

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

*UE BMC424
Immunophysiopathologie (IPP2005)
21 mars au 2 avril 2005*

Travaux Dirigés

Travaux Dirigés

IPP2005 TD-IPP 1 : Autoimmunité 1

IPP2005 TD-IPP 2 : Autoimmunité 2

IPP2005 TD-IPP 3 : Immunité anti-infectieuse sensibilité aux infections 1

IPP2005 TD-IPP 4 : Immunité anti-infectieuse sensibilité aux infections 2

IPP2005 TD-IPP 5 : Infection par le VIH

IPP2005 TD-IPP 6 : Immunologie des tumeurs

IPP2005 TD-IPP 7 : Immunologie des tumeurs Thérapeutiques immunologiques

IPP2005 TD-IPP 8 : Vaccination Thérapeutiques immunologiques

IPP2005 TD-IPP 1 :
Autoimmunité 1

Autoimmunité (1)

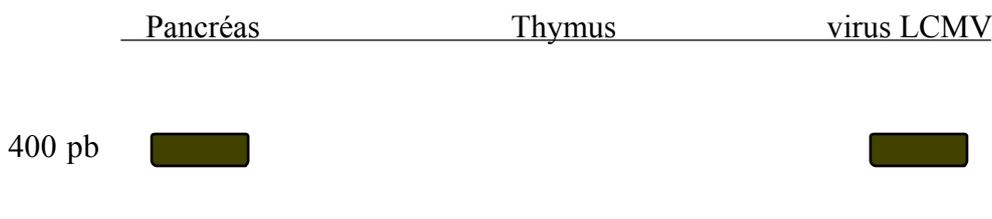
I. Un modèle de diabète auto-immun : la souris double transgénique TCR/GP LCMV

(d'après Ohashi, P.S. *et al.* (1991) *Cell*, 85:305 ; Burkhard, L. *et al.* (1998) *J. Exp. Med.*, 188:1493)

Afin de mieux comprendre les mécanismes de tolérance aux peptides extra thymiques, une souris transgénique 'GP', exprimant une glycoprotéine du virus LCMV¹ (GP LCMV), au niveau des cellules des îlots β du pancréas, a été générée. La spécificité d'expression du transgène est assurée par la présence du promoteur de l'insuline de rat, promoteur tissu spécifique. Cette souris a ensuite été croisée avec une souris transgénique pour le récepteur T spécifique pour le peptide 32-42 de GP LCMV présenté dans le contexte H-2 D^b. Les souris TCR-GP double transgéniques, résultat de ce croisement sont parfaitement normales et ne développent pas de diabètes.

Dans un premier temps, les auteurs ont examiné l'expression du transgène GP LCMV chez ces souris en réalisant des PCR radioactives : l'ARN des cellules du thymus et des cellules du pancréas a été prélevé et rétrotranscrit en ADNc. L'ADNc de la GP LCMV a ensuite été amplifié par PCR et détecté par hybridation avec une sonde radioactive spécifique.

Les résultats suivants ont été obtenus :



Question 1. De quoi les auteurs ont-ils voulu s'assurer ? Pourquoi ?

La présence de lymphocytes T CD8 exprimant le TCR anti-GP LCMV dans le thymus, et les organes lymphoïdes secondaires a été mise en évidence par cytométrie de flux : 70 à 90% des lymphocytes T expriment ce TCR.

Afin de vérifier si ces lymphocytes pouvaient être activés *in vivo*, des souris TCR transgéniques et des souris TCR-GP double transgéniques ont été infectées par le virus LCMV. 4 jours après l'infection, la lyse par les splénocytes de ces souris, de macrophages infectés ou non par le LCMV a été évaluée *in vitro* (Figure 4) :

Question 2. Que concluez- vous de cette expérience ?

Question 3. Comment expliquez-vous que les souris TCR-GP ne développent pas de diabète ?

Question 4. Comment ce phénomène a-t-il été nommé ?

¹ : Lymphocytic choriomeningitis virus

Figure 1

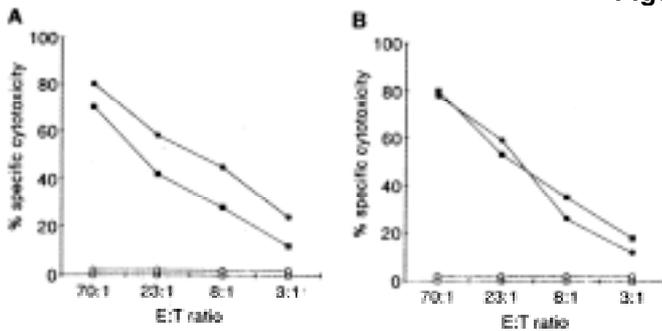


Figure 3. LCMV GP-Specific Cytotoxicity in Transgenic Mice
(A) Effector cells from spleen cells of TCR-GP transgenic animals (circles) were compared with effector cells from TCR transgenic animals (squares), targets infected with the recombinant vaccinia virus expressing the GP antigen (closed symbols), uninfected targets (open symbols).
(B) Effector T cells isolated from spleen cells of a single GP transgenic animal (circles) and C57BL/6 control mice (squares) were used in a cytotoxicity assay, as described in (A). Data shown here are representative of five transgenic mice. Spontaneous ⁵¹Cr release from target cells was below 20%.

À la vue des précédents résultats, les auteurs ont voulu savoir si l'infection par le LCMV favorisait le développement de diabète chez les souris GP et TCR-GP : des souris GP ou TCR-GP ont été infectées soit par le virus LCMV, soit par le virus de la vaccine (contrôle), soit par un variant du LCMV contenant une substitution d'un acide aminé au niveau du peptide 32-42 de la GP. Puis le taux de glucose dans le sang et les urines a été évalué régulièrement (Figure 2)

Figure 2

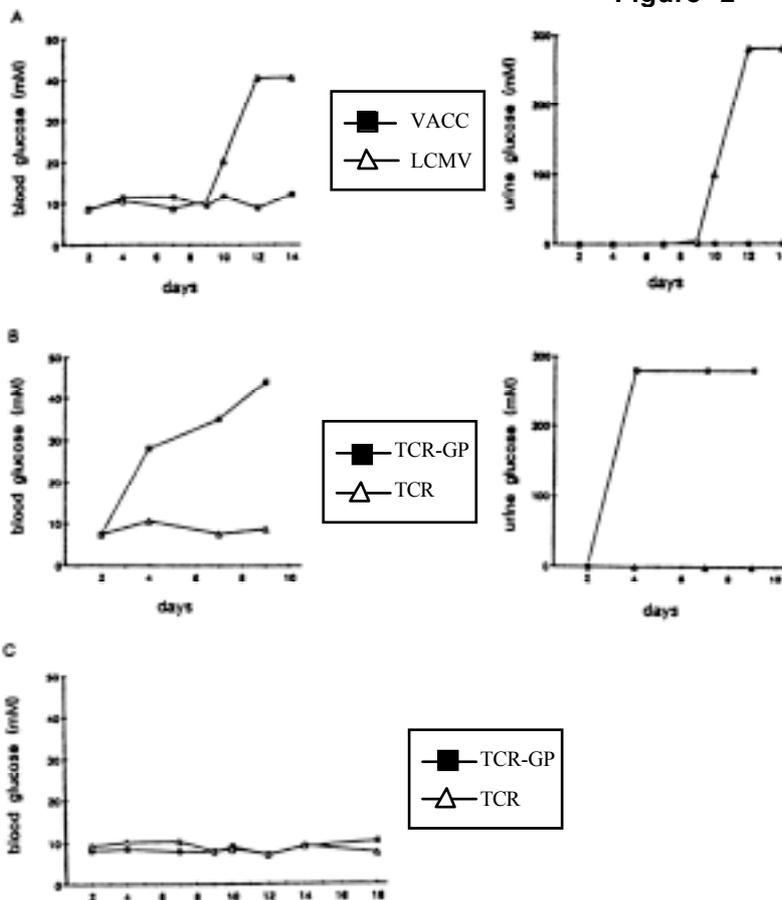


Figure 4. Onset of Diabetes in Treated Transgenic Mice

(A) GP transgenic mice were infected with either LCMV or control vaccinia virus (VACC), and glucose levels in the blood and the urine were monitored regularly. These results represent six transgenic mice. The increase in glucose levels varied from 1–2 days in the animals studied. The glucose level in the blood of normal, LCMV, or vaccinia virus-infected C57BL/6 mice varied from 8–12 mM. The glucose level in the urine from these normal and infected control animals remained negative (data not shown).
(B) TCR-GP double transgenic mice (TCR-GP) and control TCR transgenic mice (TCR) were immunized with LCMV. Glucose levels in the blood and urine were monitored. The figure shown here is representative of four double TCR-GP transgenic mice. The onset of diabetes varied in these experiments by 1 day.
(C) Double TCR-GP transgenic (TCR-GP) and TCR transgenic mice (TCR) were immunized with the 8.7 variant LCMV, which has an altered p32–42 epitope that is no longer recognized by the transgenic TCR. Glucose levels in the blood and urine (data not shown) were monitored and remained normal over a period of more than 3 weeks. These studies were done with two double TCR-GP transgenic animals.

Question 5. Quelles conclusions tirez-vous de ces résultats ? Vous permettent-ils de formuler des hypothèses sur les mécanismes déclenchant de l'auto-immunité dans ce modèle ?

Par la suite, des expériences de transfert adoptif furent réalisées : des cellules dendritiques sont pulsées avec le peptide 32-42 de la GP du LCMV. Ces cellules présentatrices d'antigènes, ainsi traitées, sont injectées en une seule fois ou de façon répétée à des souris simples transgéniques GP-LCMV.

La glycémie est ensuite mesurée régulièrement chez les animaux (Figure 3)

Figure 3

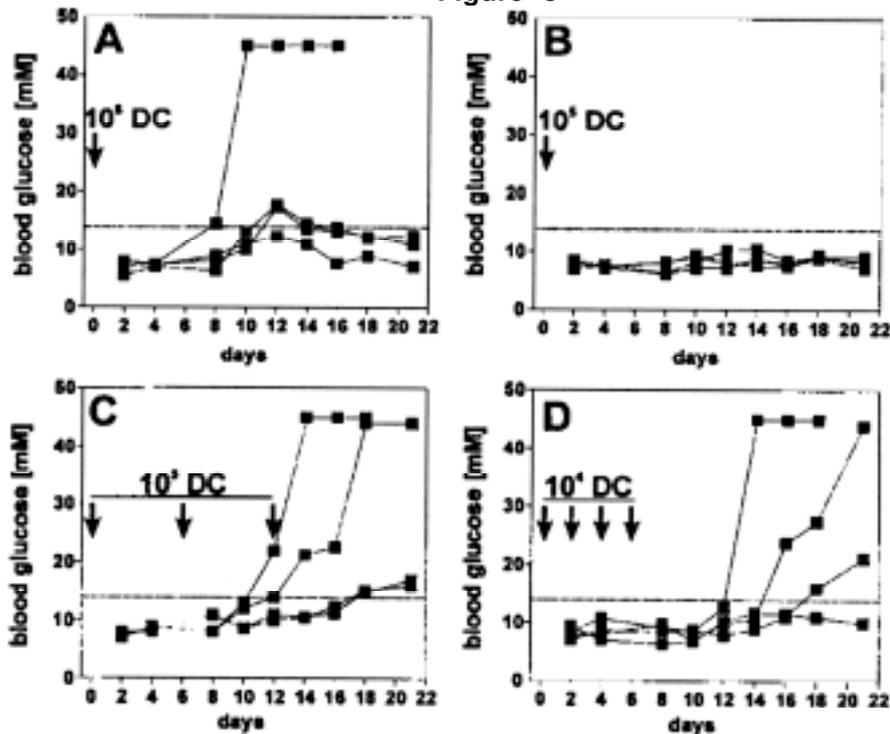


Figure 1. Blood glucose levels in RIP-GP mice after single or repetitive intravenous immunization with H8-DC. Mice were immunized with either a single dose of (A) 10^6 DC ($n = 8$) on day 0 or (B) 10^5 DC ($n = 4$) on day 0, or repetitive doses of (C) 10^5 DC ($n = 8$) on days 0, 6, and 12 or (D) 10^4 DC ($n = 8$) on days 0, 2, 4, and 6. Arrows, Day of DC injection. Values of four representative mice per group are shown.

Question 6. Que pensez-vous de ces résultats ? Peut-on préciser les hypothèses envisagées précédemment ?

II. Évolution de la réponse T chez la souris $NOD_{[AS1]}$

N.B. : Cet exercice ne sera probablement pas traité en séance de TD mais sert de base à la compréhension de l'exercice suivant ; votre enseignant se tiendra néanmoins à votre disposition pour répondre à vos questions éventuelles.

(d'après Amrani, A. *et al.* (2000) *Nature*, 406:739)

Les souris NOD (Non Obese Diabetic) développent une insulite (Inflammation des îlots pancréatiques) à l'âge de trois semaines, mais le diabète n'apparaît chez elles que dix semaines après au minimum. Il a été montré que des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) sont responsables de la destruction des cellules β du pancréas, mais les mécanismes qui contrôlent la progression de l'insulite vers le diabète restent inconnus. Ces CTL sont cytotoxiques pour les cellules β dans le contexte de la molécule de classe I du CMH H-2K^d. L'analyse de banques peptidiques combinatoires a permis d'identifier deux peptides ligands de ces CTL : NRP (KYNKANWFL) et NRP-A7 (KYNKANAFLL), qui possède des propriétés agonistes supérieures à NRP. La plupart des CTL dérivés des îlots pancréatiques de souris NOD diabétiques reconnaissent ces peptides et les souris NOD transgéniques pour un TcR reconnaissant NRP/NRP-A7 associé à H-2K^d deviennent diabétiques très rapidement après l'apparition de l'insulite.

Question 1. Que suggèrent ces informations ?

Les îlots provenant de souris NOD non diabétiques de 5, 9, 15, et 20 semaines sont cultivés en présence d'IL-2 pendant 7 jours puis marqués avec des tétramères de H-2K^d associés aux peptides NRP, NRP-A7, TUM (KYQAVTTTL, contrôle négatif), et INS (LYLVCGERG, dérivé de l'insuline, reconnu par les cellules T d'îlots de jeunes souris NOD). Le résultat de cette expérience vous est montré en **Figure 4**.

Question 2. Que peut-on conclure de cette expérience ?

Les constantes de dissociation (K_d) et les demi-vies de fixation ($t_{1/2}$) entre les tétramères NRP-A7 et les CTL dérivées des îlots, ont été mesurées chez des souris de différents âges. Le résultat vous est montré en **Figure 5**.

Figure 4

a : pourcentage de cellules CD8⁺ tétramère⁺.
 b : nombre absolu de cellules CD8⁺ tétramère⁺.

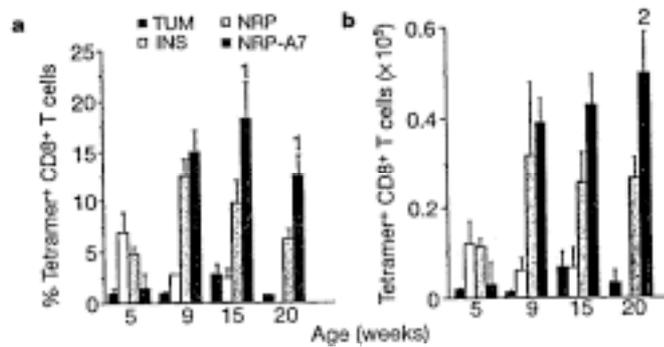
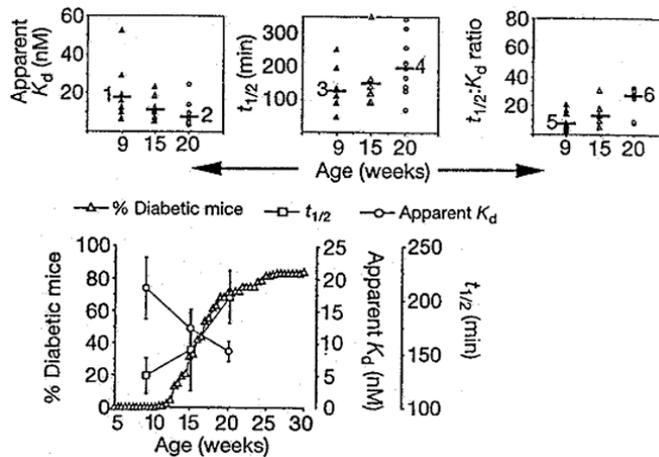


Figure 5



Question 3. Commentez ce résultat, sachant que les niveaux d'expression de TcR et de CD8 ne varient pas.

Des souris NOD reçoivent des injections intra-péritonéales répétées de 100 µg peptide TUM, NRP ou NRP-A7. Les résultats de l'analyse de ces souris sont montrés en **Figure 6**.

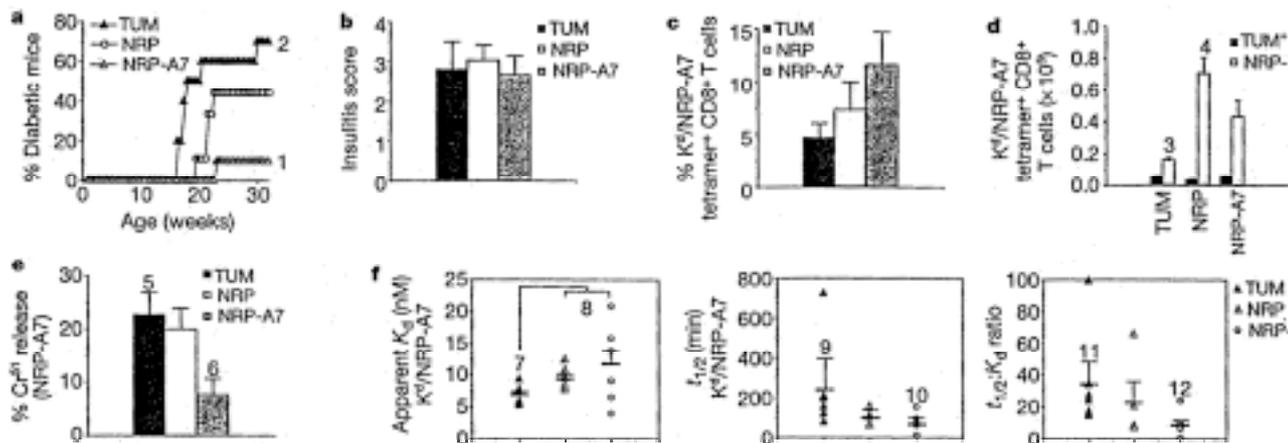


Figure 6

a : Incidence de diabète au sein de groupes de 10 souris femelles traitées avec les peptides TUM, NRP ou NRP-A7. b : Evaluation de l'insulite dans les souris non diabétiques de chaque groupe. c,d : pourcentages et nombres absolus de cellules CD8⁺ tétramères NRP-A7⁺. e : Potentiel cytotoxique des LT CD8 vis-à-vis de cellules cibles chargées en peptide NRP-A7 des souris traitées avec les différents peptides. f : Constantes cinétiques de dissociation (K_d) et demi-vie de fixation (t_{1/2}) entre les tétramères NRP-A7 et les LT CD8 des souris traitées avec les différents peptides.

Question 4. Commentez l'ensemble de ces résultats. Que peut-on en conclure ?

III. L'origine du diabète des souris NOD...

(d'après Thomas-Vaslin, V. *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4598 ; Salaün, J. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:874)

On a longtemps pensé que le diabète de la souris NOD n'était dû qu'à l'expression, au niveau des îlots β du pancréas, de complexes du CMH particuliers (I-A^{NOD}) qui favoriseraient localement l'activation des lymphocytes T CD4 et T CD8. Néanmoins, voulant en savoir plus sur le rôle de la sélection du répertoire primaire des lymphocytes T dans la pathogenèse du diabète auto-immun, une équipe française a réalisé l'expérience suivante :

des fragments d'épithélium thymique d'embryon de souris ont été greffés chez des souris nouveau-nés C57Bl/6 athymiques (nu/nu) ne développant habituellement pas de maladies auto-immunes.

Les fragments d'épithélium thymique provenaient :

- Soit d'embryons NOD de 10 jours (NOD E10)². Ces ébauches d'épithélium thymique n'étant pas encore colonisées par des cellules hématopoïétiques.
- Soit d'embryons C57Bl/6 de 10 jours (B6 E10).
- Soit d'embryons BalB/C de 10 jours (BALB E10).
- Soit d'embryons NOD de 17 jours (NOD E17). L'épithélium étant alors colonisé par des cellules hématopoïétiques.

Précédemment l'équipe avait déjà montré que les greffes d'épithélium thymique syngéniques ont pour effet de rétablir un compartiment T pratiquement normal³ chez les souris C57Bl/6^{nu/nu}, la présence de lésions inflammatoires des îlots du pancréas (insulite et péri-insulite) a été évaluée et mesurée chez les souris greffées devenues adultes (10 à 20 mois). Les résultats sont présentés sur la **Figure 7** :

² : E10 signifie "embryonic day 10"

³ : le nombre de cellules T en périphérie est juste un peu inférieur à celui d'une souris C57Bl/6 normale, mais le système immunitaire reste parfaitement fonctionnel (activation, vaccination, rejet de greffes de peau d'haplotype H-2 différent, etc...)

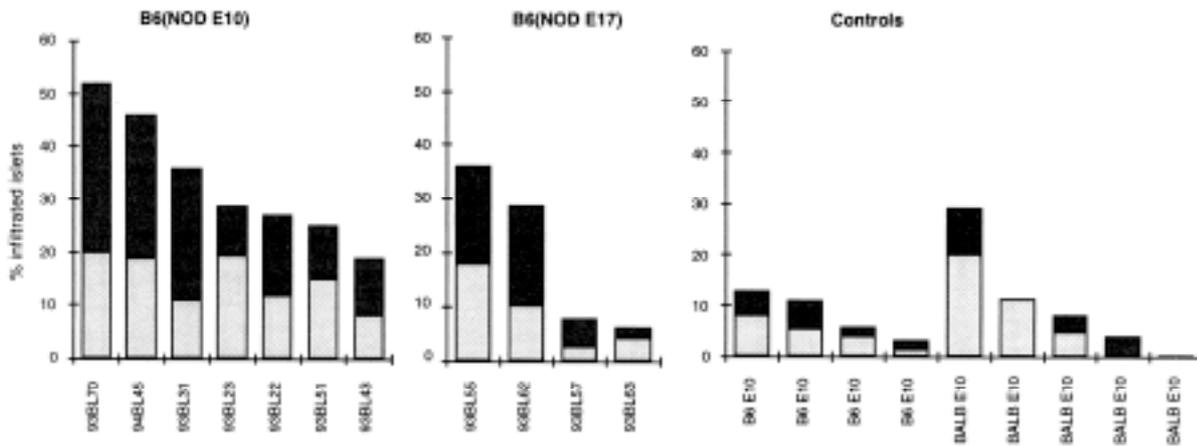


Figure 7

Infiltration in the pancreas of B6 nude mice restored by the graft of NOD E10, NOD E17, or B6 E10 and BALB/c E10 thymic rudiments as controls. The percentage of periinsulinitis (■) and insulinitis (▨) is indicated for individual chimeras, as determined by observation of classical paraffin histological sections.

