

*Université Pierre et Marie Curie – Paris 6*

*UE MV423 – Immunologie Fondamentale & Intégrée  
Epreuve écrite – mai 2011, 1<sup>ère</sup> session*

*Durée de l'épreuve : 2 heures*

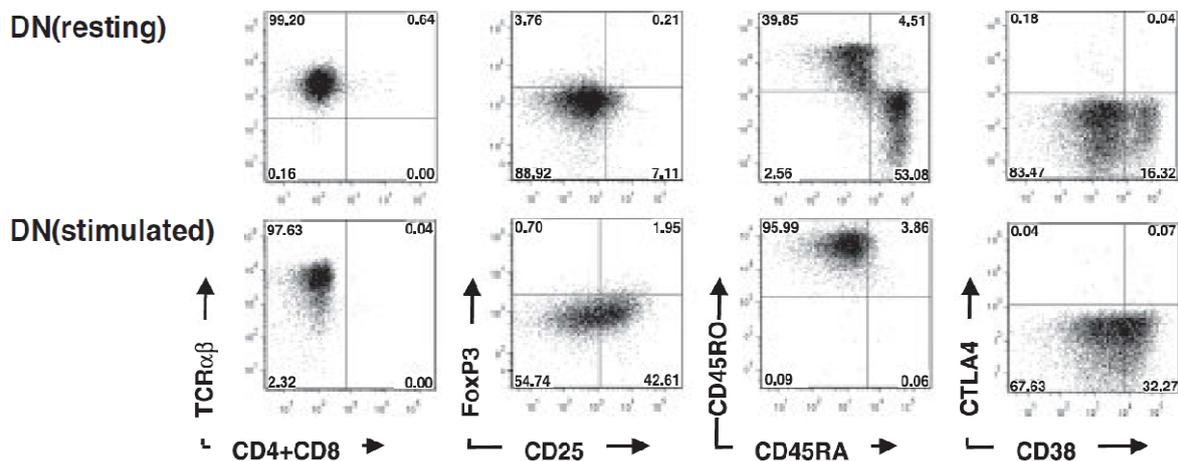
**MV423 - Immunologie Fondamentale & Intégrée**  
**Epreuve écrite – mai 2011, 1ère session**

D'après Voelkl et al. (2011) *Eur. J. Immunol.* 41:739-748.

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle d'une population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> chez l'homme. On appellera, par convention, cette population « DN » pour double négative. Pour cela, les auteurs isolent les cellules DN du sang périphérique de donneurs sains.

**Question 1.** *A l'aide d'un schéma uniquement, décrivez brièvement un protocole expérimental permettant d'isoler les cellules DN du sang périphérique.*

Dans une première expérience, le phénotype des cellules DN est étudié après culture pendant quatre semaines en présence ou non de cellules présentatrices d'antigène (APC) allogéniques. Les résultats sont présentés à la **Figure 1**.



