

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

*UE BMC423  
Immunologie Fondamentale & Intégrée  
(IF2010)  
8 au 20 février 2010*

*Travaux Dirigés*

## ***Travaux Dirigés***

***IF2010 TD-IF 1 : Méthode d'analyse scientifique & Technologies***

***IF2010 TD-IF 2 : Reconnaissance classique***

***IF2010 TD-IF 3 : Reconnaissance non classique***

***IF2010 TD-IF 4 : Interface Immunité innée/Immunité adaptative***

***IF2010 TD-IF 5 : Histoire de modèles***

***IF2010 TD-IF 6 : Cytokines, Chimiokines, Migrations cellulaires***

***IF2010 TD-IF 7 : Différenciation & Sélections***

***IF2010 TD-IF 8 : Tolérance & Régulations***

***IF2010 TD-IF 9 : Révisions/Questions – Sujet d'examen IF2009 juin***

***IF2010 TD-IF 1 :  
Méthode d'analyse scientifique & Technologies***

## **Méthode d'analyse scientifique & Technologies**

Ce sujet de TD sera disponible ultérieurement...

***IF2010 TD-IF 2 :  
Reconnaissance classique***

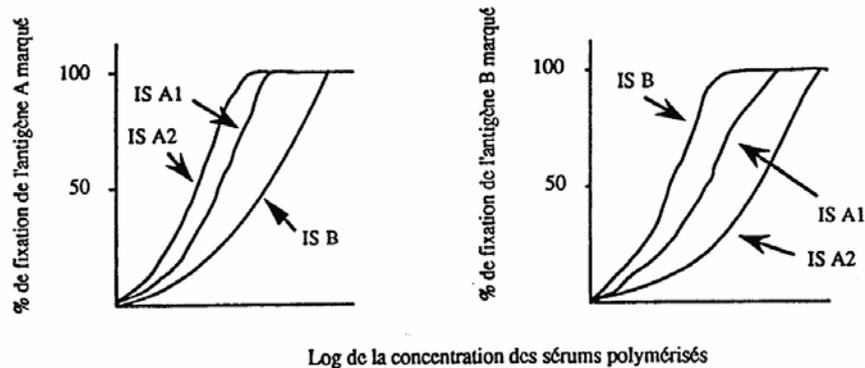
## Reconnaissance classique

### I.

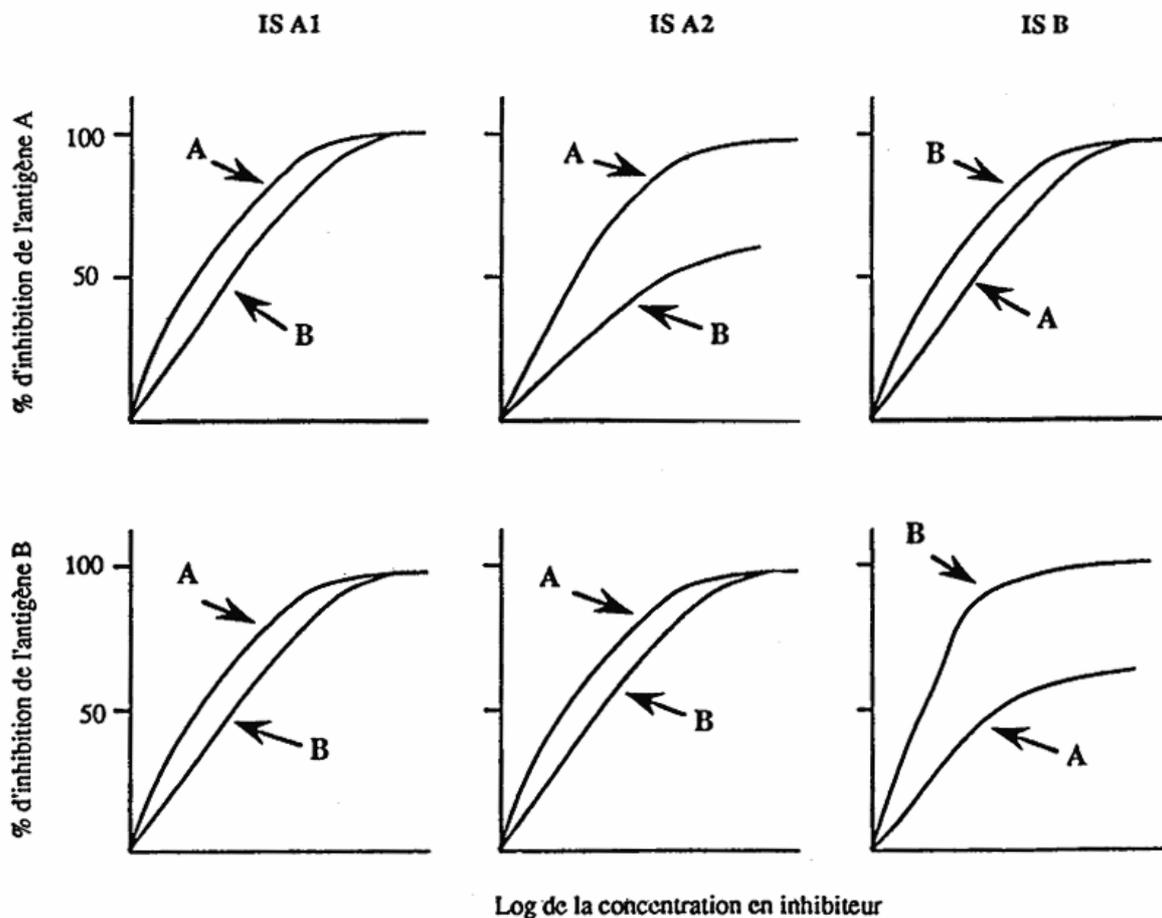
Des immunosérums sont préparés contre deux antigènes A et B :

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

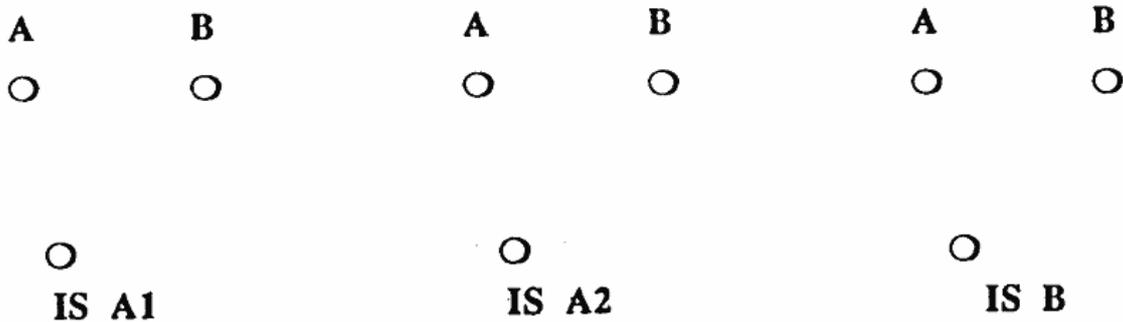
Ces trois immunosérums précipitent en milieu liquide les antigènes A et B. Les courbes de fixation des antigènes marqués sur les sérums insolubilisés sont les suivantes :



L'inhibition de la fixation des antigènes marqués sur les différents immunosérums, 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) :

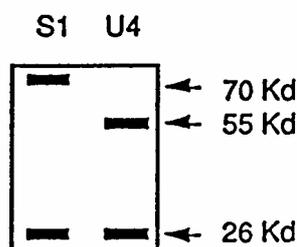


**II.**

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  $\mu, \kappa$ . 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- $\kappa$ , 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

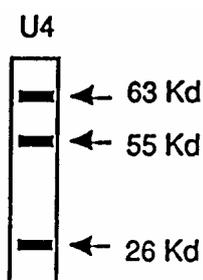
\* Titre d'hémagglutination

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

Les cellules U4 sont cultivées en présence de méthionine <sup>35</sup>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 myéomes tous d'origine BALB/c (Tableau 2).

Tableau 2

Hybridomes	Inhibiteurs											
	a	T15	167	603	HPCM2	G1	G3	61	558	104	109	315
anti-T15	b	κ,α	κ,α	κ,α	κ,μ	κ,γ1	κ,γ3	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		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

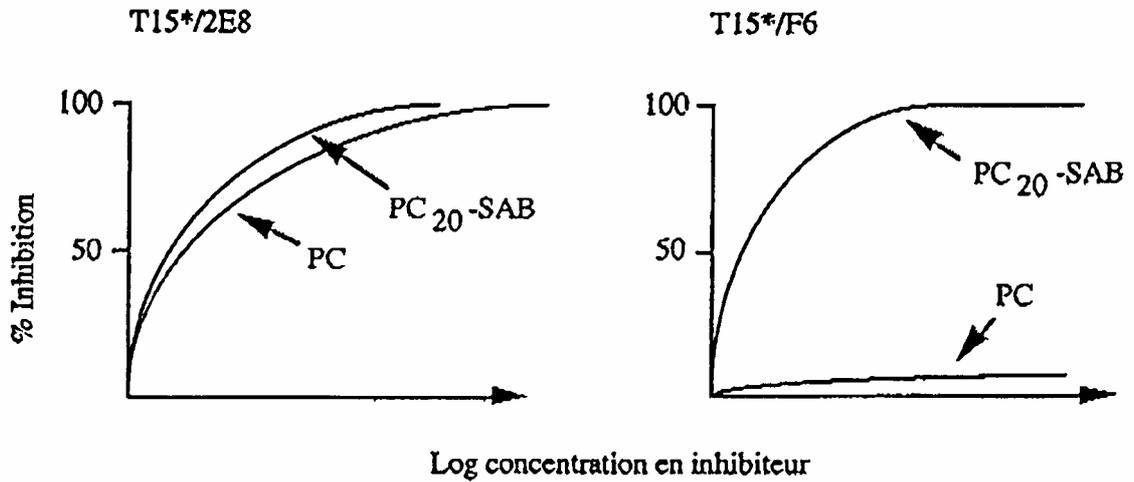
a: Nomenclature des inhibiteurs,  
 b: Isotype des chaînes légère et lourde,  
 c: Nature de l'antigène reconnu  
 PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.  
 + = inhibition, - = pas d'inhibition.

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 (PC<sub>20</sub>-SAB). La **Figure 3** résume les caractéristiques de ces inhibitions.

Question 2. *Interpréter ces résultats.*

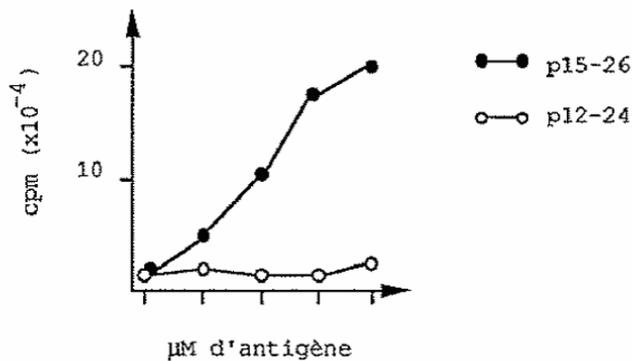
Figure 3



#### IV.

Un clone "auxiliaire" de lymphocyte T (7B7), issu d'une souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>), est obtenu contre le répresseur du bactériophage lambda. L'activation de ce clone est étudiée à l'aide de peptides dérivés du répresseur dans le test suivant: 5x10<sup>4</sup> cellules 7B7 sont mélangées à 5x10<sup>4</sup> cellules présentatrices d'antigènes en présence de différentes concentrations de peptide. Après 24h d'incubation, 50 µl de surnageant sont ajoutés à 10<sup>4</sup> cellules d'un clone T cytotoxique dépendant de l'IL2. L'incorporation de thymidine tritiée est ensuite déterminée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**.

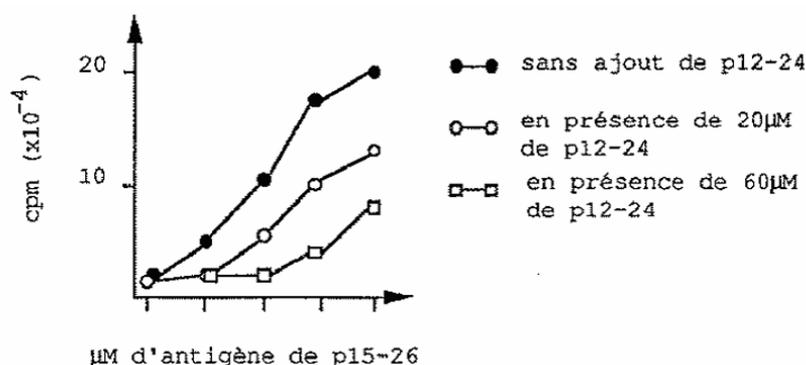
Figure 4



D'autre part, l'activation observée avec le peptide p15-26 est inhibée par un anticorps spécifique de I-A<sup>d</sup> mais pas par un anticorps spécifique de I-E<sup>d</sup>.

Dans une autre expérience, l'activation par le peptide p15-26 est effectuée en présence du peptide p12-24. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5**.

Figure 5



**Question 1.** Interpréter ces résultats en précisant comment le peptide p12-24 peut inhiber l'activation du clone 7B7 ?

La capacité inhibitrice du peptide p12-24 est testée dans différents systèmes antigéniques de façon analogue à celle décrite ci-dessus. La compilation des résultats est présentée dans le **Tableau 3**. La fixation directe du peptide p12-24 sur les molécules de classe II est déterminée par dialyse à l'équilibre comme présentée sur le **Tableau 4**.

**Question 2.** Analyser l'ensemble de ces résultats

Tableau 3

Antigène reconnu par le clone T	Elément de restriction	Pouvoir inhibiteur du peptide p12-24
Ovalbumine	I-A <sup>d</sup>	+
Myoglobine	I-E <sup>d</sup>	+++
Lysozyme	I-A <sup>k</sup>	-
Cytochrome c	I-E <sup>k</sup>	+

Tableau 4

Antigène de classe II	Fixation du peptide
I-A <sup>d</sup>	+
I-E <sup>d</sup>	+++
I-A <sup>k</sup>	-
I-E <sup>k</sup>	+

## V.

Une lignée de souris mutantes est obtenue à partir de souris de la lignée consanguine B10.BR (H-2<sup>k</sup>). L'impact de cette mutation sur le système immunitaire est recherché. Les souris B10.BR et mutantes sont immunisées contre l'ovalbumine (OVA). La production d'anticorps contre l'antigène est recherchée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

	Souris B10.BR	Souris mutante
Anticorps anti-OVA	+++++	+

**Question 1. Commenter.**

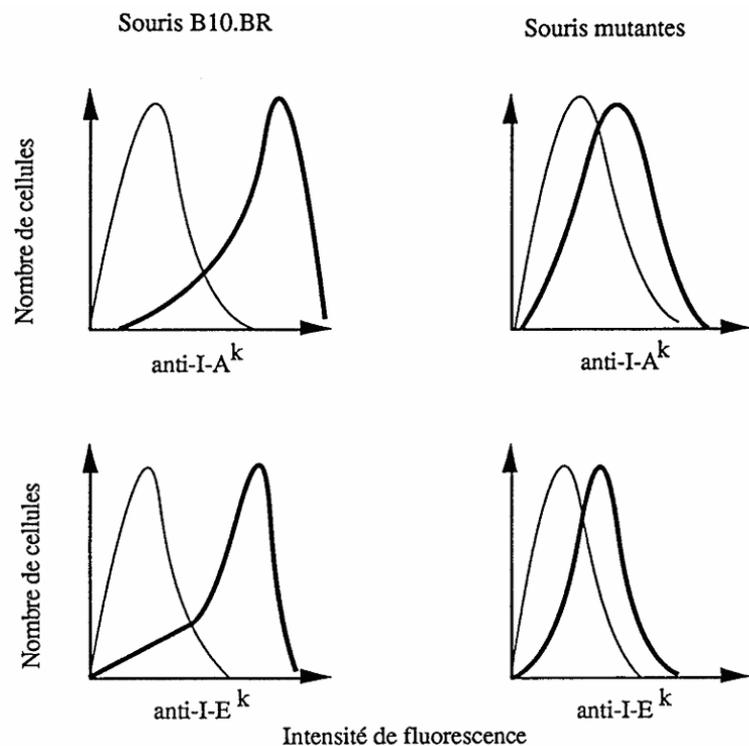
Les cellules spléniques sont isolées à partir des deux types de souris. Grâce à un trieur de cellules, les cellules marquées avec un anticorps anti-IgM fluorescent sont séparées et utilisées dans les trois expériences décrites ci-dessous.