Question 1. Pourquoi avoir réalisé des greffes d'ébauches thymiques d'embryon NOD de 10 jours ou de 17 jours ?

Question 2. Quelles conclusions tirez-vous de cette expérience ? Cette expérience vous permet-elle d'envisager une (des) hypothèse(s) quant au déclenchement des processus auto-immuns chez la souris NOD ?

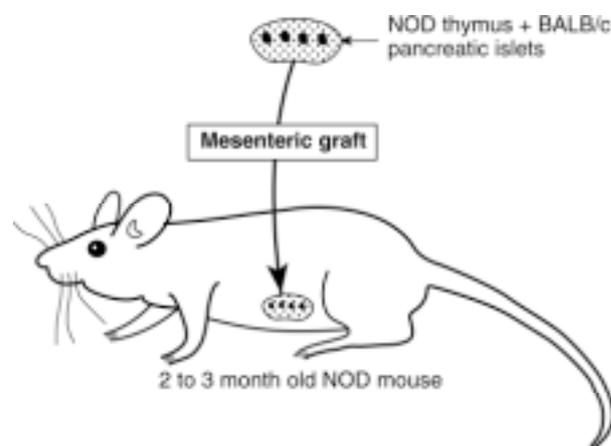
L'équipe a également montré que ces souris greffées sont capables de tolérer des greffes de peau d'haplotype du donneur bien qu'in vitro les splénocytes de ces animaux soient capables de proliférer face à des CPA d'haplotype du donneur. Dans d'autres expériences, des transplantations intrathymiques de cellules d'îlots du pancréas ont été réalisées sur des souris NOD. Chez ces souris, dont le thymus contient des cellules d'îlots, on observe que la fréquence des diabètes est très diminuée par rapport aux animaux non manipulés.

Question 3. Comment interprétez-vous ce dernier résultat ?

Très récemment, l'équipe a réalisé, sur des souris NOD âgées de 2 à 3 mois, des greffes de thymus eux-mêmes greffés d'îlots du pancréas (Figure 8) :

Figure 8

Thirty to 50 BALB/c pancreatic islets were inoculated with a micropipette into thymuses from newborn NOD mice. These thymuses were thereafter grafted in the mesentery of female NOD mice.



Question 4. Quelle est la différence principale entre cette expérience et la précédente ?

Question 5. Que peut-on attendre de cette expérience ?

Les résultats sont présentés en **Figure 9**. Le pourcentage de souris chez lesquelles un diabète se déclenche a été évalué mois par mois.

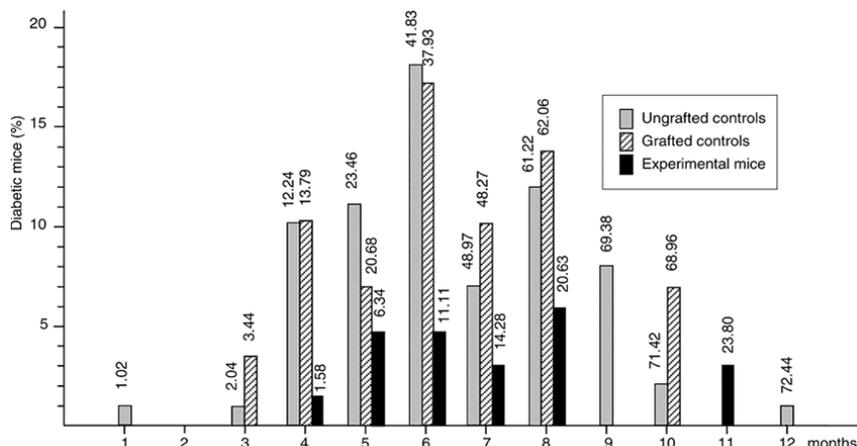


Figure 9

Effect of the transplantation of a newborn NOD thymus with BALB/c pancreatic islets on diabetes incidence in female NOD mice. \square , ungrafted control - unmanipulated NOD mice (n = 98); incidence of the disease at 12 months = 72.44%. \square , grafted controls - NOD mice grafted with newborn thymuses only (n = 29); incidence of the disease at 12 months = 68.96%. \blacksquare , experimental mice - NOD mice grafted with newborn NOD mice thymuses containing BALB/c pancreatic islets (n = 63); incidence of the disease at 12 months = 23.80%.

Question 6. Pouvez-vous donner la conclusion de cette expérience ?

IV. La thyroïdite auto-immune et sa régulation

(d'après Seddon, B. *et al.* (1999) *J. Exp. Med.* 189)

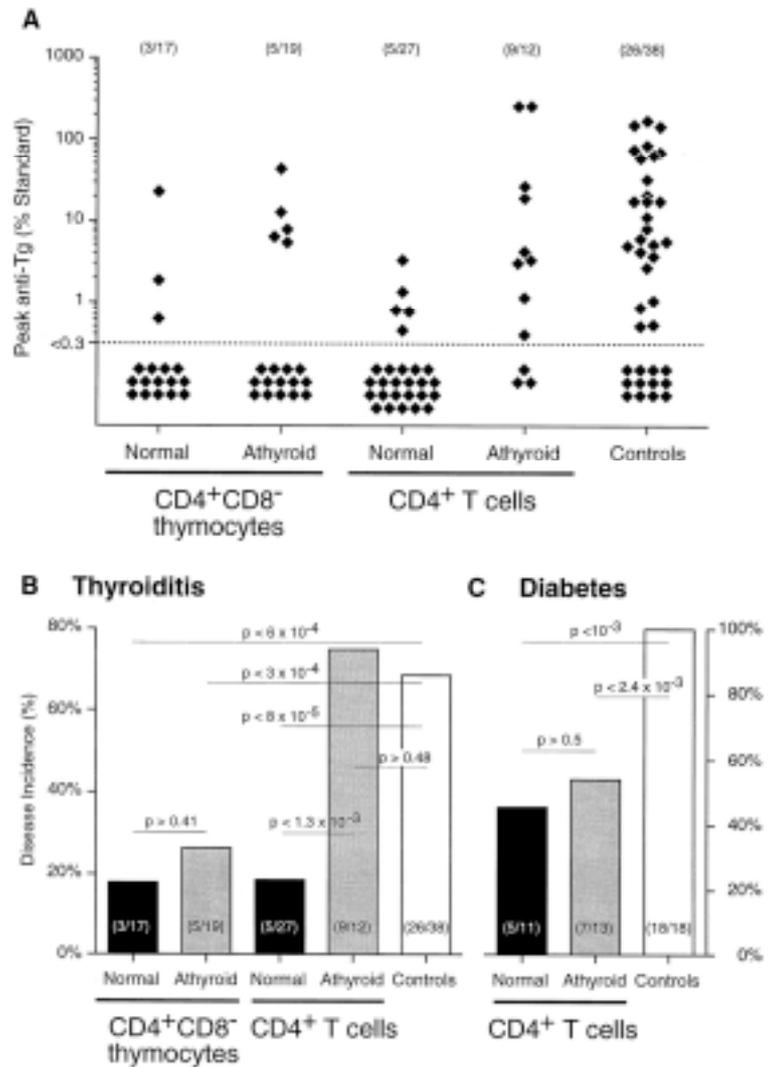
Les rats de souche PVG et PVG.RT1, qui diffèrent uniquement par leur haplotype du CMH, développent après traitement une thyroïdite auto-immune ou un diabète auto-immun, respectivement. Le traitement induisant ces maladies auto-immunes consiste en une thymectomie à l'âge de trois semaines suivie par une série de quatre irradiations à 1000 rads.

Des transferts adoptifs de lymphocytes provenant de rats autologues normaux ou athyroïdes sont réalisés (les rats athyroïdes sont obtenus par injection d'iode radioactive dans la thyroïde d'embryon en gestation) : 5.10^6 thymocytes $CD4^+CD8^-$ ou 7.10^4 lymphocytes T $CD4^+$ sont transférés aux rats PVG et PVG.RT1 peu de temps après la fin du traitement induisant les pathologies auto-immunes.

L'apparition de thyroïdites chez les rats PVG et l'apparition de diabète chez les rats PVG.RT1 est alors évaluée (**Figure 10**).

Figure 10

- A. Pourcentage d'Ac anti thyroglobuline dans le sérum sanguin
- B. Incidence de la maladie – évaluation histologique



Question 1. Quel est l'effet des différents transferts adoptifs sur le développement de la thyroïdite et du diabète ?

Question 2. Comment expliquez-vous ces résultats ?

IPP2005 TD-IPP 2 :
Autoimmunité 2

Autoimmunité (2)

I.

(d'après Rifkin, I. R. *et al.* (2000) *J.Immunol.* 165:1626 ; Leadbetter, E. A. *et al.* (2002) *Nature* 416:603 ; Vinuesa, C. G. and Goodnow, C. C. (2002) *Nature* 416:595)

Question 1. *Rappelez à l'aide d'un tableau comparatif les caractéristiques des trois mécanismes principaux de sélection négative des lymphocytes B autoréactifs au cours de leur différenciation dans la moelle osseuse.*

Des lymphocytes B autoréactifs quiescents peuvent subsister dans la circulation. Dans certaines conditions, quand l'homéostasie est perturbée, ces lymphocytes sont activés et produisent des auto-anticorps, ce qui peut entraîner des conséquences pathologiques. Ces auto-anticorps sont très fréquemment dirigés contre la chromatine ou les nucléosomes. On peut trouver par ailleurs des lymphocytes B exprimant un BCR spécifique pour des IgG2a du soi qui produisent des anticorps anti-IgG2a appelés facteur rhumatoïde (RF).

Il existe des modèles animaux de maladies auto-immunes systémiques qui permettent d'étudier dans quelles conditions les lymphocytes B autoréactifs sont activés. Par exemple, les souris MRL qui possèdent la mutation *lpr* (« *lymphoproliférative* ») n'expriment pas la protéine Fas et celles qui possèdent la mutation *gld* (« *generalized lymphoproliférative disease* ») n'expriment pas le ligand de Fas. Contrairement aux souris MRL de type sauvage ne possédant ni la mutation *lpr* ni la mutation *gld*, les souris MRL-*lpr* ou MRL-*gld* développent spontanément des maladies auto-immunes comme, respectivement, le lupus érythémateux systémique ou l'arthrite rhumatoïde (avec production de titres très élevés de facteur rhumatoïde RF dans leur sérum).

Un hybridome AM14 RF⁺, produisant un facteur rhumatoïde, a été dérivé des souris MRL-*lpr*. Des souris MRL AM14, de fonds génétique MRL et transgéniques pour le BCR de l'hybridome AM14, ont été produites. Chez les souris transgéniques MRL AM14, les lymphocytes B AM14 RF⁺ se développent normalement et restent fonctionnellement naïfs. En revanche, chez les souris MRL-*lpr* AM14, transgéniques pour AM14 RF⁺ et possédant la mutation *lpr*, les lymphocytes AM14 RF⁺ sont activés, prolifèrent et sécrètent des auto-anticorps.

Question 2. *Indiquez pourquoi les lymphocytes B des souris transgéniques AM14 expriment presque tous un BCR AM14 RF⁺. (5 lignes maximum)*

Question 3. *Formulez des hypothèses permettant d'expliquer la différence d'état d'activation des lymphocytes AM14 RF⁺ chez les souris MRL et MRL-*lpr*. (5 lignes maximum)*

Dans une première expérience, des sérums de souris MRL de type sauvage (MRL-+/+), de souris MRL-*lpr/gld* (possédant la double mutation *lpr* et *gld*) ou de souris MRL-*lpr* âgées de 4 à 5 mois ont été collectés comme source d'IgG2a. Ces sérums ont été ajoutés à des cultures de lymphocytes B, obtenus à partir de souris MRL AM14 transgéniques (RF⁺) ou de souris MRL non-transgéniques (RF⁻), et préalablement activés avec CD40-ligand. La prolifération a été déterminée après deux jours de culture (**Figure 1**).

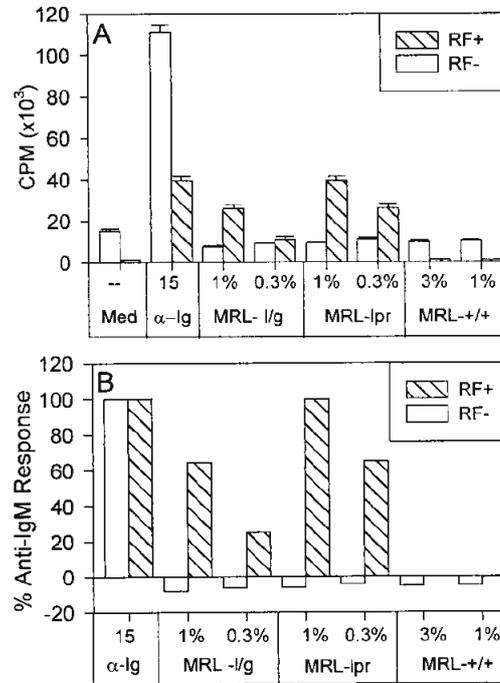
Question 4. Quel est le rôle du traitement avec CD40-ligand dans cette expérience ? Pourquoi avoir traité les cellules avec un anticorps anti-IgM ? (5 lignes maximum)

Question 5. Analysez ces résultats et expliquez les différences observées entre les sérums de souris MRL-*lpr/gld*, MRL-*lpr* et MRL-*+/+*. (8 lignes maximum)

Figure 1

Des lymphocytes B provenant de souris MRL AM14 transgéniques (RF+) ou de souris MRL non-transgéniques (RF-), ayant été préalablement activés avec CD40-ligand, ont été incubés avec 1% ou 0,3% de sérums provenant de souris MRL-*lpr/gld* (I/g), MRL-*lpr* ou MRL-*+/+*.

Comme contrôles, les cellules ont été incubées avec du milieu seul (Med) ou avec 15 µg/ml d'anticorps anti-IgM (α-Ig). La prolifération des lymphocytes B a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont donnés en cpm (A) ou en pourcentage de la réponse obtenue avec l'anticorps anti-IgM (B).

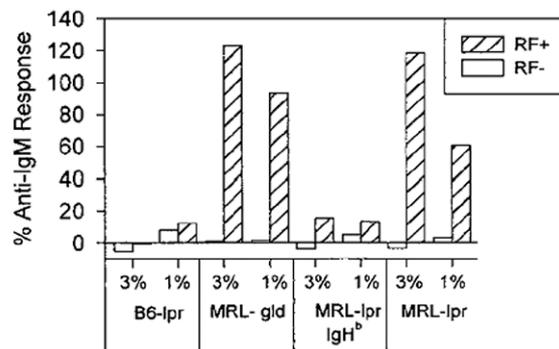


Pour préciser la spécificité des anticorps RF, des sérums provenant de souris B6-*lpr* (Igh^b), de souris MRL-*gld* (Igh^j), de souris congéniques MRL-*lpr*.Igh^b (Igh^b) ou de souris MRL-*lpr* (Igh^j) âgées de 4 à 5 mois ont été ajoutés à des lymphocytes B provenant de souris RF⁺ ou RF⁻. La prolifération des lymphocytes B a été mesurée après 2 jours de culture (Figure 2).

Figure 2

Des lymphocytes B provenant de souris RF+ ou RF-, ayant été préalablement activés avec CD40-ligand, ont été incubés avec 3% ou 1% de sérums provenant de souris B6-*lpr*, MRL-*gld*, MRL-*lpr*.Igh^b ou MRL-*lpr*.

Comme contrôles, les cellules ont été incubées avec 15 µg/ml d'anticorps anti-IgM. La prolifération des lymphocytes B a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont donnés en pourcentage de la réponse obtenue avec l'anticorps anti-IgM.



Question 6. Que pouvez-vous dire de la spécificité du BCR des lymphocytes B RF⁺ ? (4 lignes maximum)

Lorsque les sérums collectés proviennent de souris MRL-*lpr*, MRL-*gld* ou MRL-*lpr/gld* âgées de 11 semaines, ceux-ci n'ont aucun effet de stimulation des lymphocytes B RF⁺. Par un test de fixation de la

molécule C1q, il a été montré qu'il y a davantage de complexes immuns dans les sérums ayant une activité de stimulation que dans les sérums non stimulants. La corrélation entre certaines caractéristiques des sérums de souris MRL-*lpr* et MRL-*lpr/gld* et leur capacité à stimuler des lymphocytes B RF⁺ a été déterminée (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Corrélation entre les caractéristiques des sérums de souris MRL-*lpr* et MRL-*lpr/gld* et leur capacité à stimuler des lymphocytes B RF⁺ pré-activés avec CD40-ligand.

IC Titer vs Prolifération	RF Titer vs Prolifération	IgG2a Titer vs Prolifération	Age vs Prolifération
0.692 (n = 12)	0.002 (n = 13)	0.082 (n = 14)	0.246 (n = 14)

Les valeurs indiquées dans le tableau correspondent au coefficient de corrélation entre facteurs. IC : complexes immuns ; n : nombre de souris testées.

Question 7. *Quelle hypothèse pouvez-vous avancer pour expliquer ces résultats ? (8 lignes maximum)*

Comme il a été précisé dans l'introduction, dans les maladies auto-immunes, les auto-anticorps sont très fréquemment dirigés contre des nucléosomes. Différents anticorps anti-nucléosomes obtenus à partir de souris MRL ont été incubés avec des lymphocytes B RF⁺ ou RF⁻. L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites à la Figure 1. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Stimulation des lymphocytes B RF⁺ ou RF⁻ par des anticorps anti-nucléosomes

Ab	Isotype	Fine Specificity	% Anti-IgM Prolifération ^a	
			RF ⁺	RF ⁻
PL 2-3	IgG2a ⁱ	H2A-H2B-DNA	317	6
PR 1-3	IgG2a ⁱ	H2A-H2B-DNA	312	-7
LG4-1	IgG2a ⁱ	Nucleosome core particle	126	2
MRB4	IgG2a ⁱ		H2A-H2B-DNA	138
LG10-1	IgG2a ⁱ	H3-H4-DNA	154	9
LG8-1	IgG2a ⁱ	H2A-H2B-DNA	48	9
PL 2-6	IgG2b ^j	H2A-H2B-DNA	1	-6
PL 9-7	IgG3 ^j	H2A-H2B-DNA	-6	-16
PL 2-8	IgG2b ^j	H2A-H2B-DNA	-1	-1
PL 2-7	IgG2b ^j	H2A-H2B-DNA	-4	0
MGC 23	IgG2b ^j	Nucleosome core particle	5	9

^aPour chaque anticorps (Ab), l'isotype, la spécificité (Fine specificity) vis-à-vis des nucléosomes ou de complexes histone/ADN et la capacité à activer la prolifération de lymphocytes B par rapport au traitement anti-IgM (%Anti-IgM prolifération) ont été déterminés.

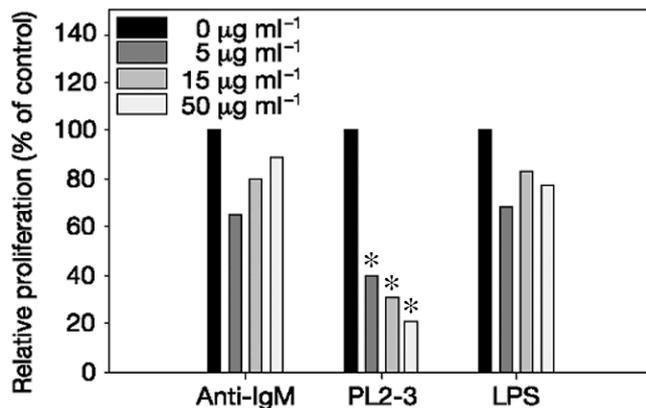
Question 8. *En interprétant les données du Tableau 2 et sachant que des anticorps monoclonaux IgG2aⁱ spécifiques d'haptènes ou d'antigènes autres que les nucléosomes ne font pas proliférer les lymphocytes B RF⁺, quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer ces résultats ? (8 lignes maximum)*

Des lymphocytes B RF⁺ ont été pré-incubés pendant 15 minutes avec des concentrations croissantes de DNase avant l'addition d'anticorps anti-IgM, d'anticorps anti-nucléosome PL2-3 (IgG2a^j), ou de LPS. La prolifération des lymphocytes B a été déterminée après 2 jours de culture (Figure 3).

Question 9. Précisez l'importance des contrôles réalisés en présence d'anticorps anti-IgM ou de LPS. Que pouvez-vous conclure de cette expérience ? (5 lignes maximum)

Figure 3

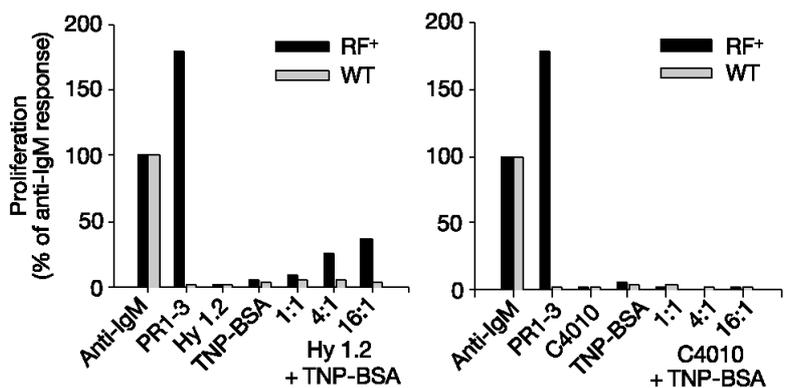
Prolifération des lymphocytes B RF⁺ incubés avec l'anticorps anti-IgM, l'anticorps PL2-3 (cf. Tableau 2) ou le LPS, en présence de DNase (0 à 50 µg/ml). Les valeurs de prolifération sont exprimées en pourcentage de la valeur obtenue, pour chaque activateur, en l'absence de DNase. Un astérisque indique une valeur de prolifération significativement différente du contrôle en l'absence de DNase.



Des complexes immuns ont été préparés en incubant des anticorps monoclonaux IgG2a anti-haptènes (anti-TNP) et des concentrations croissantes de l'haptène TNP couplé à la sérumalbumine bovine (TNP-BSA). La formation de complexes immuns a été confirmée en suivant leur fixation à la molécule C1q du complément. Les complexes immuns ainsi formés ont été testés pour leur capacité à stimuler la prolifération de lymphocytes B RF⁺ ou RF⁻ (WT) et comparés à l'action d'anticorps anti-nucléosome (Figure 4).