**Figure 1 :**

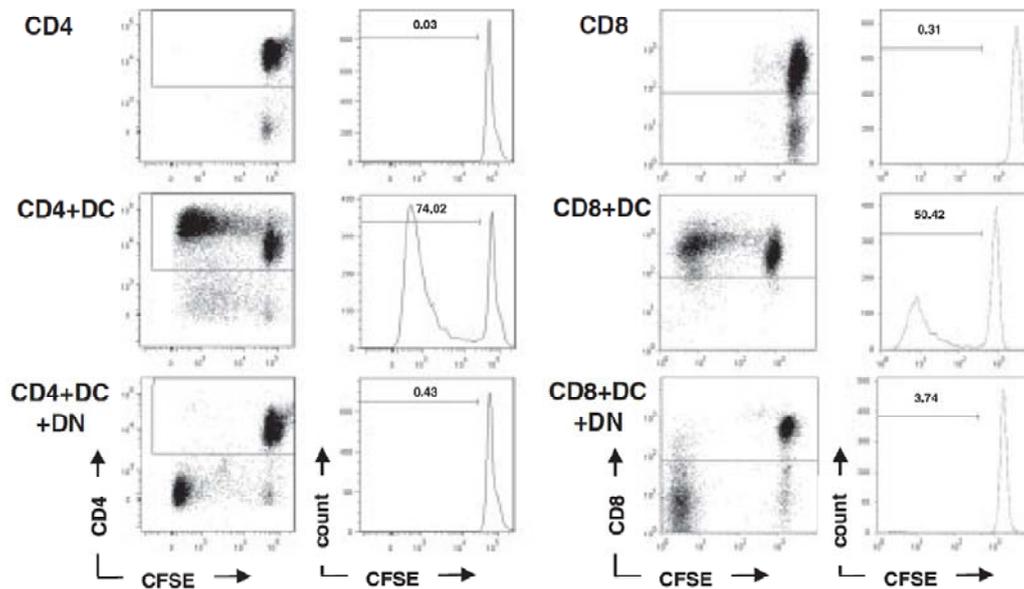
Les cellules DN fraîchement isolées du sang périphérique d'un donneur sain ont été mises en culture pendant quatre semaines en l'absence (resting) ou en présence (stimulated) d'APC allogéniques. Après culture, les cellules DN ont été marquées avec les combinaisons d'anticorps indiquées et analysées en cytométrie en flux. Les nombres indiqués correspondent aux pourcentages des populations définies dans les différents quadrants d'analyse. Les données présentées sont représentatives de quatre expériences indépendantes.

**Question 2.** *Pour quelle raison les cellules DN sont-elles cultivées en présence ou non d'APC allogéniques ? (3 lignes maximum)*

**Question 3.** *Dans un premier temps, analysez le phénotype des cellules DN cultivées en l'absence d'APC allogéniques (partie supérieure de la Figure 1). (8 lignes maximum)*

**Question 4.** *Par comparaison à votre analyse faite à la Question 3, quel est l'effet des APC allogéniques sur le phénotype des cellules DN (partie inférieure de la Figure 1) ? (5 lignes maximum)*

Dans une seconde expérience, le rôle des cellules DN, préalablement cultivées en présence d'APC allogéniques, est étudié vis-à-vis de cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> autologues. Les résultats sont présentés à la **Figure 2**.

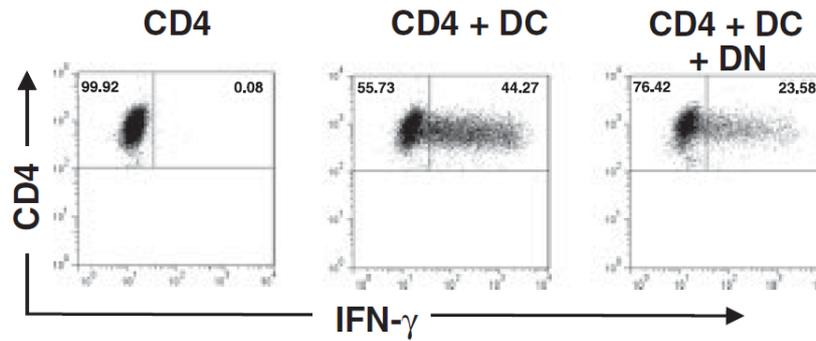


**Figure 2 :**

Des cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, fraîchement isolées du donneur A, ont été marquées au CFSE puis incubées seules (CD4 ou CD8) ou avec des cellules dendritiques allogéniques du donneur B (CD4+DC ou CD8+DC). Dans une troisième condition, des cellules DN provenant du donneur A, préalablement activées avec des APC du donneur B (cf. première expérience) sont ajoutées à un ratio 1:1 par rapport aux cellules effectrices CD4<sup>+</sup> (CD4+DC+DN) ou CD8<sup>+</sup> (CD8+DC+DN). Après 5 jours de culture, l'intensité du marquage CFSE des cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> est analysée par cytométrie en flux. Les graphes en nuages de point représentent l'intensité du marquage CFSE en abscisses et CD4 ou CD8 en ordonnées. Les graphes en histogramme montrent la distribution du marquage CFSE sur les cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Les données présentées sont représentatives de quatre expériences indépendantes.