Expérience n°1 : Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps monoclonaux anti-I-A<sup>k</sup> ou anti-I-E<sup>k</sup> couplés à un fluorochrome et analysées par cytofluorométrie.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

**Figure 6 : Fluorescence des cellules spléniques IgM<sup>+</sup>.**

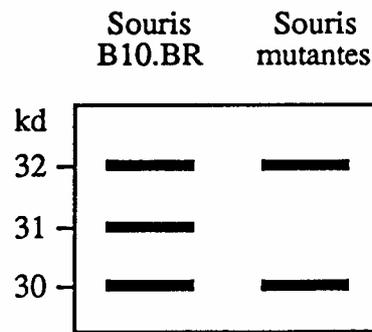
Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'autofluorescence des cellules.



Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine <sup>35</sup>S puis lysées. Le lysat est incubé en présence de l'anticorps monoclonal anti-I-A<sup>k</sup> insolubilisé. Les produits immunoprécipités sont ensuite chauffés à 95°C puis déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Après migration électrophorétique, le gel est séché et autoradiographié. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

**Figure 7 :**

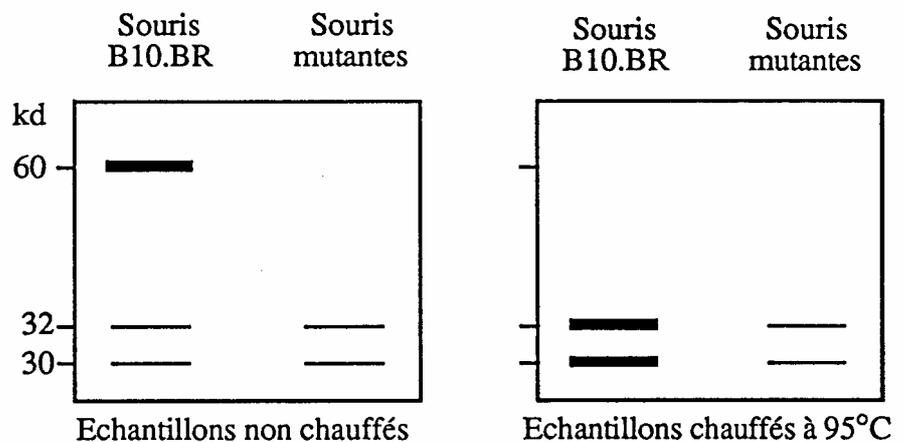
Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A<sup>k</sup>.



Expérience n°3 : Les cellules sont marquées à leur surface à l'aide de l'iode 125 puis lysées. La même expérience d'immunoprécipitation que ci-dessus est réalisée. Cependant, les échantillons immunoprécipités sont ou non chauffés à 95°C avant d'être déposés sur le gel. Les résultats sont présentés sur la **Figure 8**.

**Figure 8 :**

Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A<sup>k</sup>.



**Question 2.** *Interpréter ces expériences en indiquant notamment pourquoi les cellules IgM<sup>+</sup> ont été sélectionnées.*

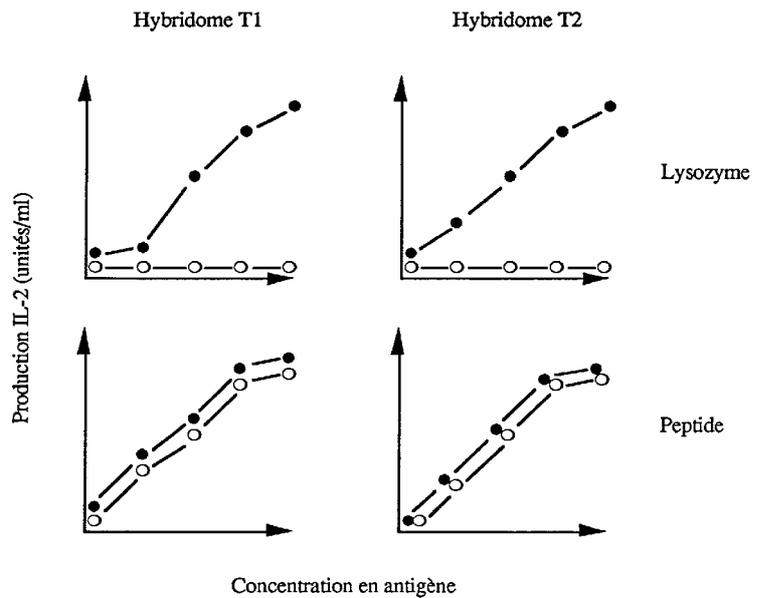
Deux hybridomes T (T1 et T2) obtenus contre le lysozyme de poulet sont testés pour leur capacité à produire de l'interleukine 2 (IL-2) en réponse à l'antigène. Celui-ci est présenté par des cellules spléniques provenant des deux types de souris. Les hybridomes T1 et T2 reconnaissent respectivement les peptides L46-61 et L112-129 présentés dans un contexte I-A<sup>k</sup>. Les résultats sont résumés sur la **Figure 9**.

**Question 3.** *Décrire succinctement un test permettant de mesurer la production d'IL-2.*

**Question 4.** *Quelles informations supplémentaires les résultats de la Figure 9 apportent-ils ?*

**Figure 9 :**

IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).

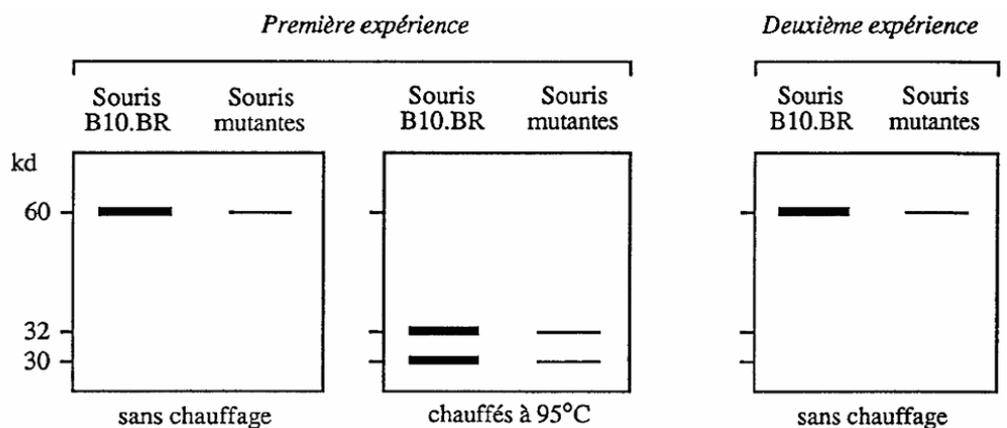


Afin de mieux comprendre l'observation ci-dessus, les expériences suivantes sont réalisées (**Figure 10**) :

- Dans une première expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont marquées à leur surface à l'iode 125 et lysées. Avant immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A<sup>k</sup> insolubilisé, les lysats sont incubés en présence du peptide L46-61. Les échantillons sont ensuite chauffés ou non comme précédemment et déposés sur gel de polyacrylamide.
- Dans la seconde expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont incubées en présence du peptide L46-61 marqué à l'iode 125 puis lysées. Une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A<sup>k</sup> est effectuée. L'échantillon immunoprécipité est déposé sur le gel de polyacrylamide sans chauffage.

**Figure 10 :**

Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A<sup>k</sup>.



**Question 5.** Interpréter ces résultats en les corrélant avec ceux des expériences précédentes.

**Question 6.** Proposer un schéma simple rendant compte du défaut de présentation de l'antigène par les cellules de la souris mutante.



***IF2010 TD-IF 3 :  
Reconnaissance non classique***

## 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 ?*

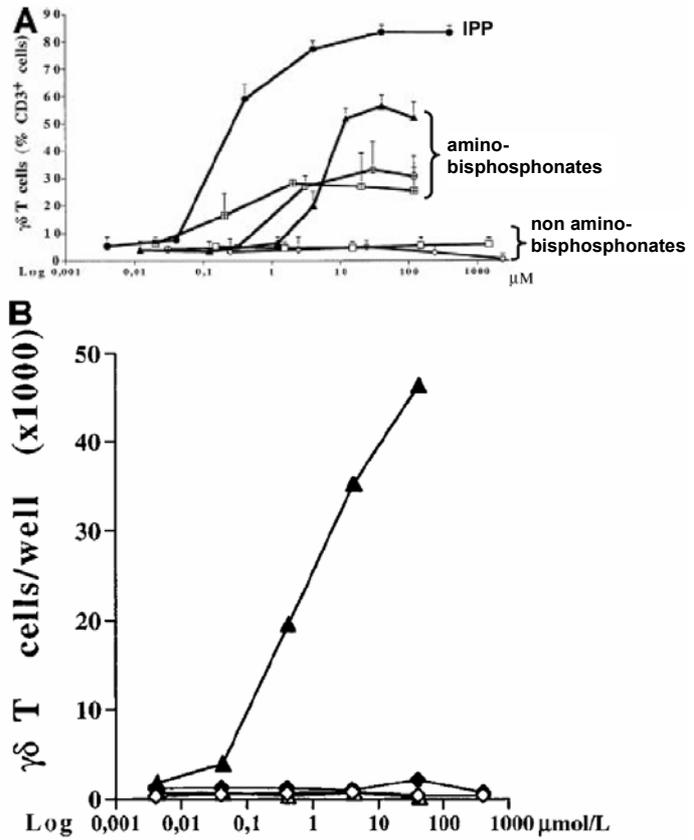
*Question 2. Quelles sont les manifestations cliniques généralement observées chez ces patients ?*

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<sup>+</sup> a été mesuré en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C $\delta$  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.

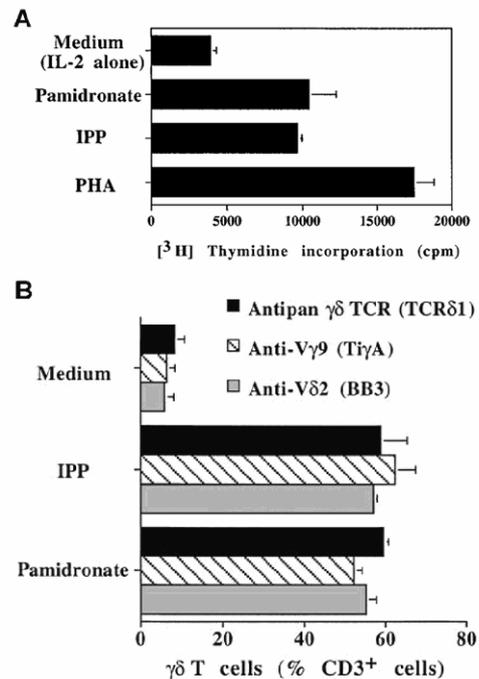


Question 3. *Interprétez les résultats de cette expérience. On notera qu'aucune autre population cellulaire parmi les PBMC ne prolifère dans les conditions de l'expérience. (8 lignes maximum)*

Dans une deuxième expérience, l'expression de V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 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  $\mu$ M d'IPP, 4  $\mu$ M de pamidronate ou 4  $\mu$ 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  $\mu$ M d'IPP ou de pamidronate, en présence d'IL-2. Après 7 jours, les cultures ont été analysées en cytométrie de flux double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C $\delta$  (Anti- $\gamma\delta$  TCR), anti-V $\gamma$ 9 ou anti-V $\delta$ 2.



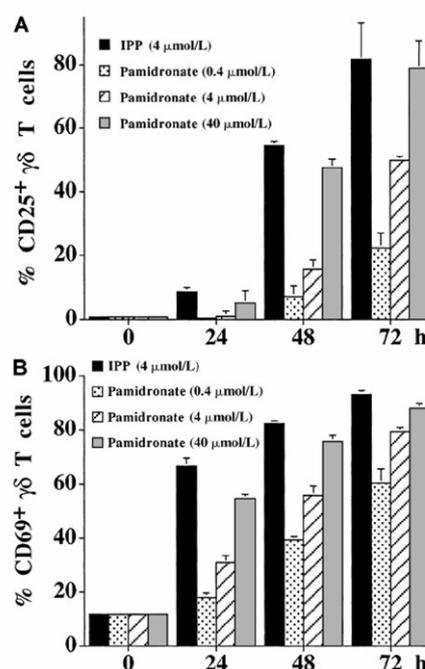
Question 4. Qu'apportent les résultats de cette expérience ? (5 lignes maximum)

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  $\mu$ M d'IPP ou de 0,4, 4 et 40  $\mu$ 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 $\delta$  et anti-CD25(A) ou anti-CD69 (B).

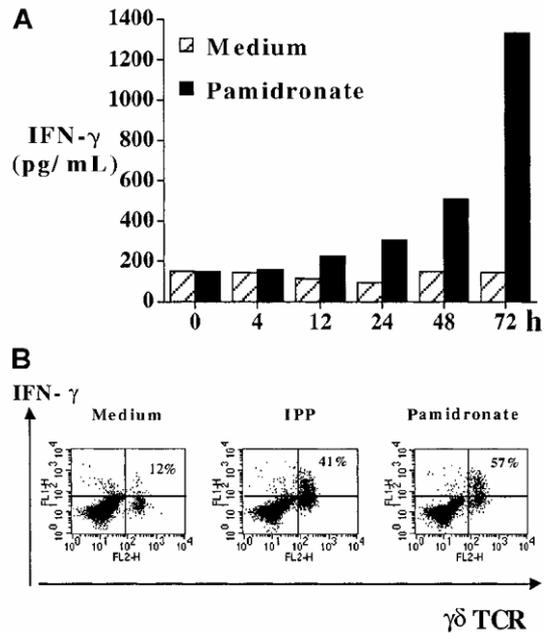


La production d'IFN $\gamma$  par les cellules T  $\gamma\delta$  activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 4**.

**Figure 4**

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

- (A) La production d'IFN $\gamma$  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 $\gamma$  intracellulaire par les cellules T  $\gamma\delta$  a été déterminée après 72h de culture par double marquage avec les anticorps anti-C $\delta$  et anti-IFN $\gamma$ .



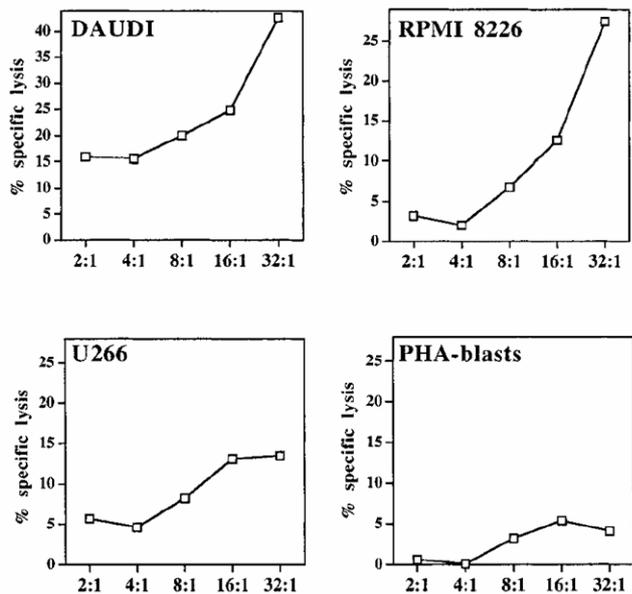
**Question 6.** Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 4B. (5 lignes maximum)

**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 Cr<sup>51</sup>. 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)

**Question 9.** 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) *J. Immunol.* 172: 2401-2406)

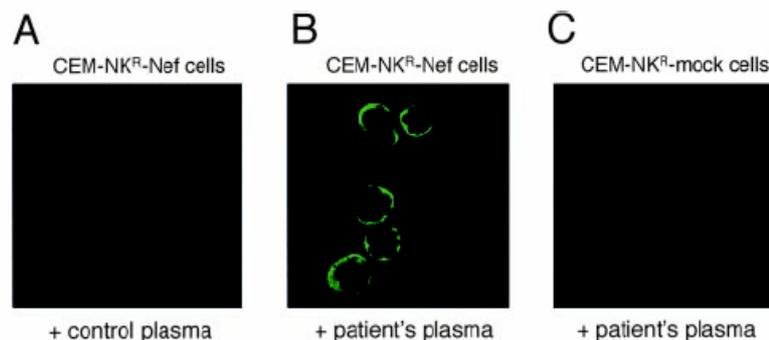
La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC, « Antibody-dependent cellular cytotoxicity ») et les activités cytotoxiques des lymphocytes T sont deux mécanismes qui jouent un rôle important dans la protection contre les infections virales. Dans le cas de l'infection par le VIH, l'ADCC peut inhiber 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<sup>R</sup> exprimant la protéine virale Nef (CEM-NK<sup>R</sup>-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<sup>R</sup>-Nef préalablement marquées au Cr<sup>51</sup> 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 1**) ont ensuite été ajoutés aux cellules CEM-NK<sup>R</sup>-Nef, pendant 4 heures, à 37°C.