Figure 4

Les lymphocytes B RF⁺ ou RF⁻ (WT) ont été incubés avec l'anticorps anti-IgM, l'anticorps PR1-3 anti-nucléosome (IgG2a^j), l'anticorps Hy1.2 anti-TNP (IgG2a^j), l'anticorps C4010 anti-TNP (IgG2a^b), l'haptène TNP-BSA, des complexes immuns Hy1.2+TNP-BSA ou des complexes immuns C4010+TNP-BSA. Après 2 jours de culture, la prolifération des lymphocytes B a été déterminée et exprimée en pourcentage de la prolifération observée en présence de l'anticorps anti-IgM.



Question 10. Commentez les résultats observés. Ces résultats vous semblent-ils surprenants ? (5 lignes maximum)

Les récepteurs du complément sont capables de fixer des complexes immuns opsonisés. Des souris transgéniques AM14 déficientes en récepteur CR2 du complément (appelées souris RF⁺ CR^{-/-}) ont été produites par croisements des souris transgéniques AM14 (RF⁺ CR^{+/+}) avec des souris déficientes en CR2. Les lymphocytes B de souris non transgéniques RF⁻ CR^{+/+} (WT), ou de souris transgéniques RF⁺ CR^{+/+} ou RF⁺ CR^{-/-} ont été incubés avec les anticorps monoclonaux PR1-3 (IgG2a^j), PL2-3 (IgG2a^j),

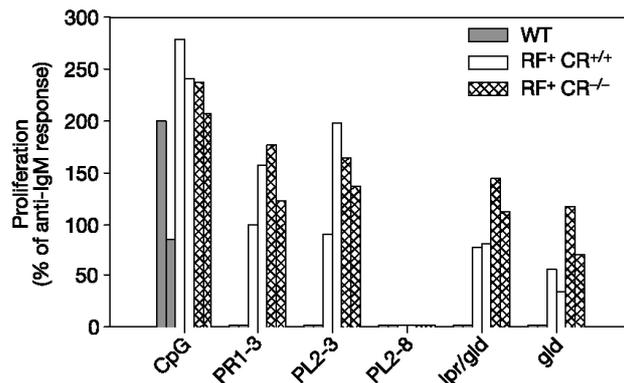
PL2-8 (IgG2b) ou du sérum provenant de souris *lpr/gld* ou *gld*. La prolifération des lymphocytes B a été déterminée après 2 jours de culture (Figure 5).

Question 11. Pourquoi n'observe-t-on aucune prolifération avec l'anticorps PL2-8 ? (4 lignes maximum)

Question 12. Que pouvez-vous conclure de cette expérience ? (5 lignes maximum)

Figure 5

Prolifération des lymphocytes B de souris RF⁻ CR^{+/+} (WT), RF⁺ CR^{+/+} ou RF⁺ CR^{-/-} en présence des anticorps PR1-3, PL2-3, PL2-8 ou de sérum provenant de souris *lpr/gld* ou *gld*. Comme contrôle positif de prolifération, les cellules ont été stimulées avec un oligodéoxynucléotide CpG hypométhylé mitogène (CpG). Après 2 jours de culture, la prolifération des lymphocytes B a été déterminée et exprimée en pourcentage de la prolifération observée en présence d'anticorps anti-IgM (non montrée). Chaque expérience a été réalisée en double.



Des souris transgéniques AM14 déficientes en MyD88 (appelées souris RF⁺ MyD88^{-/-}) ont été produites par croisements des souris transgéniques AM14 (RF⁺ MyD88^{+/+}) avec des souris déficientes en MyD88. Des lymphocytes B provenant de souris non transgéniques RF⁻ MyD88^{+/+} (WT), ou de souris transgéniques RF⁺ MyD88^{+/+} ou RF⁺ MyD88^{-/-} ont été incubés en présence de CpG, de LPS, des anticorps PR1-3 (IgG2a), PL2-3 (IgG2a) ou de sérum provenant de souris *lpr/gld*. La prolifération des lymphocytes B a été déterminée après 2 jours de culture (Figure 6).

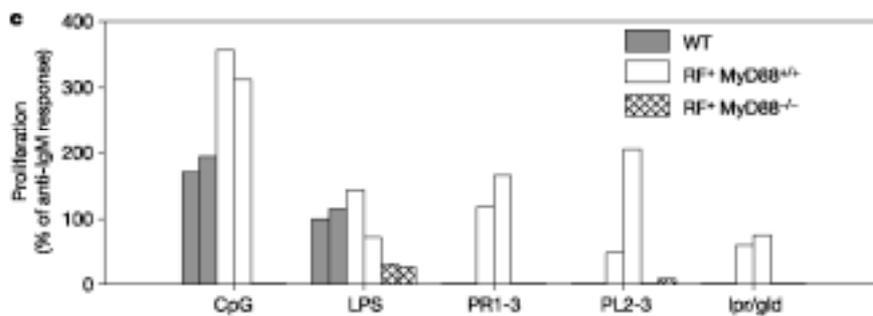


Figure 6

Prolifération des lymphocytes B RF⁻ MyD88^{+/+} (WT), RF⁺ MyD88^{+/+} ou RF⁺ MyD88^{-/-} en présence de CpG, de LPS, des anticorps PR1-3, PL2-3 ou de sérum provenant de souris *lpr/gld*. Après 2 jours de culture, la prolifération des lymphocytes B a été déterminée et exprimée en pourcentage de la prolifération observée en présence d'anticorps anti-IgM (non montrée). Chaque expérience a été réalisée en double.

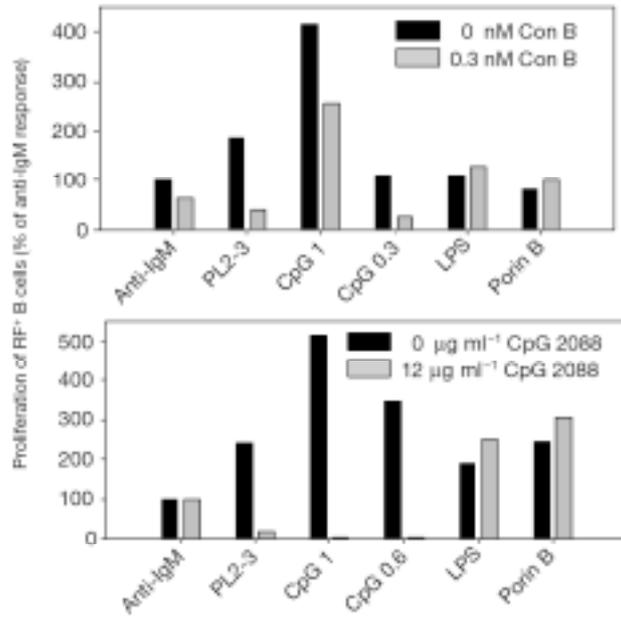
Question 13. Quels éléments nouveaux apportent ces résultats ? Quel(s) récepteur(s) est(sont) engagé(s) dans cette réponse ? (8 lignes maximum)

Question 14. A l'aide d'un schéma récapitulatif uniquement, rappelez le rôle et le mode de signalisation de cette famille de récepteurs du système immunitaire.

La voie de signalisation par le récepteur TLR9 requiert l'acidification des endosomes ; elle est donc sensible à l'action de la concanamycine B (Con B) qui est un inhibiteur spécifique de l'ATPase de type V responsable de l'acidification des endosomes. Des lymphocytes B RF⁺ ont été pré-incubés avec Con B ou un CpG inhibiteur (CpG 2088). Leur prolifération en réponse à un anticorps anti-IgM, à l'anticorps PL2-3, au CpG, au LPS ou à la porine B (un ligand de TLR2) a été déterminée (Figure 7).

Figure 7

Prolifération des lymphocytes B RF⁺ en présence d'anticorps anti-IgM, de l'anticorps PL2-3, de CpG (1 ou 0,3 µg/ml), de LPS ou de Porin B en l'absence ou en présence des inhibiteurs Concanamycine B (Con B ; haut) ou CpG 2088 (bas). On notera que la porine B est un ligand de TLR2. Après 2 jours de culture, la prolifération des lymphocytes B a été déterminée et exprimée en pourcentage de la prolifération observée en présence d'anticorps anti-IgM en l'absence d'inhibiteur.



Question 15. Commentez ces résultats. Que pouvez-vous conclure ? (8 lignes maximum)

Question 16. Faites un schéma récapitulatif le(s) mécanisme(s) conduisant à l'activation des lymphocytes B RF⁺.

IPP2005 TD-IPP 3 :
Immunité anti-infectieuse
sensibilité aux infections 1

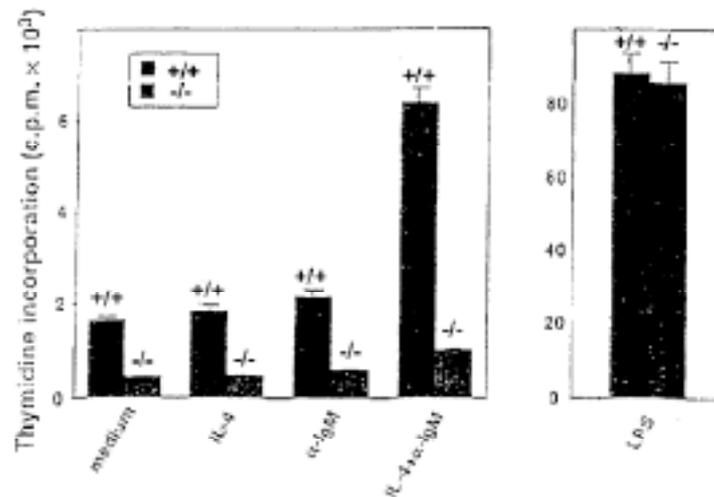
Immunité anti-infectieuse/Sensibilité aux infections (1)

I.

Les cytokines activent la phosphorylation de nombreuses protéines intracellulaires, dont les facteurs de transcription de la famille Stat (*Signal Transducers and Activators of transcription*). Une fois phosphorylés, ces facteurs de transcription Stat se dimérisent, vont dans le noyau et activent l'expression de gènes. On étudie le rôle du facteur de transcription Stat6 dans la réponse des lymphocytes B et T à l'IL4, une cytokine produite par les lymphocytes T, les mastocytes et les basophiles. Pour cela on produit des souris où le gène codant pour Stat6 a été invalidé.

On analyse la réponse à l'IL4 des lymphocytes B des souris normales (+/+) et des souris invalidées (-/-). Pour cela, on cultive les lymphocytes B au repos en présence d'IL4 recombinante additionnée ou non de Fab'2 d'anti-IgM, ou en présence de LPS et on mesure la prolifération cellulaire par incorporation de [³H]-Thymidine au jour 2 de la culture. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 1**.

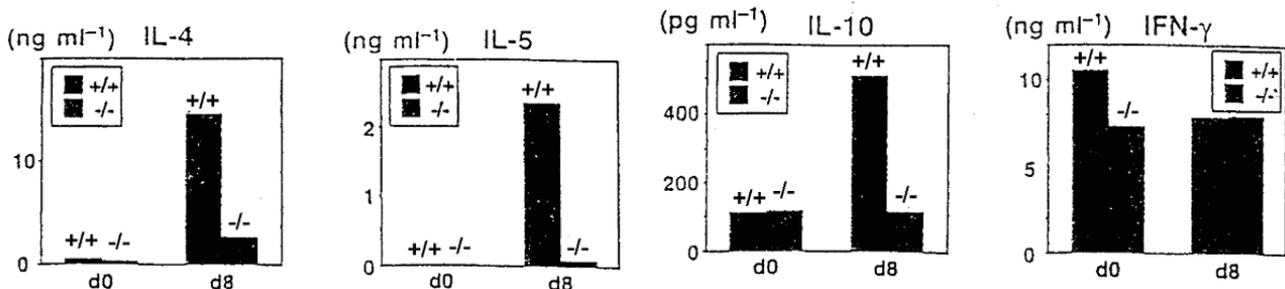
Figure 1



Question 1. Comment interprétez-vous ces résultats ?

On analyse ensuite la réponse des lymphocytes T des souris +/+ et -/- au jour 0 ou au jour 8 de l'infection des souris par *Nippostrongylus brasiliensis*, un parasite qui active les réponses de type Th2. Pour cela on isole les lymphocytes T spléniques des souris infectées et on les cultive pendant 24h en présence d'anti-CD3. On mesure ensuite par ELISA la concentration de cytokines présentes dans les surnageants de culture (**Figure 2**).

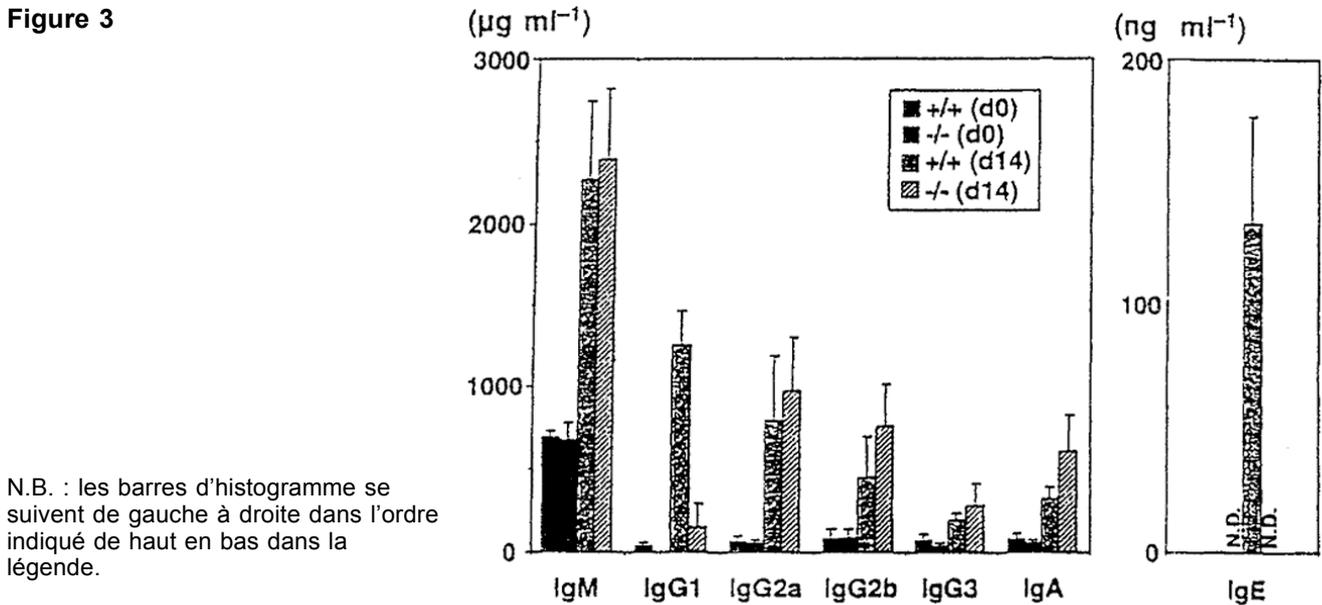
Figure 2



Question 2. Comment interprétez-vous ces résultats ?

L'IL4 est nécessaire pour la commutation isotypique vers les IgE. Aux jours 0 et 14 après infection par *N. brasiliensis*, on mesure la concentration des différents isotypes d'Ig dans les sérums des animaux +/+ ou -/- (Figure 3).

Figure 3



Question 3. Qu'en concluez-vous ?

Question 4. Quel(s) autre(s) gène(s) faudrait-il invalider pour obtenir les mêmes effets ?

II.

(d'après Jennison and Verma (2004) *FEMS Microbiology Reviews*, 28:43 ; Sansonetti et al. (1999) *Infection and Immunity*, 67:1471 ; Zhang et al. (2001) *Infection and Immunity*, 69:3240 ; Wenneras et al. (2000) *Journal of Immunology*, 164:3214)

Shigella flexneri est une bactérie gram négative responsable d'une forme de dysenterie très contagieuse (shigellose). On dénombre 164 millions de cas et 1.1 millions de morts chaque année, la majorité des cas concernant des enfants dans les pays en voie de développement. La pathogénicité de *Shigella flexneri* est basée sur sa capacité à envahir l'épithélium et à s'y multiplier en causant une importante inflammation et une destruction de l'épithélium. La réaction inflammatoire est impliquée à la fois dans la destruction de l'épithélium et dans le contrôle de l'infection. La réponse humorale de l'hôte semble également jouer un rôle protecteur important alors que le rôle de la réponse cellulaire est encore controversé.

Partie 1 : Rôle de l'interleukine 8 dans l'infection par S. flexneri

Figure 4

Dosage de l'interleukine 8 dans les tissus intestinaux de lapins 2 à 8h après infection avec une souche normale (M90T) ou avec une souche mutée avirulente et non invasive (BS176) de S. flexneri

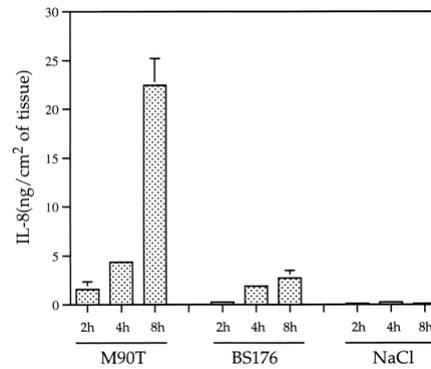


Figure 5

A et B : Marquage de coupes d'épithélium intestinal de lapins infectés avec la souche normale de S. flexneri et préalablement traités avec un anticorps contrôle (A) ou un anticorps anti IL-8 (B).

C et D : Mesure de la quantité de bactéries présentes dans l'épithélium intestinal (C) ou le sang (D) de ces lapins

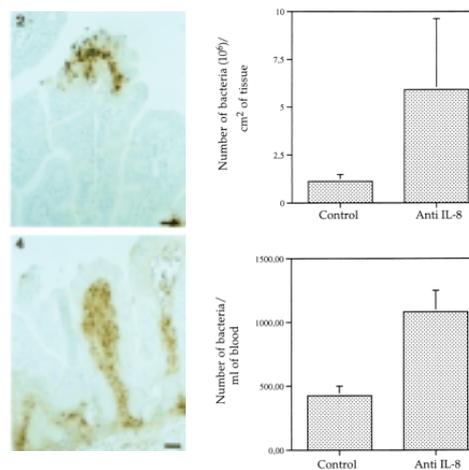
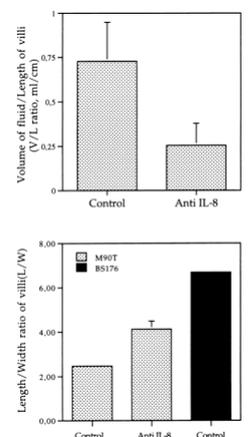


Figure 6

Evaluation des altérations de l'épithélium intestinal de lapins infectés avec une souche normale (M90T) ou non invasive (BS176) de S. flexneri après traitement par un anticorps contrôle ou un anticorps anti IL-8.

A : Mesure de la sévérité de l'inflammation (ratio volume de fluide / taille des villi intestinaux)

B : Mesure de l'atrophie des villi (ratio longueur/épaisseur)

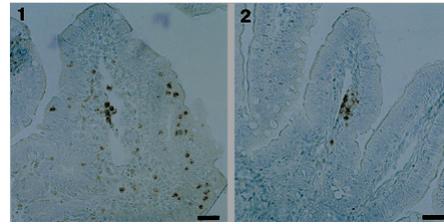


Question 1. Commentez les résultats obtenus.

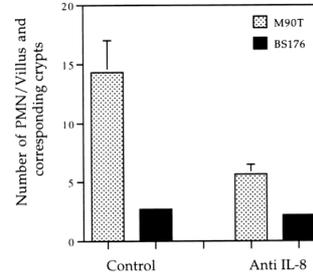
Question 2. Quelles hypothèses peut-on formuler pour les expliquer ?

Figure 7

A : Coupes d'épithélium intestinal de lapins, infectés avec une souche virulente de *S. flexneri* après traitement avec un anticorps contrôle (1) ou avec un anticorps anti IL-8 (2), marquées avec un anticorps dirigé contre une protéine spécifique des polynucléaires : la protéine BPI (bactericidal permeability increasing).



B : Mesure du nombre de polynucléaires présents dans les villi intestinaux de lapins infectés avec une souche normale ou avirulente de *S. flexneri* après traitement avec un anticorps contrôle ou un anticorps anti IL-8.



Question 3. Analysez les résultats obtenus. Ces résultats confirment-ils vos hypothèses précédentes ?

Partie 2 : Rôle des polynucléaires

Afin de mieux comprendre le rôle des polynucléaires (PMN) dans la pathologie humaine, on utilise des souris SCID dans lesquelles on greffe des portions d'intestins humains qu'on infecte avec des souches normales ou avirulentes (CDV1203) de *S. flexneri* ou avec une bactérie non pathogène (*E. coli*). L'implication des polynucléaires est analysée en comparant la réponse de souris traitées avec un anticorps contrôle (148 D41) à celle de souris traitées avec un anticorps anti polynucléaires (RB6) permettant leur élimination.

Figure 8

Dosage de l'interleukine 8 dans des lysats de greffes d'intestins 4h après infection. Le contrôle correspond à un lysat non infecté. Les résultats indiqués correspondent à la moyenne de 5 à 8 souris selon les cas.

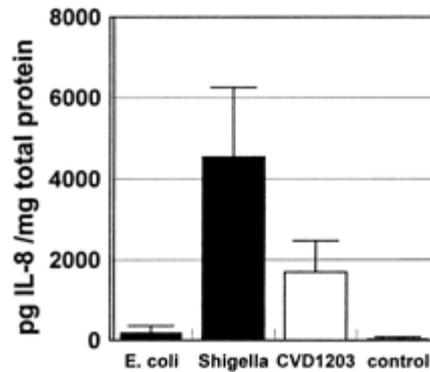
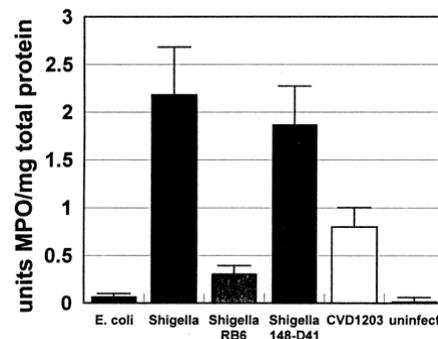


Figure 9

Evaluation de l'influx de polynucléaires au niveau de l'intestin humain greffé. La présence de polynucléaires est évaluée par mesure de l'activité myeloperoxydase dans les lysats d'intestins greffés et infectés après traitement des souris avec un anticorps contrôle (148-D41) ou un anticorps délétant anti polynucléaires (RB6). Les résultats indiqués correspondent à la moyenne de 7 à 8 souris selon les cas



souris selon les cas.