- Question 5.** *Pour quelle raison les cellules effectrices CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> sont-elles préalablement marquées au CFSE ? (3 lignes maximum)*
- Question 6.** *A quoi correspondent les barres et nombres indiqués sur les graphes en histogramme de la Figure 2 ? (3 lignes maximum)*
- Question 7.** *Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 2. (8 lignes maximum)*
- Question 8.** *Quelle autre technique que le marquage au CFSE aurait-elle pu être mise en œuvre ? (3 lignes maximum)*

Dans une troisième expérience, la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules CD4<sup>+</sup> est évaluée dans les trois conditions de cultures précédemment décrites à la Figure 2. Les résultats sont présentés à la **Figure 3**.



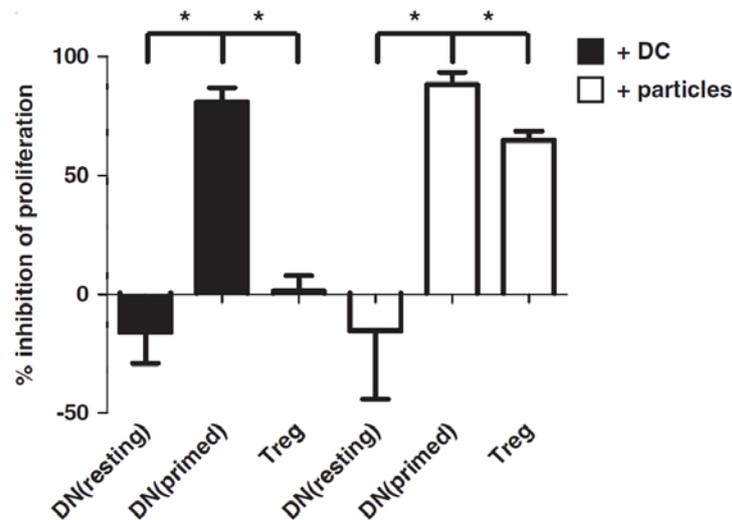
**Figure 3 :**

Les cellules d'une lignée T CD4<sup>+</sup> ayant été préalablement cultivées en présence des cellules présentatrices allogéniques ont été remises en culture pendant 5 heures en présence de monensine, en présence (CD4+DC) ou non (CD4) de cellules dendritiques allogéniques, en présence (+DN) ou non de cellules DN autologues préalablement incubées avec des APC allogéniques (cf. légende de la Figure 2). Après 5h, la production d'IFN<sub>γ</sub> par les cellules CD4<sup>+</sup> est évaluée par cytométrie en flux. Les nombres indiqués correspondent aux pourcentages des populations définies dans les fenêtres d'analyse considérées. Les données présentées sont représentatives de quatre expériences indépendantes.

- Question 9. Pourquoi utilise-t-on, dans cette expérience, des cellules CD4<sup>+</sup> préalablement cultivées en présence de cellules dendritiques allogéniques ? (3 lignes maximum)
- Question 10. Considérant la technique mise en œuvre pour mesurer la production d'IFN- $\gamma$ , pourquoi ajoute-t-on de la monensine au milieu de culture ? (3 lignes maximum)
- Question 11. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 3. (8 lignes maximum)
- Question 12. Quelle hypothèse pouvez-vous formuler, à ce stade, quant au rôle des cellules DN ? (3 lignes maximum)

Dans l'expérience suivante, l'effet des cellules DN est comparé à celui des cellules T régulatrices naturelles (Treg). Les résultats sont présentés à la **Figure 4**.

