provenant de donneurs sains, en présence de plasma du patient LTNP 5. B. Lyse spécifique en présence de PBMC provenant de donneurs sains (ratio 20:1) en présence de plasma de patient sain (c) ou de plasma des patients LTNP 2, 5 et 6. C. Lyse spécifique en présence de PBMC de 5 patients (P1-5) (ratio 20:1) en présence de plasma de donneur sain (colonnes hachurées) ou en présence de plasma du patient LTNP 5 (colonnes noires). D. Idem C, mais avec des dilutions sériées (10^{-1} - 10^{-4}) du plasma du patient LTNP 5.

Question 2. D’après le Tableau 2 quelles corrélations pouvez-vous observer entre les différentes données pour les patients 1 à 5?

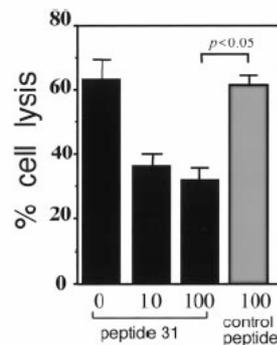
Question 3. Que permettent de mettre en évidence les expériences présentées dans la Figure 7 ?

Question 4. Quelles conclusions tirez-vous de ces expériences ?

Dans l’expérience suivante, les auteurs ont incubé des cellules CEM-NK^R-Nef marquées au Cr⁵¹, des PBMC du patient 3 et du plasma du patient LTNP 5, en présence du peptide synthétique 31. On précise que le peptide 31 est reconnu par les anticorps anti-Nef. Les résultats de lyse spécifiques ont été déterminés (**Figure 8**).

Figure 8 :

Lyse spécifique en présence de PBMC du patient 3 (ratio 20:1), de plasma du patient LTNP 5 et du peptide 31 (0 à 100 µg/ml, colonnes noires) ou d’un peptide contrôlé (100 µg/ml colonne hachurée).



Question 5. Que pouvez-vous conclure de cette expérience ?

Des PBMC de 41 patients infectés par le VIH et de 16 donneurs sains ont été analysés par cytométrie de flux. Les nombres de cellules NK (CD3⁻, CD19⁻, CD16⁺, CD56⁺) et le pourcentage de cellules NK exprimant la perforine ont été déterminés (**Figure 9**).

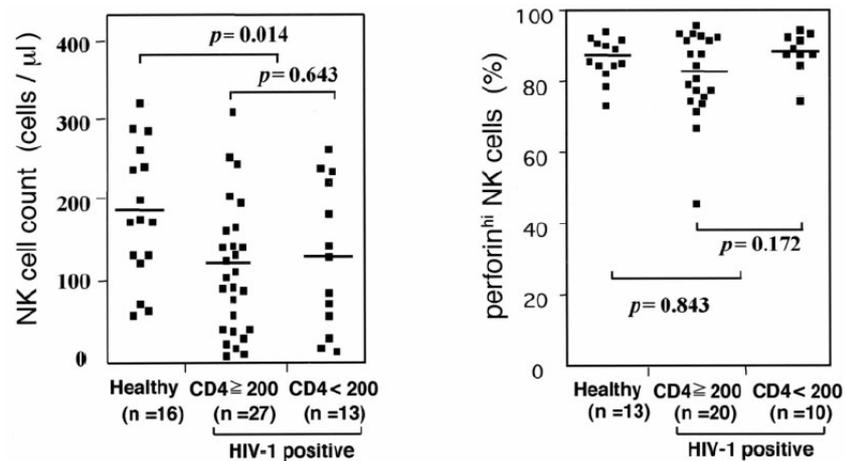


Figure 9 :

A. Nombre de cellules NK parmi les PBMC de donneurs sains et les PBMC de patients infectés par le VIH, ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4+ par μ l de sang. B. Pourcentages de cellules NK exprimant la perforine parmi les PBMC de donneurs sains et de patients infectés par le VIH ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4+ par μ l de sang.

Question 6. Que pouvez-vous conclure du rôle des cellules NK ?

IF2007 TD-IF 7 :
Diversité et sélection des répertoires

Diversité et sélection des répertoires

I.

A partir de cellules isolées de moelle osseuse de souris, une lignée cellulaire est immortalisée par transfection avec le virus d'Abelson. Après six semaines de culture, la lignée C est clonée et trois sous-clones (C1, C2, C3) sont particulièrement étudiés. Un marquage direct des cellules avec des anticorps anti-isotypiques couplés à la fluorescéine donne les résultats suivants :

Anticorps couplés à la fluorescéine	Lignées cellulaires			
	C	C1	C2	C3
Anti- μ	-	-	+	-
Anti- κ	-	-	+	-

Ces lignées sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S . Une expérience d'immunoprécipitation à l'aide d'anti- μ est réalisée à partir du lysat cellulaire de chaque lignée. L'immunoprécipité est réduit et alkylé puis déposé sur un gel d'électrophorèse en présence de SDS. Après migration, le gel est autoradiographié. L'autoradiographie est présentée sur la Figure 1 :

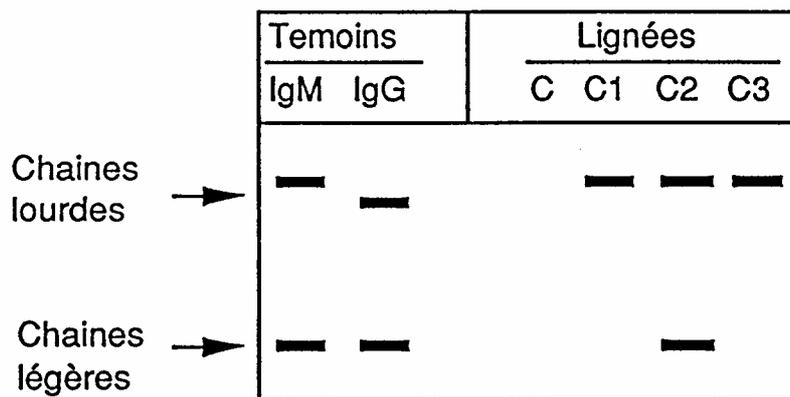


Figure 1

Question 1. Analyser les résultats.

L'ADN de chaque lignée est préparé puis coupé par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI*. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse. Après migration, l'ADN est transféré sur des filtres de nitrocellulose. Trois sondes radioactives présentées sur la Figure 2 sont utilisées pour des expériences d'hybridation (technique de Southern) :

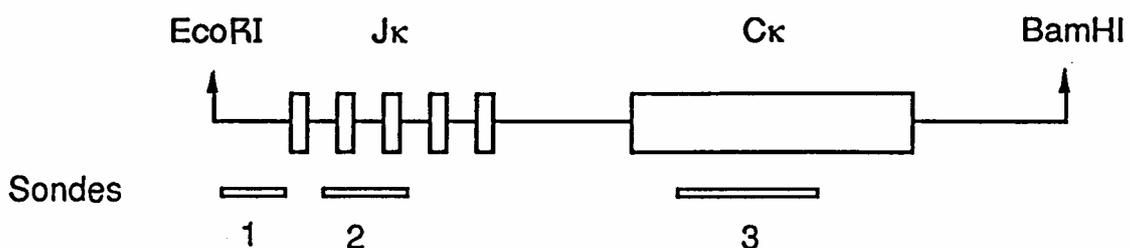


Figure 2

L'autoradiographie des filtres est présentée sur la Figure 3 :

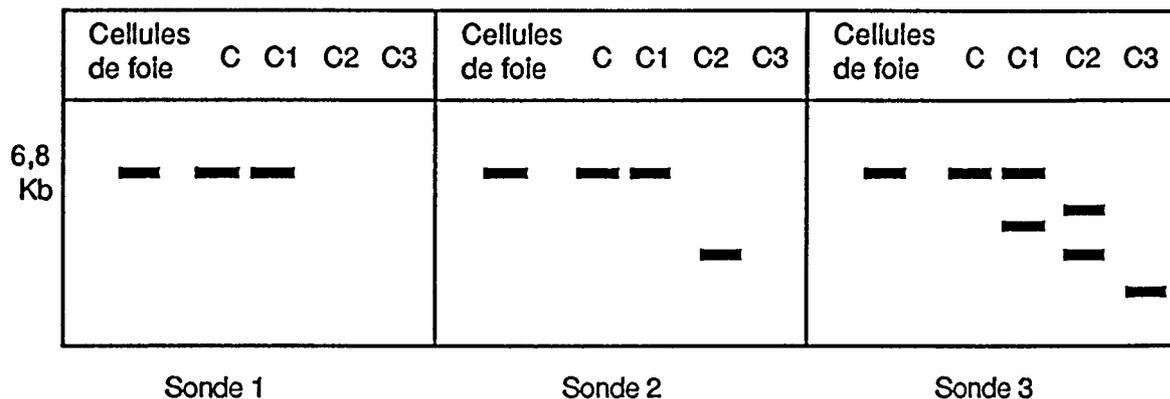


Figure 3

Question 2. Etablissez une corrélation entre l'expression des chaînes d'immunoglobuline et la présence de bandes d'hybridation.