Figure 10

Mesure de la perméabilité de l'épithélium intestinal.

La perméabilité de l'épithélium intestinal est mesurée en déposant une molécule fluorescente, le FITC-dextran, dans la lumière intestinale au moment de l'infection et en dosant son passage dans le sang des souris 4h après l'infection.

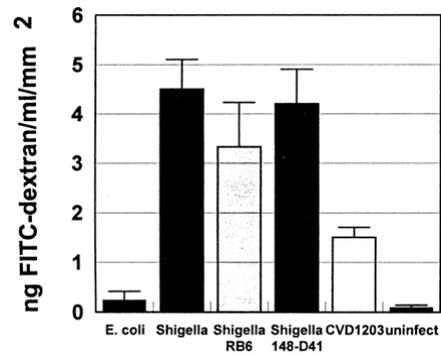
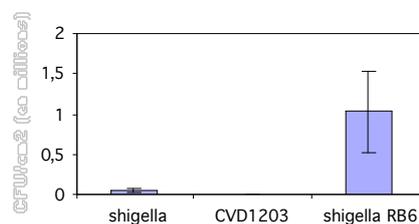


Figure 11

Nombre de bactéries présentes dans les intestins humains greffés 4h après infection.



Question 4. Analysez l'ensemble des résultats obtenus. Ces résultats sont-ils cohérents avec ceux obtenus précédemment et les hypothèses proposées dans la Question 2 ?

Partie 3 : Rôle de la molécule CD14

Dans les figures qui suivent on traite des lapins avec un anticorps contrôle ou un anticorps bloquant anti-CD14 avant infection avec une souche virulente (M90T) ou non virulente (BS176) de *S. flexneri*. Les analyses sont toujours effectuées 8h après infection. Lorsque le type d'infection n'est pas précisé il s'agit de la souche virulente.

Figure 12

Mesure du taux de destruction de l'épithélium intestinal

Le taux de destruction est évalué en mesurant la taille des villi intestinaux

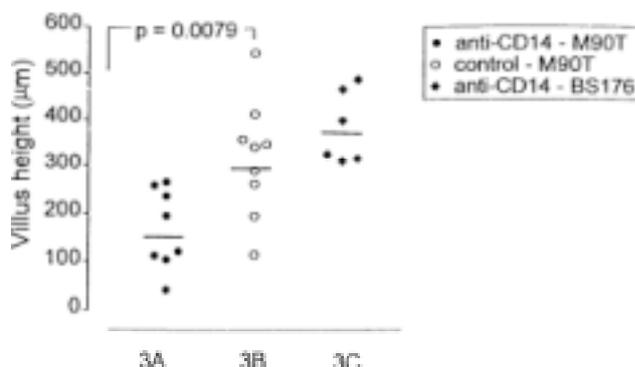
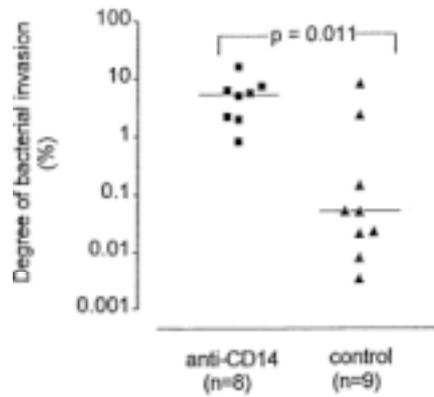


Figure 13

Mesure du degré d'invasion de la muqueuse intestinale par *S. flexneri*.

8h après infection on prélève la zone d'intestin infectée et on la marque avec un anticorps anti-LPS afin de visualiser les bactéries. On mesure ainsi la surface de la muqueuse intestinale dans laquelle les bactéries sont présentes. Les résultats sont exprimés en % de surface.



Question 5. Justifiez ces expériences. Pourquoi traiter les lapins avec des anticorps anti-CD14 avant l'infection ?

Question 6. Que peut-on conclure de ces expériences ?

Figure 14

Recrutement des polynucléaires au niveau du site de l'infection. On évalue la quantité de PMN présents dans la muqueuse intestinale par marquage hématoxyline/éosine ou mesure de l'activité myéloperoxydase

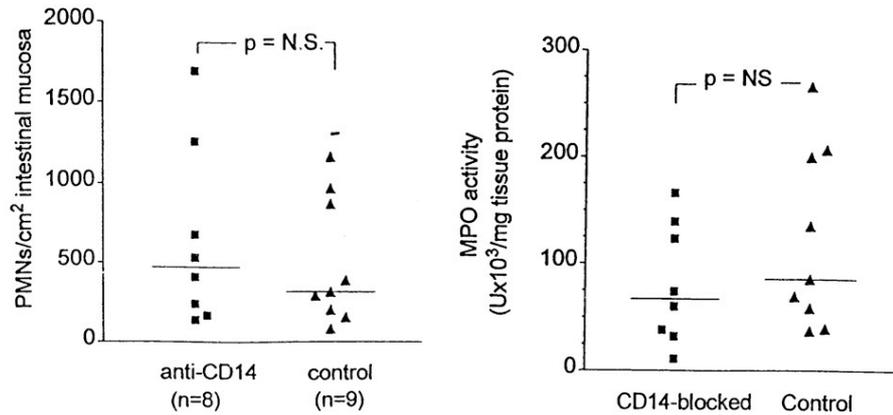
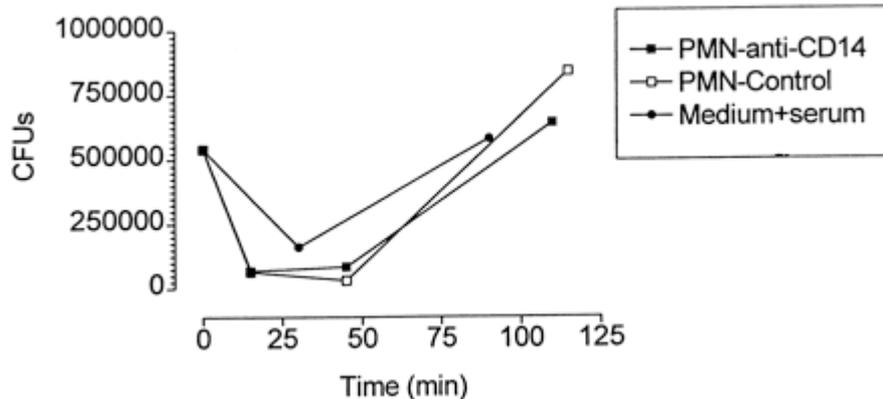


Figure 15

Mesure de la destruction de *S. flexneri* par des PMN traités avec un anticorps contrôle ou un anticorps anti-CD14.



Question 7. D'après ces figures, que peut-on dire du rôle de CD14 dans le recrutement et l'activation des PMN au cours d'une infection par *S. flexneri* ?

Question 8. Ces résultats sont-ils cohérents avec ceux obtenus dans les figures 9 et 10 ?

Question 9. Proposez des mécanismes pouvant expliquer l'ensemble des résultats.

III. Immunosuppression induite par le virus de la rougeole

(D'après Marie J., et al. (2001) *Immunity* 14:69)

Le virus de la rougeole induit une immunosuppression sévère chez les individus infectés. Les mécanismes précis de cette immunodéficience sont peu connus du fait du manque d'un modèle animal adéquat. Les auteurs de cette étude ont recherché le(s) rôle(s) des protéines virales du virus de la rougeole sur l'induction de l'immunosuppression chez des souris C57BL/6. Pour cela, ils ont étudié deux types de réactions inflammatoires dépendantes des cellules T :

- 1) l'hypersensibilité retardée (DTH) en réponse à KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) due aux lymphocytes T CD4⁺ ;
- 2) l'hypersensibilité de contact (CHS) en réponse à l'haptène DNFB (*dinitrofluorobenzene*) due aux lymphocytes T CD8⁺.

Question 1. Proposez deux modèles animaux pouvant servir à l'étude de l'infection par le virus de la rougeole (on précise que le récepteur du virus est une molécule membranaire, le CD46 humain, et que ce virus n'infecte pas normalement les cellules de souris). (5 lignes maximum)

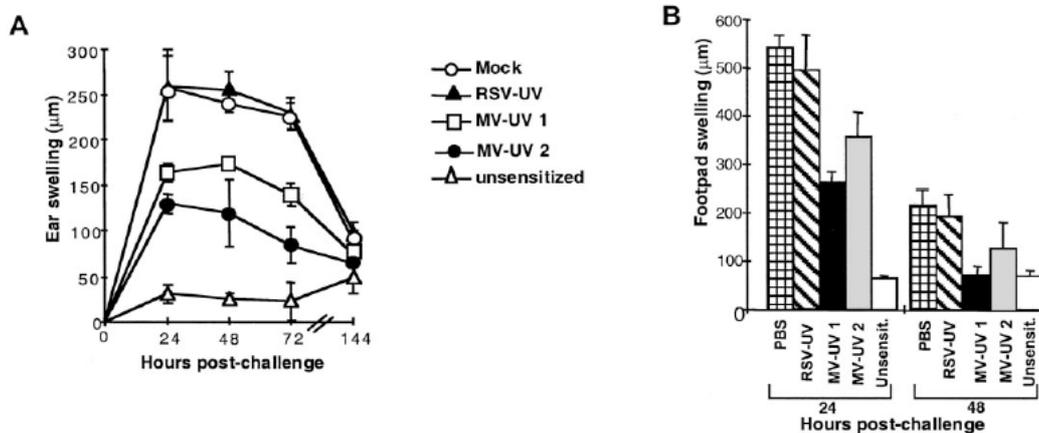


Figure 16

Des souris C57BL/6 ont reçu des injections intrapéritonéale de la préparation « Mock », de PBS, de 200 µg (MV-UV 1) ou 40 µg (MV-UV 2) de virus de la rougeole inactivé par les UV, ou de 200 µg du virus du sarcome de roux inactivé par les UV (RSV-UV).

A : Les souris ont été sensibilisées 6 heures après par une application de DNFB sur la peau du ventre et ont reçu 5 jours plus tard par une application de DNFB sur l'oreille.

B : Les souris ont été sensibilisées par une injection sous-cutanée de KLH et ont reçu 7 jours plus tard par une injection sous-cutanée de KLH dans la patte.

Les résultats sont exprimés en gonflement de l'oreille (A) ou de la patte (B). On précise que « Mock » correspond à une préparation contenant le milieu de culture sans virus. Les souris témoins (unsensitized (A) ou Unsensit. (B)) n'ont pas été sensibilisées.

Question 2. Commentez les résultats obtenus. (5 lignes maximum)

L'analyse des préparations de MV-UV par un test ELISA a montré la présence importante d'une protéine virale nucléaire libre (NP). Pour déterminer le rôle de cette protéine dans l'immunosuppression, les auteurs ont réalisé des expériences complémentaires (Figure 17) chez des souris C57BL/6 et chez des animaux FcR^{-/-} à la fois déficients pour FcγRII et FcRγ.

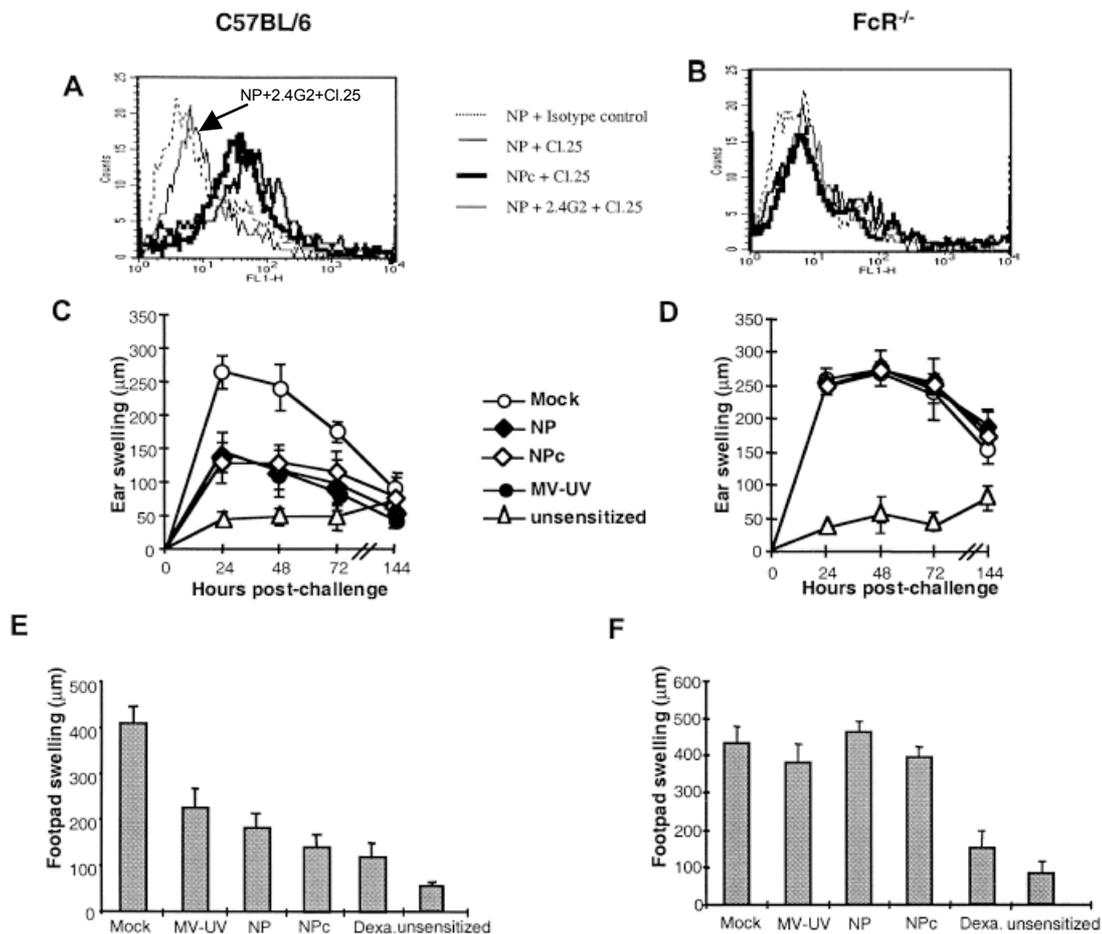


Figure 17

(A, B) Des cellules dendritiques provenant de souris C57BL/6 (A) ou déficientes en FcR (FcR^{-/-}) (B) ont été incubées avec la protéine NP entière, en absence ou en présence d'anticorps monoclonal anti-FcR (2.4G2), ou avec la protéine NPc (contenant les 126 acides aminés C-terminaux de la protéine). La liaison a été révélée avec un anticorps anti-NP biotinylé (Cl.25) et la streptavidine-FITC.

Les souris C57BL/6 (C, E) ou FcR^{-/-} (D, F) ont reçu des injections de la préparation Mock, de la protéine NP ou NPc, du virus de la rougeole inactivé par les UV (MV-UV), ou de dexaméthasone (un immunosuppresseur).

(C, D) Les souris ont été sensibilisées 6 heures après par du DNFB et ont reçu 5 jours plus tard une application de DNFB sur l'oreille.

(E, F) Les souris ont été sensibilisées 6 heures après avec du KLH et ont reçu 7 jours plus tard une application de KLH sur la patte.

Les gonflements de l'oreille ou de la patte ont été mesurés 24h après l'application. On précise que « Mock » correspond à une préparation contenant le milieu de culture sans virus. Les souris témoins (unsensitized) n'ont pas été sensibilisées.

Question 3. Pourquoi a-t-on invalidé à la fois FcγRII et FcRγ pour obtenir les souris FcR^{-/-} ?

Question 4. Analysez ces résultats. Quelles conclusions pouvez-vous émettre quant au rôle de la protéine virale NP ? (8 lignes maximum)

Pour étudier les mécanismes cellulaires précis induisant une immunosuppression, les auteurs ont réalisé les expériences suivantes : des souris C57BL/6 et des souris FcR^{-/-} ont reçu des injections intrapéritonéales de MV-UV, de protéine recombinante NP ou de PBS. Six heures après, les animaux ont été sensibilisés par le DNFB. Les lymphocytes T CD8⁺ ont été purifiés à partir des ganglions drainant 4 jours après la sensibilisation et ont été testés pour leur capacité à proliférer en réponse aux haptènes DNBS ou TNBS (Figure 18).

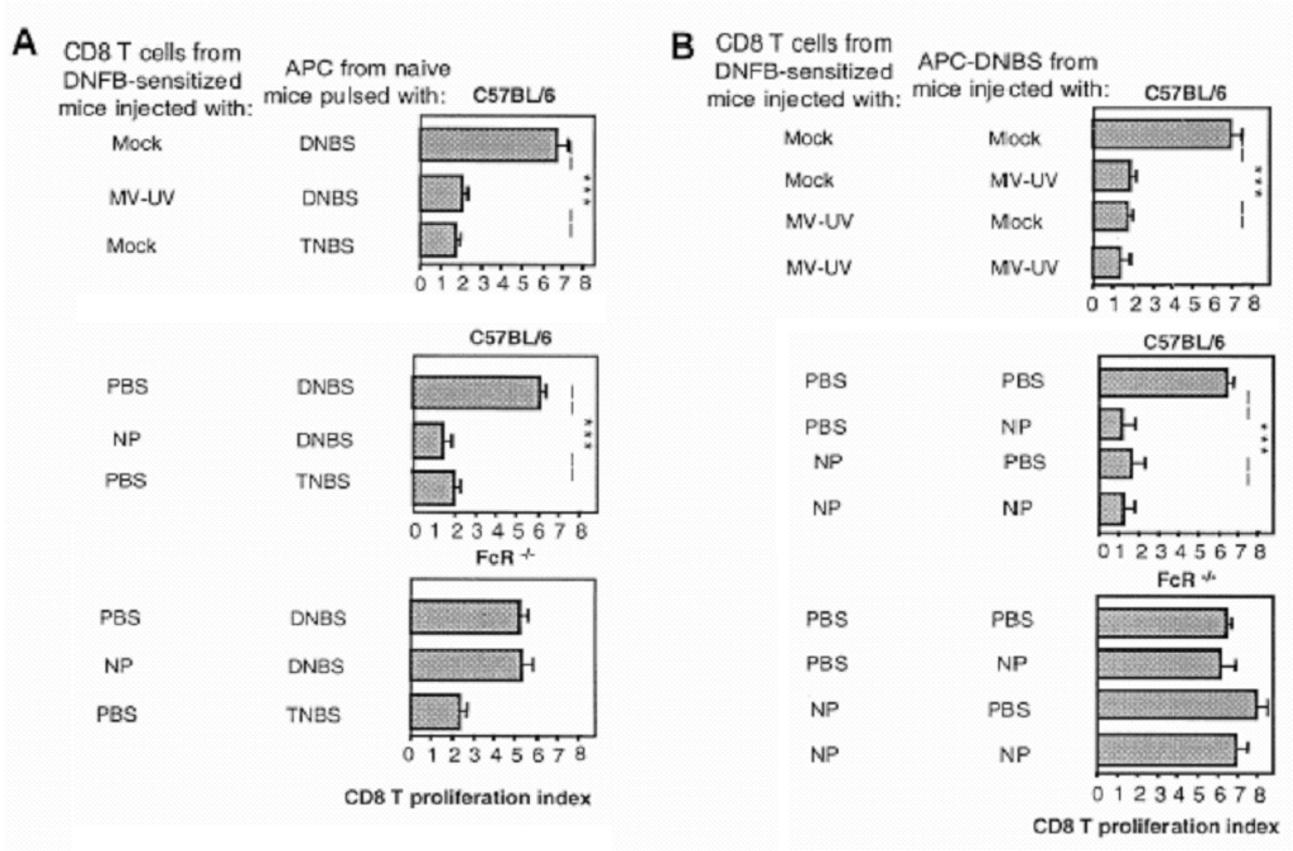


Figure 18

Les lymphocytes T CD8⁺ ont été purifiés chez des souris C57BL/6 ou FcR^{-/-} ayant reçu des injections de la préparation Mock, de MV-UV, de NP ou de PBS et ayant été sensibilisées par le DNFB 6 heures après l'injection.
 A : Des splénocytes prélevés chez des souris syngéniques naïves ont été irradiés, couplés au DNBS ou au TNBS, puis incubés avec les lymphocytes T CD8⁺ pendant 3 jours.
 B : Des splénocytes prélevés chez des souris préalablement traitées comme les souris donneuses de cellules T CD8⁺ ont été irradiés, couplés au DNBS, puis incubés avec les lymphocytes T CD8⁺ pendant 3 jours.
 La prolifération des LT CD8⁺ a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont présentés en indice de prolifération. On précise que le DNBS est le dinitrofluorobenzène-sulfonic acid et le TNBS est le 2,4,6-trinitrofluorobenzène-sulfonic acid.

Question 5. D'après ces expériences, quelles sont les différentes phases de la réponse immunitaire qui sont affectées ? (8 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, des souris C57BL/6 et FcR^{-/-} ont reçu une injection de la préparation Mock ou MV-UV, puis ont été sensibilisées au DNFB 6 heures après. Les ganglions drainants ont été

prélevés à 24h après l'injection. Une population cellulaire d'intérêt a été enrichie et la production d'IL-12 intracellulaire a été analysée par cytométrie de flux (**Figure 19**).

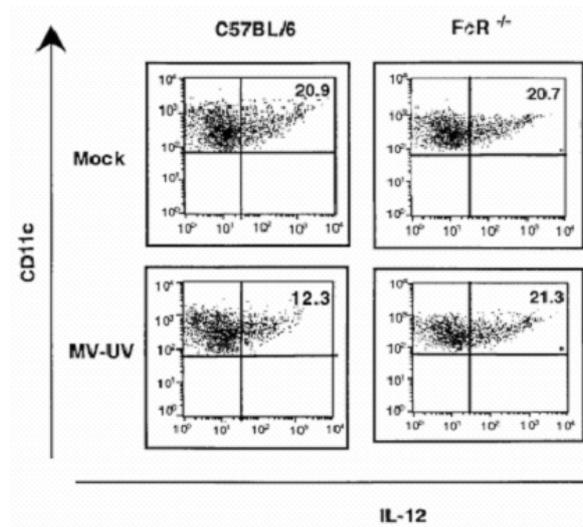


Figure 19

Des souris C57BL/6 et FcR^{-/-} ont reçu une injection de MV-UV ou de la préparation Mock et ont été sensibilisées au DNFB 6 heures après. Les ganglions drainants ont été prélevés 24h après l'injection. Une population cellulaire d'intérêt a été enrichie de ces ganglions et analysée par double marquage membranaire pour le CMH de classe II et CD11c, suivi d'un marquage intracellulaire pour l'IL-12. Ces données sont montrées sur la population CMH II⁺.

