

Chimiokines et migrations cellulaires

I. Mise en évidence de la collaboration CD4 CD8

(D'après Bennett, S. *et al.* (1997) *J.Exp.Med* 186,1:65-70)

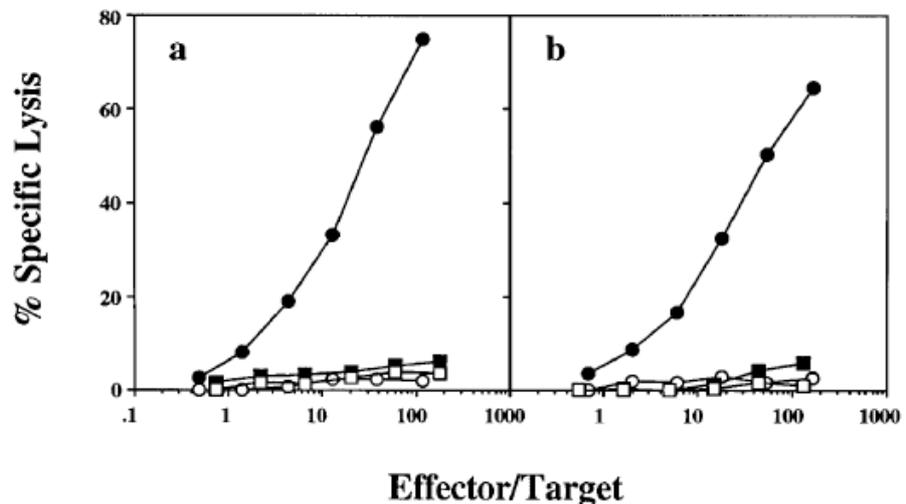
Plusieurs études ont mis en évidence des défaillances de la réponse T CD8+ en l'absence de cellules T CD4+, par exemple suite à une déplétion grâce à un anticorps. Dans ce cas, on observe que la réponse T CD8+ mémoire est quasiment inexistante, alors que l'efficacité de la réponse effectrice est généralement maintenue. De plus, il a été montré qu'en présence de forts signaux inflammatoires, l'absence de cellules T CD4+ pouvait être en partie compensée. Afin de comprendre les mécanismes et les cellules impliqués dans cette collaboration, Bennett et coll. ont étudié la réponse T CD8+ suite à l'injection de splénocytes chargés avec de l'ovalbumine, qui peut donc être présentée à la fois via le CMH I (peptide OVA 257-264 ou SIINFEKL) et le CMH II (peptide OVA 323-339).

Tout d'abord, les auteurs ont cherché à identifier l'origine des cellules qui présentent l'antigène aux cellules T CD8+. Pour cela, ils disposent de deux lignées de souris (B6 et bm1), qui diffèrent uniquement au niveau du locus H-2K. Après injection de splénocytes chargés avec de l'OVA (d'origine B6 ou bm1) dans des souris dont les cellules hématopoïétiques sont d'origine B6 ou bm1, la capacité cytotoxique des cellules T CD8+ ainsi générées est mesurée dans la **Figure 1**.

Figure 1

Des chimères sont réalisées avec de la moelle B6 (ronds) ou bm1 (carrés) sur un fonds (B6 x bm1) F1, puis injectées avec des splénocytes chargés avec l'OVA d'origine B6 (a) ou bm1 (b).

Après 7 jours, les splénocytes des souris sont récupérés, et leur capacité à lyser des cellules EL4 (H-2K^b) chargées (symboles fermés) ou non (symboles ouverts) avec le peptide OVA 257-264 est mesurée.



Question 1. Pour quelle raison les chimères sont-elles réalisées sur un fonds (B6xbm1)F1 ?