Les lignées C1 et C3 sont cultivées pendant six semaines puis de nouveau clonées. Les mêmes expériences (marquage, immunoprécipitation et technique de Southern) sont réalisées pour l'étude de ces sous-clones. L'ensemble des résultats est présenté sur le Tableau II et les Figures 4 et 5 :

Anticorps couplés à la fluorescéine	Sous-clones de C1			Sous-clones de C3		
	C11	C12	C13	C31	C32	C33
Anti-μ	-	+	+	-	+	+
Anti-κ	-	+	+	-	-	-

Tableau II

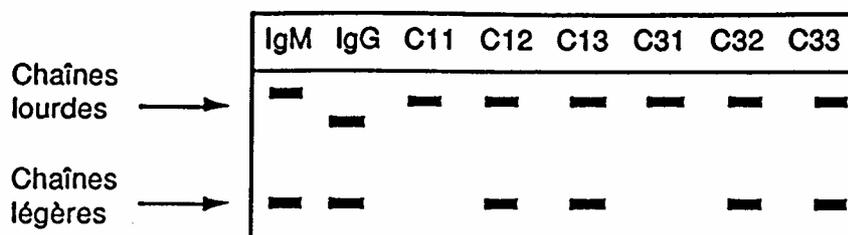


Figure 4: Electrophorèse en présence de SDS

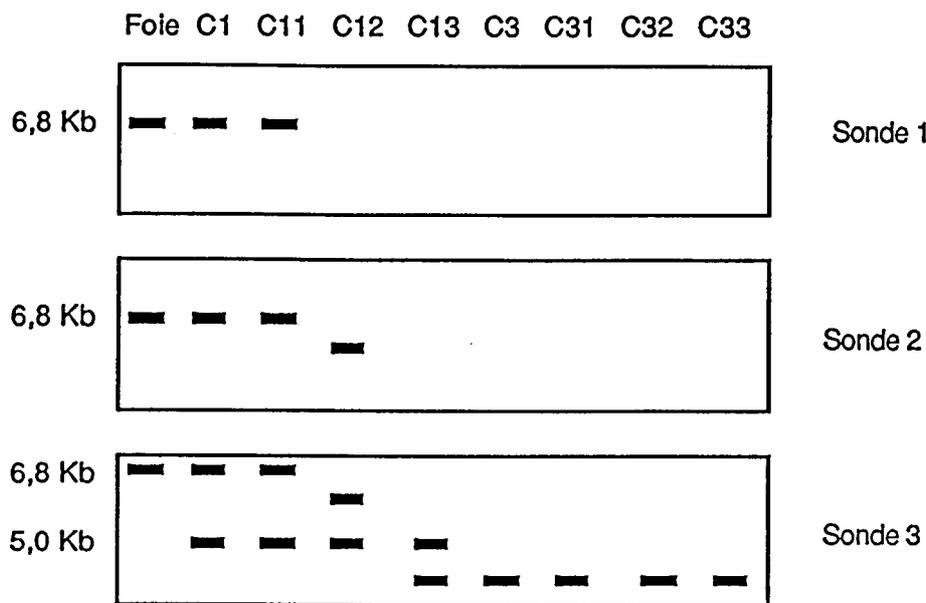
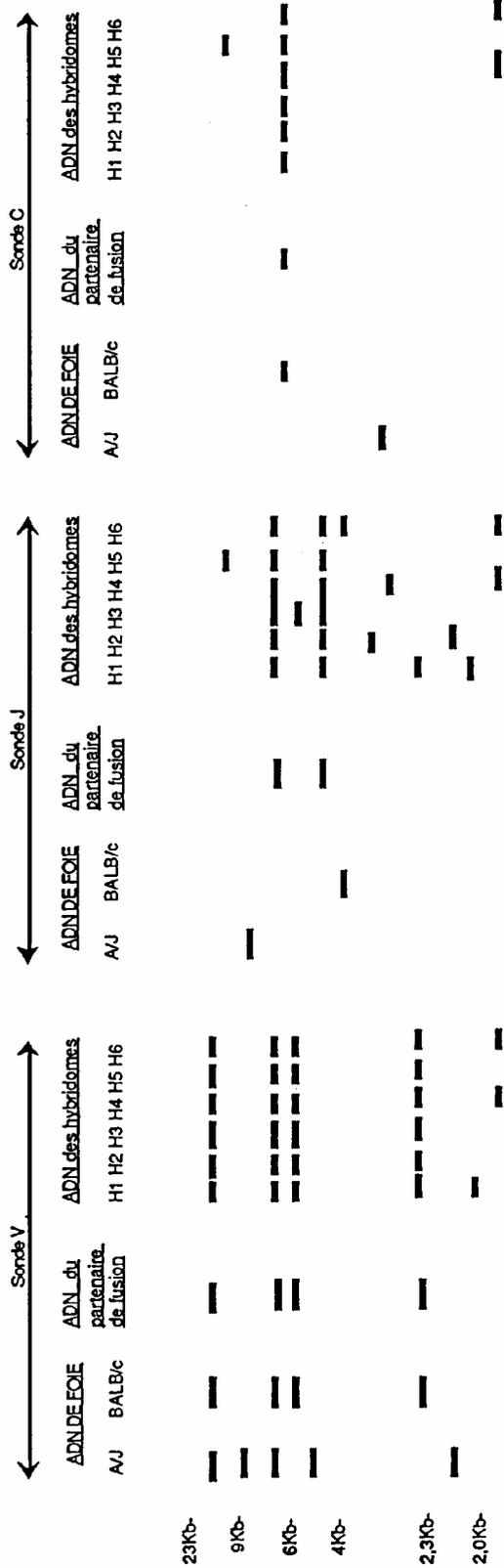


Figure 5: Hybridation de l'ADN génomique digéré

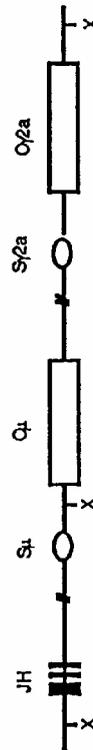
Question 3. Analyser ces résultats. Proposer un schéma explicitant les événements de recombinaison qui se sont produits dans les différentes lignées cellulaires.

II.

Six hybridomes anti-Ars sont obtenus chez la souris BALB/c. H1, H2 et H3 proviennent d'une souris ayant reçu une seule injection de Ars-KLH et H4, H5 et H6 d'une souris ayant reçu deux injections. L'ARNm de l'hybridome H6, d'isotype IgG2a, est purifié afin d'établir une banque d'ADN complémentaire (ADNc). Un clone contenant l'ensemble des segments de gène qui codent la chaîne lourde d'une immunoglobuline (Ig) permet de préparer trois sondes ADN codant pour chacun des segments V, J et C. La configuration de ces segments dans différentes préparations d'ADN est recherchée à l'aide de la technique de Southern. L'ADN des différents hybridomes ainsi que l'ADN de foie de souris BALB/c et A/J sont digérés par l'enzyme de restriction X, déposés sur un gel d'agarose soumis ultérieurement à une migration électrophorétique. L'ADN est ensuite transféré sur un filtre et hybridé avec l'une des sondes. Les résultats sont présentés sur la figure suivante :



Carte des sites de restriction au locus JH-CH de la souris BALB/c



Interprétez les résultats en rendant compte de :

- la multiplicité des bandes observées au niveau d'une piste ;
- la différence de taille des fragments entre AJ et BALB/c ;
- la présence de bandes supplémentaires avec l'ADN des hybridomes.

III. [pour mémoire]

(D'après Messaoudi *et al.* (2002) *Science* 298:1797)

Dans cette étude, les auteurs analysent la réponse lymphocytaire T contre le virus de l'Herpes (HVH-1) dans deux lignées de souris consanguines. Les auteurs ont montré au préalable que, chez ces souris la réponse est principalement dirigée contre un peptide particulier, le peptide HSV-8p, dérivé d'une protéine du virus, la glycoprotéine B.