Question 6. *Quelle population cellulaire a été enrichie dans cette expérience ? (1 ligne)*

Question 7. *Citez deux techniques permettant d'enrichir cette population. (2 lignes)*

Question 8. *Ces résultats vous permettent-ils de préciser vos conclusions précédentes ? (8 lignes maximum)*

IPP2005 TD-IPP 4 :
Immunité anti-infectieuse
sensibilité aux infections 2

Immunité anti-infectieuse/Sensibilité aux infections (2)

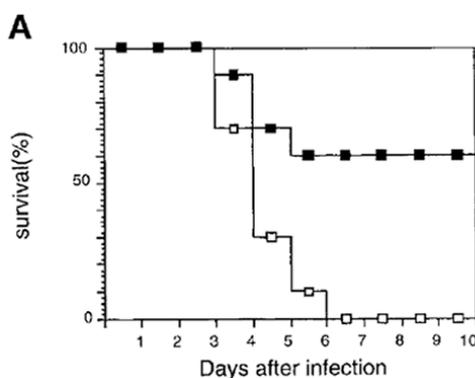
I. Comparaison de la réponse de deux lignées de souris (C57BL/6 et BALB/c) à l'infection par *Listeria monocytogenes*

(d'après Liu *et al.* (2000) *Cellular Immunology* 202:31 ; Liu *et al.* (2002) *Infection & Immunity* 70:6638)

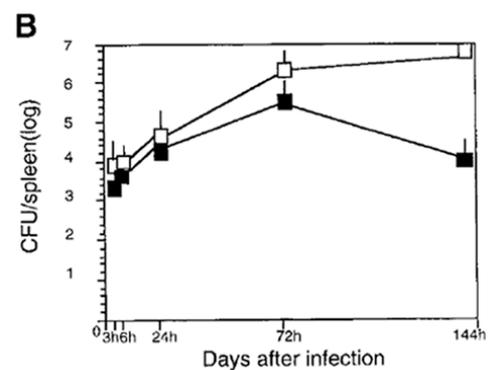
Des souris C57BL/6 et BALB/c sont infectées par injection intraveineuse avec *Listeria monocytogenes*, une bactérie gram + intracellulaire. Les auteurs étudient la survie des souris et la présence de bactéries dans leur rate. Les résultats sont présentés sur la **Figure 1**.

Question 1. Que peut-on conclure de cette expérience ?

Figure 1



□ : BALB/c ; ■ : C57BL/6

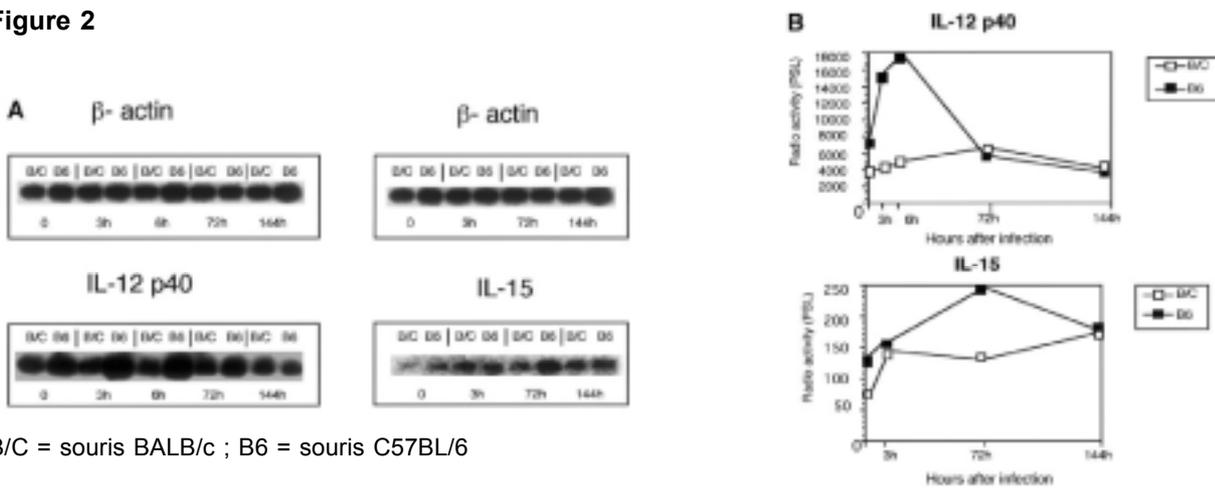


Afin de mieux comprendre la différence observée entre les deux lignées, les auteurs étudient les cytokines produites par les cellules dendritiques de ces souris.

Pour cela, ils étudient par RT-PCR l'expression des ARNm de l'interleukine 15 et de la sous unité inductible de l'interleukine 12 (IL12p40). Les ARNm sont amplifiés par RT-PCR et analysés (**Figure 2A**) et quantifiés (**Figure 2B**) après migration sur gel et hybridation avec une sonde radioactive.

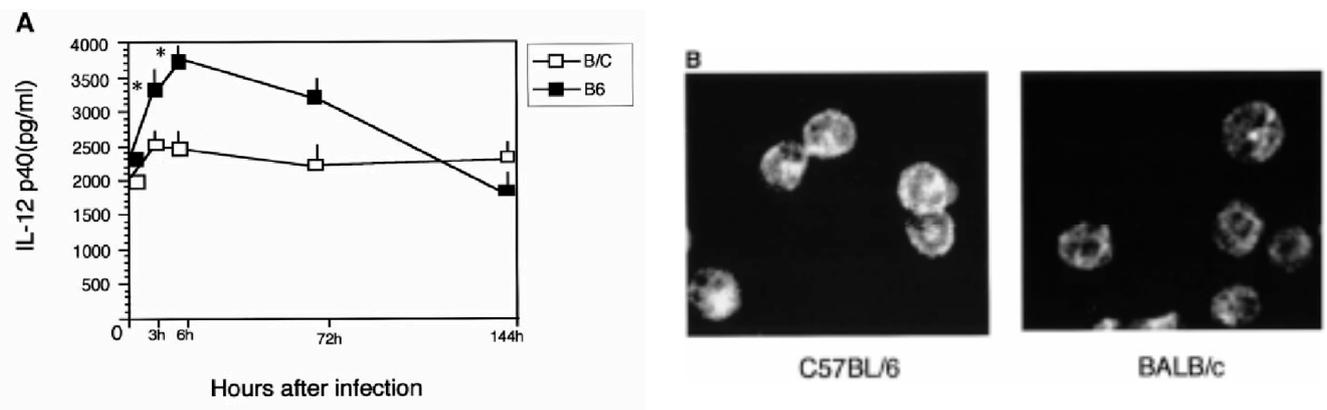
La production de ces cytokines est également étudiée au niveau protéique par ELISA (IL-12) (**Figure 3C**) ou immunofluorescence (IL-15) (**Figure 3D**).

Figure 2



B/C = souris BALB/c ; B6 = souris C57BL/6

Figure 3



B/C = souris BALB/c ; B6 = souris C57BL/6

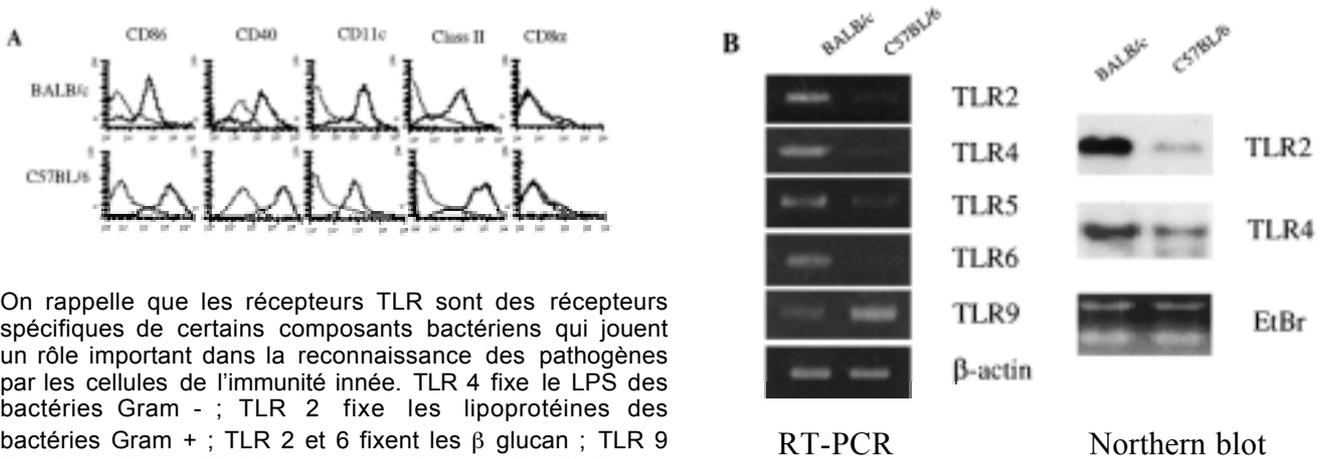
Question 2. Pourquoi étudier la production de cytokines par les cellules dendritiques ?

Question 3. Justifier le choix des cytokines étudiées et des techniques d'étude.

Question 4. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Les auteurs poursuivent la caractérisation des cellules dendritiques des deux lignées en étudiant différents marqueurs de surface et l'expression d'ARNm de différents récepteurs TLR (*Toll Like Receptor*). Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**.

Figure 4



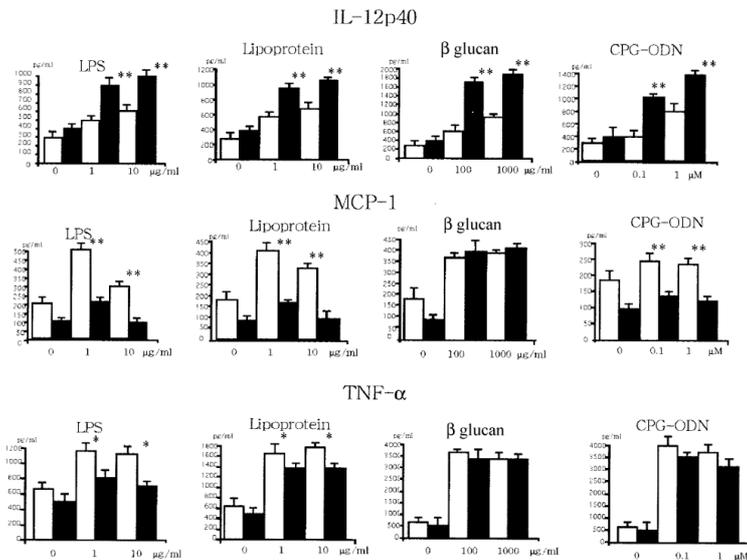
On rappelle que les récepteurs TLR sont des récepteurs spécifiques de certains composants bactériens qui jouent un rôle important dans la reconnaissance des pathogènes par les cellules de l'immunité innée. TLR 4 fixe les LPS des bactéries Gram - ; TLR 2 fixe les lipoprotéines des bactéries Gram + ; TLR 2 et 6 fixent les β glucan ; TLR 9 fixe les oligonucléotides portant des motifs CpG non méthylés.

Question 5. A partir de ces résultats, quelles hypothèses peut-on formuler pour expliquer les différences observées dans les Figure 2 et Figure 3 ?

Les auteurs étudient par ELISA la production de cytokines par les cellules dendritiques des deux lignées de souris en présence de différents composants bactériens (les cellules dendritiques sont produites à partir de souris naïves et stimulées *in vitro* par les différents produits bactériens indiqués). Les résultats sont présentés dans la Figure 5.

Figure 5

BALB/c □
C57BL/6 ■



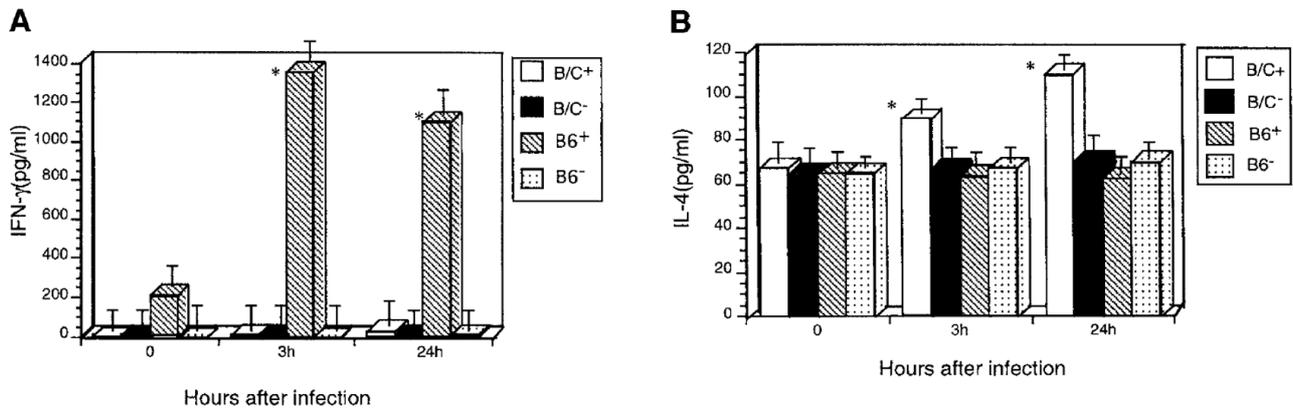
Question 6. Peut-on relier ces résultats aux résultats précédents ?

Question 7. Quelles hypothèses peut-on faire sur les résultats observés lors d'une infection avec *Listeria monocytogenes* ?

Question 8. Quelles seront les réponses des deux types de souris à d'autres infections bactériennes ?

Les auteurs étudient enfin par ELISA la production de cytokines par les lymphocytes T issus de la rate de souris infectées ou non par *Listeria monocytogenes*. Les résultats sont présentés dans la **Figure 6**.

Figure 6



B/C+ : BALB/C infectées
 B/C- : BALB/C non infectées
 B6+ : C57BL/6 infectées
 B6- : C57BL/6 non infectées

Question 9. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Question 10. Relier les différents résultats obtenus pour expliquer la différence de sensibilité à l'infection par *Listeria monocytogenes* des deux lignées de souris étudiées.

II.

(d'après Stäger S. et al. (2003) *Nature Medicine* 9:1287 – 1292)

L'importance des cellules T CD8⁺ dans la protection de l'hôte contre des pathogènes intracellulaires est reconnue, et le priming des cellules T CD8⁺ est nécessaire pour une vaccination efficace contre la leishmaniose. Bien que le projet de séquençage du génome indique pléthore de candidats potentiels pour la vaccination, peu de critères existent pour les sélectionner, et le choix de l'antigène reste empirique. De plus, une vaccination efficace nécessite de cibler l'antigène au CHM de classe I et un environnement cytokinique favorisant le priming et la différenciation des cellules T CD8⁺.

La capture des complexes immuns par les récepteurs pour les portions Fc des Igs (FcR) facilite la présentation antigénique restreinte par le CMH I, ce qui suggère que l'efficacité de vaccination peut-être améliorée par une immunisation avec des complexes immuns préformés. Les souris déficientes pour le composant C3 du complément (C3^{-/-}) ont une réponse T cytotoxique faible à une infection par le virus influenza et le virus de la chorioméningite lymphocytaire.

Les anticorps naturels IgM, IgG and IgA sont présents chez les individus sains et chez d'autres espèces animales. Ils sont de faible affinité comparé aux anticorps produits pendant la réponse immunitaire, et ont une réactivité large vis-à-vis d'antigènes du soi. La plupart des anticorps naturels sont produits par les cellules B B1, qui ont la capacité d'auto-renouvellement, et qui sont surtout localisés dans le péritoine. Ces anticorps naturels peuvent servir de récepteurs pour la reconnaissance innée de composants des parois des certaines bactéries.

La protéine HASP (« Hydrophilic acylated surface protein ») B-1, un membre d'une famille de protéines exprimées pendant les stades infectieux du parasite *Leishmania*, a été récemment identifiée comme candidat pour la vaccination contre la leishmaniose viscérale. L'immunisation avec la protéine HASPB-1 recombinante induit des cellules T CD8⁺ spécifiques de l'antigène et une protection à long terme, ce qui est caractéristique des vaccins ADN.

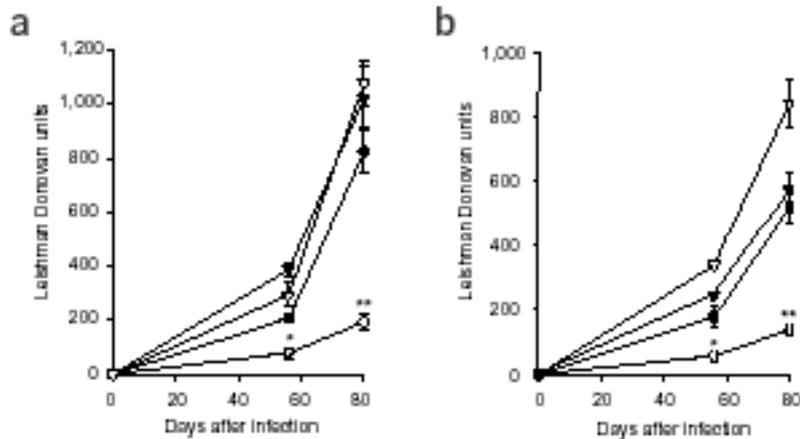
Des souris de type sauvage, des souris déficientes pour l'IL-4 (IL-4^{-/-}) ou des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-4 (IL-4ra^{-/-}) ont été immunisées avec la protéine HASPB-1 recombinante et ont été infectées 3 semaines plus tard par *leishmania donovani*. Le bourgeonnement du parasite dans la rate a ensuite été déterminé à différents temps après l'infection (**Figure 7**).

Figure 7

Mesure du bourgeonnement du parasite dans la rate aux temps indiqués

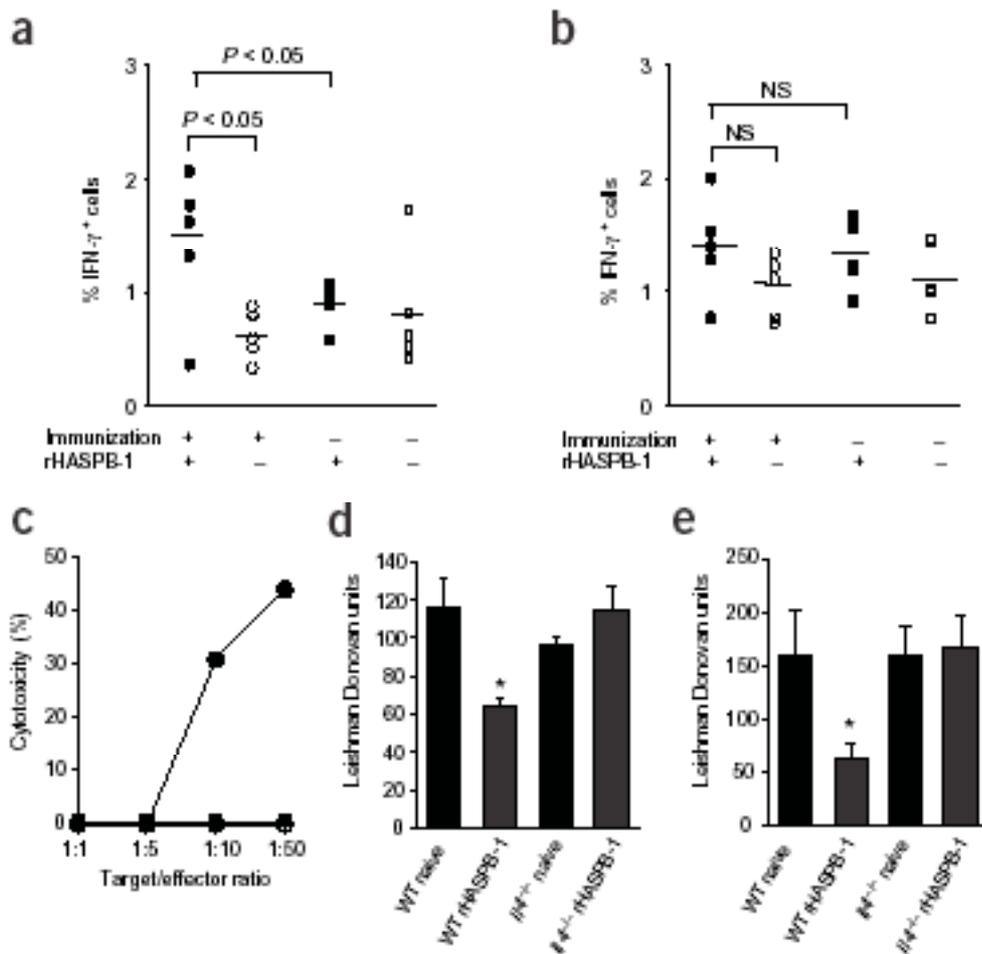
a : Souris contrôles (●▲) et souris vaccinées (○△) BALB/c (●○) et IL4^{-/-} (▲△) infectées par *leishmania donovani*.

b : Souris BALB/c (●○) et souris IL-4ra^{-/-} (▲△) infectées par *leishmania donovani*.



Les cellules spléniques ont été isolées de souris BALB/c ou de souris IL-4^{-/-} immunisées par HASPB-1 avant infection et re-stimulées *in vitro* avec la protéine HASPB-1. La fréquence de cellules productrices d'IFN- γ a été déterminée (**Figure 8 a et b**), l'activité cytotoxique des cellules T CD8⁺ spécifiques de la protéine HASPB-1 a été analysée *in vitro* (**Figure 8 c**) et la capacité de ces cellules T CD8⁺ à conférer une protection a été déterminée par transfert adoptif (**Figure 8 d et e**).

Figure 8



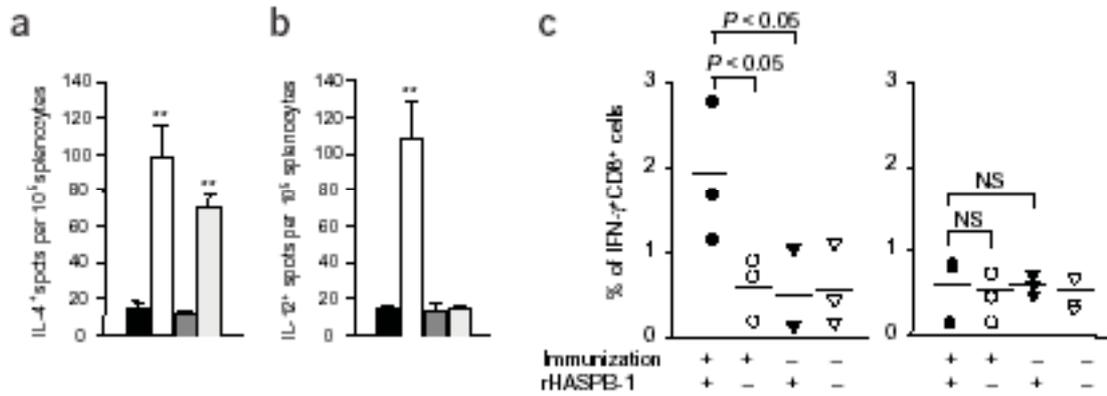
(a, b) Les cellules spléniques de souris BALB/c (a) ou de souris IL-4^{-/-} (b) immunisées par HASPB-1 (●○) ou par l'ovalbumine (■□) ont été cultivées en absence (○□) ou en présence (●■) de rHASPB-1 et le pourcentage de cellules T CD8⁺ produisant l'IFN γ a été déterminé. NS : non significatif.

