

Méthode d'analyse scientifique

- Méthodologie d'analyse scientifique (cf. présentation)

Techniques d'études des réponses immunitaires

I. Principes (cf. présentation)

II. Applications

(d'après Karlsson A.C. *et al.* (2003) *J. Immunol. Methods* 283:141)

L'objectif de cette étude est de comparer deux techniques pour mesurer les réponses cellulaires T spécifiques d'antigènes des protéines virales du VIH ou du CMV (Cytomégalovirus). L'étude porte sur des patients chroniquement infectés par le VIH.

Les lymphocytes de donneurs VIH+ ont été purifiés et stimulés en présence de peptides (15 acides aminés) correspondant à différentes protéines du VIH (protéines Gag, Env et Vif) ou d'un peptide correspondant à la protéine pp65 du CMV. L'IFN γ produit par les cellules a été détecté par 2 techniques (Figure 1A et B).

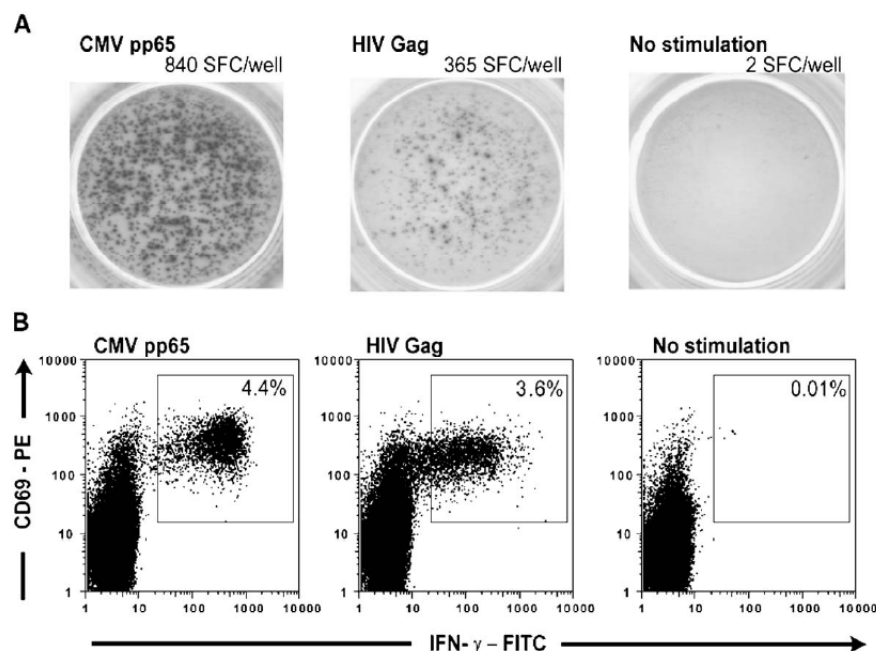


Figure 1

Question 1. Quelles sont les deux techniques utilisées. Expliquez à l'aide de schémas comment ont été réalisées les 2 expériences présentées dans la figure 1.

Question 2. Commentez les résultats obtenus

Pour comparer les résultats, les données de la technique 1 (Figure 1A) ont été exprimées en « Spot Forming Cell » SFC/10⁶ lymphocytes (**Figure 2A**), et les données de la technique 2 (Figure 1A) en pourcentages de lymphocytes T CD3⁺ producteurs d'IFN γ (**Figure 2B**).

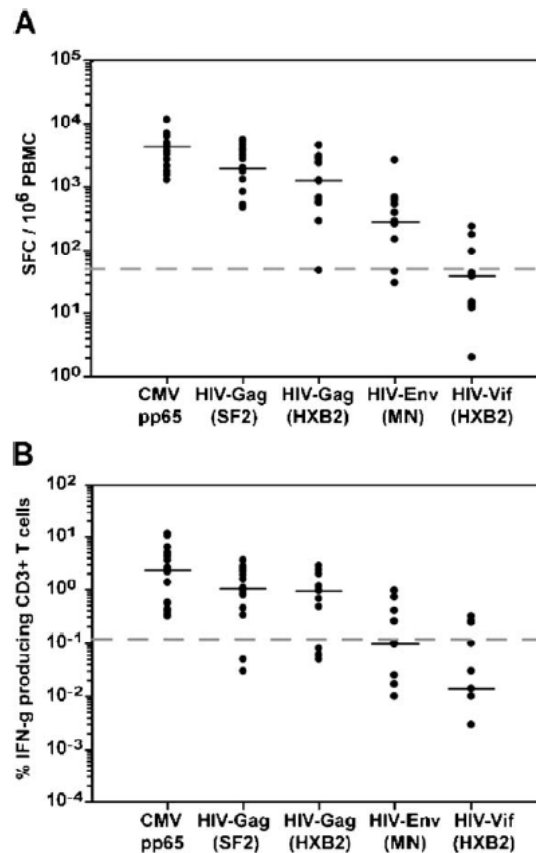


Figure 2

Question 3. Quelles sont les différences mises en évidence dans ces expériences ?

Exercice II

(d'après van Stipdonk M.J.B. *et al.* (2001) *Nature Immunology* 2:423)

L'objectif de cette étude est de déterminer le temps de stimulation antigénique nécessaire pour stimuler et permettre la prolifération et la différenciation de lymphocytes T CD8⁺.