Les lignées de souris étudiées sont les lignées C57BL/6 (B6), d'haplotype du CMH H2^b, et B6.C-H-2^{bm8} (bm8), d'haplotype du CMH H2^{bm8}. Ces deux lignées de souris sont génétiquement identiques hormis pour le gène codant la molécule de CMH de classe I H-2K. Les molécules H-2K^b et H-2K^{bm8} diffèrent de quatre acides aminés au niveau du site de fixation du peptide. Ces molécules sont par conséquent identiques pour ce qui est des régions de contact direct avec le TCR mais peuvent différer dans leur capacité à fixer et à présenter certains peptides ; elles peuvent donc différer dans leur capacité à induire les réponses T.

Question 1. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le mode de reconnaissance de l'antigène par le TCR.

Dans une première expérience, la survie des souris B6 et bm8, infectées par des doses croissantes du virus HVH-1, a été observée (Figure 1A). Dans une seconde expérience, les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose donnée de HVH-1 et la survie des souris a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K (Figure 1B).

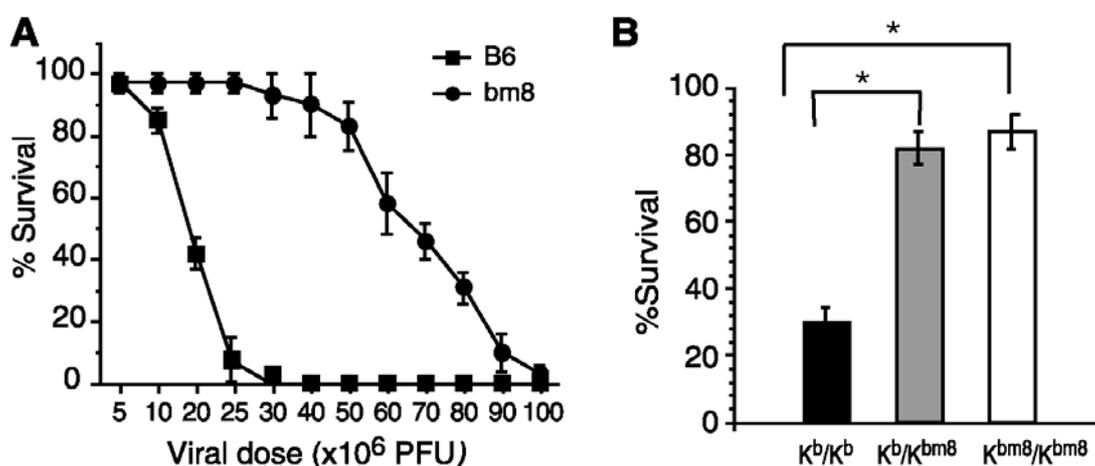


Figure 1 : (A) Les souris B6 et bm8 ont été infectées par des doses croissantes du virus HVH-1 (viral dose). La survie des souris (%survival) a été observée 100 jours après l'infection. (B) Les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose de 25.10⁶ pfu de HVH-1. La survie des souris, 100 jours après l'infection, a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K : K^b/K^b, K^b/K^{bm8} ou K^{bm8}/K^{bm8}. Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

Question 2. Analyser les résultats présentés sur la Figure 1. (10 lignes maximum)

Question 3. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre pour rendre compte de ces observations ? (8 lignes maximum)

Dans la suite de leur étude, les auteurs analysent la survie des souris B6 ou bm8 déficientes en cellules T CD8 (Figure 2A) ou en cellules NK (Figure 2B) après infection avec une dose donnée de HVH-1. Dans une autre expérience, la survie de souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8, après transfert, ou non, de cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 ou bm8, a été observée après infection avec une dose létale de HVH-1 (Figure 2C).

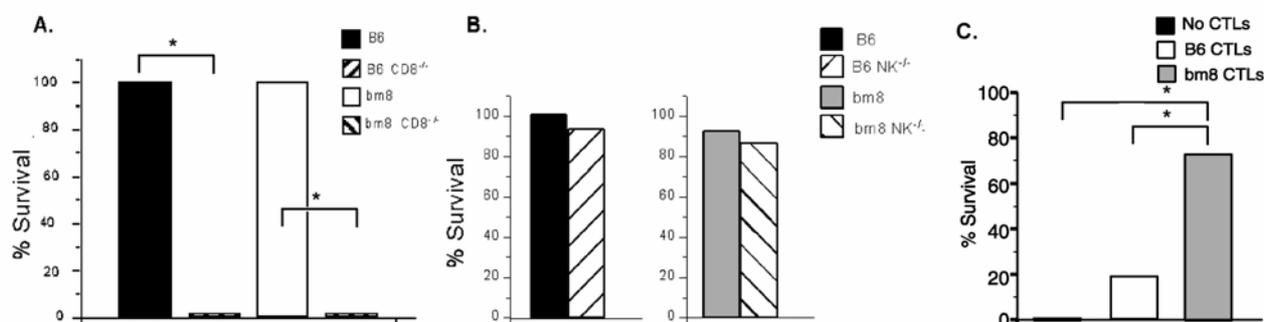


Figure 2 : (A) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules T CD8 (B6 CD8^{-/-} et bm8 CD8^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10⁶ pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (B) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules NK (B6 NK^{-/-} et bm8 NK^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10⁶ pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (C) Des souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8 ont reçu, ou non (no CTLs), des cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 (B6 CTLs) ou de souris bm8 (bm8 CTLs). Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

- Question 4.** Citer deux moyens par lesquels les auteurs ont pu obtenir des souris déficientes en cellules T CD8. (5 lignes maximum)
- Question 5.** Pour quelle raison les auteurs choisissent-ils d'étudier des souris déficientes en cellules T CD8 ou en cellules NK ? (5 lignes maximum)
- Question 6.** Analyser les résultats présentés sur la Figure 2. (15 lignes maximum)
- Question 7.** Ces résultats confirment-ils les hypothèses émises à la Question 3 ? (5 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs ont étudié le répertoire TCR β des cellules T CD8 de souris B6 ou bm8 infectées par le virus HVH-1 ou par un autre virus, le virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p chez les souris infectées par HVH-1 (Figure 3A) et parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide « Inf-ASN » chez les souris infectées par le virus Influenza (Figure 3B). On précise que, chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide « Inf-ASN » présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

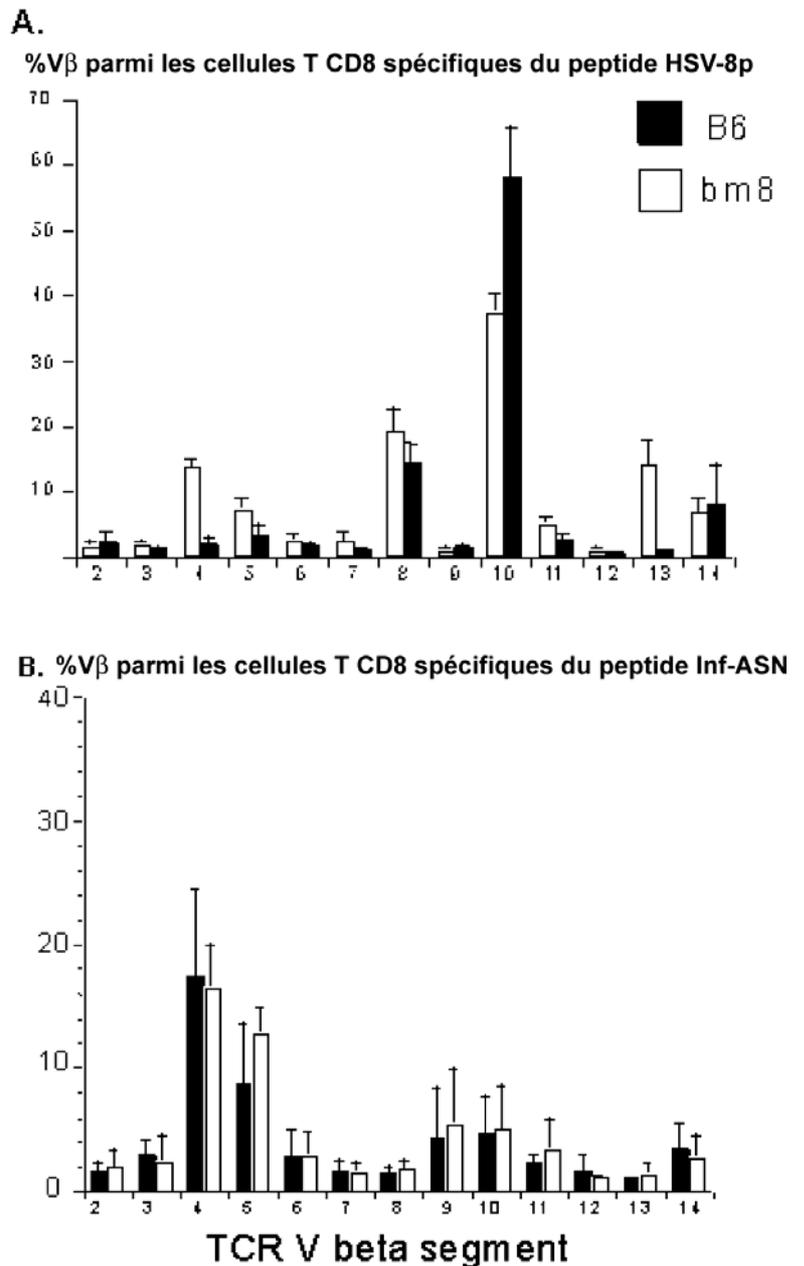


Figure 3: (A) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par le virus HVH-1. Le pourcentage d'expression des segments Vβ du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p. (B) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par un virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments Vβ du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide Inf-ASN. N.B. : Chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide Inf-ASN présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