(c) Activité cytotoxique des cellules T CD8⁺ de souris BALB/c (●○) ou de souris IL-4^{-/-} (■□) contre des cellules cibles contrôles (○□) ou contre des cellules cibles exprimant HASPB-1 (●■).

(d, e) Les cellules T CD8⁺ de souris BALB/c ou de souris IL-4^{-/-}, naïves ou vaccinées par HASPB-1 ont été transférées dans des souris receveuses BALB/c, et le bourgeonnement du parasite dans la rate (d) et dans le foie (e) a été déterminé 50 jours après infection des souris par le parasite leishmania.

Pour déterminer si l'injection de la protéine HASPB-1 induit la sécrétion d'IL-4 et d'IL-12, des souris BALB/c ou des souris déficientes pour le récepteur de l'IL-4 (IL-4ra^{-/-}) ont reçu une injection de la protéine HASPB-1 (Figure 9).

Figure 9



(a, b) Production d'IL-4 (a) ou d'IL-12 (b) par les cellules spléniques de souris BALB/c (■ □) ou de souris IL-4ra^{-/-} (■ ■) non traitées (■ ■) ou ayant reçu une injection de HASPB-1 (□ ■).

(c) Les cellules spléniques de souris C57BL/6 (gauche) ou de souris IL-12^{-/-} (droite) immunisées par HASPB-1 (● ○) ou par OVA (▲ △) ont été cultivées in vitro sans (○ △) ou avec (● ▲) HASPB-1 et la production d'IFN-γ par les cellules T CD8⁺ a été déterminée.

NS : Non significatif

Question 1. Commentez les résultats présentés sur les Figures 7 et 8. Indiquez les médiateurs et les cellules impliqués dans ce phénomène.

Question 2. Expliquez et discutez les techniques utilisées pour obtenir les résultats présentés dans les figures 8a, 8b ou 8c.

Question 3. Proposez une vue schématique du réseau de cytokines impliquées dans les réponses vaccinales.

La production d'IL-4 par les souris BALB/c contrôles ou par les souris IL-4ra^{-/-} naïves ou ayant reçu une injection de la protéine HSAPB-1 a ensuite été déterminée dans les différents types cellulaires (Figure 10 a, b). Pour mieux caractériser la réponse IL-4 par les cellules CD11b⁺, des expériences de RT-PCR en temps réel ont été réalisées (Figure 10 c). Enfin, des souris contenant le gène codant la protéine EGFP sous contrôle du promoteur de l'IL-4 (4get mice) ont reçu ou non une injection de la protéine HASPB-1, puis les cellules spléniques de ces souris ont été marquées avec un anticorps anti-CD11c et anti-CD11b (Figure 10 d) et analysées en cytométrie de flux. Dans une dernière expérience, des souris BALB/c naïves ou ayant reçu une injection de HASPB-1 ont été traitées avec des liposomes contenant ou non du clodronate (on précise que ce traitement induit sélectivement l'apoptose des cellules phagocytaires mononuclées), ou bien ont reçu une injection de l'anticorps anti-cKit. L'IL-4 a été dosée de cellules spléniques isolées après ces différents traitements (Figure 10 e, f).

Figure 10

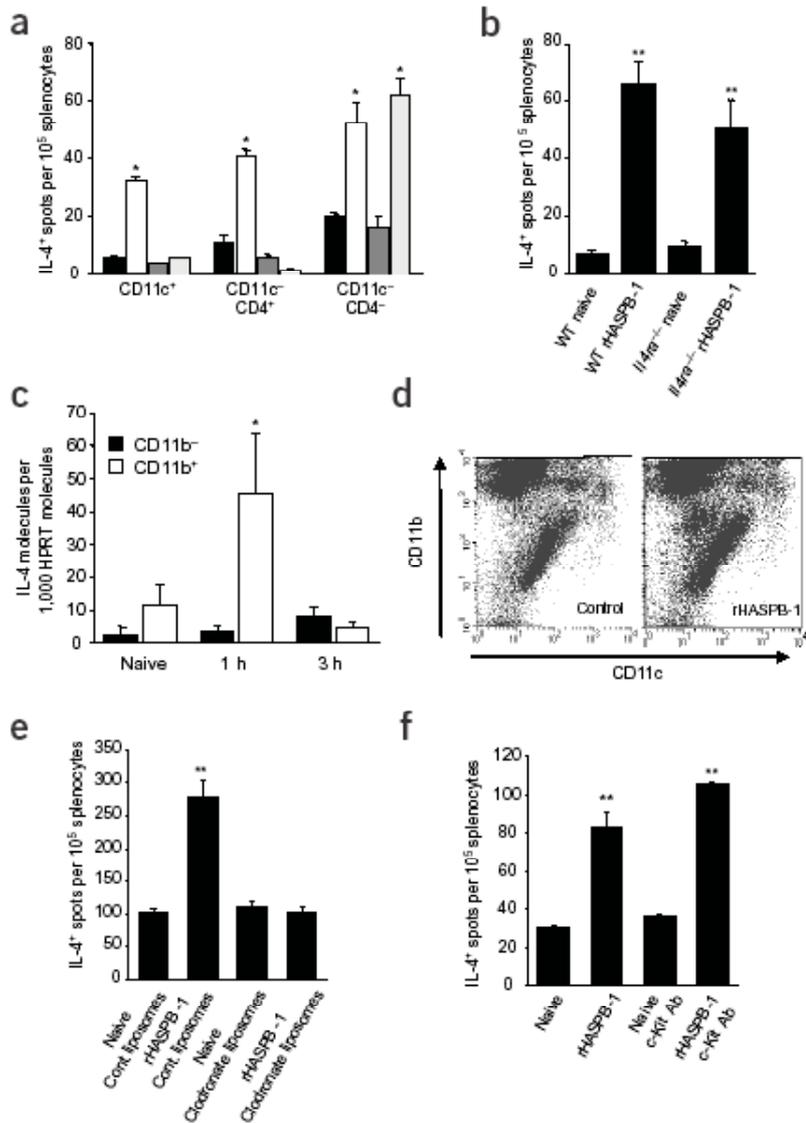
(a) Détection de la sécrétion d'IL-4 par différentes populations de cellules spléniques triées de souris contrôles BALB/c (noir) ou IL-4ra^{-/-} (gris foncé) ou de souris immunisées par HASPB-1 BALB/c (blanc) ou IL-4ra^{-/-} (gris clair).

(b) Détection de la sécrétion d'IL-4 par les cellules CD11b+

(c) Détection de la production d'IL-4 par PCR en temps réel par les cellules CD11b⁻ ou CD11b⁺ après injection de HASPB-1 aux souris.

(d) Double marquage CD11b/CD11c de cellules spléniques EGFP⁺ de souris contrôle (gauche) ou de souris ayant reçu 3h avant le prélèvement de la rate une injection de HASPB-1 (droite).

(e, f) Détection de la sécrétion d'IL-4 par les cellules spléniques de souris BALB/c naïves ou de souris ayant reçu une injection de HASPB-1. Les cellules spléniques ont été traitées avec des liposomes contenant ou non du clodronate (e), ou avec un anticorps anti-c-Kit (f).

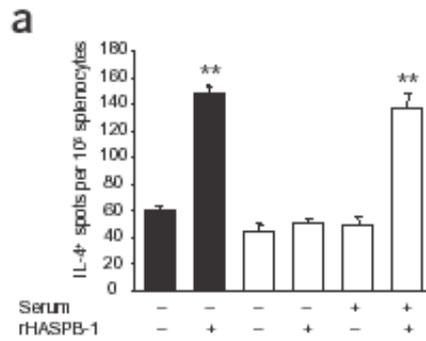


Question 4. Quelles cellules sécrètent l'IL-4 ? Expliquez.

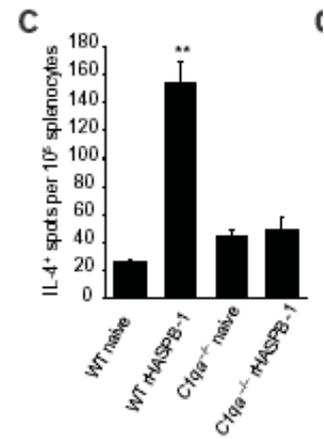
La production d'IL-4 a ensuite été étudiée dans des souris SCID immunisées ou non par la protéine HASPB-1, ayant reçu ou non du sérum de souris BALB/c (Figure 11 a), et dans des souris déficientes pour la protéine C1q (C1qa^{-/-}) immunisées ou non par la protéine HASPB-1 (Figure 11 c). La production d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺ des souris C1qa^{-/-} a été mesurée après immunisation des animaux par la protéine HASPB-1 ou par l'ovalbumine (Figure 11 e et f).

Figure 11

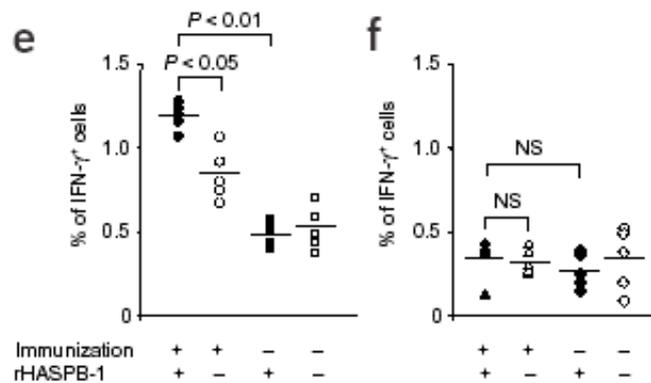
(a) Détection de la production d'IL-4 par les cellules spléniques de souris BALB/c (barres noires) ou de souris SCID (barres blanches) ayant ou non reçu une injection de HASPB-1. Les souris SCID ont également reçu ou non du sérum de souris BALB/c.



(c) Détection de la production d'IL-4 par les cellules spléniques de souris C57BL/6 de type sauvage (WT) ou de souris déficientes pour le C1q (C1qa^{-/-}) ayant ou non reçu une injection de HASPB-1.



(e,f) Détection de la production d'IFN-γ par les T CD8⁺ de splénocytes de souris C57BL/6 (e) ou de souris C1qa^{-/-} (f) immunisées avec HASPB-1 (ronds et triangles) ou avec l'ovalbumine (carrés et losanges), et ayant ou non été re-stimulées in vitro par HASPB-1 (rHASPB-1).



Question 5. Les cellules T et B sont-elles impliquées dans la production d'IL-4? Pourquoi? Quelle expérience clé a permis cette démonstration?

Question 6. Les complexes immuns jouent-ils un rôle dans la production d'IL-4? Comment? Proposez un titre pour cet article.

IPP2005 TD-IPP 5 :
Infection par le VIH

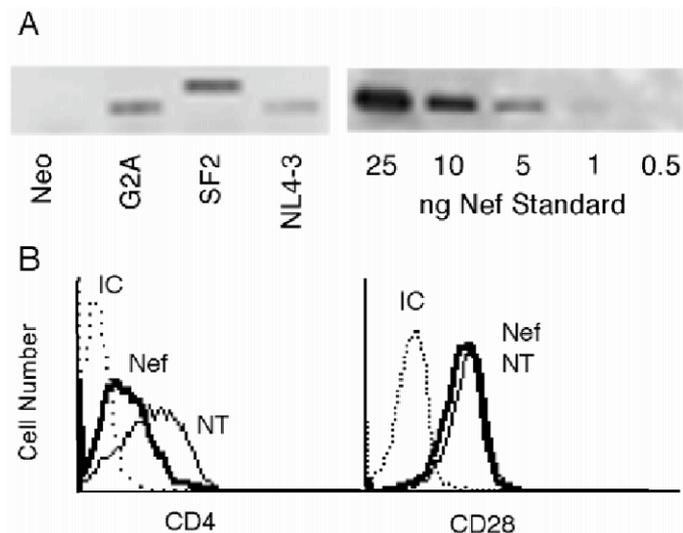
Infection par HIV

I.

(d'après Schragar *et al.* (1999) *P.N.A.S.* 96:8167)

La protéine virale Nef est exprimée précocement après infection par le VIH. Des études antérieures suggèrent que cette protéine est capable de promouvoir la réplication virale dans les cellules T. Ce processus nécessite que ces cellules T soient activées. Dans cette étude, on s'intéresse à l'effet de Nef sur l'activation des cellules T humaines. Des cellules de la lignée Jurkat (lignée de cellules T humaines) sont transduites par un vecteur rétroviral contenant le gène Neo (néomycine phosphotransférase, qui confère une résistance à la néomycine) seul, ou combiné à des protéines Nef du VIH myristylées (SF2 et NL43) ou mutante non myristylée (G2A). Les cellules transduites sont sélectionnées sur la base de leur résistance à la néomycine puis analysées. La **Figure 1A** montre le résultat d'une analyse par Western Blot de l'expression de Nef dans les cellules transfectées ($5 \cdot 10^6$ cellules par échantillon testé). La **Figure 1B** montre le résultat d'une analyse cytofluorométrique des cellules transfectées par SF2.

Figure 1



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Les cellules de Jurkat transduites sont activées par de la PMA (Phorbol Myristic Acetate à 10 ng/ml) et des anticorps anti-CD3 insolubilisés (1 μ g/puits), ou par PMA et PHA (Phytohémagglutinine 10 μ g/ml), ou par des anticorps anti-CD3 insolubilisés et des anticorps anti-CD28 solubles (0,33 μ g/puits). La sécrétion d'IL2 par ces cellules est mesurée par un test ELISA. Le résultat de cette expérience est montré sur la **Figure 2**.

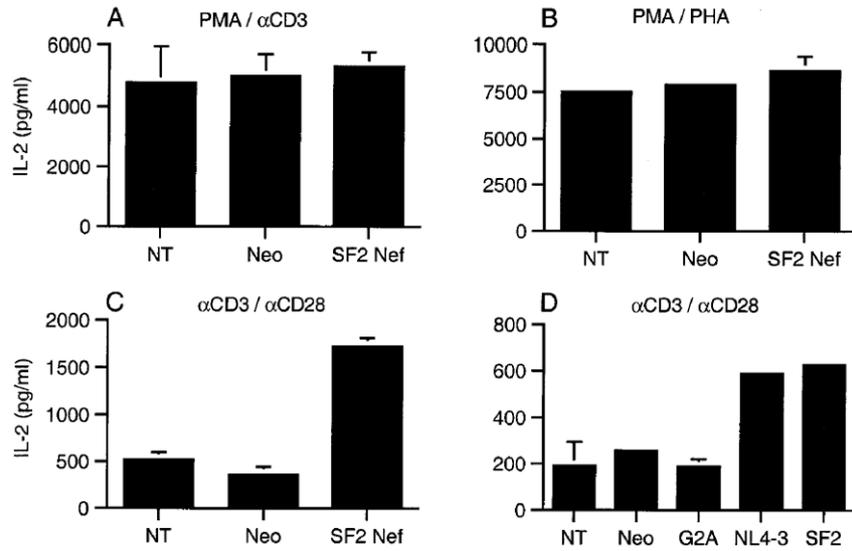
Question 2. Expliquez à quoi correspondent les différents modes de stimulation.

Question 3. Décrivez le test ELISA mis en œuvre dans cette expérience.

Question 4. Que peut-on conclure du résultat de cette expérience ?

Question 5. Quelles hypothèses peut-on formuler pour expliquer ce résultat ?

Figure 2



Les cellules transduites par NLA-3 (π), SF2 (\blacktriangleleft), G2A (\square) ou Neo ($'$) sont stimulées par anti CD3 + anti-CD28. L'activation cellulaire est mesurée par un test ELISPOT pour l'IL-2. Le résultat de cette expérience est montré sur la **Figure 3A**. La **Figure 3B** montre la corrélation entre le nombre de cellules activées et la quantité totale d'IL-2 sécrétée.

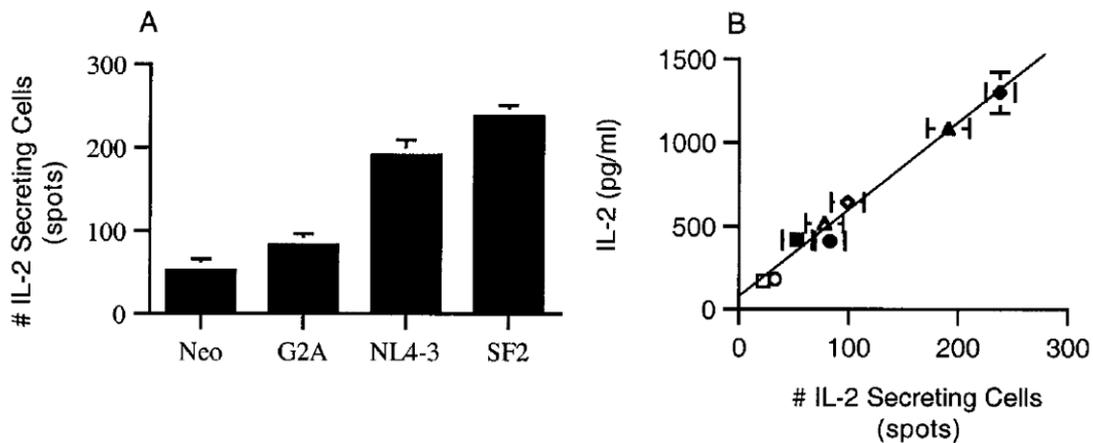


Figure 3

La quantité d'IL-2 sécrétée par chaque cellule activée est calculée. Elle est de 792 ± 236 fg pour les cellules transduites par le vecteur Neo contrôle, et de 547 ± 61 fg pour les cellules exprimant SF2.

Question 6. Ces résultats permettent-ils de préciser les hypothèses émises précédemment ?

Les mêmes expériences sont réalisées sur des lymphocytes T CD4 humains fraîchement isolés et transduits par les mêmes vecteurs. La **Figure 4A** montre le résultat d'une expérience de Western Blot sur ces cellules et la **Figure 4B**, l'analyse de ces cellules par cytométrie de flux.

Les cellules transfectées ou non (NT) sont stimulées par anti-CD3 + anti-CD28. La quantité d'IL-2 sécrétée par ces cellules après différents temps est mesurée par test ELISA. La **Figure 5** montre le résultat de cette expérience.

Question 7. Que suggère l'ensemble de ces résultats ?

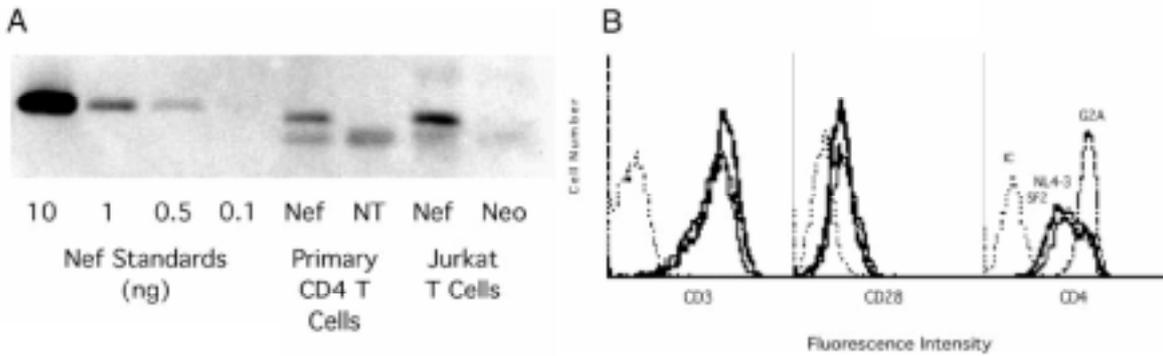
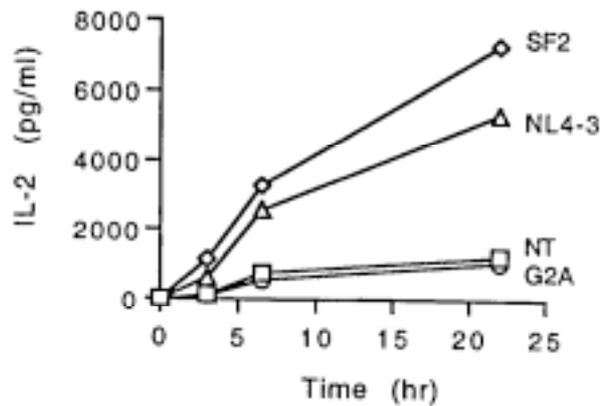


Figure 4

Figure 5



II.

(d'après De Maria *et al.* (1997) *P.N.A.S.* 94:10285 ; Cohen *et al.* (1999) *Immunity* 10:661)

Les KIRs (NK Inhibitory Receptors) sont des récepteurs inhibiteurs ayant pour ligands la molécule de classe I du CMH HLA-C, mais pas HLA-A ou HLA-B. On compte parmi ces récepteurs les molécules p58.1, p58.2, p70 et CD94/NKG2A. Ces récepteurs ont initialement été mis en évidence à la surface des cellules NK. Il a récemment été montré qu'une fraction des lymphocytes T α/β et γ/δ exprime ces récepteurs KIR, inhibiteurs de l'activation cellulaire. Dans cette étude, on s'intéresse à l'expression de ces récepteurs par les lymphocytes T de patients infectés par le VIH, et aux conséquences de leur expression. Le **Tableau 1** montre le pourcentage de cellules CD3⁺ du sang exprimant ces différents KIRs chez 14 patients infectés par le VIH.

Les lymphocytes T du patient 2 sont purifiés à partir d'un prélèvement de sang. On mesure l'activité cytotoxique de ces cellules non fractionnées, ainsi que celle des lymphocytes T CD8 purifiés à partir de cet échantillon sur des cellules cibles autologues infectées exprimant les protéines gag, pol, env et nef du VIH. L'activité cytotoxique est mesurée en absence (hachuré) ou en présence (noir) d'anticorps anti-p58.2. Le résultat de cette expérience est présenté sur la **Figure 6**.

La même expérience est réalisée avec deux clones (Sa 20 et Ni 15) de lymphocytes T CD3⁺p58.2⁺, dérivés respectivement à partir des patients 2 et 5. Le résultat de cette expérience est présenté sur la **Figure 7**.

