

Cytokines & Chimiokines

I.

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

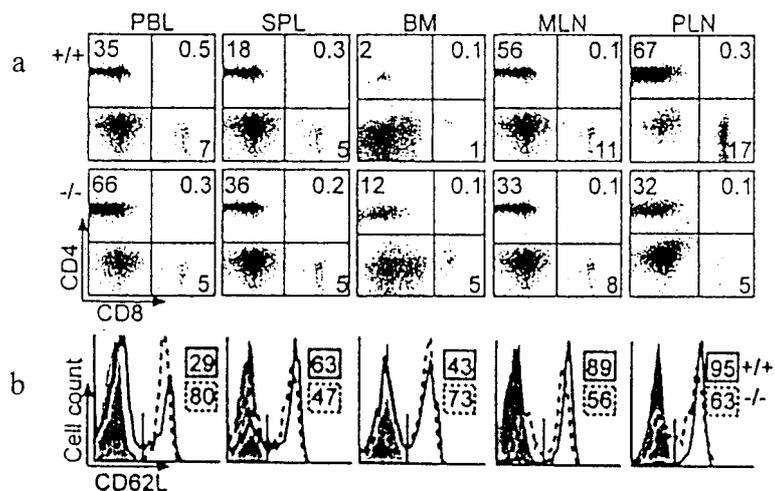
Dans le but d'étudier la régulation de la circulation des leucocytes dans l'organisme, des souris déficientes pour le récepteur CCR7 de chimiokine ont été générées par recombinaison homologue. Dans tous les cas, les animaux mutés sont viables et fertiles. On se propose d'étudier les conséquences de la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

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

Figure 1

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

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

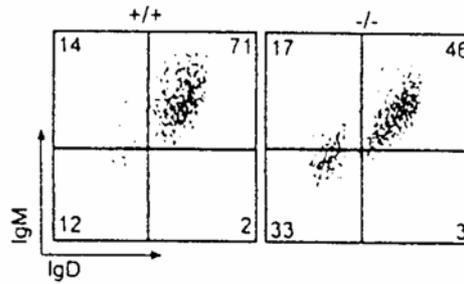


Question 1. Commentez l'ensemble des résultats.

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

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

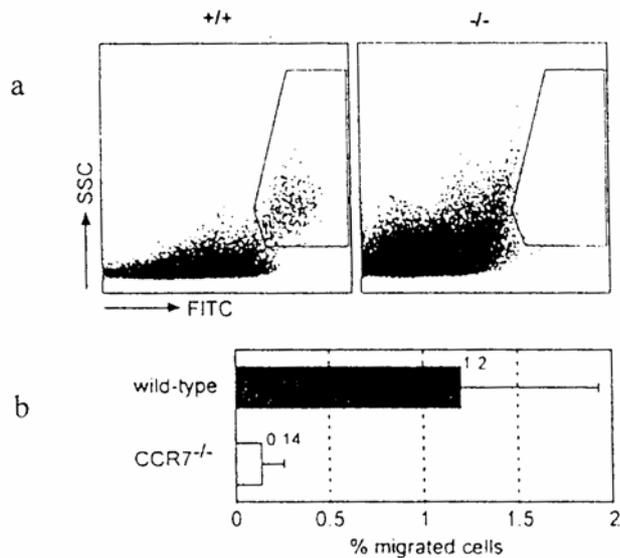
Figure 2



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

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

Figure 3



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

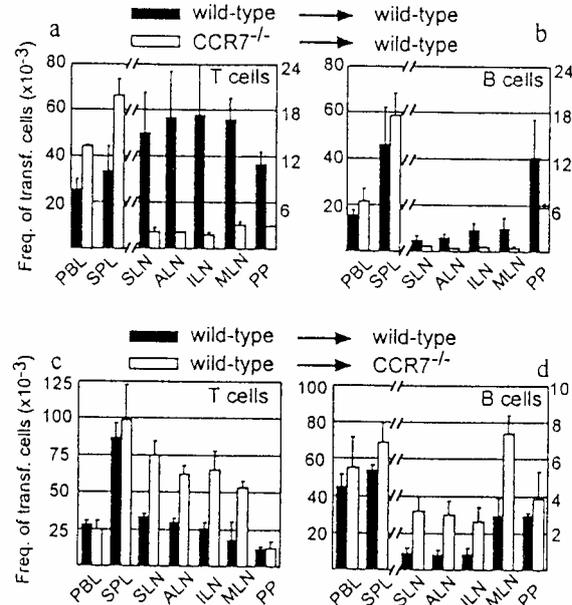
Les lymphocytes T (Thy-1⁺) et B naïfs (IgD⁺) fluorescents, issus de souris de type sauvage ou mutantes CCR7^{-/-} sont injectés à des animaux de type sauvage (**Figure 4a et b**) ; par ailleurs, les lymphocytes T (Thy-1⁺) et B naïfs (IgD⁺) fluorescents, issus de souris de type sauvage sont injectés à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