- Question 8. A l'aide d'un schéma uniquement, résumez le mécanisme de génération de la diversité des anticorps et TCR.
- Question 9. Analysez les résultats présentés sur la Figure 3. (8 lignes maximum)
- Question 10. Sur la base de ces derniers résultats, comment interprétez-vous la différence de susceptibilité à l'infection par le virus HVH-1 chez les souris B6 et bm8 ? (8 lignes maximum)

IF2007 TD-IF 8 :
Sélection et Tolérance

Sélection et Tolérance

I. Problème n°1 du sujet d'examen de juin 1997

1) Les souris de la lignée **C57BL/6 (B6)** sont d'haplotype CMH H-2^b et sont I-E⁻ à cause d'un défaut dans le gène I-E α qui n'est pas exprimé dans cette lignée de souris. A partir de la lignée B6, on construit deux lignées de souris transgéniques : la lignée **B6.E α ^d** exprime le transgène I-E α ^d sous le contrôle d'un élément du promoteur des molécules du CMH de classe II ; la lignée **B6.CD11cE α ^d** exprime le transgène I-E α ^d sous le contrôle du promoteur de la molécule CD11c qui s'exprime normalement dans toutes les cellules dendritiques chez la souris. A l'aide d'anticorps anti-CD11c et anti-I-E^d couplés à des fluorochromes, on réalise un marquage sur des coupes de thymus de ces différentes souris. Les résultats de ces marquages vous sont présentés dans les **Tableau 1** et **Tableau 2**.

	souris C57BL/6	souris B6E α ^d	souris B6CD11cE α ^d
cortex:			
- ϕ épithéliales	-	-	-
médulla:			
- ϕ épithéliales	-	-	-
- ϕ dendritiques	+	+	+

Tableau 1 : Marquage des coupes de thymus avec anti-CD11c

	souris C57BL/6	souris B6E α ^d	souris B6CD11cE α ^d
cortex:			
- ϕ épithéliales	-	+	-
médulla:			
- ϕ épithéliales	-	+	-
- ϕ dendritiques	-	+	+

Tableau 2 : Marquage des coupes de thymus avec anti-I-E

Question 1. Quelles sont les molécules de classe II du CMH exprimées dans ces différentes souris ? Commentez ces résultats.

2) Dans certaines lignées de souris qui expriment la molécule I-E, les cellules T qui utilisent les segments V β 5 ou V β 11 pour produire leur chaîne β de TCR sont éliminées dans le thymus ; ceci correspond à un phénomène de sélection négative. On analyse les cellules spléniques des différentes souris avec des anticorps anti-V β 5, anti-V β 11, anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats de ces marquages vous sont présentés dans le **Tableau 3**.

	souris C57BL/6	souris B6E α^d	souris B6CD11cE α^d
Au sein de la population CD4⁺:			
% de cellules V β 5 ⁺	4	0,6	0,7
% de cellules V β 11 ⁺	4	0,2	0,3
Au sein de la population CD8⁺:			
% de cellules V β 5 ⁺	15	1,1	1,3
% de cellules V β 11 ⁺	6	0,4	0,7

Tableau 3 : Pourcentage de cellules T spléniques exprimant V β 5 et V β 11 dans les souris C57BL/6, B6.E α^d et B6.CD11cE β^d .

Question 2. A quoi l'élimination des cellules T V β 5⁺ et V β 11⁺ est-elle liée ?

Question 3. Expliquez ces résultats. Que pouvez-vous en conclure quant aux cellules capables de réaliser la sélection négative dans le thymus ?

3) Les souris C57BL/6, B6.E α^d et B6.CD11cE α^d ont été croisées avec des souris B6.I-A^{-/-}. On obtient ainsi des souris B6.I-A^{-/-}, B6.E α^d I-A^{-/-} et B6.CD11cE α^d I-A^{-/-} qui n'expriment pas la molécule du CMH de classe II I-A. On réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux sur les splénocytes et les thymocytes de ces souris à l'aide d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats sont présentés en Figure 1.

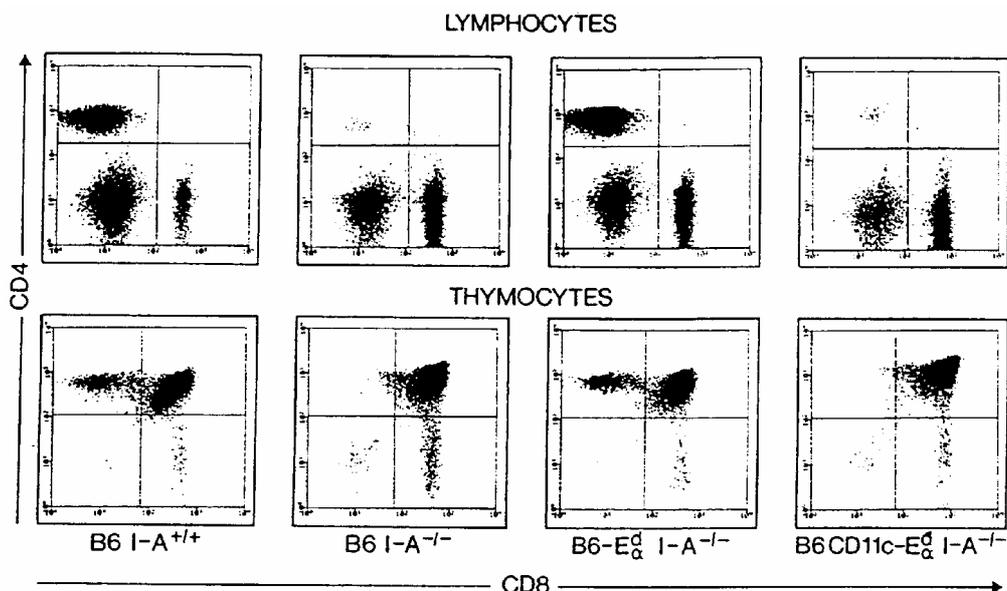


Figure 1 : Marquage des splénocytes et les thymocytes des souris C57BL/6 (B6), B6 I-A^{-/-}, B6.E α^d I-A^{-/-} et B6.CD11cE α^d I-A^{-/-} avec anti-CD4 et anti-CD8.

Question 4. Analysez ces résultats en commentant l'influence des transgènes sur la proportion de cellules T CD4⁺ dans la rate et le thymus des différentes souris.

Question 5. Quelles informations concernant la sélection thymique pouvez-vous déduire de l'ensemble de ces expériences?