La lignée de cellules 221 est une lignée de cellules T CD4. Ces cellules sont manipulées génétiquement de façon à exprimer, de façon stable, différentes molécules de CMH I (A2, B2705, Cw4). Les différentes lignées cellulaires obtenues sont infectées avec la souche NL-PI du virus HIV qui porte le gène reporter de la phosphatase alcaline placentaire (PLAP). Les cellules infectées expriment à leur surface la protéine PLAP. 48 heures après l'infection, on réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux sur ces cellules avec un anticorps anti-CMH I (qui reconnaît tous les types de molécules de CMH I) et un anticorps anti-PLAP. Le résultat de cette expérience est présenté sur la **Figure 8**.

Question 1. Que suggère l'ensemble de ces résultats ?

Tableau 1

Patient	% T de lymphocytes exprimant les NKR			
	p58.1	p58.2	p70	CD94/NKG2
1	24	34	32	18
2	11	12	13	12
3	2	3	3	4
4	2	9	9	5
5	ND	3	7	6
6	0	5	3	5
7	4	7	4	8
8	5	8	7	6
9	13	20	17	19
10	8	3	1	14
11	12	36	14	16
12	14	11	4	7
13	1	7	2	2
14	15	17	12	2

Figure 6

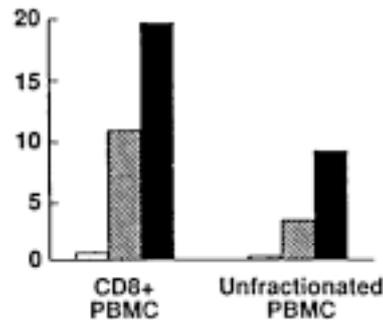


Figure 7

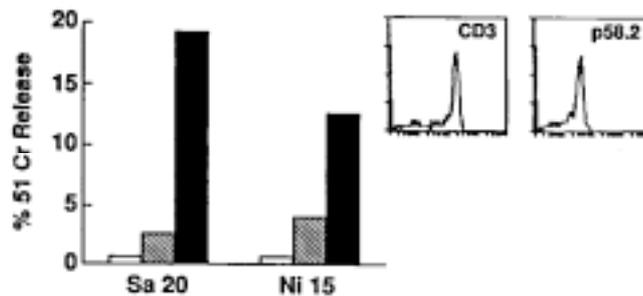
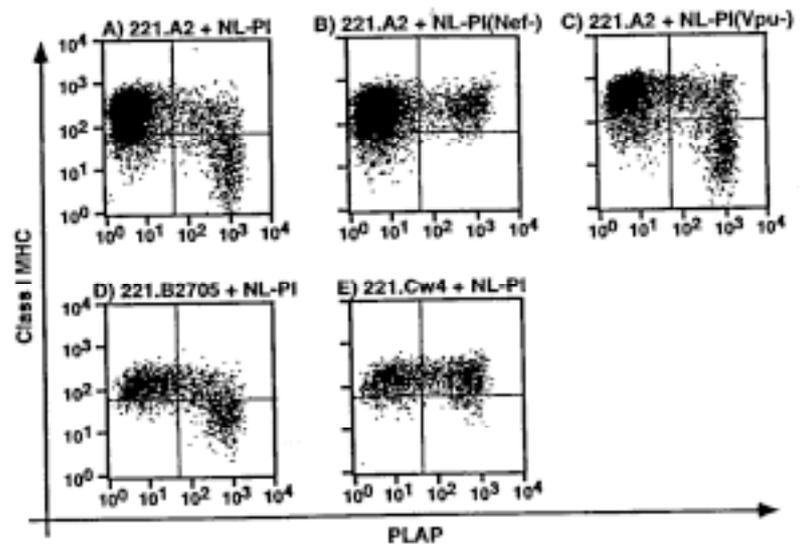


Figure 8



III.

(d'après Sol-Foulon *et al.* (2002) *Immunity* 16:145-155).

DC-SIGN, une lectine spécifique des cellules dendritiques favorise l'accrochage des lymphocytes T à la surface des cellules dendritiques. Cette fixation entre les lymphocytes T et ces cellules présentatrices d'antigènes professionnelles est un événement crucial dans l'initiation des réponses immunitaires. On étudie ici l'expression de DC-SIGN chez des cellules dendritiques infectées ou non par le VIH.

Des cellules dendritiques immatures ont été infectées par les souches de VIH NLAD8 et YU2, ou NLAD8 Δ nef et YU2 Δ nef pour lesquelles le gène *nef* a été délété. Sur la **Figure 9**, on observe en microscopie à fluorescence l'effet de l'infection des cellules dendritiques sur leur expression de DC-SIGN par comparaison à l'expression de la protéine virale Gag ; les cellules dendritiques non infectées (NI) servent de contrôle. Sur la **Figure 10** est observée en microscopie la fixation des lymphocytes T sur les cellules dendritiques infectées par différentes souches du VIH en présence ou non d'anticorps anti-DC-SIGN.

Figure 9

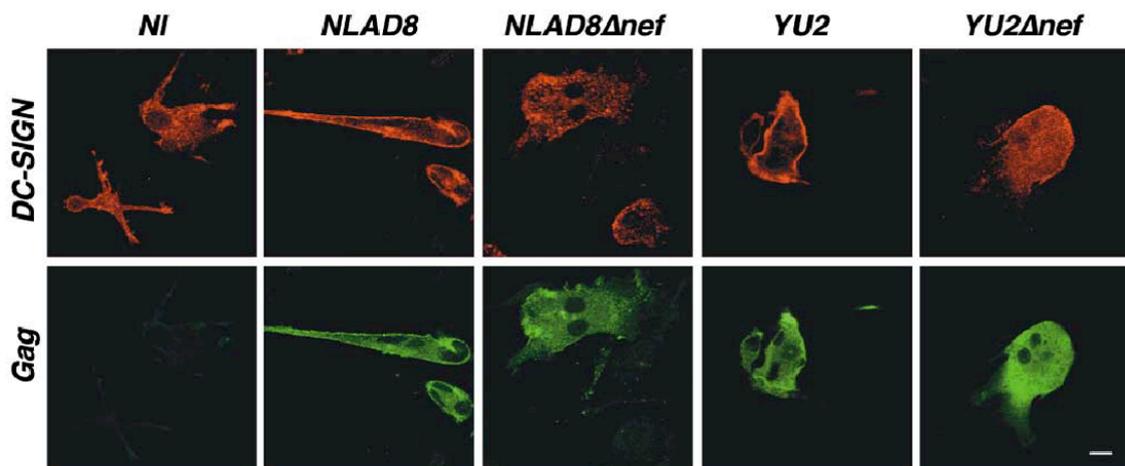
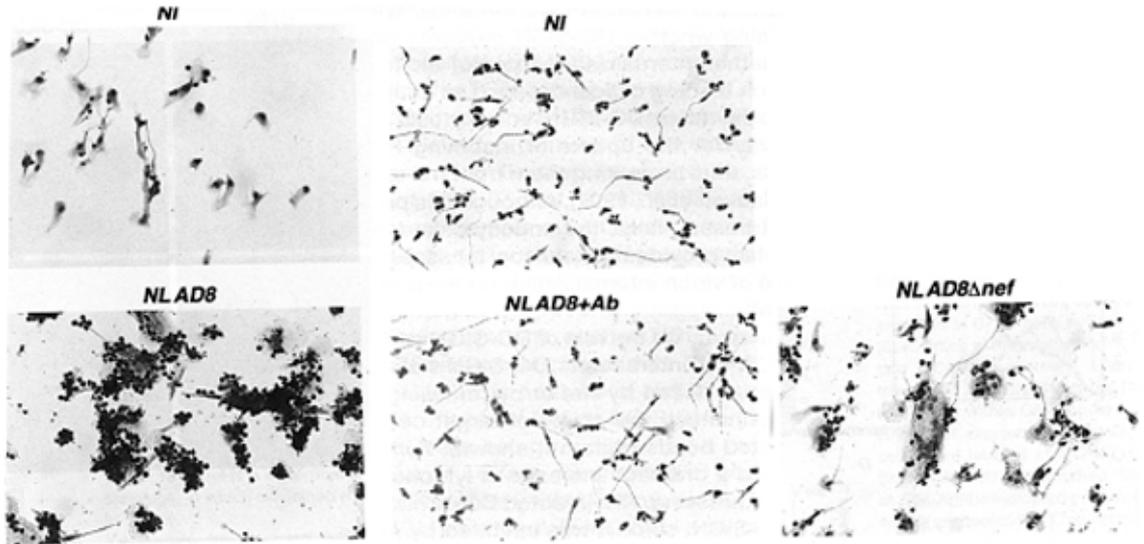


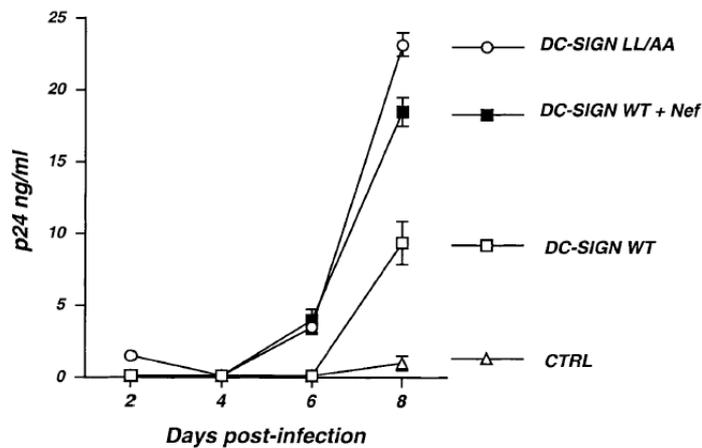
Figure 10



Question 1. Que concluez-vous de l'ensemble de ces résultats ?

Des cellules humaines HeLa, qui n'expriment pas CD4, ont été transfectées par un vecteur contrôle (CTRL), ou par un vecteur permettant l'expression de DC-SIGN sauvage (WT) ou de DC-SIGN WT plus Nef. Les cellules ont ensuite été exposées pendant 2 heures à du VIH (souche NL43), lavées puis incubées avec des lymphocytes T activés. La réplication virale a été mesurée dans les surnageants de culture, par dosage de la protéine virale p24 (Figure 11 ; on ne tiendra pas compte de la courbe « DC-SIGN LL/AA »).

Figure 11



Question 2. Les cellules HeLa peuvent-elles être infectées par le VIH ? Pourquoi ?

Question 3. Commentez les résultats de cette expérience.

IV.

(D'après Yamada T. *et al.* Blood. (2004), 172 : 2401-2406)

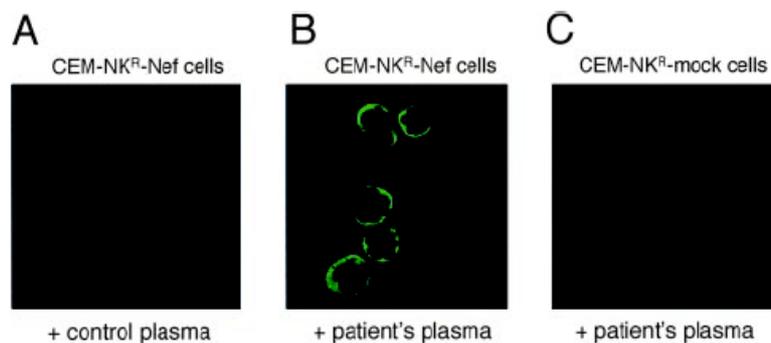
La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC « Ab-dependent cellular cytotoxicity ») et les activités cytotoxiques des lymphocytes T sont deux mécanismes qui jouent un rôle important dans la protection contre les infections virales. Dans le cas de l'infection par le VIH, l'ADCC peut inhiber la réplication 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 pathogénèse 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^R exprimant la protéine virale Nef (CEM-NK^R-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 ac secondaire anti-Ig humaine couplé à la fluorescéine. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale (**Figure 12**).

Figure 12



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Des cellules CEM-NK^R-Nef préalablement marquées au Cr⁵¹ 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 I**) ont ensuite été ajoutés aux cellules CEM-NK^R-Nef, pendant 4 heures, à 37°C.

L'émission de rayons γ dans les surnageants a ensuite été comptée avec un compteur gamma et les résultats de lyse spécifique des cellules sont déterminés (Figure 13).

Tableau 1

Table I. Patient profiles

Patient	Age	Sex	CD4 ⁺ Count (cells/ μ l)	CD8 ⁺ Count (cells/ μ l)	NK Cell Count (cells/ μ l)	% NK Cell in FBMC	HIV RNA (copies/ml) ^a	Antiretroviral Drugs ^b
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

^a Amplicor HIV monitor test (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ).

^b AZT, zidovudine; d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; ddC, zalcitabine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir.

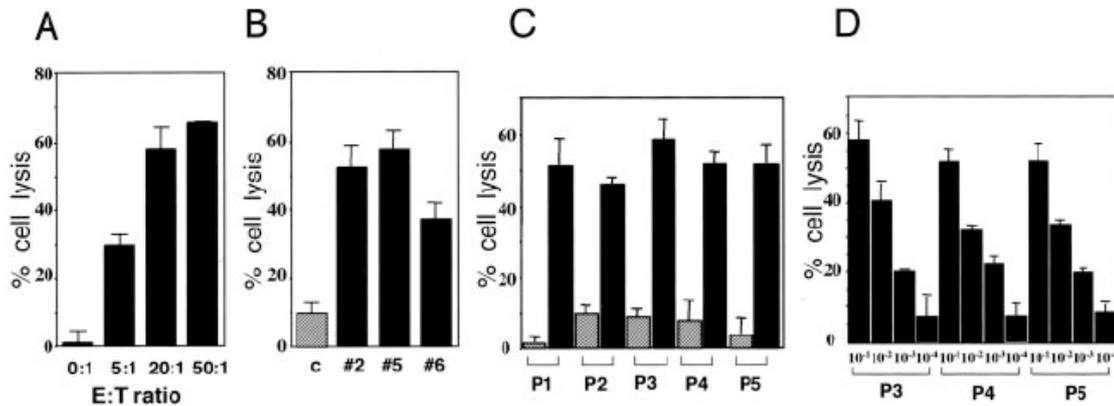


Figure 13

Les pourcentages de lyse spécifique sont calculés : $100 \times (\text{comptage échantillon} - \text{comptage relargage spontané}) / (\text{comptage maximum} - \text{comptage relargage spontané})$. 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?

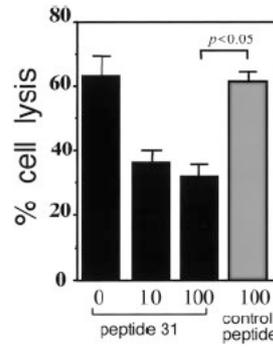
Question 3. Que permettent de mettre en évidence les expériences présentées dans la figure 2 ?

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

Dans l'expérience suivante, les auteurs ont incubé des cellules CEM-NK^R-Nef marquées au Cr⁵¹, 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 14).

Figure 14

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 mg/ml, colonnes noires) ou d'un peptide contrôle (100 mg/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 15**).

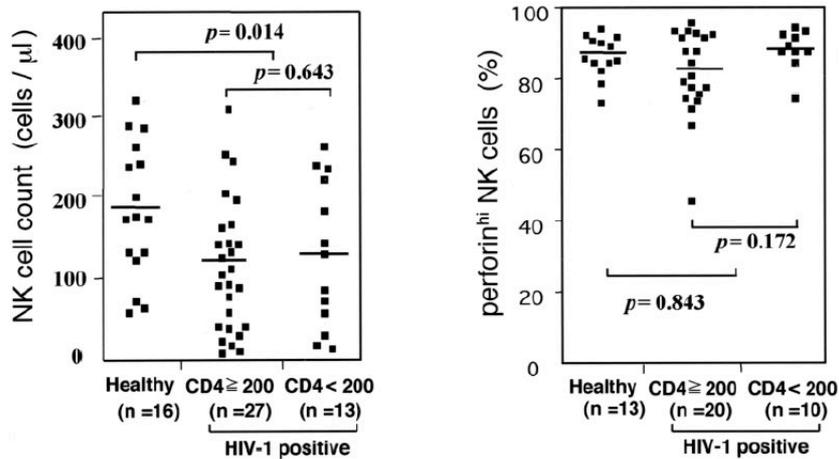


Figure 15

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 ml 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 ml de sang.

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

IPP2005 TD-IPP 6 :
Immunologie des tumeurs

Immunologie des tumeurs

I.

(d'après Byrne and Halliday (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:396 ; Byrne and Halliday (2003) *Int.J.Cancer* 106:736 ; Halliday and Le (2001) *Intern. Immunol.* 13:1147 ; Lucas and Halliday (1999) *Immunology* 97:130)

Les raisons pour lesquelles certaines tumeurs sont détectées par le système immunitaire et détruites alors que d'autres persistent et se développent, restent encore aujourd'hui inexplicables. L'immunogénicité propre des tumeurs mais également les mécanismes d'échappement développés par celles-ci jouent un rôle déterminant. Les auteurs ont ici étudié spécifiquement ces données dans différents modèles tumoraux utilisant deux types de lignées cellulaires tumorales dérivées de carcinomes : la première capable de se développer après injection chez la souris (désignée comme « progressive ») alors que la seconde (désignée comme « régressive ») est rejetée spontanément chez les souris immunocompétentes.

Les données dans les autres modèles tumoraux, notamment ceux des mélanomes, suggèrent fortement que le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans la régression des tumeurs. Dans ce sens, il a pu être mis en évidence chez la souris, par des techniques d'immunohistochimie, une infiltration importante des carcinomes « régressifs » par les cellules CD3⁺CD4⁺, en comparaison avec les carcinomes de type « progressifs ». Reste à comprendre les mécanismes favorisant ou limitant, selon le type de tumeur, la réponse anti-tumorale.

Les auteurs ont cherché à caractériser la nature du microenvironnement cytokinique au sein des tumeurs obtenues à partir de patients présentant un carcinome des cellules basales (BCC) de type progressif ou régressif. Les mécanismes effecteurs mis en œuvre pour la régression tumorale sont ainsi analysés. 10 tumeurs régressives vs 10 tumeurs non-régressives ont été analysées par une technique sensible de RT-PCR quantitative.

Question 1. *Décrivez le profil cytokinique observé dans les différents échantillons (Figure 1) et proposez des mécanismes effecteurs pouvant être impliqués dans la réponse anti-tumorale.*

Dans le cas des carcinomes, la réponse anti-tumorale primaire est déclenchée après activation des lymphocytes T naïfs par les antigènes tumoraux présentés par les cellules de Langerhans (LC) au niveau des ganglions lymphatiques drainants.

Les étapes d'infiltration des LC au niveau de la tumeur, leur migration jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires drainants apparaissent donc déterminantes pour le déclenchement des réponses immunitaires.

La migration des LC a pu être étudiée et visualisée par les auteurs après badigeonnage de la peau par du FITC (molécule fluorescente).

Question 2. *Déterminez à partir de la Figure 2, les facteurs influençant la migration des LC.*

Question 3. *Justifiez l'utilisation des souris nude (nu/nu) dans la Figure 3.*

Question 4. D'après les Figure 3 et Figure 4, donnez une explication quant à la différence d'évolution des deux types de tumeurs (progressives et régressives) chez les souris immunocompétentes.

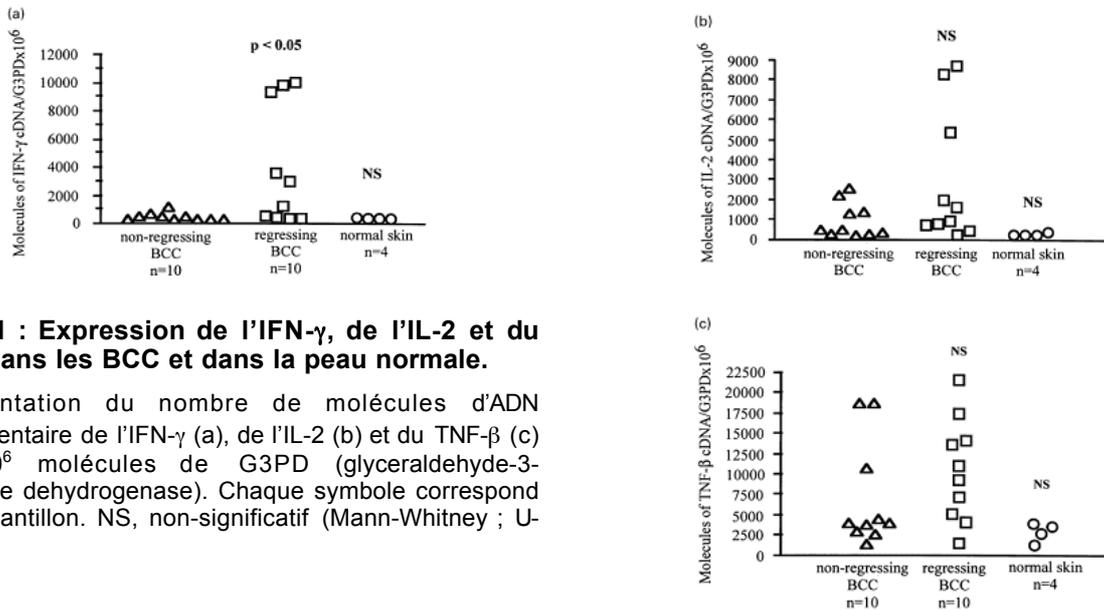


Figure 1 : Expression de l'IFN- γ , de l'IL-2 et du TNF- β dans les BCC et dans la peau normale.

Représentation du nombre de molécules d'ADN complémentaire de l'IFN- γ (a), de l'IL-2 (b) et du TNF- β (c) pour 10^6 molécules de G3PD (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Chaque symbole correspond à un échantillon. NS, non-significatif (Mann-Whitney ; U-test)

Figure 2 :

Les souris sont traitées pendant 5 jours avec une pommade contrôle ou contenant du surnageant tumoral récolté in vitro à partir des cultures des cellules de carcinome de type T7 (de type progressive). 24h après, les souris sont badigeonnées avec du FITC dilué à 0,5% dans un solvant. 18h plus tard, les feuilletts épidermiques sont prélevés, marqués par un anticorps spécifique du CMH-II. Après lecture du marquage, le pourcentage de migration des LC est déterminé pour chaque groupe par comparaison avec les souris badigeonnées avec du solvant seul.