- Question 13. A votre avis, pour quelle raison utilise-t-on des particules couplées aux anticorps anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28 dans une partie de l'expérience présentée à la Figure 4 ? (5 lignes maximum)
- Question 14. Expliquez, à l'aide d'une formule, comment les pourcentages d'inhibition de la prolifération présentés à la Figure 4 sont calculés.
- Question 15. A l'aide d'un tableau synthétique, résumez les résultats présentés à la Figure 4.
- Question 16. Sur la base de votre analyse, et à la lumière de l'hypothèse que vous avez formulée à la Question 12, comment pouvez-vous qualifier la fonction des cellules DN comparativement à celle des cellules Treg ? (5 lignes maximum)



**Figure 4 :**

Des cellules DN et Treg ( $CD4^+CD25^+$ ) ont été purifiées par cytométrie en flux à partir de sang périphérique d'un donneur sain. Les cellules DN, fraîchement isolées (resting) ou préalablement incubées avec des cellules présentatrices allogéniques (primed), et les cellules Treg ont été ajoutées, à un ratio 1:1, à une culture de cellules T  $CD4^+$  autologues, marquées au CFSE, en présence, soit de cellules dendritiques allogéniques (+DC), soit de particules couplées à des anticorps anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28 (+particules). Le graphe représente le pourcentage d'inhibition de la prolifération (% inhibition of proliferation) des cellules  $CD4^+$  en l'absence de cellules DN ou Treg ajoutées. Un astérisque indique une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ) entre deux conditions considérées.

**Question 17.** A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez les mécanismes d'action des cellules régulatrices naturelles.

Dans la série d'expériences suivantes, les chercheurs souhaitent préciser le mode d'action des cellules DN sur les cellules T effectrices. Pour cela, ils mesurent à nouveau la prolifération de cellules T  $CD4^+$  cultivées en présence de cellules dendritiques allogéniques, dans différentes conditions de culture. Les résultats sont présentés aux **Figure 5**, **Figure 6** et **Figure 7**.

**Question 18.** Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 5. Que concluez-vous ? (8 lignes maximum)

**Question 19.** Quel est l'effet du traitement des cellules dendritiques par le glutaraldéhyde (Figure 6A) ? (3 lignes maximum)

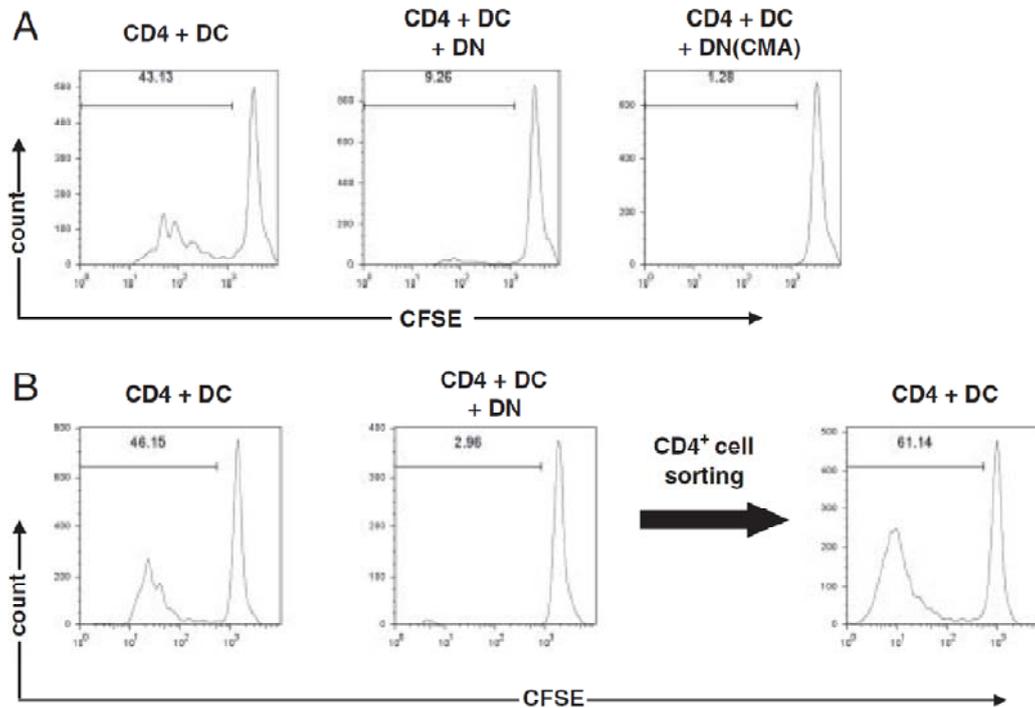
**Question 20.** En quoi l'utilisation de billes couplées à des anticorps faite à la Figure 6B est-elle différente de celle faite à la Figure 4 ? (3 lignes maximum)