II. Problème n°2 du sujet d'examen de juin 1997

1) On introduit dans des ovocytes fécondés de souris C57BL/6 d'haplotype H-2^b deux transgènes contenant les gènes réarrangés codant respectivement pour la chaîne α et la chaîne β du TcR d'un clone T spécifique du peptide 257-264 de l'ovalbumine (pOVA 257-264) présenté par H-2 K^b. Ce TcR utilise les segments de gènes V α 2 et V β 5. Les souris transgéniques ainsi obtenues sont croisées avec des souris de même haplotype, déficientes en β 2 microglobuline (β 2m^{-/-}). On obtient ainsi des souris TcRtg β 2m^{+/-} et des souris TcRtg β 2m^{-/-}. On réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V α 2 et anti-V β 5 couplés à des fluorochromes sur les thymocytes des différentes souris non transgéniques et transgéniques. Le résultat de cette expérience vous est présenté sur la **Figure 2** :

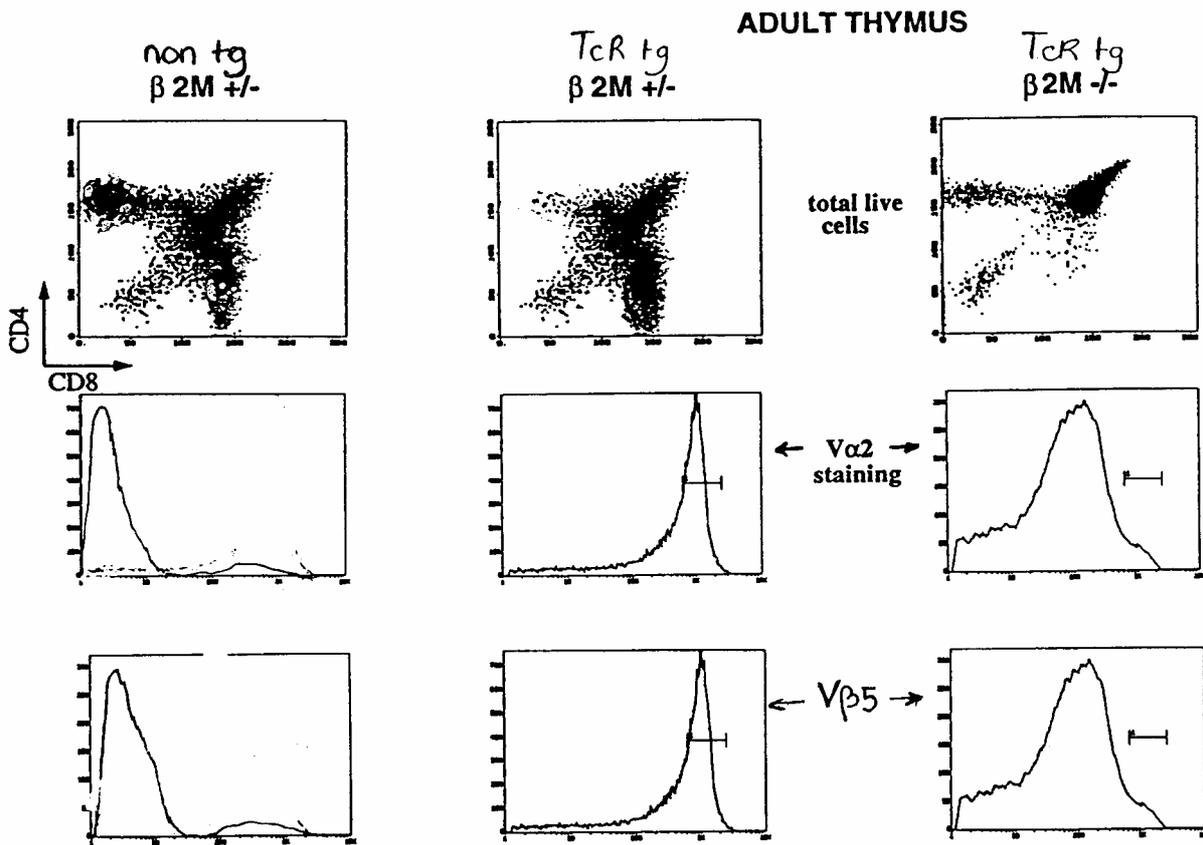


Figure 2 : Marquage des thymocytes de souris non transgéniques β 2m^{+/-} (non tg), TcRtg β 2m^{+/-} et TcRtg β 2m^{-/-} avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V α 2 et anti-V β 5.

Question 1. Analysez ces résultats en comparant et en expliquant les proportions de cellules simple-positives CD8⁺ dans les thymus des différentes souris.

2) On peut cultiver *in vitro* des lobes thymiques fœtaux. Ces cultures organotypiques de thymus fœtal (FTOC) permettent d'observer et de manipuler *in vitro* la maturation et la sélection des thymocytes. On réalise des cultures organotypiques de lobes thymiques fœtaux de souris **TcRtg $\beta 2m^{+/-}$** et de souris **TcRtg $\beta 2m^{-/-}$** , en ajoutant ou non à ces cultures le peptide pOVA. Après 7 jours de culture, les lobes sont récupérés et broyés pour en extraire les thymocytes. Un marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 est réalisé sur les thymocytes extraits de ces cultures organotypiques (**Figure 3**).

Les mêmes cultures sont réalisées en présence de concentrations différentes du peptide pOVA. On mesure les nombres de thymocytes $CD4^+CD8^+$ récupérés à l'issue des 7 jours de culture en fixant arbitrairement à 1 les nombres de cellules observés dans les cultures en absence de peptide ajouté (**Figure 4**).

Question 2. Analysez l'ensemble de ces résultats. A quel processus est due la diminution du nombre de cellules DP ? Explicitez en particulier ce qui se produit dans les lobes TcRtg $\beta 2m^{-/-}$.

Figure 3 :

Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ (+/- lobes) et de souris TcRtg $\beta 2m^{-/-}$ (-/- lobes) avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8.

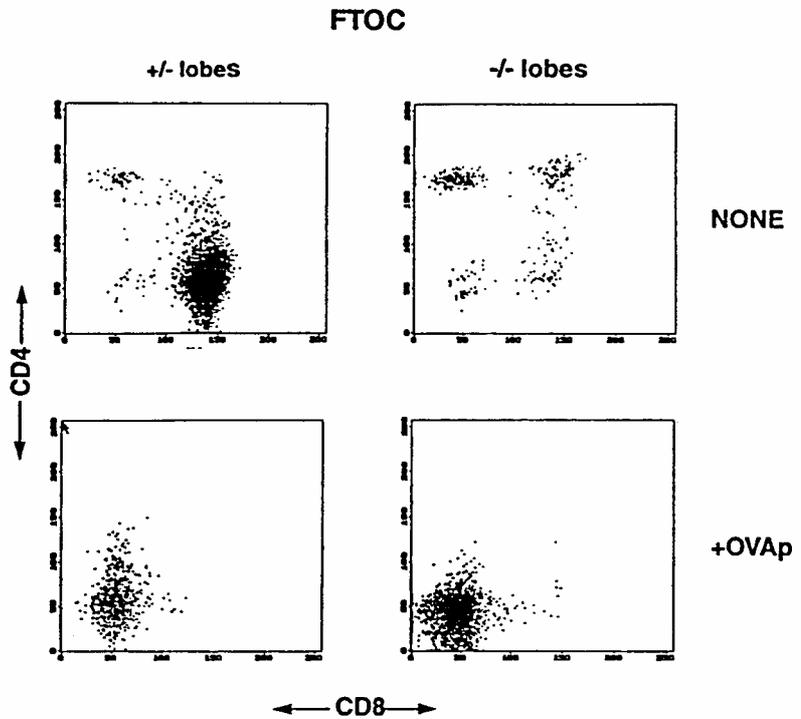
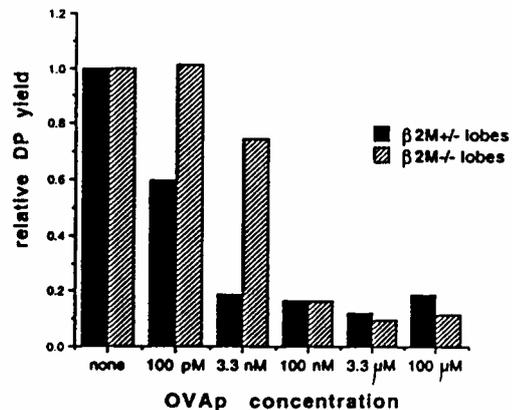


Figure 4 :

Nombre de cellules DP ($CD4^+CD8^+$) dans les lobes thymiques de souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ ($\beta 2m^{+/-}$ lobes) et de souris TcRtg $\beta 2m^{-/-}$ ($\beta 2m^{-/-}$ lobes) cultivés en présence de concentrations croissantes de pOVA.