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

Tableau 1

Table I. Patient profiles

Patient	Age	Sex	CD4 <sup>+</sup> Count (cells/ $\mu$ l)	CD8 <sup>+</sup> Count (cells/ $\mu$ l)	NK Cell Count (cells/ $\mu$ l)	% NK Cell in FBMC	HIV RNA (copies/ml) <sup>a</sup>	Antiretroviral Drugs <sup>b</sup>
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

<sup>a</sup> Amplicor HIV monitor test (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ).

<sup>b</sup> AZT, zidovudine; d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; ddC, zalcitabine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir.

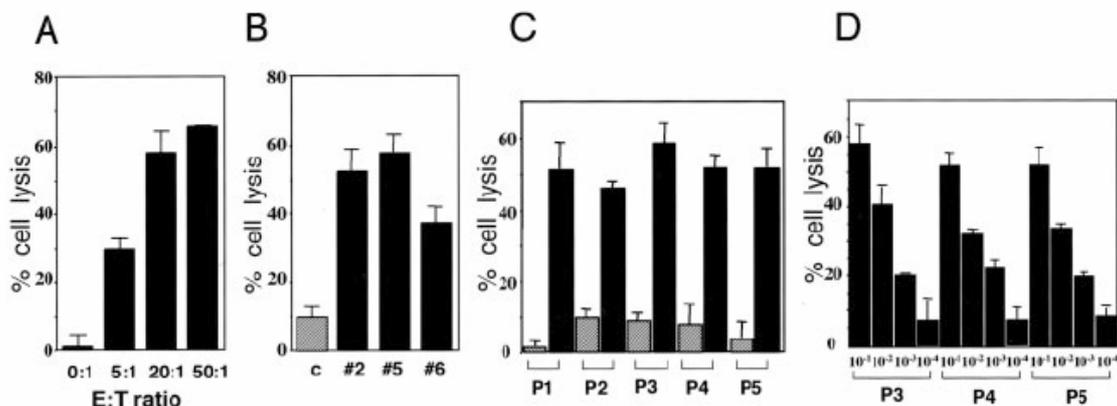


Figure 7 :

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 1 quelles corrélations pouvez-vous observer entre les différentes données pour les patients 1 à 5?

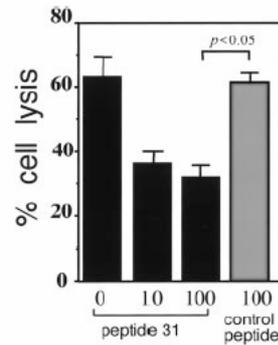
Question 3. Que permettent de mettre en évidence les expériences présentées dans la Figure 7 ?

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

Dans l'expérience suivante, les auteurs ont incubé des cellules CEM-NK<sup>R</sup>-Nef marquées au Cr<sup>51</sup>, 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).

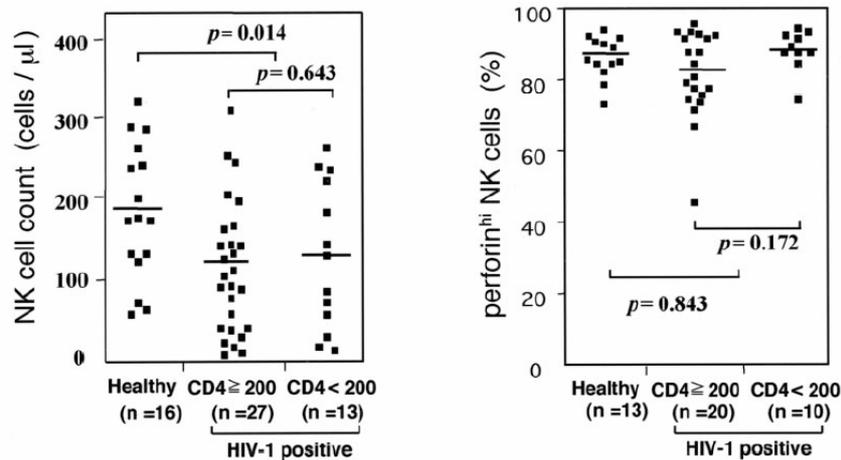
**Figure 8 :**

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 contrôle (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 µl 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 µl de sang.

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

***IF2010 TD-IF 4 :***  
***Interface Immunité innée/Immunité adaptative***

## Interface Immunité innée/Immunité adaptative

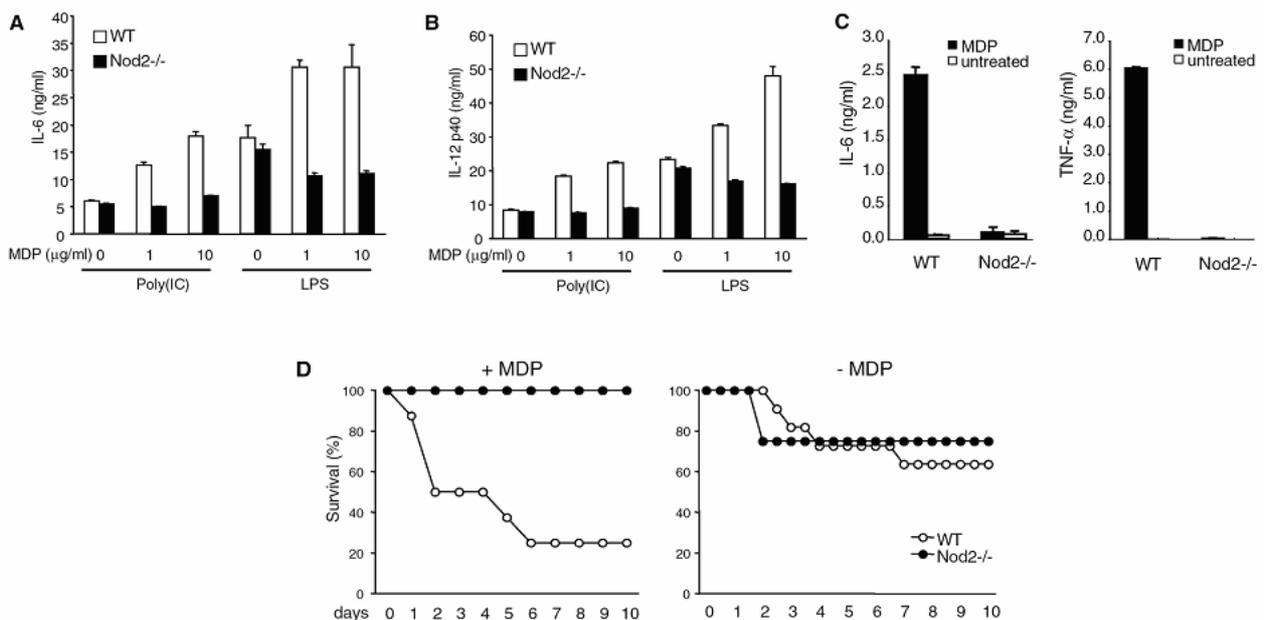
### I. Les récepteurs Nod

(D'après Kobayashi, K.S., et al. (2005) *Science* 307:731)

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle de Nod2, une molécule appartenant à une famille de récepteurs de l'immunité innée nouvellement identifiée. Pour cela, une lignée de souris déficiente pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) a été produite par invalidation et les auteurs étudient les conséquences de l'absence de Nod2 sur le développement et le fonctionnement du système immunitaire en situation physiologique et pathologique.

**Question 1.** *Rappelez, à l'aide d'un tableau synthétique, les différents types et le rôle des récepteurs de l'immunité innée.*

Dans une première expérience, les auteurs étudient la réponse *in vitro* et *in vivo* de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) après stimulation par différents stimulus mettant en jeu certains récepteurs de l'immunité innée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 1**.



**Figure 1**

A & B : Mesure de la production par ELISA d'IL-6 et d'IL-12 par des macrophages de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) après stimulation *in vitro* pendant 24 h par du Poly(IC) ou du LPS en présence de concentrations croissantes de MDP (muramyl dipeptide).

C : Mesure de la production par ELISA d'IL-6 et de TNF-α par des macrophages de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> après stimulation *in vitro* pendant 20 h en présence ou en absence de MDP.

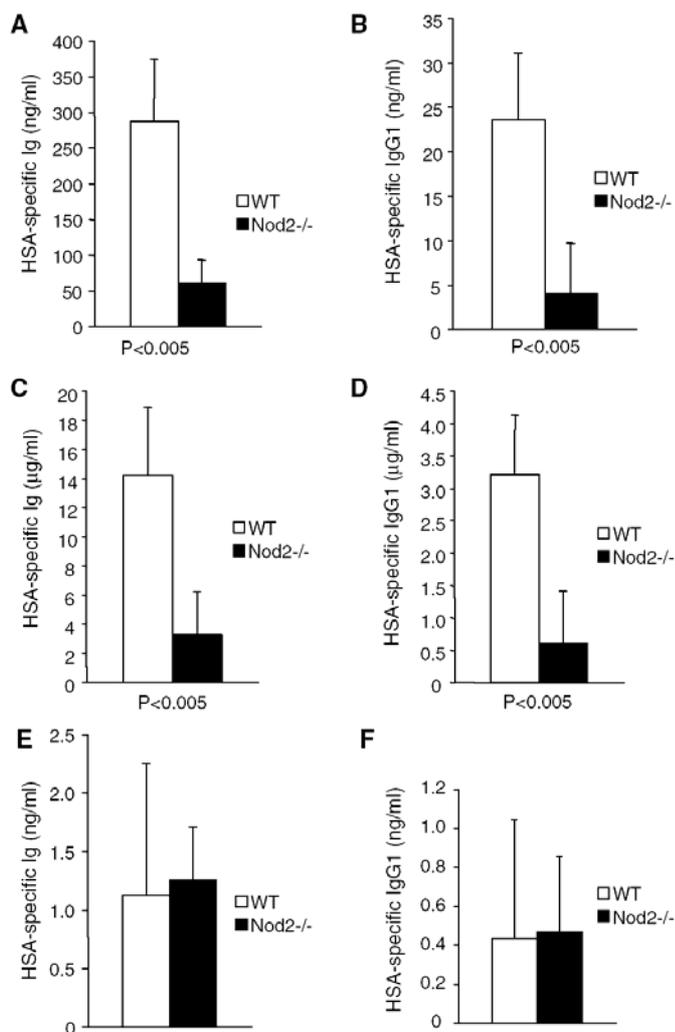
D : Courbes de survie de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> après injection de LPS en présence ou en absence de MDP.

Dans une deuxième expérience, les auteurs étudient la réponse anticorps spécifique suite à une immunisation avec la sérum albumine humaine (HSA) chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) en présence ou en absence de MDP (muramyl dipeptide). Les résultats sont présentés sur la **Figure 2**.

**Figure 2**

La réponse anticorps sérique totale (A, C & E) et IgG1 (B, D & F) spécifique de HSA a été mesurée par ELISA chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) deux semaines après immunisation avec la sérum albumine humaine (HSA) en présence de MDP (A & B) et après un rappel trois semaines après la première immunisation (C & D). En E & F, la réponse anticorps anti-HSA a été mesurée deux semaines après immunisation avec HSA en présence de R-848, un ligand synthétique de TLR7.

N.B. : Les valeurs « P<0.005 » indiquent des différences statistiquement significatives entre les deux lignées de souris pour les paramètres considérés.

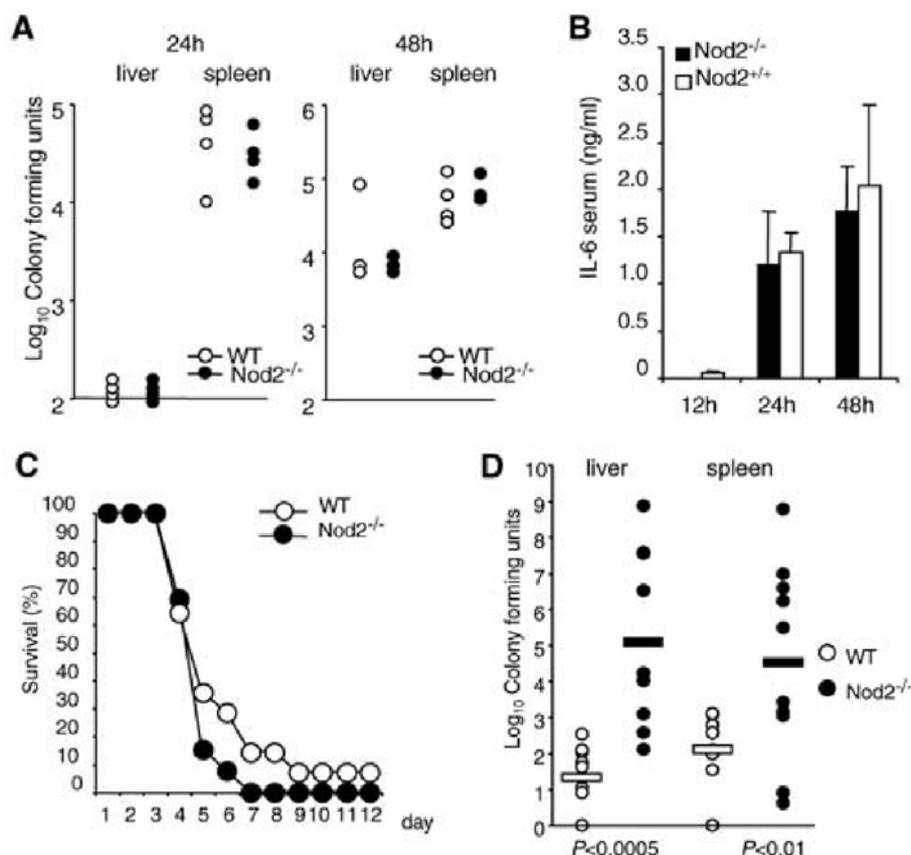


**Question 2.** Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 2. (10 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs mesurent la charge bactérienne chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) après injection de *Listeria monocytogenes* par voies intraveineuse, intrapéritonéale ou intragastrique. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

**Question 3.** Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 3. (10 lignes maximum)

**Question 4.** Que concluez-vous quant au rôle de Nod2 dans la protection contre des pathogènes bactériens. (5 lignes maximum)



**Figure 3**

A : La charge bactérienne (colony forming unit) de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2<sup>-/-</sup>) est mesurée dans le foie (liver) et dans la rate (spleen) 24h et 48h après infection par *Listeria monocytogenes* par voie intraveineuse.

B : La production d'IL-6 est mesurée dans le sérum de souris WT (Nod<sup>+/+</sup>) ou Nod2<sup>-/-</sup> 12h, 24h et 48h après infection par *L. monocytogenes* par voie intraveineuse.

C : La survie de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> est mesurée après infection par *L. monocytogenes* par voie intrapéritonéale.

D : La charge bactérienne (colony forming unit) de souris WT ou Nod2<sup>-/-</sup> est mesurée dans le foie (liver) et dans la rate (spleen) 72h après infection par *Listeria monocytogenes* par voie intragastrique.

N.B. : Les valeurs « P<0.0005 » et « P<0.01 » indiquent des différences statistiquement significatives entre les deux lignées de souris pour les paramètres considérés.