**Question 21.** Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 6. Que concluez-vous ? (12 lignes maximum)

**Question 22.** Pour chaque expérience présentée à la Figure 7 (A, B, C et D), analysez les résultats et donnez la conclusion de l'expérience. (12 lignes maximum)

**Question 23.** A l'aide d'un schéma uniquement, proposez un mécanisme d'action des cellules DN qui tienne compte de l'ensemble des résultats obtenus.

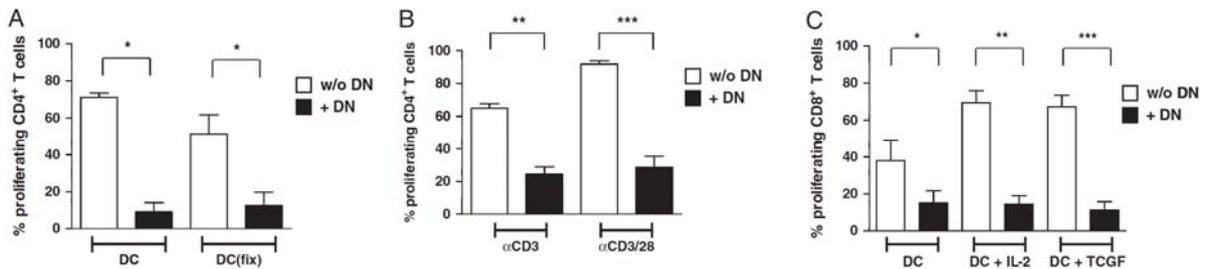
**Question 24.** *Quelle application thérapeutique pouvez-vous envisager exploitant la fonction des cellules DN mise en évidence dans cette étude ? (8 lignes maximum)*



**Figure 5 :**

- (A) Des cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques, sont incubées pendant 20h en présence ou non de Concanamycine A (CMA), un inhibiteur de la voie de sécrétion des perforines/granzymes. Les cellules DN ainsi préparées sont ajoutées, à un ratio 1:1, à des cellules T CD4<sup>+</sup>, préalablement marquées au CFSE, incubées en présence de cellules dendritiques allogéniques : CD4+DC+DN (cellules DN préparée sans CMA) et CD4+DC+DN(CMA) (cellules DN préparées en présence de CMA). Un contrôle est réalisé en l'absence de cellules DN (CD4+DC).
- (B) Des cellules CD4<sup>+</sup>, préalablement marquées au CFSE, sont incubées en présence de cellules dendritiques allogéniques, en absence (CD4+DC, à gauche) ou en présence (CD4+DC+DN, au centre) de cellules DN, préalablement incubées avec des APC allogéniques, à un ratio 1:1. Après 3 jours, les cellules CD4<sup>+</sup> de la culture « CD4+DC+DN » (condition du centre) sont triées (CD4<sup>+</sup> cell sorting) et remises en culture pendant 5 jours en présence de cellules dendritiques allogéniques mais en l'absence de cellules DN.

Pour chaque condition expérimentale, la distribution de l'intensité du marquage CFSE des cellules CD4<sup>+</sup> est évaluée par cytométrie en flux comme représenté sur les histogrammes. Les données présentées sont représentatives de quatre expériences indépendantes.