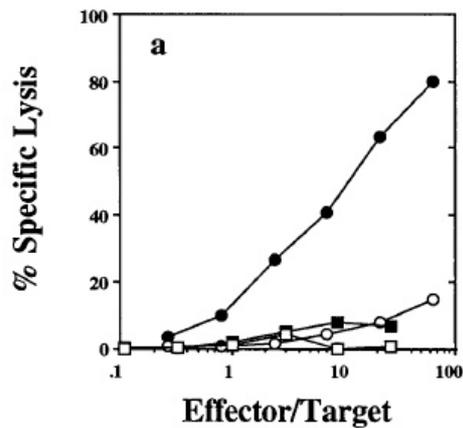
Question 2. Commentez les résultats de cette expérience. Quelles sont les cellules responsables de l'activation des cellules T CD8+, et par quel mécanisme?

Afin de déterminer le rôle des cellules CD4+, des expériences similaires sont réalisées en éliminant les cellules CD4+ à l'aide d'un anticorps spécifique avant l'injection des splénocytes chargés avec OVA. Les résultats sont présentés dans la **Figure 2**.

Figure 2

Des souris B6 ont été traitées avec un anti-CD4 (carré) ou un isotype contrôle (rond) avant l'injection de splénocytes B6 chargés avec de l'OVA.

Après 7 jours, les splénocytes des souris sont récupérés, et leur capacité à lyser des cellules EL4 (H-2K^b) chargées (symboles fermés) ou non (symboles ouverts) avec le peptide OVA 257-264 est mesurée.



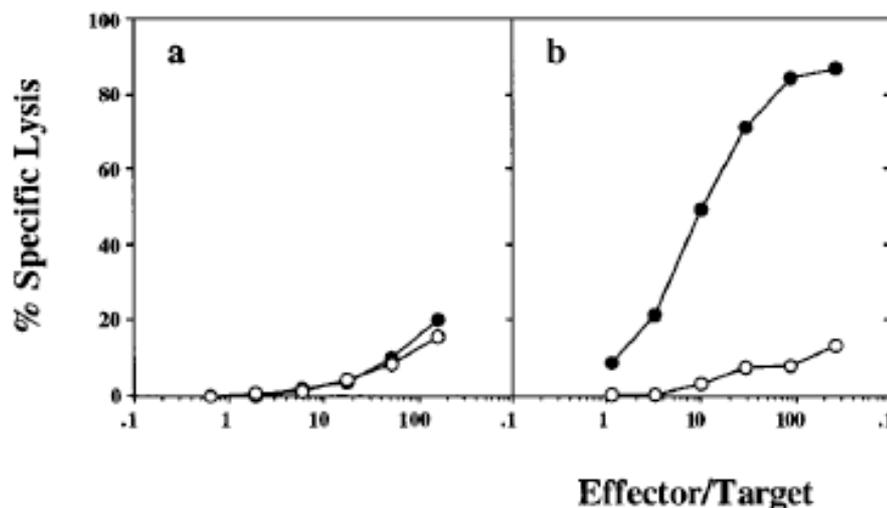
Question 3. *Que peut-on conclure de cette expérience sur le rôle des cellules CD4+ ?*

Question 4. *Quelle(s) expérience(s) supplémentaire(s) faudrait-il effectuer pour confirmer qu'il y a bien une collaboration CD4-CD8 au cours de l'activation ?*

Pour comprendre comment se déroule la collaboration entre les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺, des chimères sont réalisées sur un fonds (B6xbm1)F1 en utilisant un mélange de moelle provenant de souris bm1 et de moelle provenant de souris H-2A^{-/-}, déficiente en molécules du CHM II. Des chimères reconstituées avec de la moelle (B6xbm1)F1 sont utilisées en tant que contrôle et l'activation des cellules T CD8⁺ est mesurée comme précédemment.

Figure 3

Les chimères reconstituées avec un mélange de moelles osseuses (a) ou avec de la moelle (B6xbm1)F1 (b) ont été injectées avec des splénocytes (B6xbm1)F1 chargés avec de l'OVA. L'activation des cellules T CD8⁺ est mesurée comme dans la Figure 1 et 2.