## II. Les récepteurs Toll-like

(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- $\alpha$  par des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>) 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 4**. Par ailleurs, des cellules de moelle

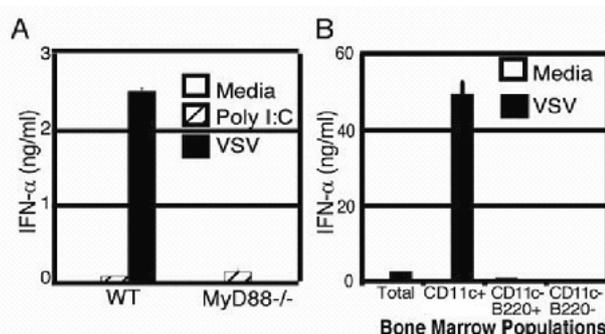
osseuse incubées en présence d'ARN simple brin synthétique produisent des quantités comparables d'IFN- $\alpha$  à celles observées pour VSV chez les souris WT et MyD88 $^{-/-}$ .

#### Figure 4

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- $\alpha$  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- $\alpha$  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)

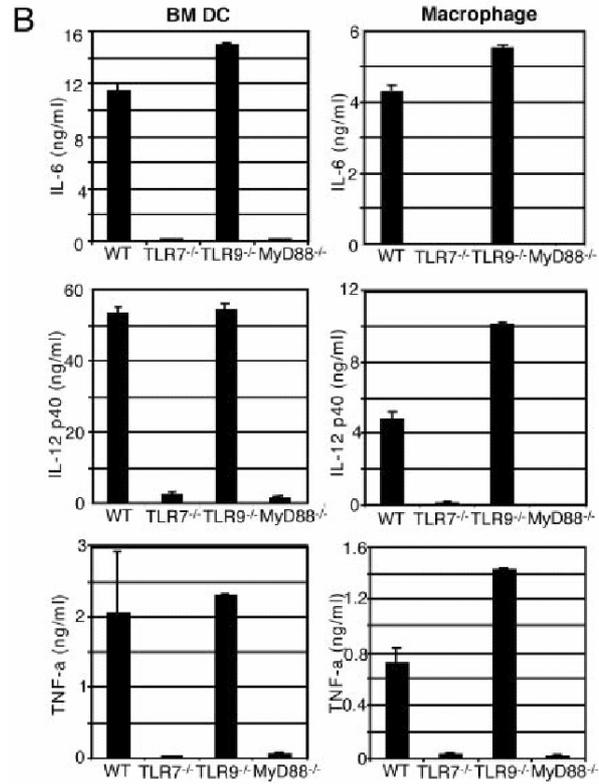
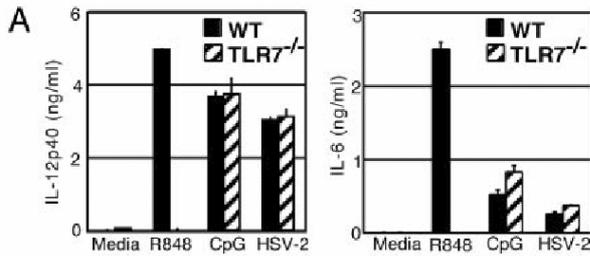
De nombreux TLR sont exprimés par les cellules dendritiques. Etant donné que le mode d'infection du VSV implique un mécanisme d'endocytose, les auteurs ont porté leur attention sur TLR7 et TLR9 qu'on retrouve au niveau des endosomes. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse ou de macrophages à différents stimulus a été étudiée chez des souris de type sauvage, Myd88 $^{-/-}$ , ou invalidées pour TLR7 (TLR7 $^{-/-}$ ) ou TLR9 (TLR9 $^{-/-}$ ) (**Figure 5**).

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

**Figure 5**

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour TLR7 (TLR7<sup>-/-</sup>) 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<sup>-/-</sup>, invalidées pour le gène TLR9 (TLR9<sup>-/-</sup>), ou MyD88<sup>-/-</sup> ont été cultivées en présence de R848. Après 48h de culture, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.



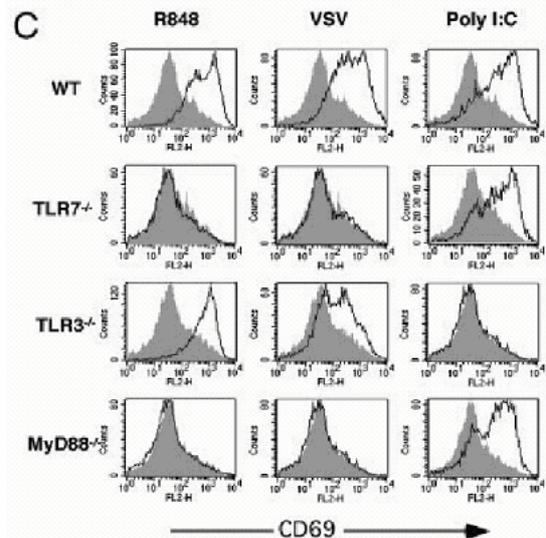
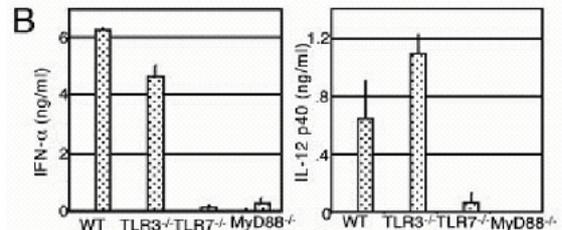
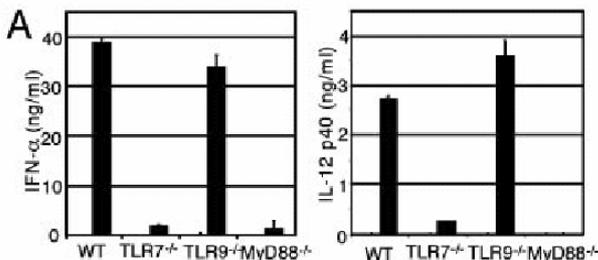
Les auteurs étudient ensuite le rôle de TLR7 pour la production d'IFN- $\alpha$  en réponse aux virus VSV et influenza. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse a été étudiée chez des souris de type sauvage, TLR7<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup>, TLR3<sup>-/-</sup> ou Myd88<sup>-/-</sup> (Figure 6).

**Figure 6**

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

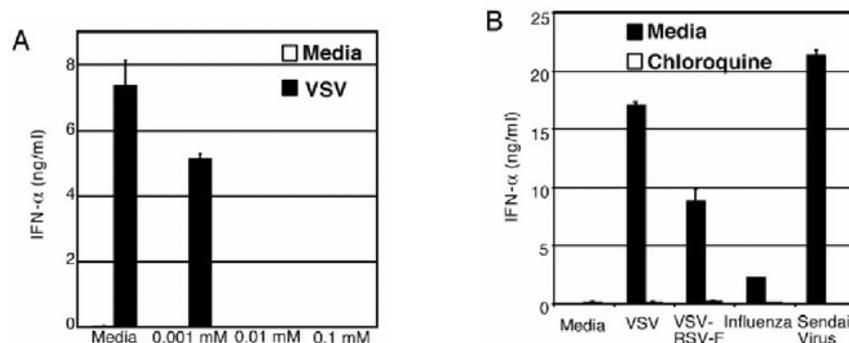
B : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT), TLR3<sup>-/-</sup> (invalidées pour le gène TLR3), TLR7<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> ont été cultivées en présence de virus influenza. Après 18h, l'IFN- $\alpha$  et l'IL-12 produits ont été mesurés dans les surnageants de culture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

C : Des splénocytes de souris de type sauvage (WT), TLR7<sup>-/-</sup>, TLR3<sup>-/-</sup> ou MyD88<sup>-/-</sup> ont été cultivés en présence de R848, de virus VSV ou de PolyI: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<sup>+</sup>. 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 7**).



**Figure 7**

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- $\alpha$  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- $\alpha$  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.



***IF2010 TD-IF 5 :  
Histoire de modèles***

## **Histoire de modèles**

Ce sujet de TD sera distribué ultérieurement...

***IF2010 TD-IF 6 :***  
***Cytokines, Chimiokines, Migrations cellulaires***

## Cytokines, Chimiokines, Migrations cellulaires

### I.

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

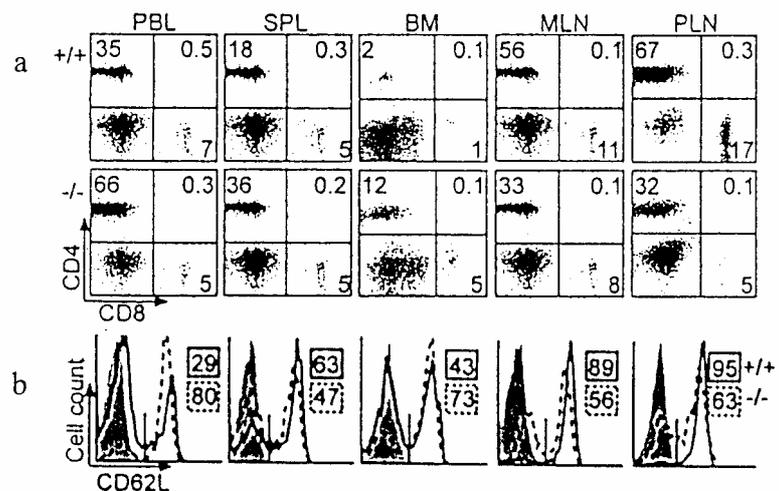
Dans le but d'étudier la régulation de la circulation des leucocytes dans l'organisme, des souris déficientes pour le récepteur CCR7 de chimiokine ont été générées par recombinaison homologue. Dans tous les cas, les animaux mutés sont viables et fertiles. On se propose d'étudier les conséquences de la 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<sup>-/-</sup>, 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<sup>+</sup> sont analysées sur la Figure 1b et que les cellules CD62L<sup>+</sup> expriment la L-sélectine et sont majoritairement des lymphocytes T naïfs.

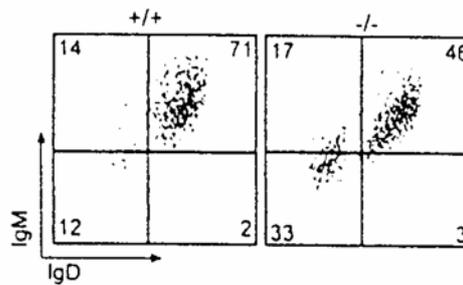


#### Question 1. Commentez l'ensemble des résultats.

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<sup>+</sup> 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<sup>-/-</sup>.

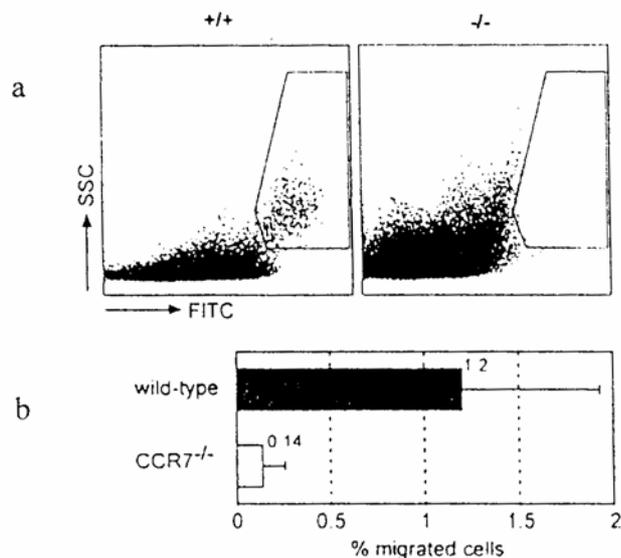
Figure 2



**Question 2.** *Interprétez les résultats obtenus. Que se produit-il dans les ganglions lymphatiques des souris mutantes CCR7<sup>-/-</sup>? 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<sup>-/-</sup>. 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<sup>-/-</sup> ?*

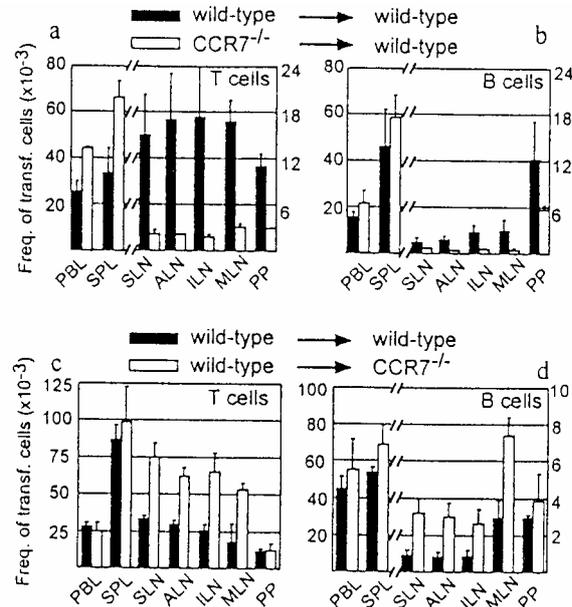
Les lymphocytes T (Thy-1<sup>+</sup>) et B naïfs (IgD<sup>+</sup>) fluorescents, issus de souris de type sauvage ou mutantes CCR7<sup>-/-</sup> sont injectés à des animaux de type sauvage (**Figure 4a et b**) ; par ailleurs, les lymphocytes T (Thy-1<sup>+</sup>) et B naïfs (IgD<sup>+</sup>) fluorescents, issus de souris de type sauvage sont injectés à des animaux de type sauvage ou mutants CCR7<sup>-/-</sup> (**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 ?

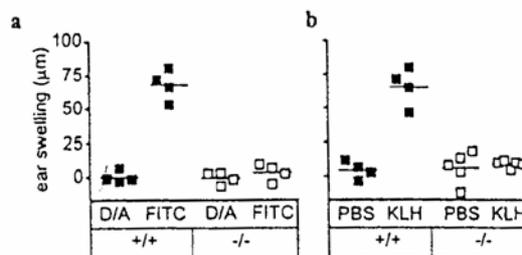
**Figure 4**

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

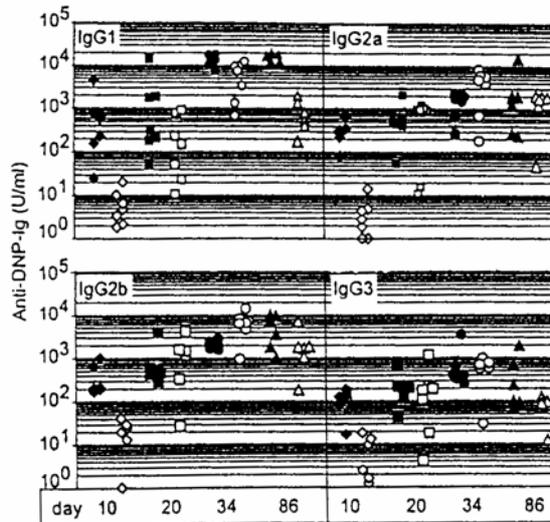
Question 6. Rappelez brièvement les différentes étapes provoquant l'inflammation locale d'un tissu. Pourquoi réalise-t-on ces expériences ? Que permettent-elles de confirmer ?

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<sup>+/+</sup> (symboles noirs) ou mutants CCR7<sup>-/-</sup> (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.**

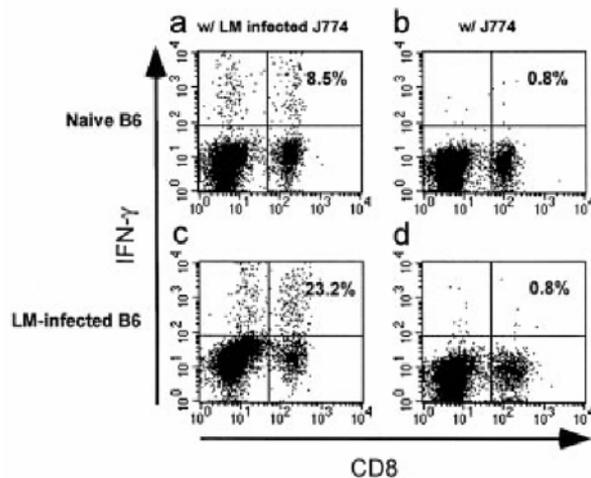
(Examen d'Immunologie Fondamentale - septembre 2004. D'après Berg, R. E. *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2807)

Les auteurs de la présente étude s'intéressent à l'induction de la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD8<sup>+</sup> 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 $\gamma$  par des cellules T CD8<sup>+</sup> 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 $\gamma$  par des cellules T CD8<sup>+</sup> 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 $\gamma$  et analysées par cytométrie de flux. Le pourcentage de cellules CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN $\gamma$  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 $\gamma$  mise en œuvre pour obtenir les résultats présentés à la Figure 3 ainsi qu'une autre technique de détection de la production d'IFN $\gamma$ , en précisant les avantages ou inconvénients relatifs de ces techniques.