3) On réalise des expériences similaires en ajoutant, au lieu de pOVA, aux cultures organotypiques, deux autres peptides tous deux capables de se fixer sur K^b avec la même affinité que le peptide pOVA :

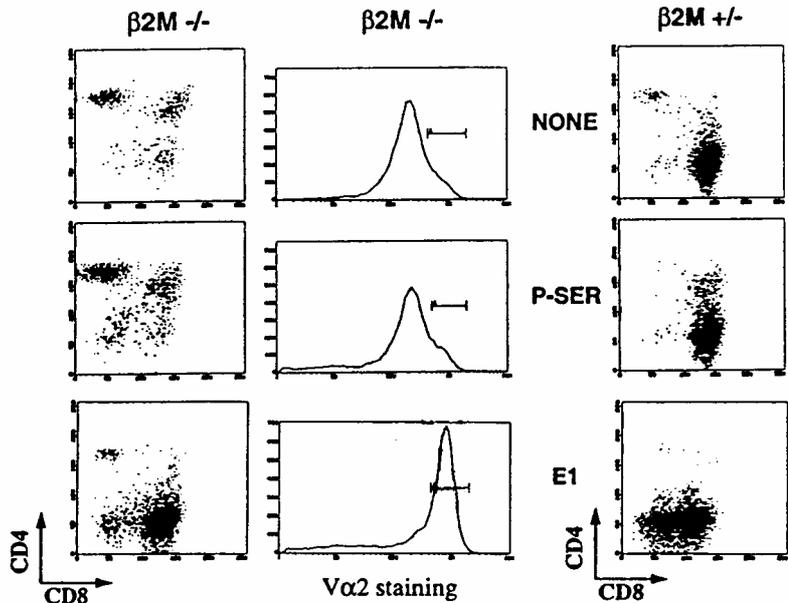
P-SER (S S Y S Y S S L) n'est jamais reconnu par le TcR transgénique.

E1 (E I I N F E K L) est un variant du peptide pOVA (S I I N F E K L).

Le résultat du marquage des thymocytes extraits des cultures organotypiques est montré à la **Figure 5** :

Figure 5 :

Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ ($\beta 2m^{+/-}$) et de souris TcRtg $\beta 2m^{-/-}$ ($\beta 2m^{-/-}$) cultivés en absence ou en présence de 20 μM de P-SER ou E1 avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-V $\alpha 2$.

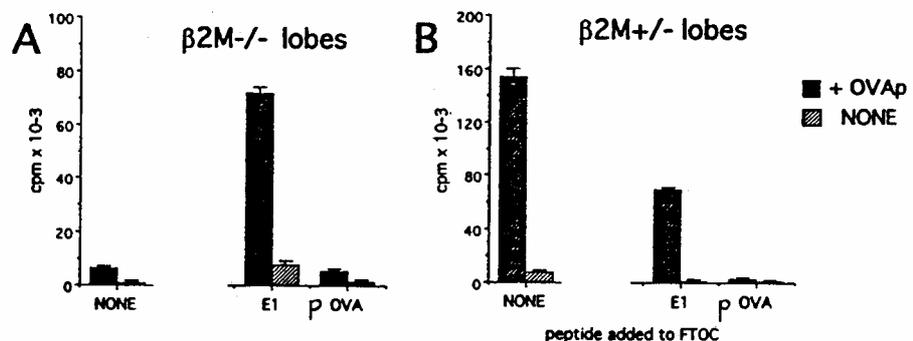


Question 3. Quels rôles jouent les peptides P-SER et E1 sur la sélection des cellules T exprimant le TcR transgénique dans les lobes des souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ et TcRtg $\beta 2m^{-/-}$?

4) Les cellules extraites des cultures organotypiques sont mises en culture *in vitro* en présence de cellules EL4 (qui expriment K^b) irradiées en absence (NONE) ou en présence de 10 nM du peptide pOVA (+ OVAp). Après 48h, on ajoute de la thymidine tritiée aux cultures et on évalue l'incorporation de thymidine tritiée 8 heures après. Les résultats sont présentés à la **Figure 6** :

Figure 6 :

Réponse des thymocytes extraits des FTOC au peptide antigénique pOVA.



Question 4. Que pouvez-vous en conclure sur les aptitudes fonctionnelles des cellules T extraites des différents types de FTOC, et pourquoi ?

5) A partir des souris TcRtg $\beta 2m^{+}$, on dérive un clone T cytotoxique spécifique du peptide pOVA présenté par H-2 K^b . Ce clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement

marquées au ⁵¹Cr, et des peptides pOVA, P-SER ou E1. La lyse des cellules EL4 est évaluée par mesure du ⁵¹Cr relargué dans le surnageant après 4 heures de culture. Le résultat de cette expérience est présenté en **Figure 7**.

Le même clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement marquées au ⁵¹Cr et préalablement chargées avec 2 pM de pOVA, et les peptides P-SER ou E1. La **Figure 8** montre le pourcentage d'inhibition de la lyse des cellules EL4 chargées en pOVA par les différents peptides.

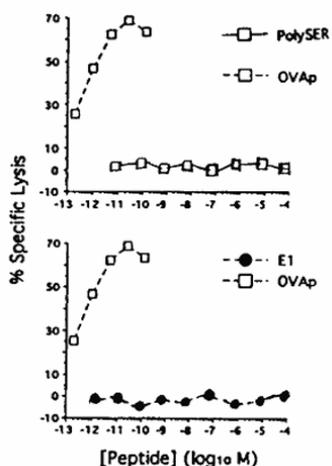


Figure 7

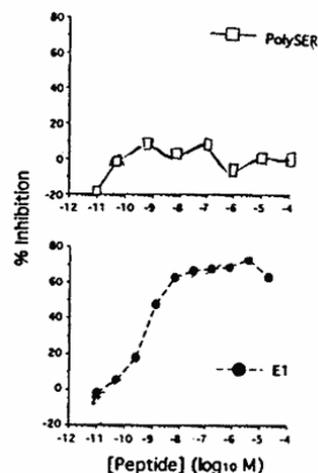


Figure 8

Question 5. Que peut-on en conclure sur les propriétés des peptides pOVA, P-SER et E1 ?

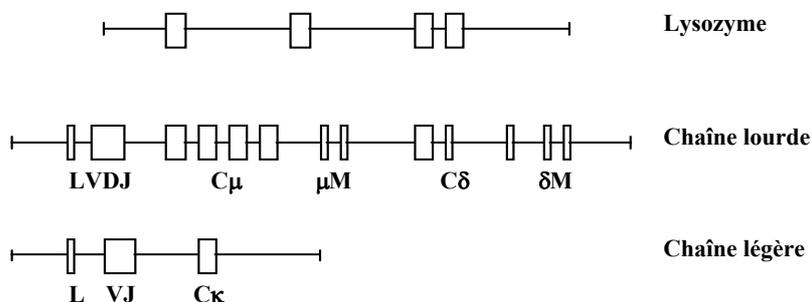
Question 6. Que suggère l'ensemble de ces résultats quant à la nature des peptides impliqués dans le processus de sélection positive dans le thymus ?

III.

(D'après Goodnow, C.C., et al. (1998) *Nature* 334:676 ; Adams, E., et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5687).

Trois types de souris transgéniques sont obtenus avec les transgènes présentés sur la **Figure 9** :

Figure 9



Les souris Lys-Tg possèdent le transgène lysozyme qui s'exprime de façon ubiquitaire dès le stade embryonnaire. Les souris Ig-Tg possèdent les transgènes codant les chaînes lourde et légère d'un anticorps anti-lysozyme. Les souris double-transgéniques (Dbl-Tg) possèdent l'ensemble des transgènes.

La réponse contre le lysozyme est étudiée dans des souris Lys-Tg, dans les lignées C57BL/6 (B6) ou C57BL/6 x CBA. Les souris sont immunisées avec le lysozyme seul ou le lysozyme couplé à des

globules rouges de cheval (GRC). Après immunisation, le titre anticorps anti-lysozyme est déterminé ainsi que la capacité des lymphocytes ganglionnaires à proliférer en présence de cellules présentatrices d'antigène et de lysozyme (**Tableau 4**).

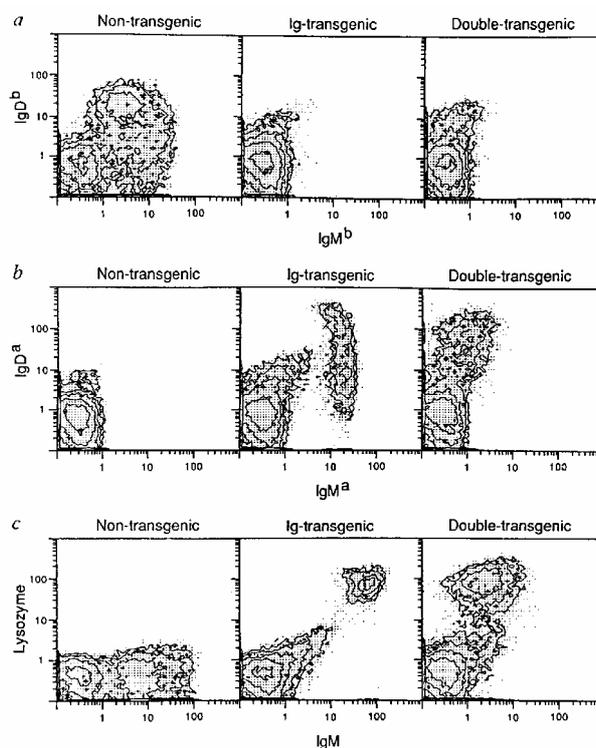
Question 1. Expliquer la différence de comportement entre les souris B6 et B6 x CBA ainsi que l'effet du transgène dans ces souris.