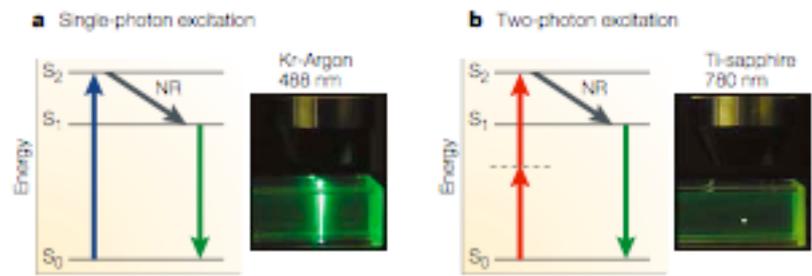
Question 5. *Quelle information supplémentaire cette expérience apporte-t-elle ?*

Question 6. *Proposez au moins deux modèles de collaboration entre les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Lequel vous paraît le plus probable au vu de la fréquence des précurseurs T CD4⁺ et CD8⁺ ?*

II. Migrations cellulaires et aide CD4

(D'après Castellino F. *et al.* (2006) *Nature*. 404:690-5 et Beueneu H. *et al.* (2006) *J.I.* 177(3):1405-10)

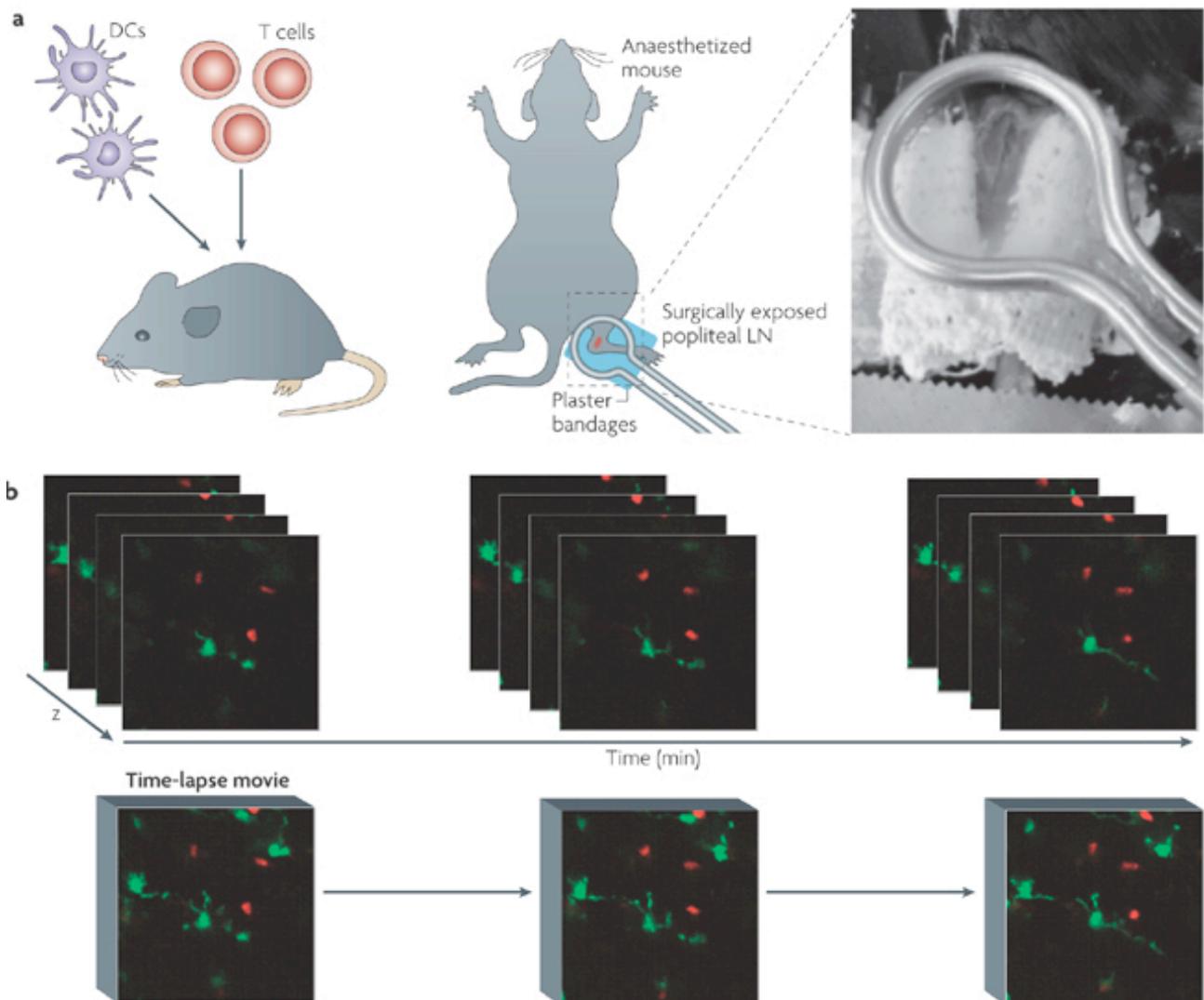
La microscopie bi-photonique repose sur le même principe que l'imagerie onfocale, sauf que l'excitation du fluorochrome est réalisée par deux photons de basse énergie (infrarouge) au lieu d'un photon de haute énergie (ultraviolet/bleu).