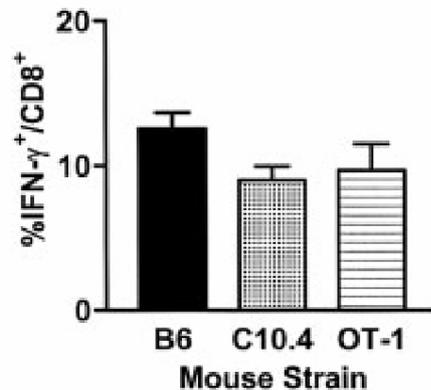
Question 2. Analyser les résultats présentés à la Figure 3. (5 lignes maximum)

Dans une deuxième expérience, on étudie la production d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD8<sup>+</sup> 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<sup>b</sup>. Les résultats sont présentés à la Figure 8.

**Figure 8 : Sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD8<sup>+</sup> 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 $\gamma$  puis analysées par cytométrie de flux. Les résultats présentés indiquent le pourcentage de cellules T CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN $\gamma$ .

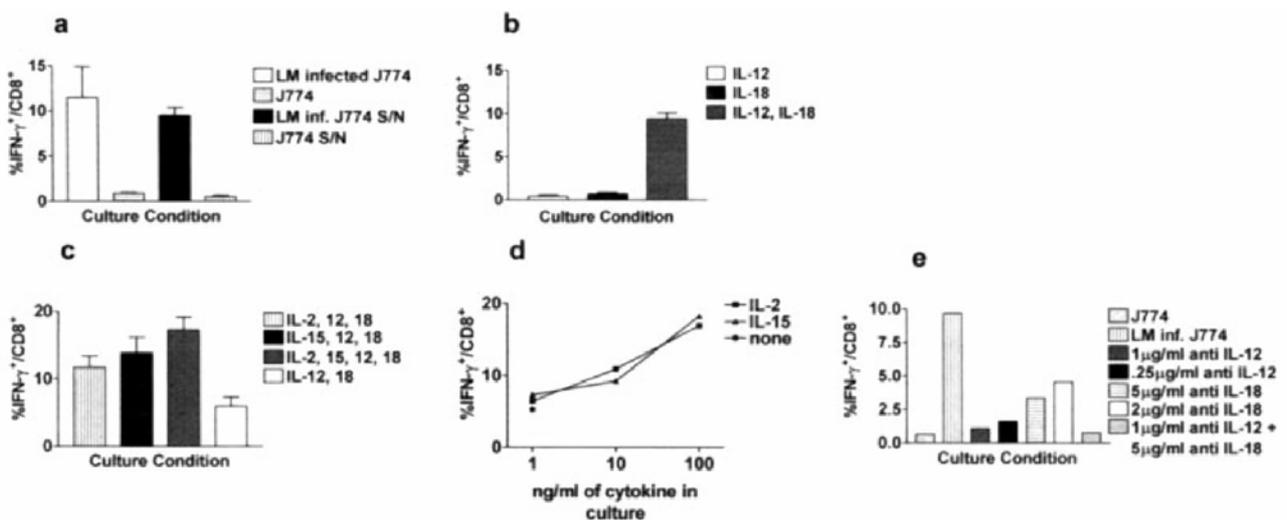
N.B. : on précise que moins de 1% des cellules T CD8<sup>+</sup> produisent de l'IFN $\gamma$  après culture avec des cellules J774 non infectées.



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 $\gamma$  par les cellules CD8<sup>+</sup> ? (5 lignes maximum)

Dans la troisième expérience, les auteurs cherchent à caractériser les facteurs responsables de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules CD8<sup>+</sup>. Les résultats sont présentés à la Figure 9.



**Figure 9 : Rôle des cytokines dans la production d'IFN $\gamma$  par les cellules T CD8<sup>+</sup>**

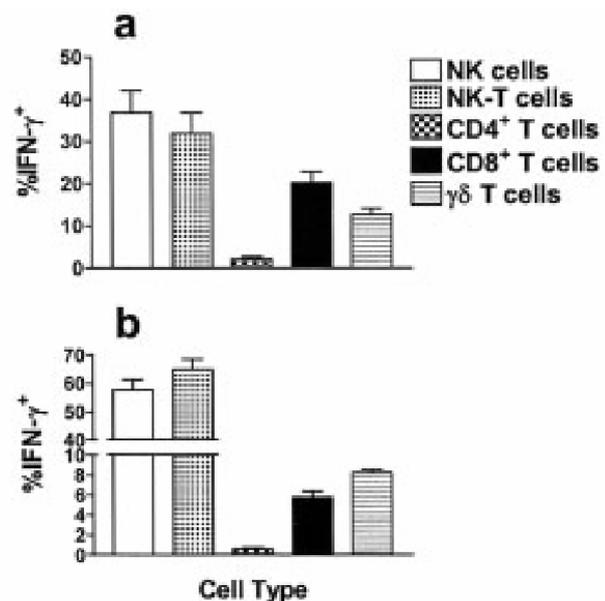
- (a) Des splénocytes de souris C57BL/6 ont été cultivés pendant une nuit en présence de cellules J774 infectées par *L. monocytogenes* (LM infected J774) ou non (J774), ou en présence de surageant de culture de cellules J774 infectées par (LM inf. J774 S/N) ou non (J774 S/N).
- (b) Des splénocytes de 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<sup>+</sup> produisant de l'IFN $\gamma$ .

Dans l'expérience suivante, on cherche à comparer la production d'IFN $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  a été mesuré par cytométrie de flux pour différentes populations de cellules : lymphocytes NK (NK cells), NK T (NK-T cells), CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> T cells), CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup> T cells) et  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta$  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 $\gamma$ . Les résultats indiquent le pourcentage de cellules produisant de l'IFN $\gamma$  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<sup>+</sup>, calculez les valeurs suivantes :

- proportion de cellules CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN $\gamma$  parmi les lymphocytes
- proportion de cellules NK produisant de l'IFN $\gamma$  parmi les lymphocytes
- nombre de cellules CD8<sup>+</sup> produisant de l'IFN $\gamma$  par rate
- nombre de cellules NK produisant de l'IFN $\gamma$  par rate

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



***IF2010 TD-IF 7 :  
Différenciation & Sélections***

## Différenciation & Sélections

### I.

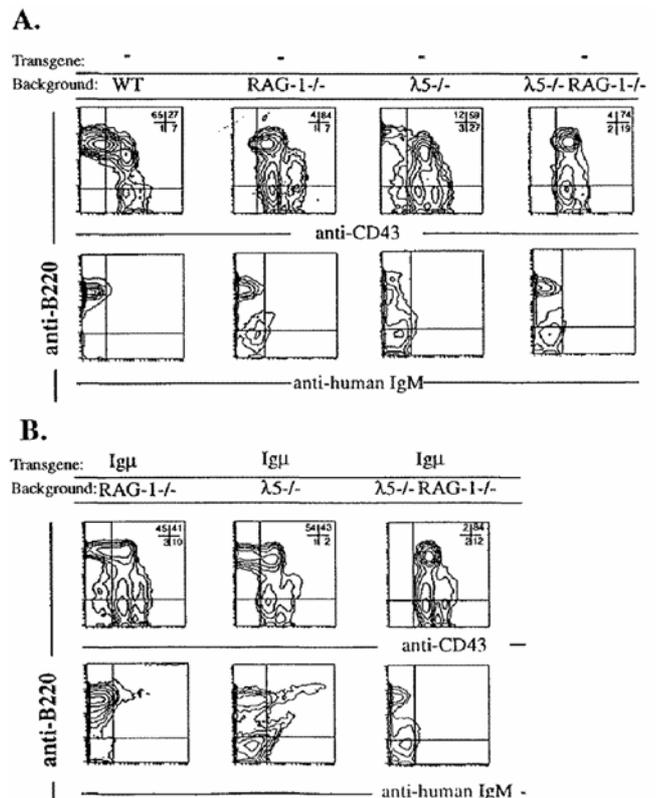
(d'après Papavasiliou, F. *et al.* (1996) *J.Exp.Med.* 184:2025)

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<sup>-/-</sup>, λ5<sup>-/-</sup> et double mutants (RAG<sup>-/-</sup> λ5<sup>-/-</sup>). 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 1 : Analyse par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris âgées de 6 à 8 semaines.**

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

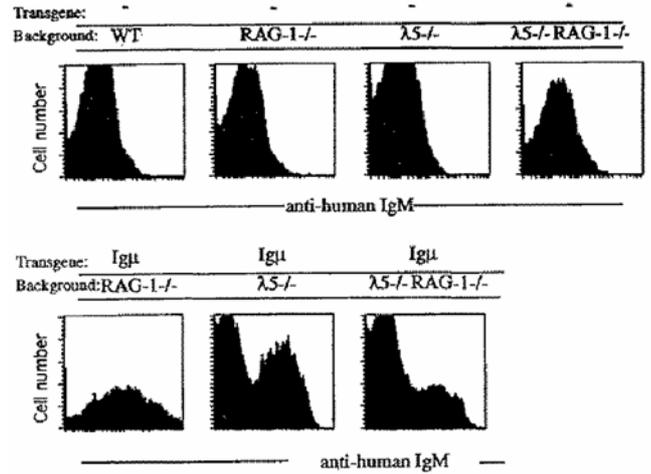
Les cellules ont été marquées par des anticorps anti-B220, anti-CD43 et anti-IgM humain (ne reconnaît que IgM humaine). Le pourcentage de lymphocytes présents dans chaque cadran est inscrit en haut et à droite pour les marquages B220/CD43.



- Question 1. Quel est l'effet de l'introduction du transgène Igμ dans les mutants RAG<sup>-/-</sup>, λ5<sup>-/-</sup> et RAG<sup>-/-</sup> λ5<sup>-/-</sup> ?
- 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<sup>-/-</sup>, λ5<sup>-/-</sup> et double mutants RAG<sup>-/-</sup> λ5<sup>-/-</sup>.
- Question 4. D'après les résultats présentés aux Figure 3 et Figure 4 que peut-on conclure quant au rôle des chaînes légères dans l'assemblage, le transport et la fonction du récepteur pré-B ?

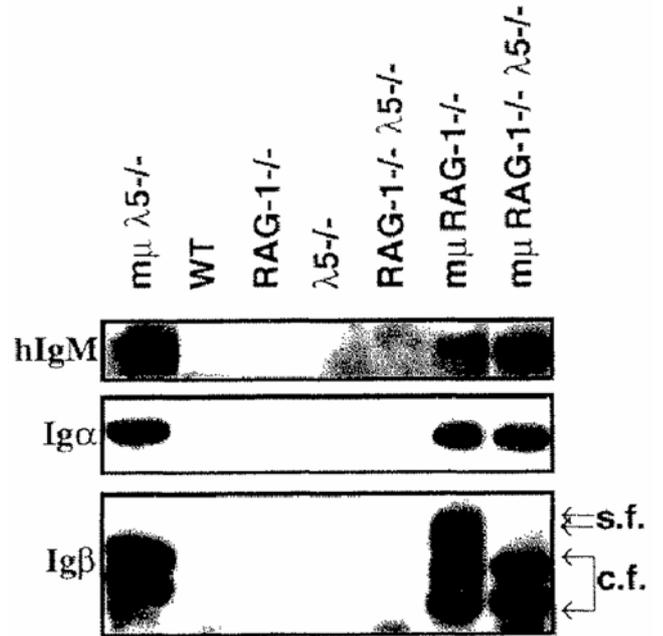
**Figure 2 : Analyse de l'expression intracellulaire du transgène  $Ig\mu$  humain dans les cellules  $B220^+CD43^+$  de la moelle.**

Après marquage avec les anticorps anti-B220 et anti-CD43, les cellules des souris utilisées à la **Figure 1** ont été fixées, perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-IgM humain.



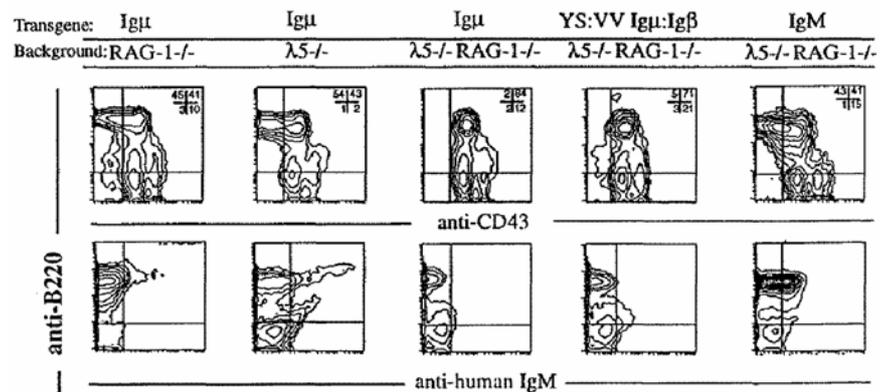
**Figure 3 : Analyse du complexe pré-BCR par des expériences d'immunoprécipitation.**

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 ( $RAG-1^-/-$ ), ( $\lambda 5^-/-$ ) et ( $RAG-1^-/- \lambda 5^-/-$ ) ainsi que de souris mutantes exprimant le transgène  $Ig\mu$  humain : ( $m\mu RAG-1^-/-$ ), ( $m\mu \lambda 5^-/-$ ) et ( $m\mu RAG-1^-/- \lambda 5^-/-$ ). Les complexes Ig ont été immunoprécipités avec un immunosérum 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 $\alpha$  (Ig $\alpha$ ) et anti-Ig $\beta$  (Ig $\beta$ ). 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 $\beta$  dans la 1<sup>ère</sup> piste ( $m\mu \lambda 5^-/-$ ).



**Figure 4 : Analyse par FACS des cellules de la moelle provenant de souris mutantes dans lesquelles on a introduit soit le transgène  $Ig\mu$  comme précédemment, soit un transgène YS:VV  $Ig\mu:Ig\beta$  codant pour une protéine chimérique  $Ig\mu-Ig\beta$ , soit un transgène IgM codant pour une immunoglobuline complète ( $Ig\mu/Ig\kappa$ ).**

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



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

## II.

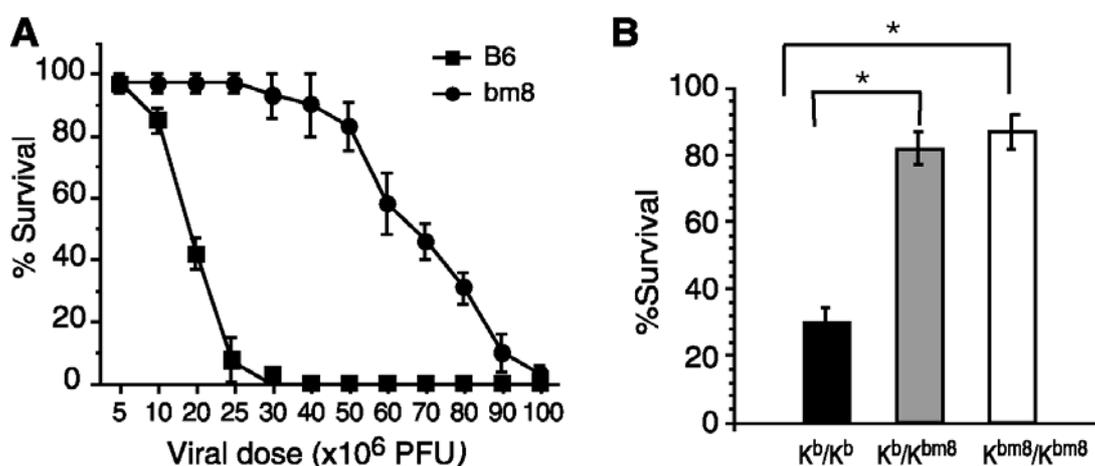
(D'après Messaoudi *et al.* (2002) *Science* 298:1797)

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<sup>b</sup>, et B6.C-H-2<sup>bm8</sup> (bm8), d'haplotype du CMH H2<sup>bm8</sup>. 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<sup>b</sup> et H-2K<sup>bm8</sup> 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 6.** *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 5A). 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 5B).