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

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

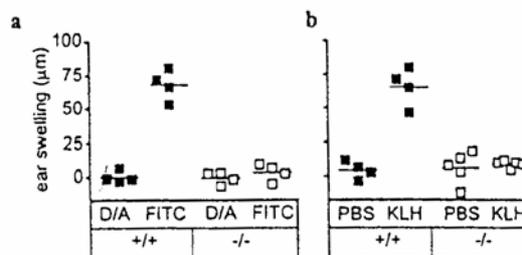
Figure 4

PBL: lymphocytes du sang périphérique; SPL: rate; SLN: ganglions lymphatiques 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 de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7 (-/-) est réalisée (expérience a). L'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HR) est d'autre part étudiée en injectant de l'hémocyanine (KLH) par voie sous-cutanée aux animaux de type sauvage ou mutantes 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

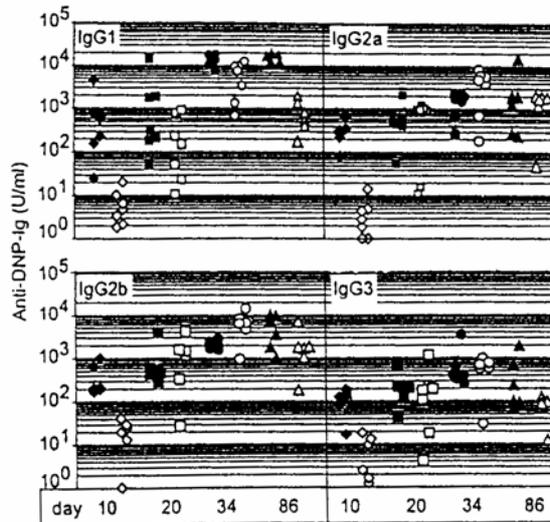
Question 6. Rappelez brièvement les différentes étapes provoquant l'inflammation locale d'un tissu. Pourquoi réalise-t-on ces expériences ? Que permettent-elles de confirmer ?

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

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

Figure 6 :

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



II.

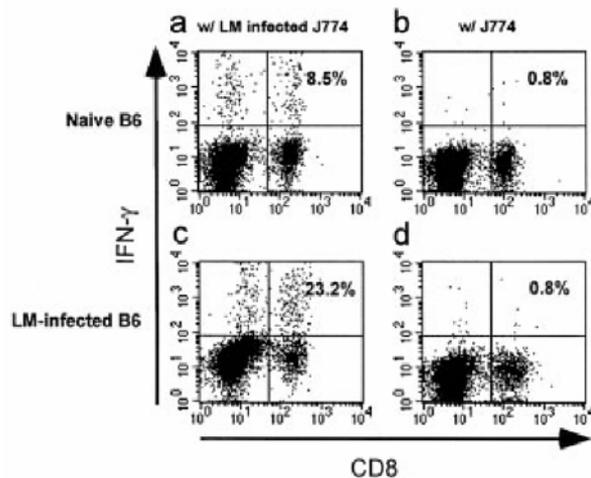
(Examen d'Immunologie Fondamentale - septembre 2004. D'après Berg, R. E. *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2807)

Les auteurs de la présente étude s'intéressent à l'induction de la sécrétion d'IFN γ par les cellules T CD8⁺ en réponse à l'infection par *Listeria monocytogenes*, une bactérie intracellulaire infectant les macrophages.

Dans une première expérience, par la technique de marquage intracellulaire et analyse en cytométrie de flux, on étudie la production d'IFN γ par des cellules T CD8⁺ provenant de souris C57BL/6, infectées ou non par *L. monocytogenes*, mises en culture avec des cellules de la lignée de macrophage J774 infectées ou non par *L. monocytogenes* (Figure 3).

Figure 7 : Sécrétion d'IFN γ par des cellules T CD8⁺ naïves ou immunes vis-à-vis de *L. monocytogenes*

Des souris C57BL/6 ont été infectées par *L. monocytogenes*. 5 jours plus tard, la rate de souris infectées (LM-infected B6 ; c & d) et de souris contrôles non infectées (Naive B6 ; a & b) a été prélevée. Les splénocytes ont été mis en culture pendant une nuit en présence de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes* (w/ LM infected J774 ; a & c) ou non infectées (w/ J774 ; b & d). Les cellules ainsi cultivées ont été marquées, en surface par l'anticorps anti-CD8 et dans le cytoplasme par l'anticorps anti-IFN γ et analysées par cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules CD8⁺ produisant de l'IFN γ est indiqué dans chaque graphe.