De Cahalan *et al.* (2002) *Nature Reviews Immunology*

Étant donné que la probabilité d'absorber deux photons « en même temps » est très faible en dehors du plan focal, cette technique permet de limiter la toxicité à la zone du tissu que l'on est en train d'imager. De plus, la lumière infrarouge pénètre mieux dans les tissus, ce qui permet de visualiser des organes intacts sur une profondeur de 100-200 μ m.

On peut ainsi observer par imagerie l'activation des cellules T au sein d'un ganglion intact. Les données sont obtenues sous forme de films en 3D pour chacun des canaux de fluorescence (typiquement 2 à 4).



De Bousso P. (2008) *Nature Reviews Immunology*

En utilisant cette technique, Castellino et coll. ont étudié les interactions des cellules dendritiques avec les cellules T CD8⁺ en présence de différentes populations de cellules T CD4⁺. Dans leurs expériences, ils ont marqué avec des fluorochromes distincts des cellules dendritiques chargées ou non chargées avec le peptide OVA 323-339 puis les ont injectés dans des souris C57BL/6. Par ailleurs, ces souris ont reçu un transfert de cellules CD4⁺ polyclonales ou spécifiques du peptide 323-339 (OT-II) et de cellules CD8⁺ polyclonales ou spécifiques du peptide OVA 257-264 (OT-I). Les interactions entre ces différentes populations de cellules ont été visualisées par microscopie bi-photonique au sein du ganglion drainant la zone d'injection des cellules dendritiques. A partir des films réalisés, la capacité relative des cellules dendritiques à établir des interactions avec les cellules T CD8⁺ a été mesurée (indiqué par le "hit rate ratio"). L'ensemble de ces résultats est présenté dans les **Figures 4 et 5**.

Figure 4 : Visualisation des interactions cellules dendritiques – cellules T CD8⁺ au sein de ganglions

Des cellules dendritiques chargées (bleu) ou non (jaune) avec le peptide OVA 323-339 ont été injectées dans des souris ayant reçu des cellules T CD4⁺ OT-II (rouge) et CD8⁺ polyclonales (vert, trajectoires en vert dans les panels inférieurs).