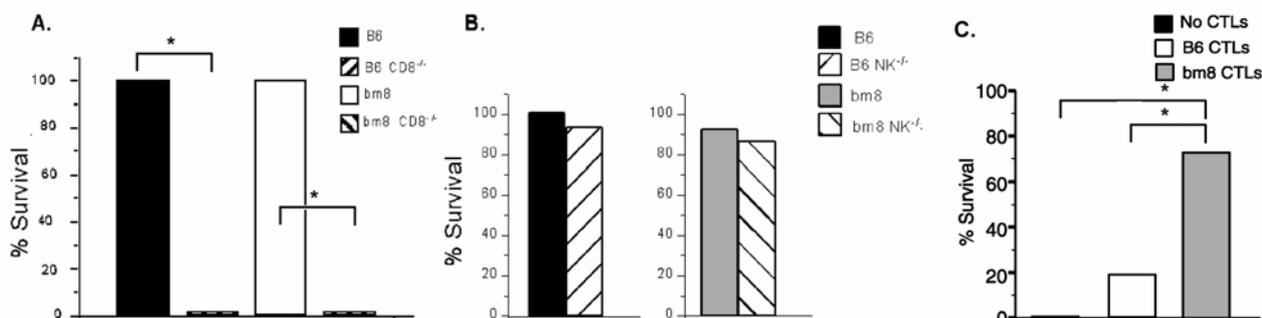
**Figure 5 :** (A) Les souris B6 et bm8 ont été infectées par des doses croissantes du virus HVH-1 (viral dose). La survie des souris (%survival) a été observée 100 jours après l'infection. (B) Les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose de 25.10<sup>6</sup> 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<sup>b</sup>/K<sup>b</sup>, K<sup>b</sup>/K<sup>bm8</sup> ou K<sup>bm8</sup>/K<sup>bm8</sup>. Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

**Question 7.** *Analyser les résultats présentés sur la Figure 5. (10 lignes maximum)*

**Question 8.** *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 6A) ou en cellules NK (Figure 6B) 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 6C).



**Figure 6 :** (A) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules T CD8 (B6 CD8<sup>-/-</sup> et bm8 CD8<sup>-/-</sup>) ont été infectées par une dose de 5.10<sup>6</sup> 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<sup>-/-</sup> et bm8 NK<sup>-/-</sup>) ont été infectées par une dose de 5.10<sup>6</sup> 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.

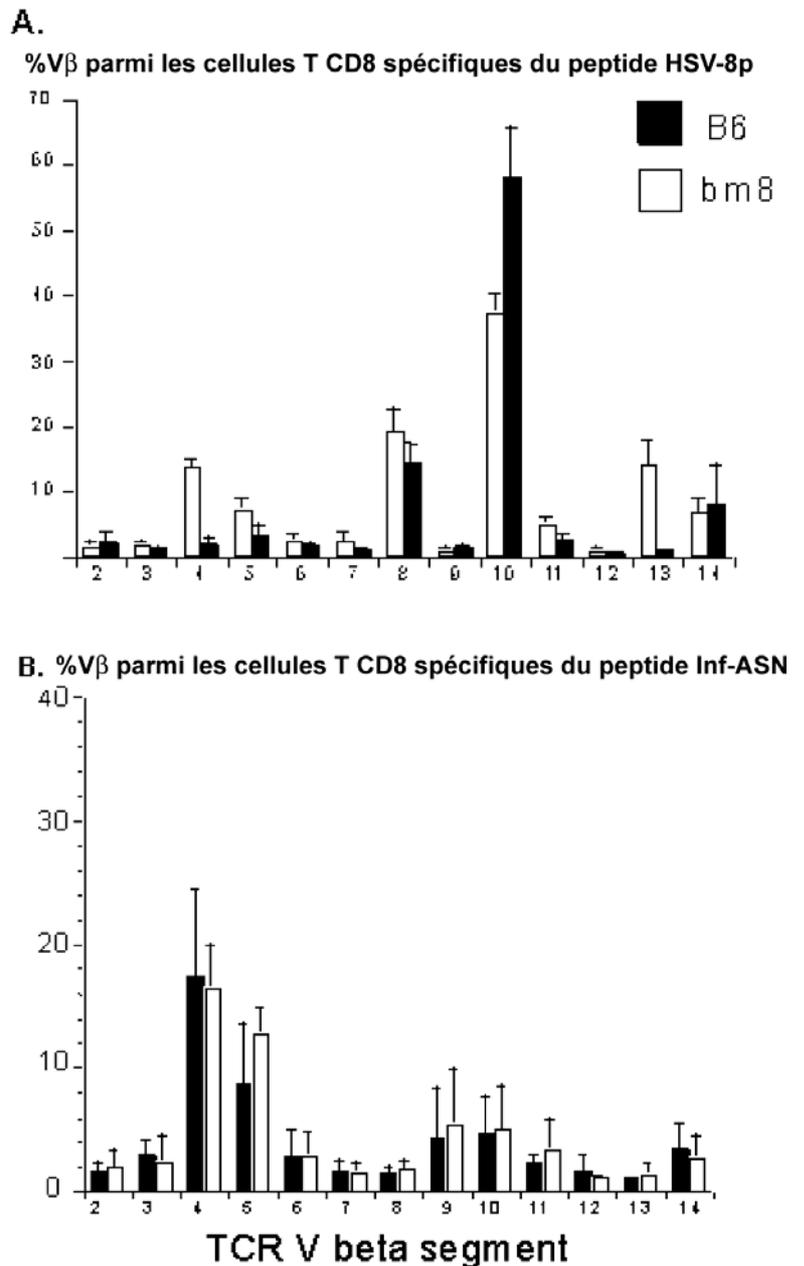
Question 9. Citer deux moyens par lesquels les auteurs ont pu obtenir des souris déficientes en cellules T CD8. (5 lignes maximum)

Question 10. Pour quelle raison les auteurs choisissent-ils d'étudier des souris déficientes en cellules T CD8 ou en cellules NK ? (5 lignes maximum)

Question 11. Analyser les résultats présentés sur la Figure 6. (15 lignes maximum)

Question 12. Ces résultats confirment-ils les hypothèses émises à la Question 8 ? (5 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs ont étudié le répertoire TCR $\beta$  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 $\beta$  du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p chez les souris infectées par HVH-1 (Figure 7A) et parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide « Inf-ASN » chez les souris infectées par le virus Influenza (Figure 7B). 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 7 :** (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 13. A l'aide d'un schéma uniquement, résumez le mécanisme de génération de la diversité des anticorps et TCR.

Question 14. Analysez les résultats présentés sur la Figure 7. (8 lignes maximum)

Question 15. 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)

### III.

(D'après Grandjean, I., et al. (2003) *J.Exp.Med.* 198:1089)

Le clone T CD4<sup>+</sup> *Marylin* a été établi chez une souris de CMH H-2<sup>b</sup>xH-2<sup>k</sup>. Ce clone est dirigé contre un peptide de l'antigène H-Y exclusivement exprimé chez la souris mâle et présenté par la molécule I-A<sup>b</sup>. Les chaînes TCRβ et TCRα du clone *Marylin* ont été clonées pour produire des souris transgéniques (Tg) pour le TCR *Marylin*, de fonds génétique C57BL/6 (B6) et d'haplotype H-2<sup>b</sup> ou H-2<sup>k</sup>. Les souris *Marylin* TCR Tg H-2<sup>b</sup> (ou H-2<sup>k</sup>) ainsi obtenues ont alors été croisées avec des souris RAG-2<sup>-/-</sup> H-2<sup>b</sup> (ou H-2<sup>k</sup>) de fonds B6 afin d'obtenir les souris *Marylin* TCR Tg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2<sup>b</sup> (ou H-2<sup>k</sup>).

Grâce à ces souris et aux lignées supplémentaires de souris B6 RAG-2<sup>-/-</sup> H-2Aβ<sup>b-</sup> et B6 RAG-2<sup>-/-</sup> β2m<sup>-</sup>, on a également pu obtenir les lignées de souris *Marylin* TCR Tg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2Aβ<sup>b-</sup> ou H-2<sup>k</sup>β2m<sup>-</sup> ou H-2<sup>b<sup>bk</sup></sup> ou H-2Aβ<sup>b-<sup>x</sup>b</sup> ou H-2Aβ<sup>b-<sup>x</sup>k</sup>, toutes de fonds génétique B6.

**Question 16.** A l'aide d'un schéma de croisements uniquement, expliquer comment ces dernières lignées de souris ont été obtenues :

- *Marylin* TCR Tg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2Aβ<sup>b-</sup>
- *Marylin* TCR Tg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2<sup>k</sup>β2m<sup>-</sup>
- *Marylin* TCR Tg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2<sup>b<sup>bk</sup></sup>
- *Marylin* TCR Tg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2Aβ<sup>b-<sup>x</sup>b</sup>
- *Marylin* TCR Tg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2Aβ<sup>b-<sup>x</sup>k</sup>

**Question 17.** Rappelez l'effet de la mutation RAG-2<sup>-/-</sup>. (5 lignes maximum)

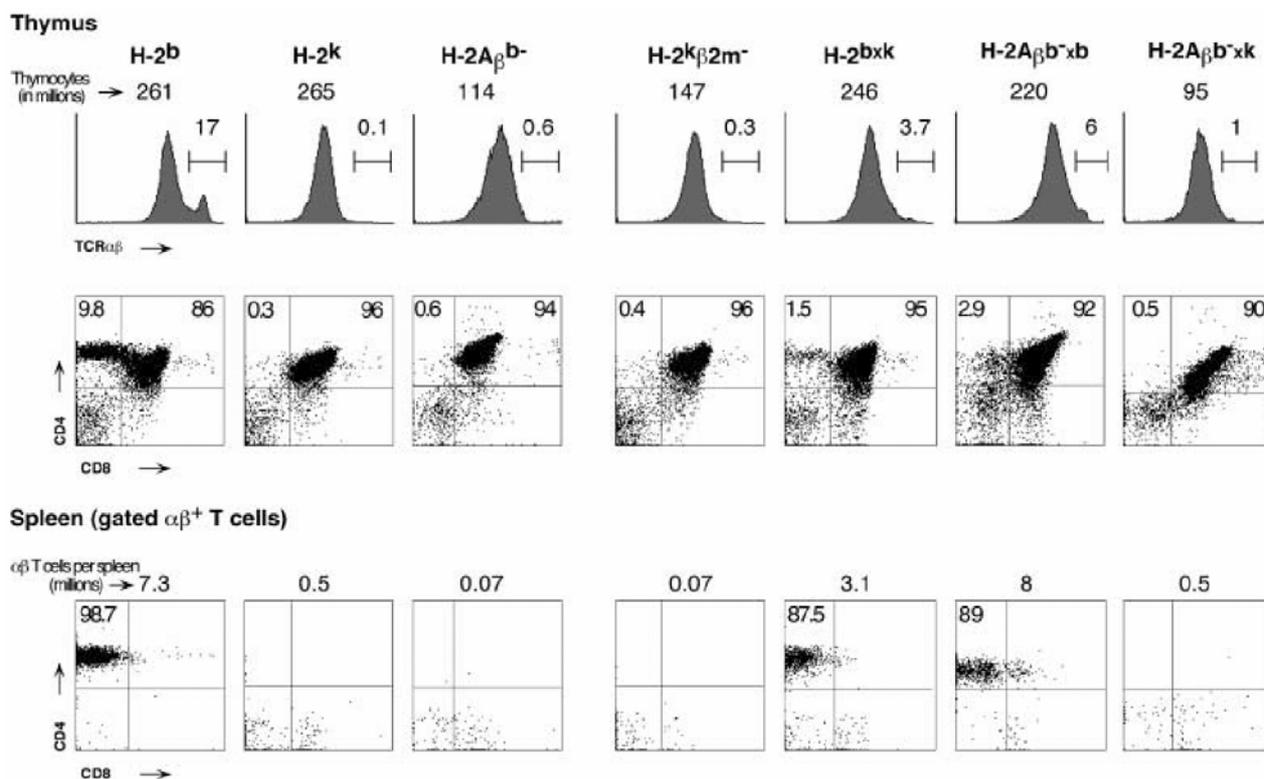
Le développement lymphocytaire T a été étudié chez des souris femelles de ces différentes lignées de souris, dans le thymus et la rate, par cytométrie en flux avec les anticorps anti-TCRβ, anti-CD4 et anti-CD8 (**Figure 8**).

**Question 18.** A l'aide d'un tableau comparatif (cf. modèle ci-dessous), vous résumerez et analyserez ces résultats en précisant, pour chaque lignée,

- quelles molécules du CMH sont exprimées
- quelle cellularité est observée dans le thymus et dans la rate
- quelles populations sont absentes ou présentes
- comment ces observations cadrent avec vos connaissances du développement lymphocytaire T

**Question 19.** A la fin de ce tableau comparatif, vous terminerez votre analyse en indiquant quelle(s) population(s) supplémentaire(s) vous attendriez-vous à observer

- si l'on injectait l'antigène H-Y dans le thymus des souris nouveaux-nés
- ou si les souris ne portaient pas la mutation RAG-2<sup>-/-</sup>

**Figure 8**

Le développement lymphocytaire T a été étudié chez des souris femelles des différentes lignées de souris *Marylin* TCR Tg. Le génotype du CMH des lignées étudiées est indiqué en haut de chaque colonne. Les thymocytes et splénocytes ont été analysés par cytométrie en flux avec les anticorps anti-TCR $\beta$  (TCR $\alpha\beta$ ), anti-CD4 et anti-CD8. Pour les splénocytes, l'analyse ne montre que les cellules TCR $\alpha\beta^+$ . Pour chaque organe étudié, le nombre total de cellules est indiqué (en millions). Les nombres inscrits dans les quadrants des profils correspondent à la proportion de cellules du phénotype correspondant.

N.B. : On rappelle que toutes les souris sont ici déficientes pour RAG-2.