**Figure 6 :**

- (A) Des cellules  $CD4^+$ , préalablement marquées au CFSE, ont été cultivées pendant 5 jours en présence de cellules dendritiques allogéniques normales (DC) ou fixées par traitement au glutaraldéhyde (DC(fix)), en absence (w/o DN) ou en présence (+DN) de cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques. Le pourcentage de prolifération des cellules  $CD4^+$  est évalué par cytométrie en flux.
- (B) Des cellules  $CD4^+$ , préalablement marquées au CFSE, ont été cultivées pendant 5 jours dans des plaques de culture au fond desquelles des billes couvertes d'anticorps anti-CD3 ( $\alpha$ CD3) ou anti-CD3/anti-CD28 ( $\alpha$ CD3/28) ont été fixées. Les cellules  $CD4^+$  ont été ainsi incubées, en absence (w/o DN) ou en présence (+DN) de cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques. Le pourcentage de prolifération des cellules  $CD4^+$  est évalué par cytométrie en flux.
- (C) Des cellules  $CD8^+$ , préalablement marquées au CFSE, ont été cultivées en présence de cellules dendritiques allogéniques, en absence (w/o DN) ou en présence (+DN) de cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques, sans facteur exogène supplémentaire (DC) ou en présence d'IL2 (DC+IL-2) ou en présence d'un mélange de facteurs de croissance des cellules T (DC+TCGF). Le pourcentage de prolifération des cellules  $CD8^+$  est évalué par cytométrie en flux.

Les cellules DN sont ajoutées à un ratio 1:1 avec les cellules  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ . Pour chaque expérience, les données représentées correspondent à la moyenne de quatre expériences ; les barres indiquent la valeur de l'écart-type. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions considérées : \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