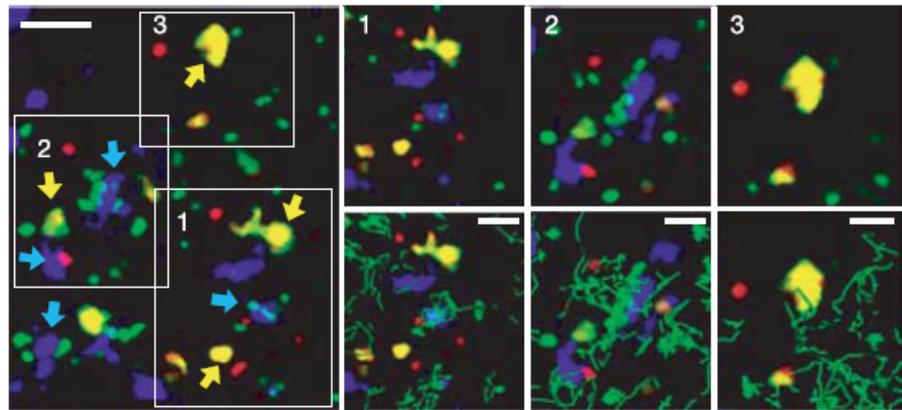
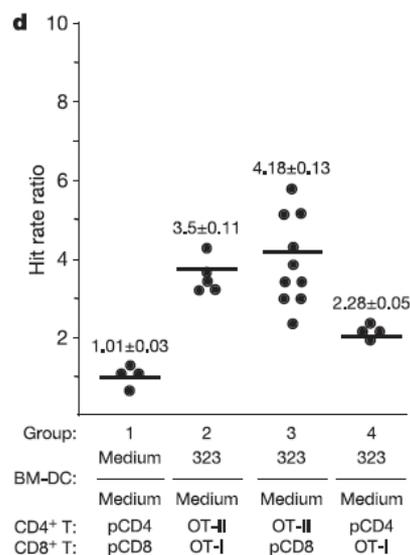


Figure 5 : Comparaison de la capacité d'interaction des cellules dendritiques avec les cellules T CD8⁺

Un ratio a été établi entre le nombre d'interactions établies entre les cellules dendritiques indiquées (Medium = non chargé, 323 = chargées avec OVA 323-339) et les cellules T CD8⁺ transférées. Les différentes populations T CD4⁺ et T CD8⁺ transférées sont indiquées pour chaque condition (p = polyclonal).

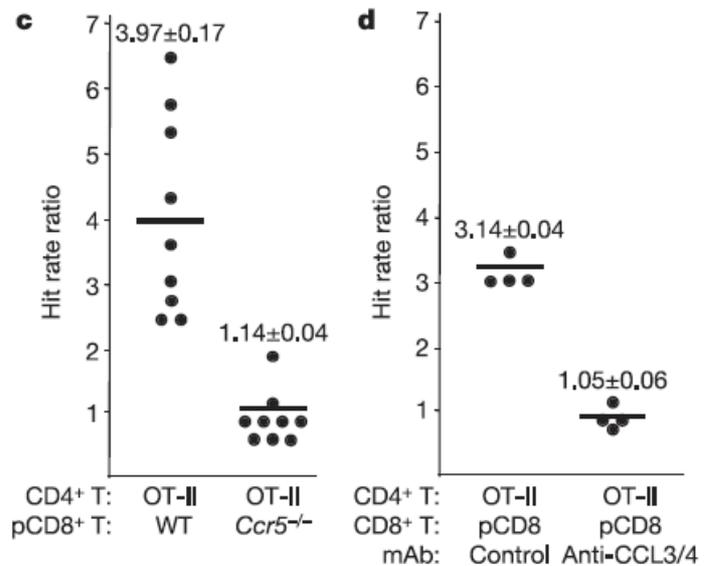


Question 1. *Interprétez l'ensemble des résultats obtenus. Quelles informations supplémentaires apportent les expériences de microscopie bi-photonique?*

Suite à cette expérience, les auteurs ont cherché à savoir quels étaient les facteurs responsables de l'augmentation des contacts entre les cellules dendritiques et les cellules T CD8⁺. Puisque les chimiokines jouent un rôle majeur dans les migrations cellulaires, ils ont reproduit l'expérience précédente après l'injection d'anticorps bloquant spécifique des chimiokines CCL3 et CCL4, ou en utilisant des cellules T CD8⁺ déficientes pour le récepteur CCR5 (récepteur aux chimiokines CCL3/4/5). Les "hit rate" ratios correspondant à ces expériences sont présentés en **Figure 6**.