Modèle de tableau pour la réponse aux **Question 18** et **Question 19** :

	H-2 <sup>b</sup>	H-2 <sup>k</sup>	H-2A $\beta^b$	H-2 <sup>k</sup> $\beta$ 2m <sup>*</sup>	H-2 <sup>b</sup> <sup>bxk</sup>	H-2A $\beta^b$ <sup>xb</sup>	H-2A $\beta^b$ <sup>bxk</sup>
Expression CMH I							
Expression CMH II							
Cellularité thymus							
Cellularité rate							
Populations thymus							
Populations rate							
Interprétation développement T							
Prédiction injection thymique antigène H-Y							
Prédiction RAG2+							

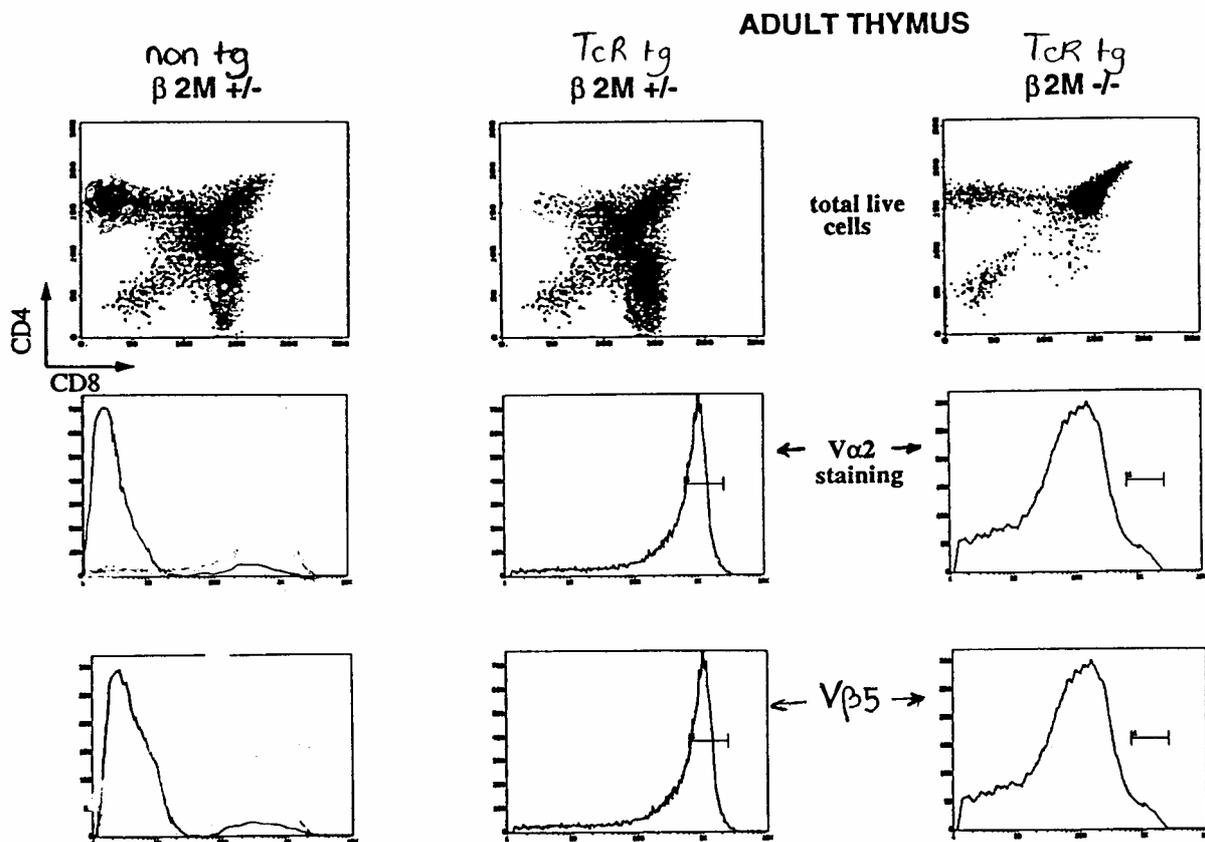


***IF2010 TD-IF 8 :  
Tolérance & Régulations***

## Tolérance & Régulations

### I. 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<sup>b</sup> deux transgènes contenant les gènes réarrangés codant respectivement pour la chaîne  $\alpha$  et la chaîne  $\beta$  du TcR d'un clone T spécifique du peptide 257-264 de l'ovalbumine (pOVA 257-264) présenté par H-2 K<sup>b</sup>. Ce TcR utilise les segments de gènes V $\alpha$ 2 et V $\beta$ 5. Les souris transgéniques ainsi obtenues sont croisées avec des souris de même haplotype, déficientes en  $\beta$ 2 microglobuline ( $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>). On obtient ainsi des souris TcRtg  $\beta$ 2m<sup>+/-</sup> et des souris TcRtg  $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>. On réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V $\alpha$ 2 et anti-V $\beta$ 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 1** :



**Figure 1** : Marquage des thymocytes de souris non transgéniques  $\beta$ 2m<sup>+/-</sup> (non tg), TcRtg  $\beta$ 2m<sup>+/-</sup> et TcRtg  $\beta$ 2m<sup>-/-</sup> avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V $\alpha$ 2 et anti-V $\beta$ 5.

**Question 1.** Analysez ces résultats en comparant et en expliquant les proportions de cellules simple-positives CD8<sup>+</sup> 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

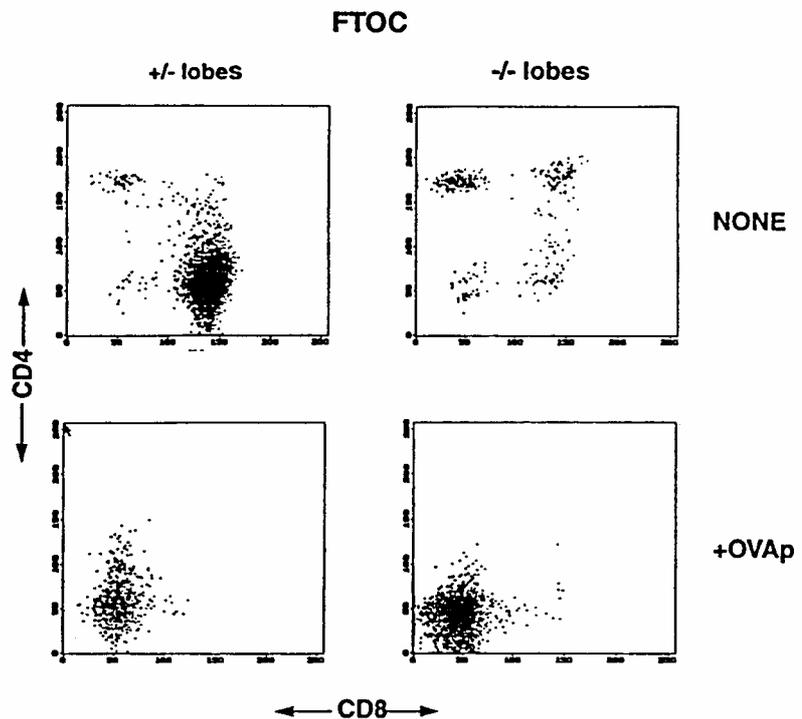
$\beta 2m^{+/-}$  et de souris TcRtg  $\beta 2m^{-/-}$ , en ajoutant ou non à ces cultures le peptide pOVA. Après 7 jours de culture, les lobes sont récupérés et broyés pour en extraire les thymocytes. Un marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 est réalisé sur les thymocytes extraits de ces cultures organotypiques (**Figure 2**).

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 3**).

**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  $\beta 2m^{-/-}$ .

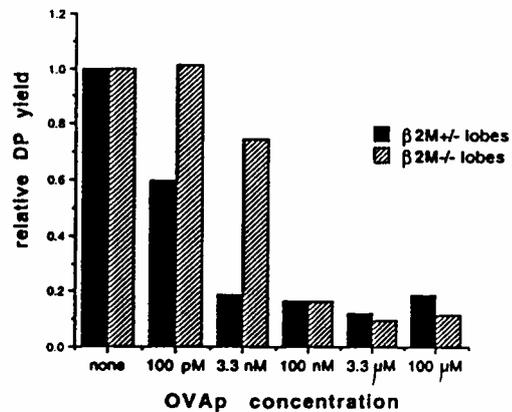
**Figure 2 :**

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 3 :**

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 :

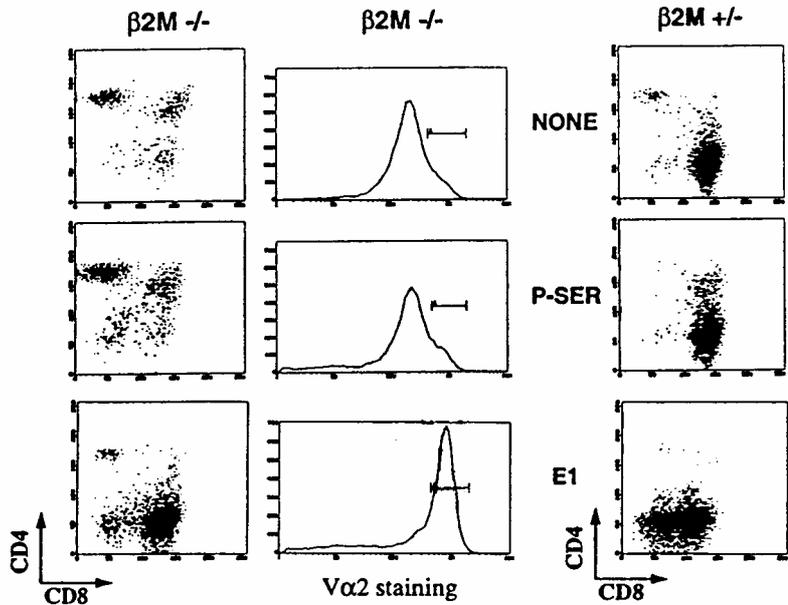
P-SER (S S Y S Y S S L) n'est jamais reconnu par le TcR transgénique.

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 4** :

**Figure 4 :**

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  $\mu M$  de P-SER ou E1 avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-V $\alpha 2$ .

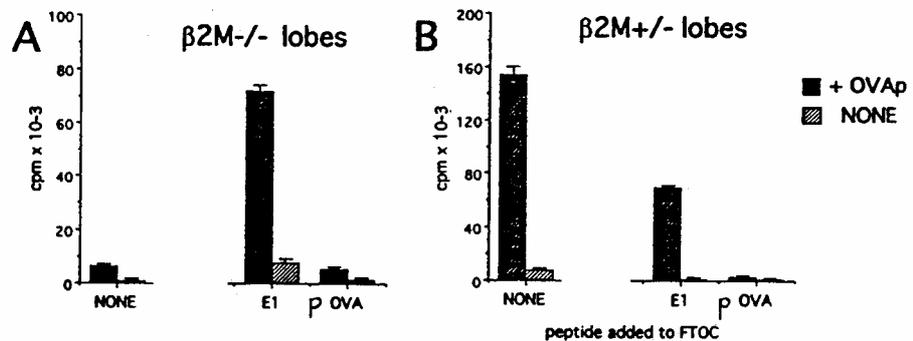


**Question 3.** Quels rôles jouent les peptides P-SER et E1 sur la sélection des cellules T exprimant le TcR transgénique dans les lobes des souris TcRtg  $\beta 2m^{+/-}$  et TcRtg  $\beta 2m^{-/-}$  ?

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 5** :

**Figure 5 :**

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  $^{51}\text{Cr}$ , et des peptides pOVA, P-SER ou E1. La lyse des cellules EL4 est évaluée par mesure du  $^{51}\text{Cr}$  relargué dans le surnageant après 4 heures de culture. Le résultat de cette expérience est présenté en **Figure 6**.

Le même clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement marquées au  $^{51}\text{Cr}$  et préalablement chargées avec 2 pM de pOVA, et les peptides P-SER ou E1. La **Figure 7** montre le pourcentage d'inhibition de la lyse des cellules EL4 chargées en pOVA par les différents peptides.

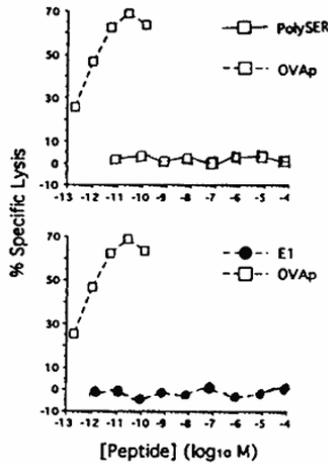


Figure 6

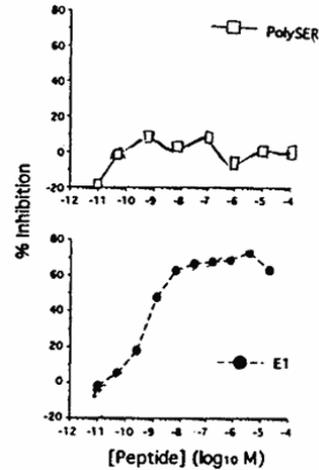


Figure 7

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

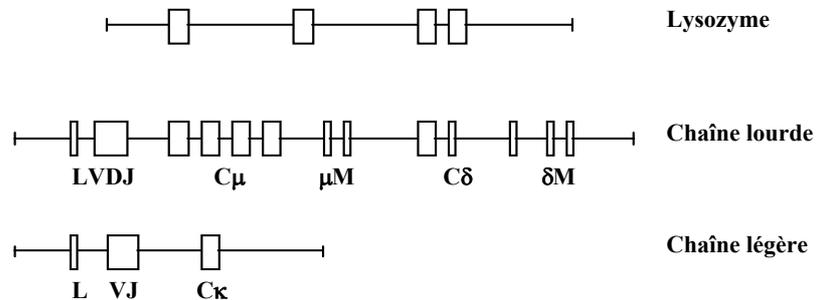
Question 6. Que suggère l'ensemble de ces résultats quant à la nature des peptides impliqués dans le processus de sélection positive dans le thymus ?

## II.

(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 8** :

Figure 8



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 1**).

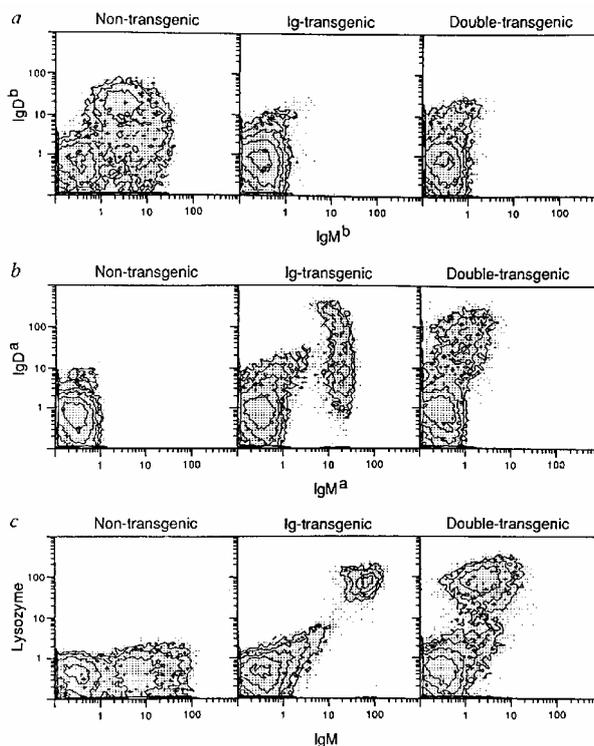
**Question 1.** Expliquer la différence de comportement entre les souris B6 et B6 x CBA ainsi que l'effet du transgène dans ces souris.

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<sup>a</sup>) et que les souris B6 sont d'haplotype Igh<sup>b</sup>.

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 1**

**Figure 9**



**Question 2.** Analyser les résultats présentés sur la **Figure 9** qui illustre les analyses de fluorescence des cellules spléniques provenant de souris B6, transgéniques ou non.

La sécrétion spontanée d'IgM<sup>a</sup> ainsi que le nombre de plages de lyse anti-lysozyme sont évalués dans les souris Ig-Tg et Dbl-Tg (**Tableau 2**).

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

**Tableau 2**

*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. 10<sup>5</sup> cellules spléniques de souris non-immunisées normales ou transgéniques sont transférées avec 5.10<sup>6</sup> 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 3**).

Cellules transférées		Antigène lysozyme-GRC	Titres anticorps anti-lysozyme
10 <sup>5</sup> cellules	5.10 <sup>6</sup> 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 3**

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



**IF2010 TD-IF 9 :**  
***Révisions/Questions – Sujet d'examen IF2009 juin***

## Révisions/Questions

### Epreuve d'Immunologie Fondamentale – juin 2009

D'après Song et al. (2009) *J. Clin. Invest.* 119:1524-1536.

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle anti-tumoral des cellules NKT invariante (TCR V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11) chez des patients atteints de neuroblastome. Il a en effet été montré que l'infiltration de ces cellules au site de la tumeur était associée à un pronostic favorable.

**Question 1.** *A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le mode de reconnaissance des cellules NKT par comparaison à celui des cellules T conventionnelles.*

**Question 2.** *A votre avis quel peut être le mode d'action anti-tumorale des cellules NKT ? (3 lignes maximum)*

Dans une première expérience, les auteurs observent que les cellules tumorales de neuroblastome n'expriment pas la molécule CD1d.