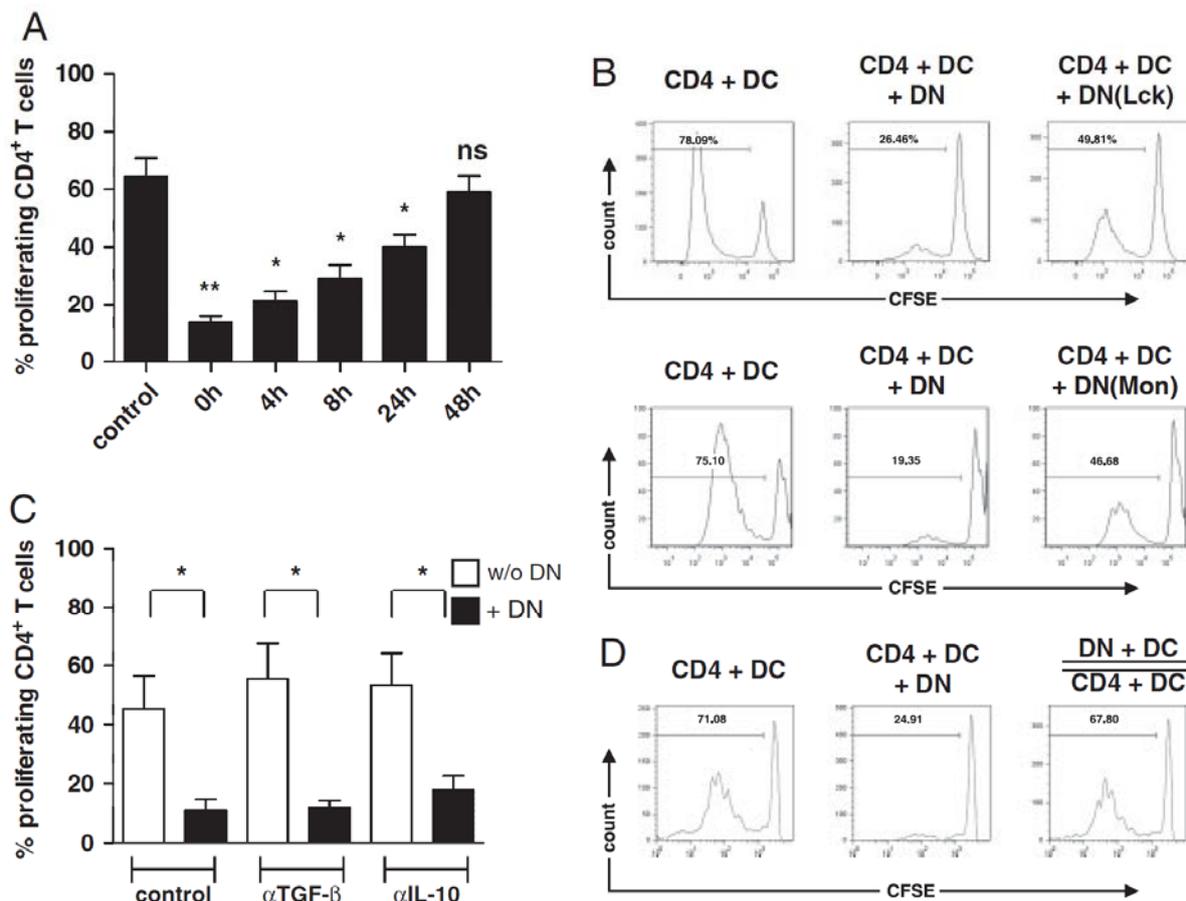


Figure 7 :

- (A) Des cellules T CD4<sup>+</sup>, préalablement marquées au CFSE, ont été cultivées en présence de cellules dendritiques allogéniques pendant 5 jours. Des cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques, ont été ajoutées, à un ratio 1:1, à la culture aux temps indiqués. La prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> a été déterminée, après 5 jours, par cytométrie en flux. Les données représentées correspondent à la moyenne de quatre expériences ; les barres indiquent la valeur de l'écart-type. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions considérées : \* p<0,05 ; \*\* p<0,01.
- (B) Des cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques, ont été incubées pendant 3 heures avec un inhibiteur de la lck ou avec de la monensine. Des cellules T CD4<sup>+</sup>, préalablement marquées au CFSE, ont été cultivées en présence de cellules dendritiques allogéniques, en l'absence (CD4+DC), ou en présence de cellules DN, non traitées (CD4+DC+DN), traitées à l'inhibiteur de lck (CD4+DC+DN(Lck)), ou traitées à la monensine (CD4+DC+DN(Mon)). Les cellules DN ont été ajoutées aux cellules CD4<sup>+</sup> à un ratio 1:1. Après 5 jours, la distribution de l'intensité du marquage CFSE des cellules CD4<sup>+</sup> est évaluée par cytométrie en flux comme représenté sur les histogrammes. Les données présentées sont représentatives de quatre expériences indépendantes.
- (C) Des cellules CD4<sup>+</sup>, préalablement marquées au CFSE, ont été cultivées en présence de cellules dendritiques allogéniques, en absence (w/o DN) ou en présence (+DN) de cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques, en l'absence (Control) ou en présence d'anticorps anti-TGF- $\beta$  ( $\alpha$ TGF- $\beta$ ) ou anti-IL-10 ( $\alpha$ IL-10). Le pourcentage de prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> est évalué par cytométrie en flux après 5 jours de culture. Les données représentées correspondent à la moyenne de trois expériences ; les barres indiquent la valeur de l'écart-type. Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives entre les conditions considérées : \* p<0,05.
- (D) Des cellules CD4<sup>+</sup>, préalablement marquées au CFSE, ont été cultivées en présence de cellules dendritiques allogéniques seules (CD4+DC) ou en présence de cellules DN, préalablement incubées en présence d'APC allogéniques (CD4+DC+DN). Dans une troisième condition, les cellules DN sont ajoutées, en présence de cellules dendritiques allogéniques, dans la partie supérieure d'une chambre *transwell* (DN+DC//CD4+DC). Après 5 jours, la distribution de l'intensité du marquage CFSE des cellules CD4<sup>+</sup> est évaluée par cytométrie en flux comme représenté sur les histogrammes. Les données présentées sont représentatives de trois expériences indépendantes.