Figure 6 : Influence des chimiokines CCL3 et CCL4 sur les interactions CD-T CD8+

- (a) Les interactions entre des cellules dendritiques chargées avec le peptide OVA 323-339 et des cellules T CD8+ polyclonales sauvages ou déficientes pour le récepteur CCR5 ont été mesurées au sein des ganglions lymphatiques drainants.
- (b) Les interactions entre des cellules T CD8+ polyclonales sauvages et des cellules dendritiques chargées avec le peptide OVA 323-339 ont été mesurées au sein de ganglions drainants après l'injection d'un anticorps dirigé contre les chimiokines CCL3 et CCL4 ou d'isotype contrôle.



Question 2. D'après ces expériences, quel est le rôle des chimiokines dans la collaboration entre les cellules T CD4+ et CD8+ ? Comment ces données expliquent-elles les résultats obtenus dans la Figure 3 ?

Question 3. Quelles sont les sources possibles de ces chimiokines? Comment pourriez-vous les identifier ?

Dans une autre étude, Beuneu et coll. ont cherché à déterminer quels signaux étaient impliqués dans la communication entre les cellules dendritiques et les cellules T CD4+. Pour cela, des cellules dendritiques sauvages ou déficientes pour la molécule CD40 ont été chargées avec le peptide OVA 257-264 seul ou avec un mélange du peptide OVA 257-264 et du peptide N15S. Des cellules T CD4+ Marilyn (spécifiques du peptide N15S) et T CD8+ OT-I ont ensuite été injectées dans ces souris, et le nombre de cellules T CD8+ en interaction avec chaque type de cellule dendritique a été mesuré comme indiqué dans la Figure 7.

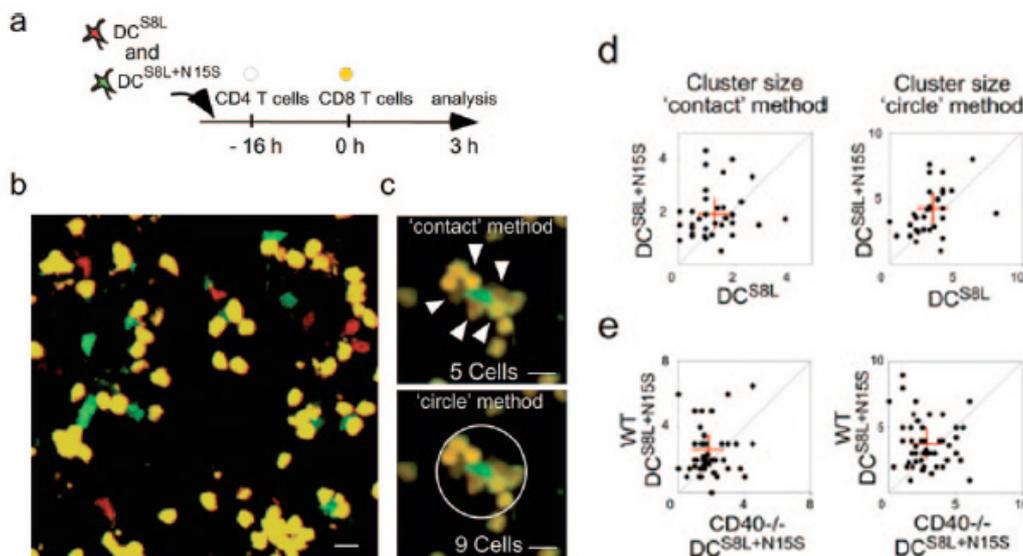


Figure 7 : Rôle de la molécule CD40 dans les contacts entre cellules dendritiques et T CD8+

- (a) Design expérimental
- (b) Visualisation des cellules T CD8+ (jaunes) au sein des ganglions drainant la zone d'injection des cellules dendritiques (vert et rouge).
- (c) Méthodes de comptage des cellules T CD8+ en interaction avec une cellule dendritique donnée.
- (d) Comparaison du nombre de cellules T CD8+ interagissant avec des cellules dendritiques chargées avec le peptide OVA 257-264 seul ou avec les peptides OVA 257-264 et N15S.
- (e) Comparaison du nombre de cellules T CD8+ interagissant avec des cellules dendritiques chargées avec les peptides OVA 257-264 et N15S et exprimant ou non la molécule CD40.