L'expression des transgènes d'immunoglobuline est étudiée dans les souris Ig-Tg ou Dbl-Tg par immunofluorescence sachant que les transgènes proviennent d'un hybridome issu de BALB/c (Igh^a) et que les souris B6 sont d'haplotype Igh^b.

Souris immunisées	Antigène immunisant	Titre anticorps en µg/ml	Incorporation thymidine (cpm)
B6	Lysozyme	<1	2 000
	Lysozyme-GRC	1 000	4 000
B6 Lys-Tg	Lysozyme	<1	2 200
	Lysozyme-GRC	<1	1 800
B6 x CBA	Lysozyme	1 200	40 000
	Lysozyme-GRC	1 500	48 000
B6 x CBA Lys-Tg	Lysozyme	<1	1 800
	Lysozyme-GRC	<1	1 900

Tableau 4

Figure 10



Question 2. Analyser les résultats présentés sur la **Figure 10** qui illustre les analyses de fluorescence des cellules spléniques provenant de souris B6, transgéniques ou non.

La sécrétion spontanée d'IgM^a ainsi que le nombre de plages de lyse anti-lysozyme sont évalués dans les souris Ig-Tg et Dbl-Tg (**Tableau 5**).

Souris	IgM ^a (µg/ml)	Nombre de plages de lyse anti-lysozyme par rate
B6 Ig-Tg	40	9 450
B6 Dbl-Tg	2	<100

Tableau 5

Question 3. Ces résultats sont-ils en accord avec l'analyse d'immunofluorescence présentée à la Question 2 ? Expliquer.

Des expériences de transfert de cellules sont effectuées dans des souris receveurs B6 irradiés. 10⁵ cellules spléniques de souris non-immunisées normales ou transgéniques sont transférées avec 5.10⁶ cellules spléniques de souris B6 ayant été immunisées contre des globules rouges de cheval. Après immunisation avec du lysozyme-GRC, le titre sérique anti-lysozyme est déterminé dans les souris receveurs (**Tableau 6**).

Cellules transférées		Antigène lysozyme-GRC	Titres anticorps anti-lysozyme
10 ⁵ cellules	5.10 ⁶ cellules "sensibilisées aux GRC"		
B6	B6	-	<1
B6 Ig-Tg	B6	-	<1
B6 Dbl-Tg	B6	-	<1
B6	B6	+	<1
B6 Ig-Tg	B6	+	40
B6 Dbl-Tg	B6	+	<1

Tableau 6

Question 4. Quelle est la nature des cellules lymphocytaires impliquées dans la non-réponse au lysozyme des souris double-transgéniques ?

IF2007 TD-IF 9 :
Révisions/Questions – Sujet d'examen IF2006 juin

Révisions/Questions

Epreuve d'Immunologie Fondamentale – juin 2006

(D'après Anderson, M. S., et al. (2005) *Immunity* 23:227)

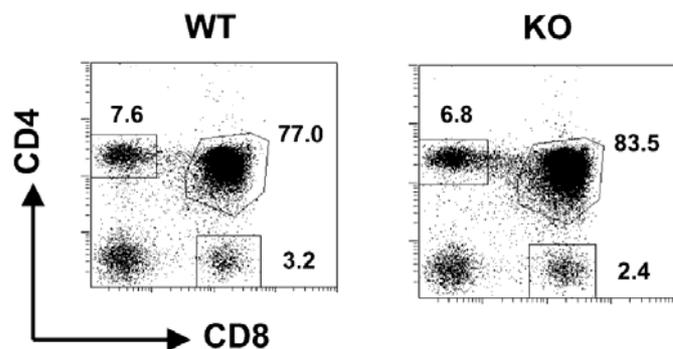
Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle de AIRE (*Auto-Immune Regulator*), produit d'un gène récemment identifié, agissant apparemment comme un facteur de transcription. AIRE est supposé intervenir dans le contrôle du développement de l'auto-immunité en induisant la transcription d'un nombre important de gènes codant des protéines, normalement spécifiques de tissus périphériques, au niveau des cellules épithéliales thymiques.

Dans un premier temps, les thymocytes de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour AIRE (KO) sont étudiés par cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats sont présentés sur la Figure 1.

Figure 1

Des thymocytes de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour AIRE (KO) ont été isolés, incubés en présence d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes puis analysés en cytométrie en flux. Les nombres indiqués correspondent aux pourcentages de thymocytes dans les sous-populations encadrées.

N.B. : On précise que le nombre total de thymocytes est comparable pour les deux lignées de souris.



- Question 1.** A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez les grandes lignes de la différenciation thymique.
- Question 2.** A votre avis, comment la fonction régulatrice de l'auto-immunité de AIRE, comme supposée dans l'introduction, peut-elle s'exercer ? [5 lignes maximum]
- Question 3.** Analysez les résultats présentés sur la Figure 1. Que concluez-vous ? [8 lignes maximum]

Dans les expériences présentées ci-dessous, les auteurs essayent de préciser la fonction de AIRE sur la sélection du répertoire lymphocytaire T. Dans une première expérience, le rôle de AIRE sur la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg) est étudié en comparant les populations lymphocytaires observées, dans différents organes, chez des souris déficientes pour AIRE (KO) ou chez des souris de type sauvage (WT). On rappelle ici que l'expression des marqueurs CD4 et CD25 a été démontrée à la surface de certaines cellules Treg, combinée à l'expression du facteur de transcription *Foxp3*. Les résultats sont présentés sur la Figure 2.

- Question 4.** Sachant que *Foxp3* est un facteur de transcription, rappelez, à l'aide d'un schéma uniquement, par quelle variante de la technique de cytométrie cette protéine peut être détectée ?
- Question 5.** Analysez les résultats de la Figure 2. [10 lignes maximum]

Question 6. *En particulier, à l'aide d'un tableau uniquement, indiquez le phénotype et les caractéristiques fonctionnelles des quatre sous-populations mises en évidence sur ces diagrammes.*

Question 7. *Quelle(s) conclusion(s) pouvez-vous émettre quant aux conséquences de l'absence de AIRE chez les souris KO sur la différenciation des cellules Treg ? [5 lignes maximum]*