Question 1. A l'aide d'un tableau comparatif synthétique, expliquez le principe de la technique de détection de la production d'IFN γ mise en œuvre pour obtenir les résultats présentés à la Figure 3 ainsi qu'une autre technique de détection de la production d'IFN γ , en précisant les avantages ou inconvénients relatifs de ces techniques.

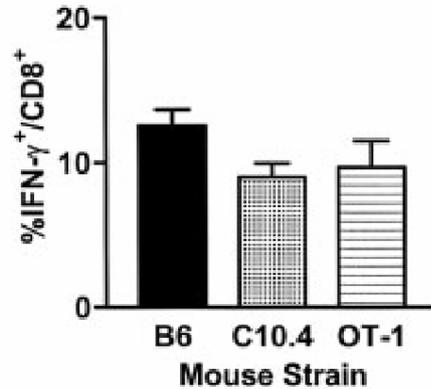
Question 2. Analyser les résultats présentés à la Figure 3. (5 lignes maximum)

Dans une deuxième expérience, on étudie la production d'IFN γ par les cellules T CD8⁺ de différentes lignées de souris : C57BL/6, C10.4, une lignée transgénique pour un TCR spécifique d'un peptide f-MIVTLF présenté par la molécule de CMH de classe I non classique M3, et OT-1, une lignée transgénique pour un TCR spécifique du peptide SIINFEKL présenté par K^b. Les résultats sont présentés à la Figure 8.

Figure 8 : Sécrétion d'IFN γ par les cellules T CD8⁺ de différentes lignées de souris

Les splénocytes de souris C57BL/6, C10.4 et OT-1 ont été mis en culture pendant une nuit en présence de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes*. Les cellules ainsi cultivées ont été marquées, en surface par l'anticorps anti-CD8 et dans le cytoplasme par l'anticorps anti-IFN γ puis analysées par cytométrie de flux. Les résultats présentés indiquent le pourcentage de cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN γ .

N.B. : on précise que moins de 1% des cellules T CD8⁺ produisent de l'IFN γ après culture avec des cellules J774 non infectées.



Question 3. Analysez ces résultats. (5 lignes maximum)

Question 4. Quelle information ces deux expériences donnent-elles quant à la nature du signal conduisant à la production d'IFN γ par les cellules CD8⁺? (5 lignes maximum)

Dans la troisième expérience, les auteurs cherchent à caractériser les facteurs responsables de la production d'IFN γ par les cellules CD8⁺. Les résultats sont présentés à la Figure 9.