Question 4. Comment expliquez-vous les différences entre les interactions stables observées ici et les interactions transitoires observées précédemment ?

Question 5. Quelles sont les informations supplémentaires apportées par cette expérience ?

Question 6. Résumez sur un schéma l'ensemble des acteurs cellulaires et moléculaires de la collaboration entre les cellules T CD4+ et T CD8+

III.

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

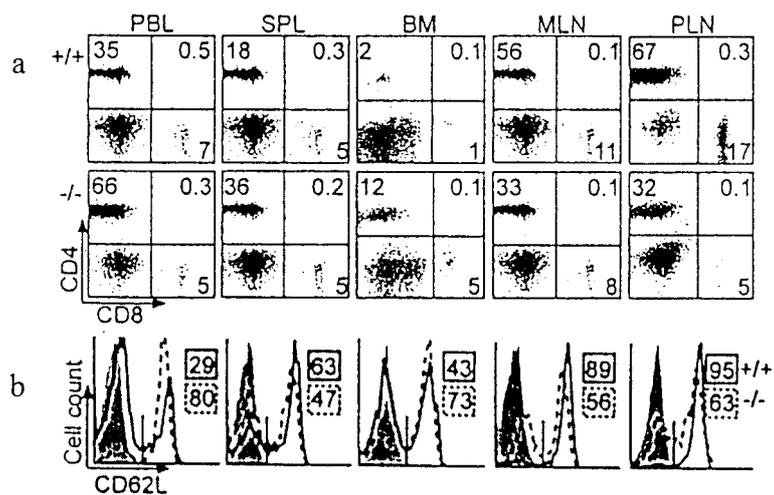
Dans le but d'étudier la régulation de la circulation des leucocytes dans l'organisme, des souris déficientes pour le récepteur CCR7 de chimiokine ont été générées par recombinaison homologue. Dans tous les cas, les animaux mutés sont viables et fertiles. On se propose d'étudier les conséquences de la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

Chez les souris CCR7^{-/-}, la dissection des principaux organes lymphoïdes secondaires montre des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer de petites tailles alors que les rates sont généralement très volumineuses. Pour étudier la distribution tissulaire des lymphocytes T au sein de ces organes, des expériences de double marquage sont réalisées à l'aide d'anticorps (AC) anti-CD4/anti-CD8 ou anti-CD3/anti-CD62L couplés à des fluorochromes. Les lymphocytes sont isolés à partir du sang ou des organes lymphoïdes de souris de type sauvage (+/+) ou déficientes en CCR7 (-/-). La Figure 8 montre les résultats des analyses de cytométrie en flux (FACS).

Figure 8

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

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

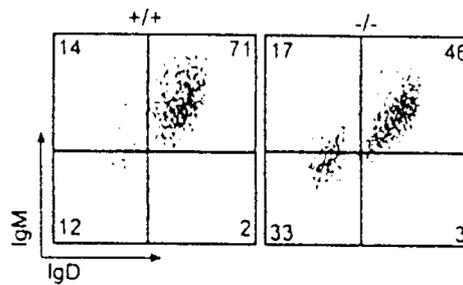


Question 1. Commentez l'ensemble des résultats.

Afin de compléter cette analyse, les cellules extraites des ganglions lymphatiques de souris de type sauvage (+/+) ou déficientes en CCR7 (-/-) sont marquées avec des AC couplés à des fluorochromes et spécifiques des lymphocytes B. L'analyse par FACS du double marquage anti-IgD/anti-IgM de la population cellulaire B220⁺ est montrée sur la Figure 9.