Les cellules T CD8⁺ naïves sont obtenues de souris transgéniques dont le TCR est spécifique pour le peptide OVA(257-264). Les cellules T CD8⁺ prélevées chez ces souris ont été marquées au CFSE, puis cultivées en présence de CPA (cellules présentatrices d'antigènes) présentant le peptide OVA(257-264) sur le CMH de classe I. Après un temps de culture de 0, 2, 4, 6 et 8h, les cellules TCD8⁺ ont été transférées dans d'autres puits de culture sans APC, et analysées en cytométrie de flux après 24 ou 48h. Les résultats sont présentés dans la **Figure 3**.

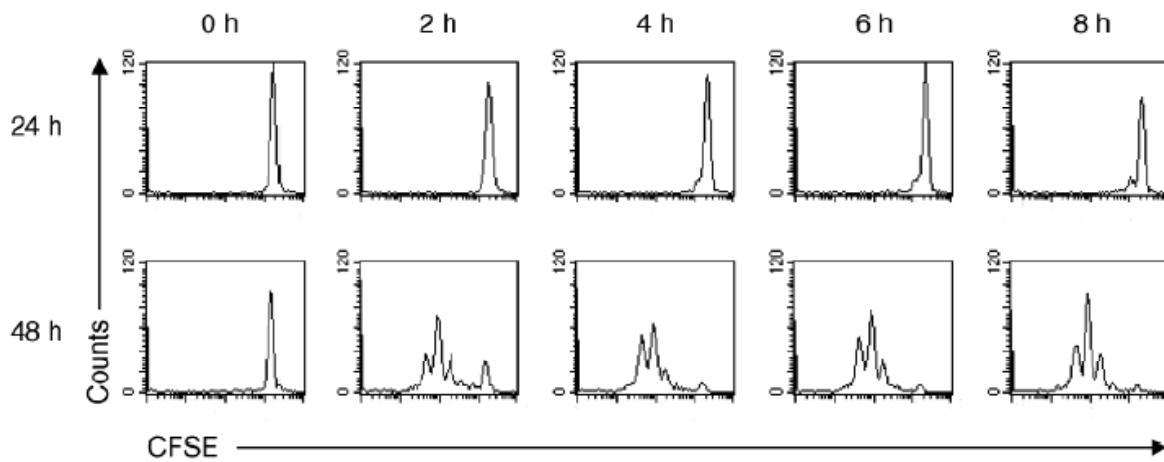


Figure 3

Question 4. Quelle est la technique utilisée ?

Question 5. Quelles sont les différences observées aux temps 24h et 48h ? Quelles conclusions tirez-vous de cette expérience ?

Les auteurs ont par la suite étudié la différenciation des cellules T CD8⁺ en cellules effectrices. Les cellules T CD8⁺ ont été isolées des souris transgéniques, stimulées avec les APC présentant le peptide OVA(257-264) sur le CMH de classe I pendant 8h, puis transférées dans des puits de culture sans APC. Après 24h (**Figure 4a**), 48h (**Figure 4b**), ou 72h (**Figure 4c**), les lymphocytes T ont été incubés avec des cellules cibles EL4 exprimant le peptide OVA(257-264), préalablement marquées au Cr51 (carrés noirs). Les pourcentages de lyse ont alors été déterminés (**Figure 4**).

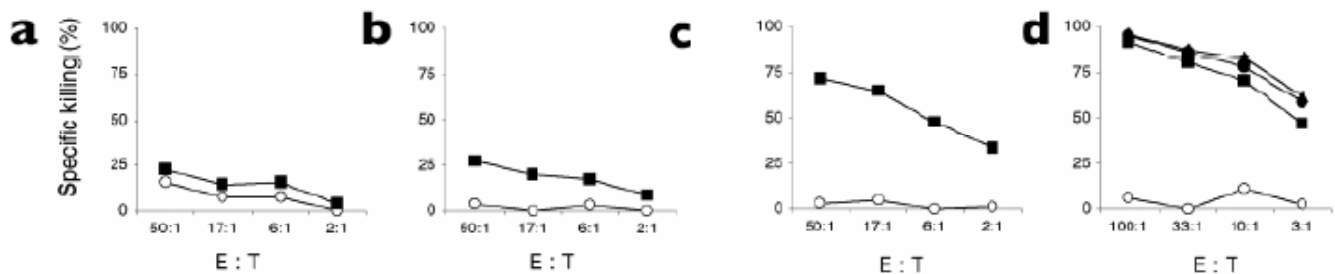


Figure 4

(a), (b) et (c) : ronds ouverts : cellules T non stimulées par les APC, carrés noirs : cellules stimulées. (d) : Cellules T stimulées pendant 0h (ronds ouverts), 2h (ronds noirs), 8h (triangles noirs) ou plus de 8h (carrés noirs) avec les APC, puis transférées dans des puits de culture sans APC. Après 72h de culture, les cellules ont été collectées et la cytotoxicité mesurée sur les cellules cibles EL-4 OVA. (E:T rapport cellules effectrices/cellules cibles).

Question 6. Schématisez l'expérience réalisée

Question 7. Quelles informations complémentaires ces résultats apportent-ils ?

Exercice III : Un problème de casting...

Vous êtes Chargé de Recherche, vous disposez de trois types de souris :

- i) Des souris de phénotype sauvage
- ii) Des souris transgéniques dont le TCR des lymphocytes T CD8⁺ est spécifique d'un peptide de la glycoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), le GP³³⁻⁴¹
- iii) Des souris de phénotype sauvage qui ont reçu un transfert adoptif de cellules spléniques provenant des souris transgéniques décrites ci-dessus

Malheureusement (suite à une étourderie !) les étiquettes sur les cages ont été mélangées....

Proposez une ou (des) expériences qui vous permettrai(en)t de retrouver le phénotype de vos souris.