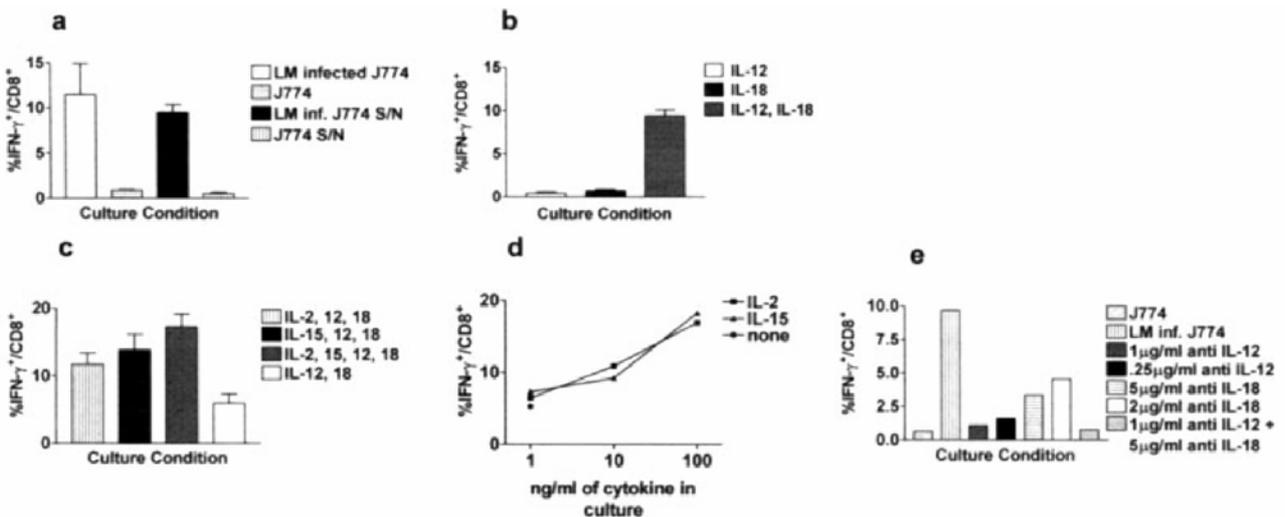


Figure 9 : Rôle des cytokines dans la production d'IFN γ par les cellules T CD8⁺

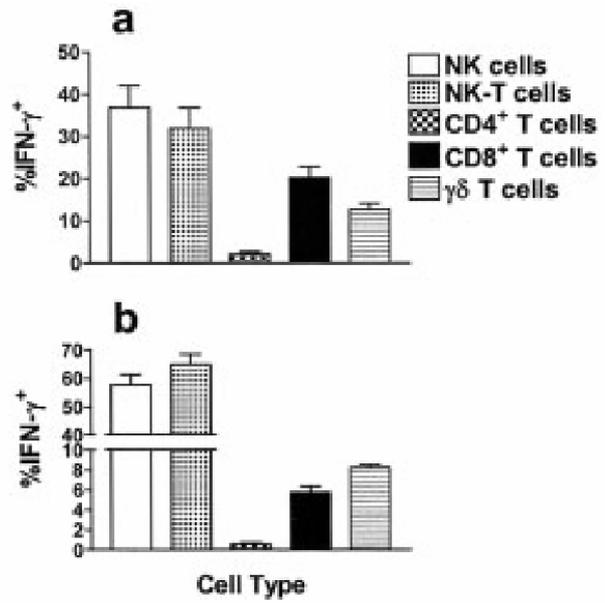
- (a) Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes* (LM infected J774) ou non (J774), ou en présence de surageant de culture de cellules J774 infectées par (LM inf. J774 S/N) ou non (J774 S/N).
- (b) Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de 5 ng/ml d'IL-12, de 10 ng/ml d'IL-18, ou d'une combinaison de ces deux cytokines, chaque fois en présence d'IL-2.
- (c) Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence des différentes combinaisons de cytokines suivantes : 100 ng/ml d'IL-2, 100 ng/ml d'IL-15, 5 ng/ml d'IL-12, et/ou 10 ng/ml d'IL-18.

- (d) Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de 5 ng/ml d'IL-12 et 10 ng/ml d'IL-18, et de concentrations croissantes d'IL-2 ou d'IL-15.
 - (e) Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de cellules J774 non infectées (J774), de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes* (LM inf. J774), en présence ou non de combinaisons d'anticorps bloquants anti-IL-12 et/ou anti-IL-18 comme indiqué.
- Les graphes a-e indiquent, pour chacune des conditions expérimentales décrites, le pourcentage de cellules T CD8⁺ produisant de l'IFN_γ.

Dans l'expérience suivante, on cherche à comparer la production d'IFN_γ par différentes populations de cellules de la rate soit *in vitro* en présence d'une combinaison de cytokines, soit *ex vivo* chez des souris infectées par *L. monocytogenes*. Les résultats sont présentés sur la **Figure 10**.

Figure 10 : Capacité de production d'IFN_γ de différentes populations de la rate

- (a) Des splénocytes de C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de 10 ng/ml d'IL-2, 5 ng/ml d'IL-12 et 10 ng/ml d'IL-18. Le pourcentage de cellules produisant de l'IFN_γ a été mesuré par cytométrie de flux pour différentes populations de cellules : lymphocytes NK (NK cells), NK T (NK-T cells), CD4⁺ (CD4⁺ T cells), CD8⁺ (CD8⁺ T cells) et γδ (γδ T cells). Des résultats similaires ont été obtenus en remplaçant la combinaison de cytokines par des cellules J774 infectées par *L. monocytogenes*.
- (b) Des souris C57BL/6 ont été infectées par *L. monocytogenes*. 16 heures après l'infection, les splénocytes ont été isolés et cultivés pendant 3 heures en présence de brefeldin A, une drogue qui bloque le transport des protéines, avant le marquage intracellulaire anti-IFN_γ. Les résultats indiquent le pourcentage de cellules produisant de l'IFN_γ dans différentes populations.



Question 5. Analysez les résultats présentés à la Figure 10. (5 lignes maximum)

Question 6. En estimant qu'une rate compte 100 millions de lymphocytes dont environ 3% sont des cellules NK et 15% sont des cellules T CD8⁺, calculez les valeurs suivantes :

- proportion de cellules CD8⁺ produisant de l'IFN_γ parmi les lymphocytes
- proportion de cellules NK produisant de l'IFN_γ parmi les lymphocytes
- nombre de cellules CD8⁺ produisant de l'IFN_γ par rate
- nombre de cellules NK produisant de l'IFN_γ par rate

Question 7. Qu'apportent ces nouvelles observations ? (5 lignes maximum)