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

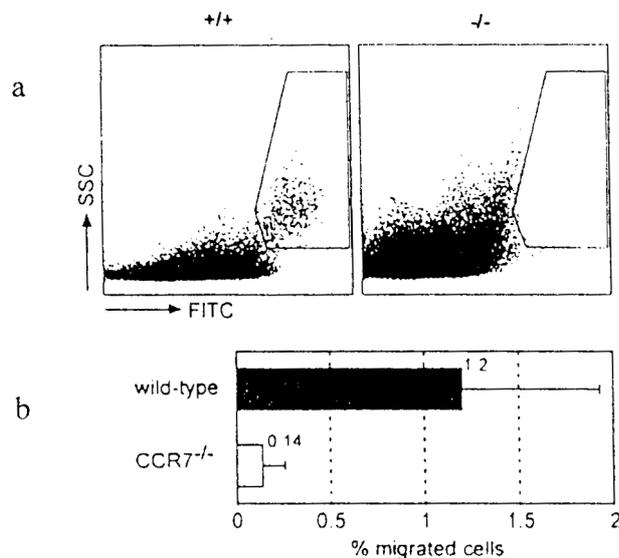
Figure 9



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

De l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est appliquée à forte concentration sur des portions de l'épiderme du thorax et de l'abdomen de souris de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7^{-/-}. Après 24 heures de traitement, les ganglions lymphatiques de drainage sont prélevés (ganglions lymphatiques inguinaux, axillaires et brachiaux) et les cellules extraites des organes sont analysées par FACS. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 10 ; les pourcentages moyens des cellules contenues dans le contour d'intérêt de la Figure 10a sont établis avec précision sur la Figure 10b.

Figure 10



Question 3. *D'après les propriétés morphologiques des cellules contenues dans le contour d'intérêt de la Figure 10a quel est le type cellulaire concerné par l'analyse ? Proposez une expérience permettant de vérifier votre interprétation. Que se passe-t-il chez les souris mutantes CCR7^{-/-} ?*

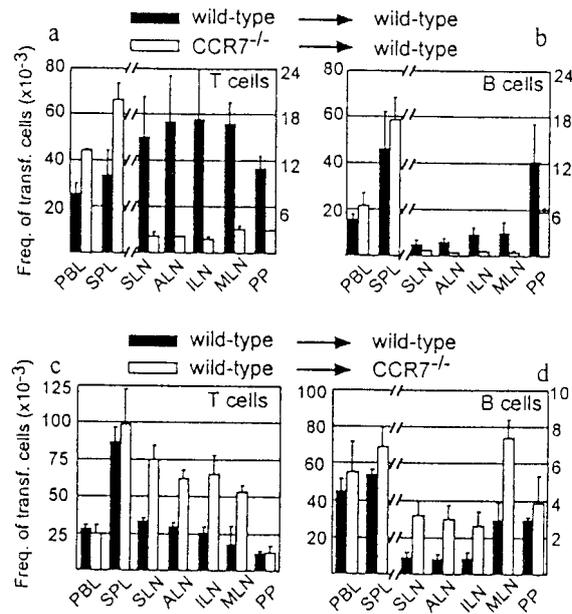
Les lymphocytes T (Thy-1⁺) et B naïfs (IgD⁺) fluorescents, issus de souris de type sauvage ou mutantes CCR7^{-/-} sont injectés à des animaux de type sauvage (Figure a et b) ; par ailleurs, les lymphocytes T (Thy-1⁺) et B naïfs (IgD⁺) fluorescents, issus de souris de type sauvage sont injectés à des animaux de type sauvage ou mutants CCR7^{-/-} (Figure c 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 .

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

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

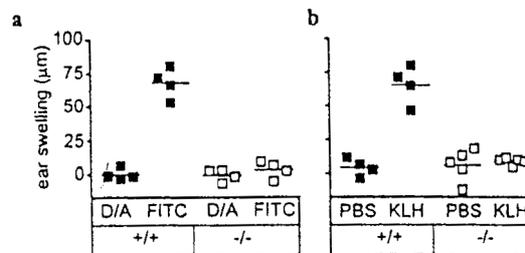
Figure 11

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 .

Figure 12



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 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 13 :

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