**Question 3.** *Par quelle technique les auteurs ont-ils pu faire cette observation ? (3 lignes maximum)*

**Question 4.** *Cette observation est-elle en accord avec votre réponse à la Question 2 ? (3 lignes maximum)*

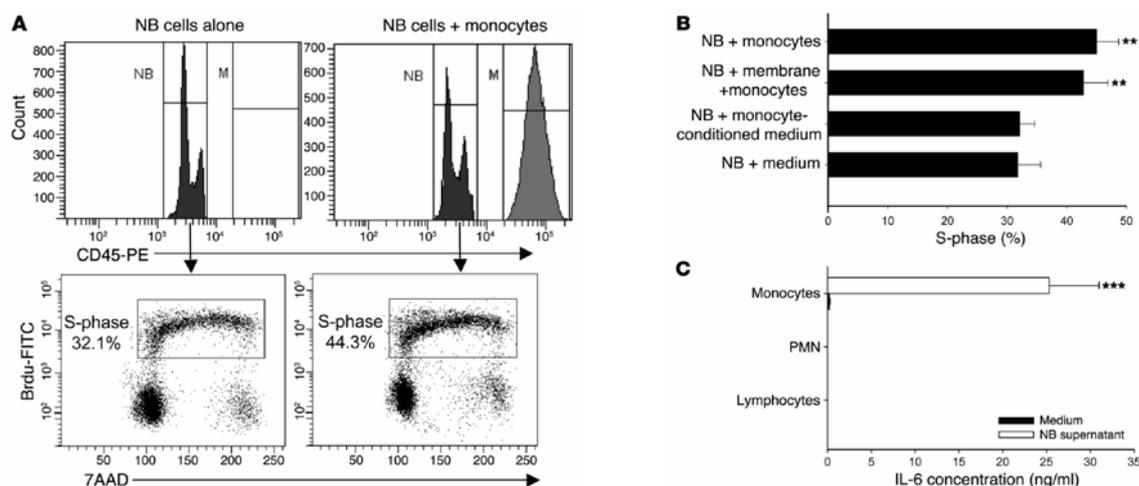
Dans l'expérience qui suit, les auteurs mesurent le pourcentage de cellules d'une lignée de neuroblastome (cellules NB) en phase S du cycle cellulaire, en absence ou en présence de monocytes. Les résultats sont présentés sur la **Figure 1**.

**Question 5.** *Pourquoi les auteurs cherchent-ils à déterminer la proportion de cellules tumorales NB en phase S du cycle cellulaire ? (3 lignes maximum)*

**Question 6.** *A quoi le BrdU utilisé dans l'expérience présentée à la Figure 1 sert-il ? (3 lignes maximum)*

**Question 7.** *Comment, dans l'expérience présentée à la Figure 1A, les auteurs peuvent-ils mesurer spécifiquement l'état du cycle cellulaire des cellules tumorales NB lorsqu'elles sont mélangées avec des monocytes ? (3 lignes maximum)*

**Question 8.** *Citez trois techniques applicables à la mesure de l'IL-6 rapportée dans l'expérience présentée à la Figure 1C. (3 lignes maximum)*



**Figure 1 :**

(A) Des cellules de la lignée de neuroblastome CHLA-255 (NB) ont été cultivées seules (« NB cells alone », à gauche) ou mélangées avec des monocytes (ratio 1:1 ; « NB cells + monocytes », à droite) pendant 24 heures. Pendant les 40 dernières minutes de culture, les cellules sont cultivées en présence de BrdU et, après fixation et perméabilisation, les cellules sont marquées avec un mélange d'anticorps anti-BrdU couplé au FITC (BrdU-FITC), de 7AAD, et d'un anticorps anti-CD45 couplé à la phycoérythrine (CD45-PE), puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes du haut représentent l'expression du marqueur CD45 à la surface des cellules en culture ; le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire (S-phase) parmi les cellules exprimant faiblement le marqueur CD45 est alors calculé en repérant les cellules BrdU<sup>+</sup> (en bas). On ignorera ici le marquage 7AAD.

(B) Le pourcentage de cellules NB en phase S a été mesuré comme en (A) après culture comme indiqué sur l'axe y : « NB + monocytes », cellules NB cultivées en présence de monocytes ; « NB + membrane + monocytes », cellules NB et monocytes cultivés dans deux chambres de culture séparées par une membrane perméable mais empêchant tout contact cellulaire ; « NB + monocyte-conditioned medium », cellules NB cultivées dans du milieu de culture provenant d'une culture de monocytes ; « NB + medium », cellules NB cultivées en milieu seul. Les résultats indiqués sont la moyenne  $\pm$  écart-type de quatre expériences. \*\* indique une différence statistiquement significative par rapport à la condition « NB + medium ».

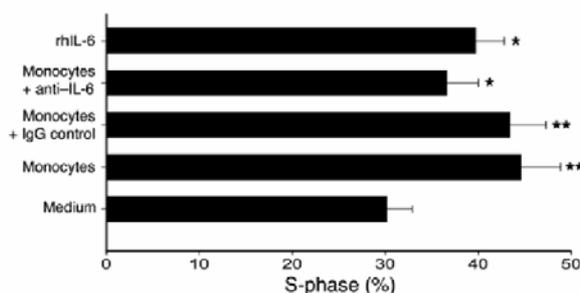
(C) Des monocytes, des polynucléaires (PMN) et des lymphocytes isolés du sang ont été cultivés pendant 24 heures en présence de milieu de culture provenant d'une culture de cellules NB (NB supernatant) ou de milieu seul (Medium). La concentration d'IL-6 dans le surnageant de culture est déterminée. Les résultats indiqués sont la moyenne  $\pm$  écart-type de huit expériences effectuées avec du sang d'individus sains différents. \*\*\* indique une différence statistiquement significative par rapport à la condition « Medium ».

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

**Question 9. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 1. (15 lignes maximum)**

Les auteurs évaluent ensuite l'importance de l'IL-6 produite par les monocytes pour leur action sur les cellules NB. Pour cela, ils mesurent à nouveau le pourcentage de cellules NB en phase S en présence d'IL-6, de monocytes seuls ou en présence d'anticorps anti-IL-6. Les résultats sont présentés sur la **Figure 2**.

**Question 10. A quoi la condition « Monocytes + IgG control » utilisée dans l'expérience présentée à la Figure 2 sert-elle ? (3 lignes maximum)**



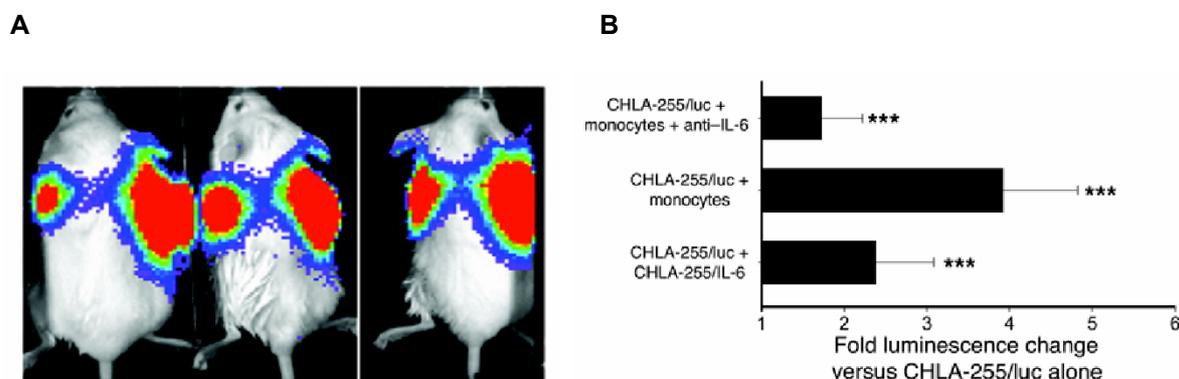
**Figure 2 :**

Les cellules de neuroblastome CHLA-255 (NB) ont été cultivées seules (Medium), en présence d'IL-6 (rhIL6), en présence de monocytes seuls (Monocytes), en présence de monocytes et d'anticorps contrôle (Monocytes + IgG control) ou en présence de monocytes et d'anticorps anti-IL-6 humaine (Monocytes + anti-IL-6). La proportion de cellules NB en phase S a été déterminée comme décrit à la Figure 1A. Les résultats indiqués sont la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences. \*/\*\* indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition « Medium ».

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

**Question 11.** Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 2. (8 lignes maximum)

Le rôle de l'IL-6 est maintenant étudié dans un modèle *in vivo* en implantant, sous la peau de souris immunodéficientes, des cellules tumorales de neuroblastome transduites pour le gène codant la Luciférase en présence de monocytes, avec ou sans anticorps anti-IL-6. La mesure de la bioluminescence par imagerie *in vivo* permet de suivre la croissance de la tumeur. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3**.



**Figure 3 :**

(A) Des cellules de neuroblastome CHLA-255 transduites avec le gène codant la Luciférase (CHLA-255/luc) ont été injectées seules ou mélangées à des monocytes, respectivement dans les flancs droit et gauche de souris immunodéficientes. Les images de bioluminescence pour trois souris représentatives ont été acquises 28 jours après l'implantation des cellules tumorales. L'intensité de bioluminescence observée est proportionnelle à la taille de la tumeur.

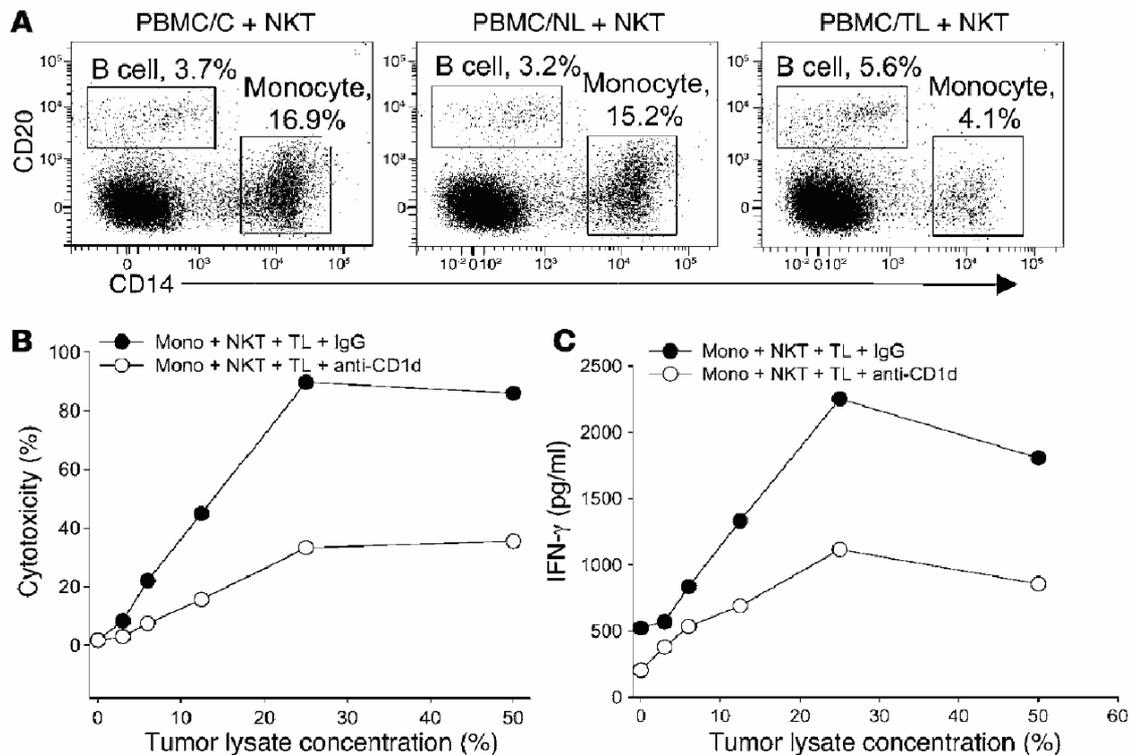
(B) Le groupe de souris recevant, dans le flanc droit, des cellules CHLA-255/luc en présence de monocytes (CHLA-255/luc + monocytes), comme indiqué en (A), a été comparé à deux autres groupes expérimentaux : un groupe de souris (CHLA-255/luc + monocytes + anti-IL-6) recevant, en plus de la même injection de cellules CHLA-255/luc + monocytes dans le flanc droit, un traitement avec un anticorps anti-IL-6 humaine ; un groupe de souris (CHLA-255/luc + CHLA-255/IL-6) recevant, dans le flanc droit, un mélange de cellules CHLA-255/luc et de cellules CHLA-255 transduites avec le gène codant l'IL-6 humaine. Dans chaque cas, la croissance de la tumeur implantée dans le flanc droit des souris est rapportée à la croissance de la tumeur CHLA-255/luc seule implantée dans le flanc gauche (CHLA-255/luc alone). Les résultats (Fold luminescence change versus CHLA-255/luc alone) sont la moyenne  $\pm$  écart-type pour deux expériences. \*\*\* indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules CHLA-255/luc seules (flanc gauche).

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

Question 12. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 3. (8 lignes maximum)

Question 13. Ces résultats confirment-ils vos conclusions précédentes ? (3 lignes maximum)

Dans l'expérience suivante, les auteurs étudient l'action des cellules NKT sur les cellules du sang périphérique en culture, en présence ou non de lysat de cellules tumorales comme indiqué sur la Figure 4.



**Figure 4 :**

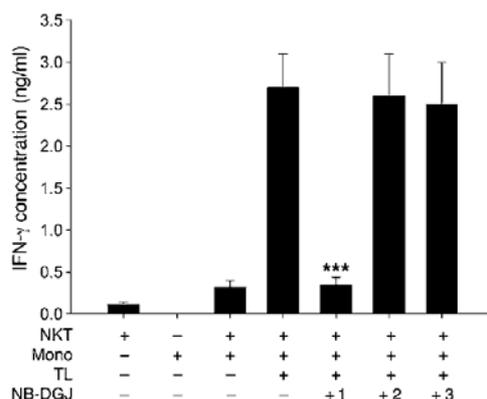
(A) Des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été cultivées avec du milieu de culture seul (PBMC/C), ou en présence de lysat cellulaire de PBMC normales (PBMC/NL) ou de lysat de cellules tumorales NB (PBMC/TL). Après une nuit en culture, les cellules ont été incubées pendant quatre heures en présence de cellules NKT (ratio 5:1 effecteurs/cibles), puis analysées en cytométrie en flux après marquage avec les anticorps anti-CD14 (monocytes) et anti-CD20 (lymphocytes B).

(B & C) La cytotoxicité des cellules NKT vis-à-vis des monocytes (B) et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NKT (C) ont été mesurées après que les monocytes ont été préincubés avec des concentrations croissantes de lysat de cellules tumorales en présence d'anticorps anti-CD1d bloquant (Mono + NKT + TL + anti-CD1d) ou en présence d'un anticorps contrôle (Mono + NKT + TL + IgG).

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

Question 14. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 4. (15 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs précisent les conditions nécessaires à l'activation des cellules NKT en présence de N-butyl-déoxygalactonojirimycine, un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase, une enzyme nécessaire à la première étape de biosynthèse des glycosphingolipides (Figure 5).



**Figure 5 :**

Les cellules NKT ont été incubées, en présence ou non de monocytes (Mono) préalablement préincubés ou non avec du lysat de cellules tumorales (TL). Par ailleurs, de la N-butyl-déoxygalactonojirimycine (NB-DGJ) a été ajoutée aux cellules tumorales en culture pendant 24h avant la préparation du lysat cellulaire TL (+1), pendant la culture sur la nuit des monocytes en présence du lysat de cellules tumorales (+2), ou pendant la coculture des cellules NKT avec les monocytes préincubés avec le lysat de cellules tumorales (+3). Pour chaque condition expérimentale, la production d'IFN- $\gamma$  a été mesurée dans le surnageant de culture. Les résultats présentés sont la moyenne  $\pm$  écart-type de trois expériences. \*\*\* indique une réduction statistiquement significative de la production d'IFN- $\gamma$  par rapport à la condition « NKT + Mono + TL ».

N.B. : La NB-DGJ est un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase, une enzyme nécessaire à la première étape de biosynthèse des glycosphingolipides. Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

**Question 15.** Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 5. (10 lignes maximum)

**Question 16.** A l'aide d'un schéma uniquement, résumez les résultats obtenus dans l'ensemble de cette étude concernant le mode d'action des monocytes et des cellules NKT dans le contrôle de la croissance tumorale.