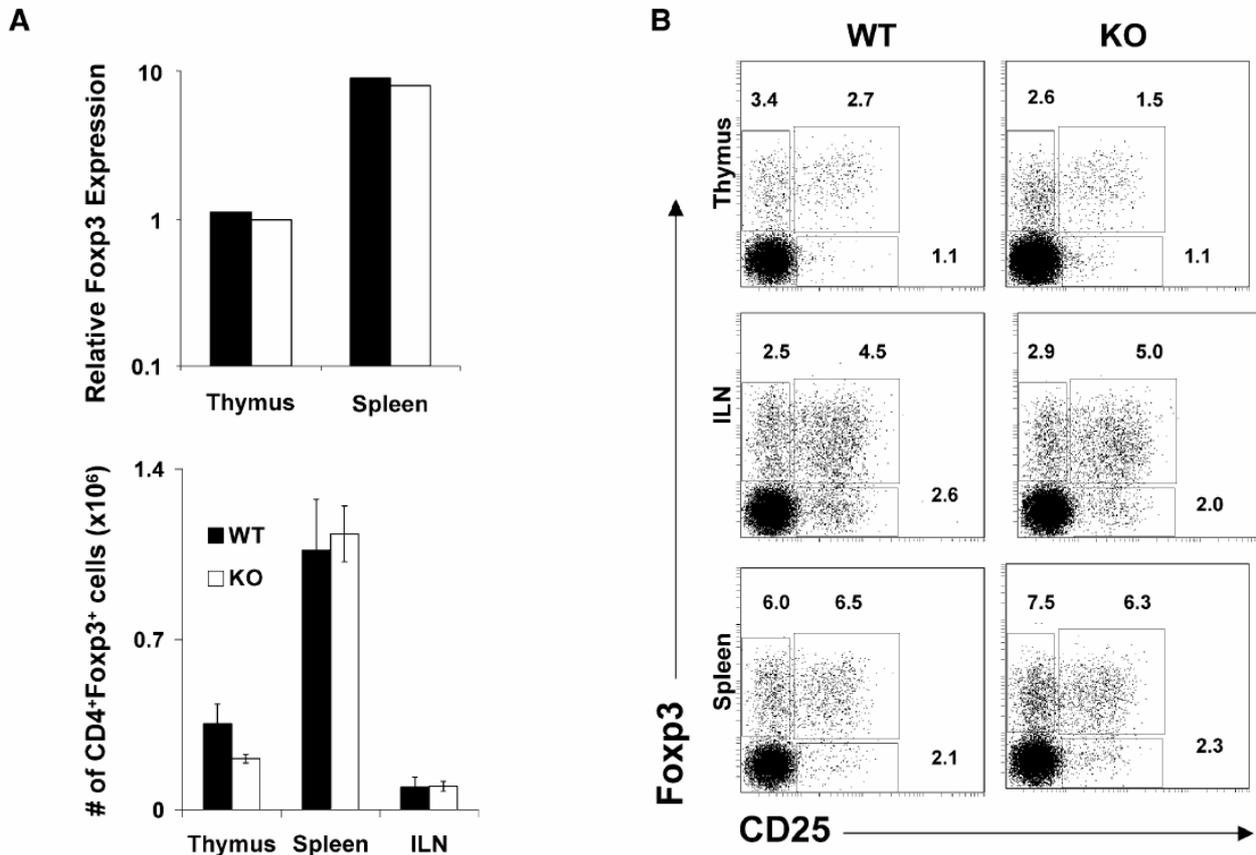


Figure 2

A :
Haut : Le taux de niveau d'expression du gène Foxp3 (Relative Foxp3 Expression) est évalué par RT-PCR dans le thymus et dans la rate (spleen) de souris déficientes pour AIRE (KO ; barres blanches) ou de type sauvage (WT ; barres noires).
Bas : Mesure du nombre de cellules CD4⁺ Foxp3⁺ dans le thymus, la rate (spleen) et les ganglions inguinaux (ILN) de souris déficientes pour AIRE (KO ; barres blanches) ou de type sauvage (WT ; barres noires).
B : Les cellules du thymus, des ganglions inguinaux (ILN) et de la rate (spleen) de souris déficientes pour AIRE (KO) ou de type sauvage (WT) ont été marquées avec les anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 et anti-Foxp3 couplés à des fluorochromes. Les cellules ainsi marquées sont analysées par cytométrie en flux. Les diagrammes présentés montrent l'expression de Foxp3 et CD25 au sein de la sous-population CD4⁺CD8⁻. Les nombres indiqués correspondent, pour chaque organe étudié, aux pourcentages de cellules CD4⁺CD8⁻ dans chaque fenêtre d'analyse.

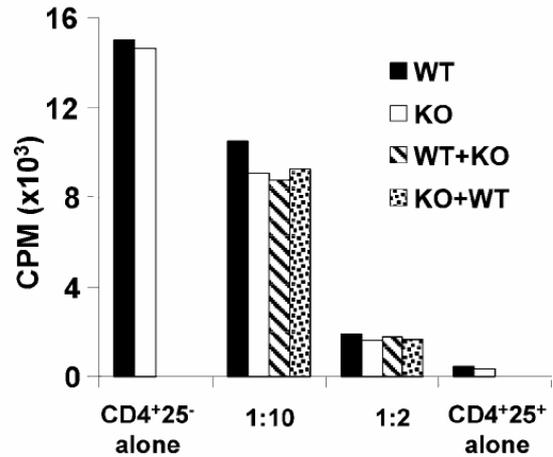
Dans l'expérience suivante, les auteurs testent la capacité des cellules Treg (CD4⁺CD25⁺) à proliférer par comparaison aux cellules T classiques (CD4⁺CD25⁻), également dénommée cellules T conventionnelles. Pour cela, ils incubent ces sous-populations, pures ou mélangées, avec des anticorps anti-CD3 en présence de cellules de rate irradiées et mesurent la prolifération par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

Figure 3

Des cellules CD4⁺CD25⁺ seules ou mélangées avec des cellules CD4⁺CD25⁻ en proportions 1:10 ou 1:2, ou des cellules CD4⁺CD25⁻ seules, provenant de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour AIRE (KO), ont été incubées en présence d'anticorps anti-CD3 et de cellules de rate irradiées. Leur prolifération a alors été mesurée par incorporation de thymidine tritiée.

N.B. :

- WT+KO correspond au mélange de cellules CD4⁺CD25⁺ WT avec des cellules CD4⁺CD25⁻ KO ;
- KO+WT correspond au mélange de cellules CD4⁺CD25⁺ KO avec des cellules CD4⁺CD25⁻ WT



Question 8. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le principe d'une autre technique permettant de détecter la prolifération cellulaire.

Question 9. Pourquoi les cellules sont-elles incubées en présence d'anticorps anti-CD3 et de cellules de rate irradiées ? [5 lignes maximum]

Question 10. Après analyse des résultats de la Figure 3, que concluez-vous quant au potentiel des cellules testées ? [10 lignes maximum]

Dans une dernière expérience, les auteurs étudient le rôle de AIRE dans la sélection thymique. Pour cela, les souris transgéniques suivantes sont obtenues :

- OT-II⁺ Aire^{+/+} : souris transgénique pour les chaînes α et β d'un TCR spécifique d'un peptide dérivé de l'ovalbumine (OVA) présenté par la molécule de CMH I-A^b. Cette lignée de souris exprime AIRE.
- OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/+} : souris OT-II⁺ également transgénique pour le gène codant OVA sous promoteur de l'insuline. Cette lignée de souris exprime AIRE.
- Après croisements des souris OT-II⁺ RIP-OVA⁺ avec les souris déficientes pour AIRE, les souris OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/-} et OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{-/-} sont obtenues.

Pour chacune des quatre lignées, les thymocytes sont analysés en cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.

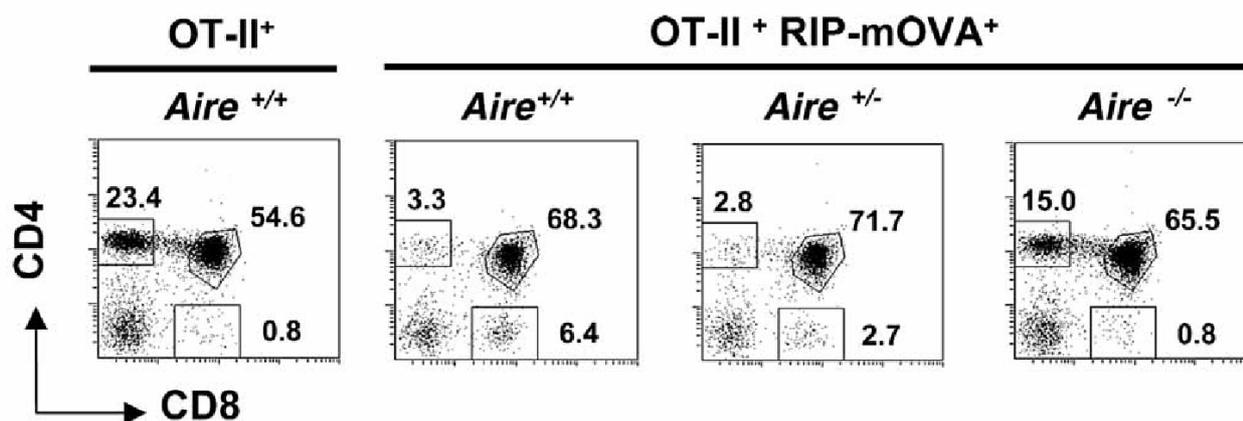


Figure 4

Les thymocytes de souris OT-II⁺ Aire^{+/+}, OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/+}, OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/-} et OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{-/-} sont incubés avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes et analysés en cytométrie en flux. Les nombres correspondent aux pourcentages de thymocytes dans les sous-populations encadrées.

N.B. : OT-II est un transgène codant un TCR $\alpha\beta$ spécifique d'un peptide dérivé de l'ovalbumine (OVA) présenté par la molécule de CMH I-A^b. RIP-OVA est un transgène codant l'ovalbumine sous promoteur de l'insuline.

Question 11. *A priori dans quel tissu attend-on l'expression du transgène OVA ? [5 lignes maximum]*

Question 12. *Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 4. [15 lignes maximum]*

Question 13. *Quelle(s) conclusion(s) tirez-vous de ces expériences concernant le rôle de AIRE ? [5 lignes maximum]*