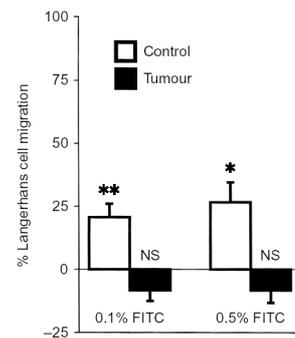


Figure 3 :

Différentes lignées de cellules tumorales « régressives » ou « progressives » sont injectées dans des souris BALB/c nu/nu. Lorsque les tumeurs atteignent 10mm de diamètre, la moitié des souris sont badigeonnées avec une solution FITC 1%, l'autre moitié avec du solvant seul. Les souris contrôles ne reçoivent pas de tumeur. La migration des LC est déterminée comme précédemment.

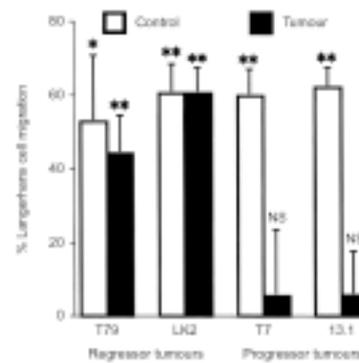


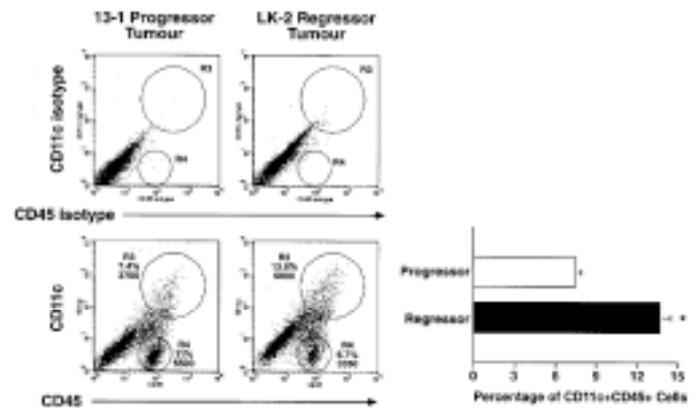
Figure 4 :

(A)

(A) Les cellules dendritiques infiltrant les tumeurs progressives ou régressives sont identifiées par cytométrie de flux à l'aide des anticorps spécifiques du CD11c et du CD45 (région R3). Les anticorps isotypiques sont utilisés en parallèle pour contrôler la spécificité des anticorps et placer correctement les fenêtres d'analyses.

(B)

(B) Le pourcentage moyen (n=7) de DC infiltrant les tumeurs est ici représenté.



De nombreuses cytokines, produites au niveau de la peau, sont connues pour agir sur la maturation et la migration des LC. Le TNF- α , l'IL-1 β , le GM-CSF et l'IL-10 peuvent toutes influencer la maturation ou la migration des LC.

Figure 5 :

(A) De la peau de souris est prélevée, l'épiderme est soit isolé immédiatement et marqué spécifiquement pour les LC (fresh), soit mis en culture pendant 3H en l'absence (cultured control) ou en présence de TGF- β à 50ng/ml (cultured TGF- β). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM des LC révélées dans l'épiderme.

(B) Des expériences identiques ont été réalisées avec de l'IL-10 (5 ng/ml).

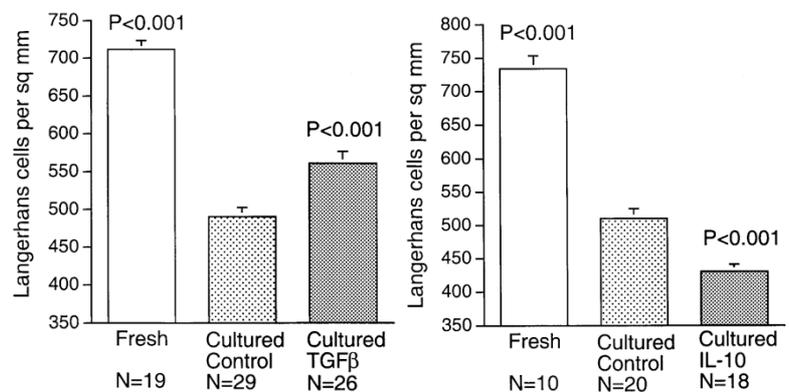
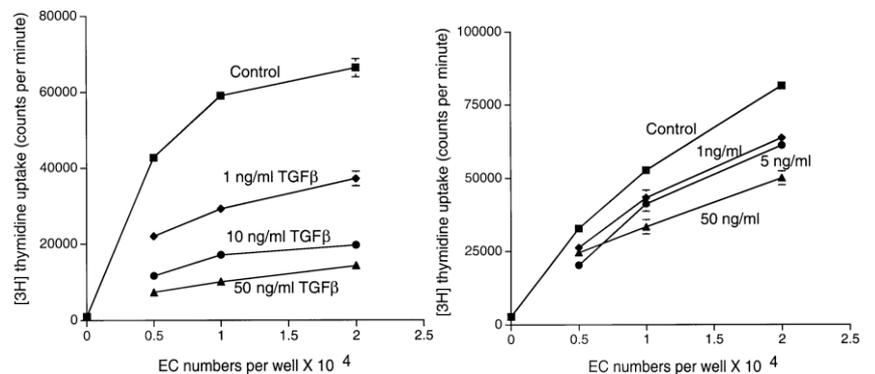


Figure 6 :

(A) Les cellules épidermales (EC) sont mises en culture, à des concentrations variables, pendant 3 jours en l'absence (contrôle) ou en présence de 1, 10 ou 50ng/ml de TGF-b1. Les cellules sont ensuite lavées plusieurs fois et co-cultivées en présence de splénocytes allogéniques déplétés en monocytes. La prolifération cellulaire est déterminée par incorporation de Thymidine tritiée. La moyenne est déterminée à partir de 12 cultures distinctes.

(B) Des expériences identiques ont été réalisées en présence de 1, 5 ou 50 ng/ml d'IL-10.



Question 5. Révélez, d'après les Figure 5 et Figure 6, l'action du TGF- β et de l'IL-10 sur la migration et l'état d'activation des cellules LC ?

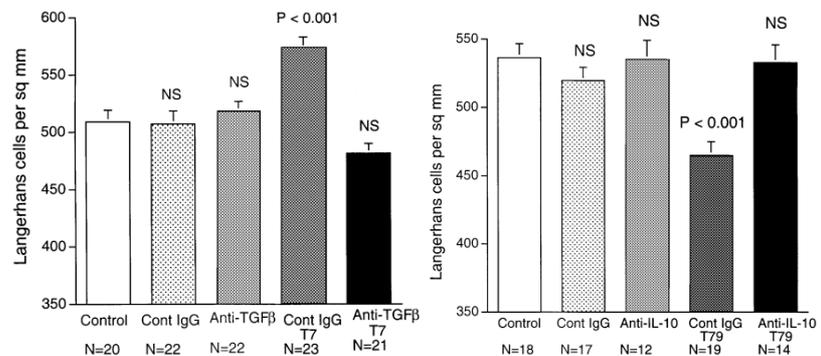
Question 6. Dans ce même type d'expérience, quel serait selon vous l'effet des anticorps spécifiques du TGF- β ou de l'IL-10 sur la prolifération des lymphocytes allogéniques mis en contact avec les cellules épithéliales allogéniques (traitées au préalable par les anticorps cités)?

Question 7. Proposez des expériences qui permettraient de caractériser le profil cytokinique spécifique des cellules tumorales de type progressives ou régressives.

Pour révéler directement l'action des cytokines sécrétées par les cellules tumorales (de type progressives ou régressives) sur les LC, les auteurs ont mis en culture des échantillons de peau en présence des surnageants obtenus à partir des cultures des lignées tumorales (**Figure 7**).

Figure 7 :

La peau est mis en culture pendant 3h en l'absence ou en présence du surnageant des lignées progressives T7 (A) ou des lignées régressives T79 (B). Les anticorps contrôles IgG de lapin ou ceux dirigés contre le TGF- β ou l'IL-10 sont ajoutés dans certaines cultures. Les feuilletts de l'épiderme sont ensuite isolés et marqués spécifiquement pour révéler les LC. La numération moyenne, calculée à partir de 3 expériences indépendantes, est ici représentée.



Il est maintenant établi que certaines cellules tumorales ont la particularité de pouvoir développer des mécanismes d'échappement au système immunitaire. Les auteurs se sont ici intéressés, dans leur modèle de tumeurs régressives ou progressives, aux mécanismes d'échappements éventuels et plus particulièrement à l'implication de FasL.

Figure 8 : Expression du CD80, CD86, Fas et MCH II par les cellules tumorales « progressives » et « régressives ».

Il est précisé que les cellules tumorales régressives prélevées chez la souris sont marquées plus fortement par l'annexin-V que les cellules tumorales progressives (résultats non-montrés ici)

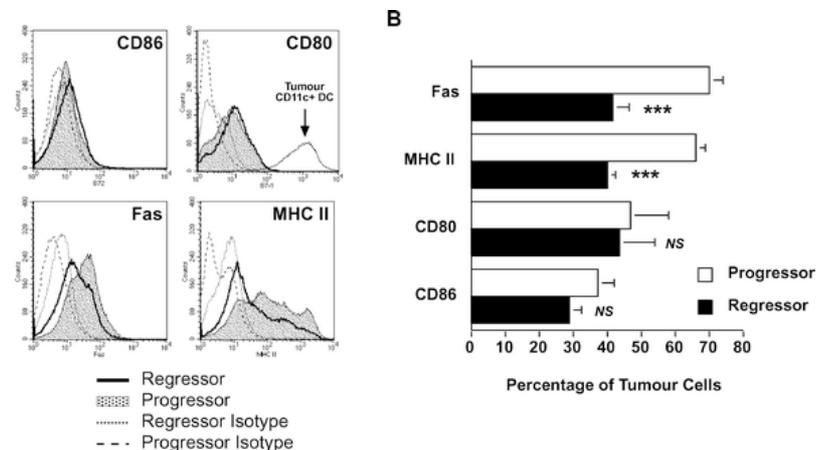
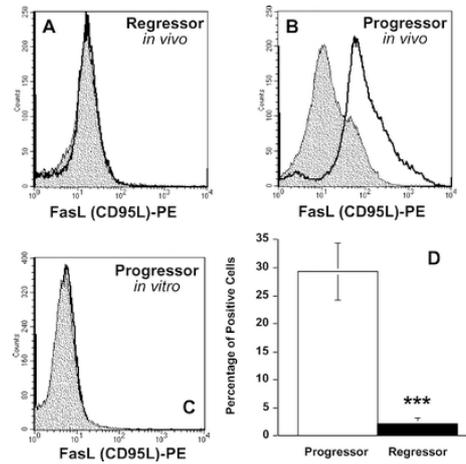


Figure 9 : Expression de FasL par les cellules tumorales « progressives » et « régressives ».



Question 8. *D'après les Figure 7, Figure 8 et Figure 9, précisez dans votre interprétation expliquant le caractère progressif ou régressif de ces tumeurs, les différents mécanismes et molécules impliqués.*

Question 9. *Expliquer la différence d'expression de FasL entre les cellules tumorales prélevées in vivo et celles in vitro (Figure 9). Proposez des expériences complémentaires cherchant à élucider cette différence.*

IPP2005 TD-IPP 7 :
Immunologie des tumeurs
Thérapeutiques immunologiques

Immunologie des tumeurs ; Thérapeutique immunologique

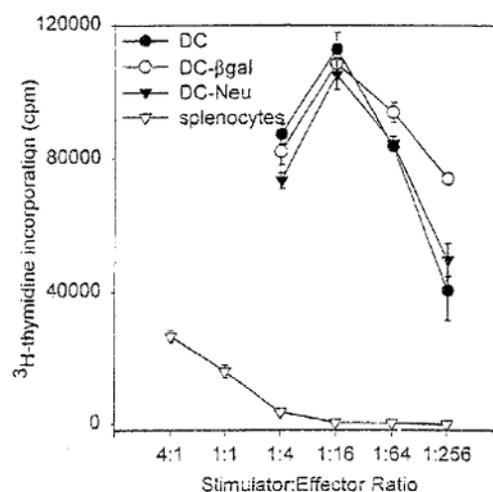
I.

On utilise dans cet exercice la protéine β -galactosidase comme modèle d'antigène tumoral. On transduit le gène de la β -gal dans des cellules de moelle osseuse de souris BALB/c (H-2^d) avec un rétrovirus contenant le gène codant pour LacZ ou le gène codant pour Neu (contrôle négatif). On cultive ensuite les DC en présence de GM-CSF et d'IL-4 de façon à obtenir des cellules dendritiques immatures. On teste leur capacité à stimuler des cellules T allogéniques par culture des DC irradiées en présence de cellules T de souris C57BL/6. On la compare à celle de DC non transduites ou de splénocytes de souris BALB/c. Au bout de trois jours, on mesure l'incorporation de thymidine tritiée. On obtient les résultats présentés à la

Figure 1 :

Figure 1

Allogeneic MLR of bone marrow-derived DCs and splenocytes. Bone marrow cells were transduced by coculture with retroviral producer lines, CreLacZ (DC- β -gal) and CreNeu (DC-Neu), and differentiated into DCs *in vitro*. DCs were cocultured with allogeneic, C57BL/6 T cells, isolated from bulk splenocytes by passing cells through an immunoaffinity column. After 3.5 d in culture, cells were pulsed with [³H]thymidine as described in Materials and Methods. Results from triplicate wells were corrected for [³H]thymidine incorporation by irradiated stimulators and T cells alone, and are plotted as the mean \pm SEM.

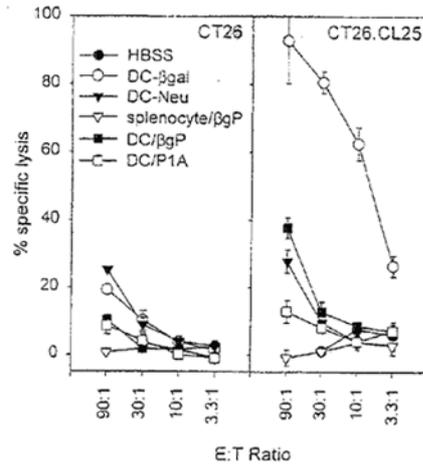


Question 1. Que concluez-vous ?

On teste ensuite la capacité des DC à induire des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) *in vivo*. Pour cela on injecte à des souris BALB/c aux jours 0 et 3 soit des DC pulsées avec le peptide 876-884 de la β -gal (β -gal pep) ou avec un peptide contrôle P1A, tous deux présentés sur L^d, soit des DC transduites β -gal (ou Neu), soit des splénocytes préalablement incubés en présence de β -gal pep. Trois semaines plus tard, on prélève les splénocytes des souris et on les stimule *in vitro* avec β -gal pep. Au jour 7, on mesure l'activité cytotoxique des cellules vis-à-vis de cellules tumorales transfectées avec LacZ (CT26.CL25) ou non transfectées (CT26) et marquées au ⁵¹Cr. On obtient les résultats présentés à la Figure 2 :

Figure 2

Lysis of tumor targets by CTLs from mice immunized with transduced (DC-β-gal and DC-Neu) or peptide-pulsed DCs (DC-βgP and DC-P1A) or peptide-pulsed splenocytes (splen-βgP). Splenocytes from immunized animals were harvested, restimulated in vitro for 7 d with the L⁴-restricted β-gal peptide₃₇₁₋₃₈₄, and mixed in graduated doses with 5×10^3 ⁵¹Cr-labeled target cells. Cells were incubated for 4 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. ⁵¹Cr released from the lysed target cells was measured. Results are plotted as the mean percent specific lysis ± SEM.



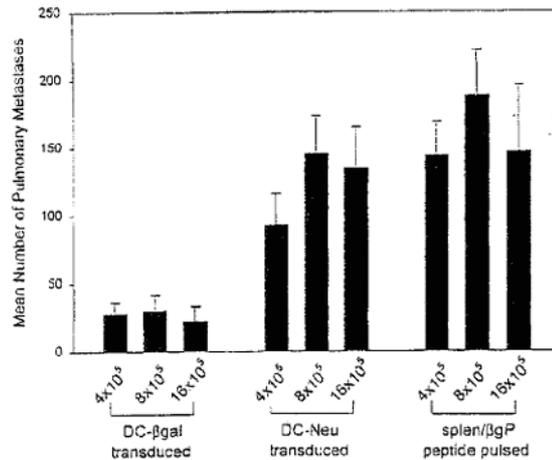
Question 2. Que concluez-vous ?

Question 3. Quel types de présentation antigénique peuvent intervenir dans ce modèle de DC transduites ?

On étudie ensuite la capacité des DC à inhiber l'apparition des métastases pulmonaires chez des souris BALB/c injectées avec des cellules de cancer du colon transfectées avec LacZ (CT26.CL25). Pour cela on injecte les cellules tumorales au jour 0 par voie intraveineuse, les DC au jour 3 et 6 et on mesure le nombre de métastases pulmonaires au jour 12. On obtient les résultats présentés à la Figure 3 :

Figure 3

BALB/c mice were challenged with 3×10^5 CT26.CL25 tumor cells. On days 3 and 6 after tumor challenge, mice received intravenous injections of transduced DCs or fresh peptide-pulsed splenocytes at varying doses ($4-16 \times 10^5$). On day 12 after tumor challenge, lungs were harvested and pulmonary nodules were enumerated in a blinded fashion.



Question 4. Que concluez-vous ?

Question 5. Quels sont les mécanismes qui peuvent expliquer l'activité des DC à empêcher la formation de métastases ?

Question 6. Pourquoi les DC sont-elles plus actives que les splénocytes ?

II.

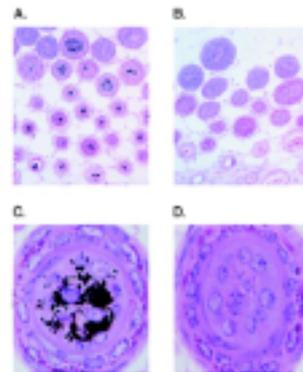
(d'après Overwijk et coll. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2982-2987 ; Xiang et coll. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 5492-5497 ; Janetzki et coll. (2000) Int. J. Cancer, 88, 232-238)

De nombreux antigènes tumoraux humains ou murins sont en réalité des antigènes normalement exprimés au cours de la différenciation. Le système immunitaire est par conséquent a priori tolérant vis-à-vis de ces antigènes, considérés comme antigènes du soi. Les expériences suivantes visent à décrire des stratégies vaccinales ayant pour but d'induire une réponse immunitaire contre de tels antigènes exprimés à la surface de tumeurs, ainsi que les conséquences sur la tolérance.

Des souris de pelage noir sont vaccinées avec un virus de vaccine recombinant exprimant l'antigène TRP-1 (rVVmTRP-1), un antigène de différenciation des mélanocytes, ou un antigène contrôle LacZ (rVVLacZ). Les souris vaccinées par rVVmTRP-1 présentent une dépigmentation du pelage similaire à celle observée chez des patients atteints de mélanomes et traités par l'IL-2 qui développent un vitiligo, une maladie auto-immune de la peau caractérisée par une perte de la pigmentation suite à la destruction des mélanocytes. Une analyse histologique de la peau des souris vaccinées par rVVmTRP-1 ou rVVLacZ est montrée sur la **Figure 4** :

Figure 4 :

Immunization with rVVmTRP-1 induces destruction of cutaneous melanocytes. Mice were vaccinated twice with rVVmTRP-1 (B and D) and developed a patchy and permanent loss of coat color pigmentation. Histologic comparison is with mice receiving control virus rVVLacZ twice (A and C). [Magnifications: x10 (A and B) and x100 (C and D).]



Les souris ainsi vaccinées sont testées pour leur susceptibilité au développement d'une tumeur de mélanome (B16). Les résultats sont présentés sur la **Figure 5**.

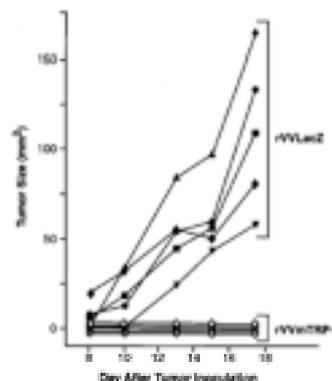
Le sérum de souris « normales », ou déficientes en molécules du CMH de classes I ou II, de même fonds génétique, vaccinées par rVVmTRP-1 ou rVVLacZ, est ensuite testé vis-à-vis de lysats cellulaires de la tumeur B16 ; les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

L'effet protecteur contre le développement de la tumeur B16 chez les souris vaccinées par rVVmTRP-1 est à nouveau testé chez des souris déficientes en molécules du CMH de classes I ou II. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

Question 1. Analysez et interprétez l'ensemble de ces résultats

Figure 5 :

Immune responses to the normal melanocyte antigen mTRP-1 can prevent melanoma growth. Mice vaccinated with $2 \cdot 10^7$ plaque-forming units of either rVVLacZ or rVVmTRP-1 and boosted 3 weeks later were challenged with $1 \cdot 10^5$ B16 s.c. after an additional 3 weeks. Mice receiving rVVmTRP-1 developed vitiligo and completely rejected tumor challenge. The experiment was repeated three times with similar results.



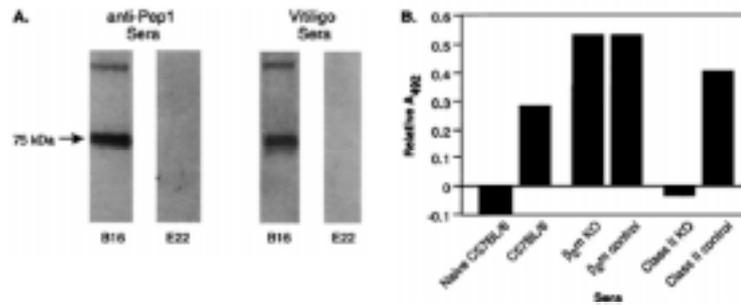


Figure 6 :

Sera from mice immunized with rVvMTRP-1 recognizes mTRP-1 in melanoma cells. (A) Lysates from B16 melanoma (lanes 1 and 3) and E22 thymoma cells (lanes 2 and 4) were subjected to SDS-PAGE, and stained with the mTRP-1 peptide-specific rabbit sera, αPEP1 (lanes 1 and 2), or sera from depigmented mice vaccinated twice with rVvMTRP-1 (lanes 3 and 4). Both sera specifically detected a 75-kDa TRP-1 band in lysate from B16 tumor, but not in lysate from TRP-1 negative E22 control tumor. (B) Induction of mTRP-1-specific antibodies depends on CD4⁺ T lymphocytes, MHC class II knockout mice, β2m knockout mice, and nontransgenic litter mates were immunized with 2.10⁷ plaque-forming units of either rVvLacZ or rVvMTRP-1 and boosted 3 weeks later. Sera from each group of mice were tested by ELISA. Nonspecific absorption of sera from mice immunized twice with rVvLacZ was subtracted. The experiment was repeated twice with similar results.

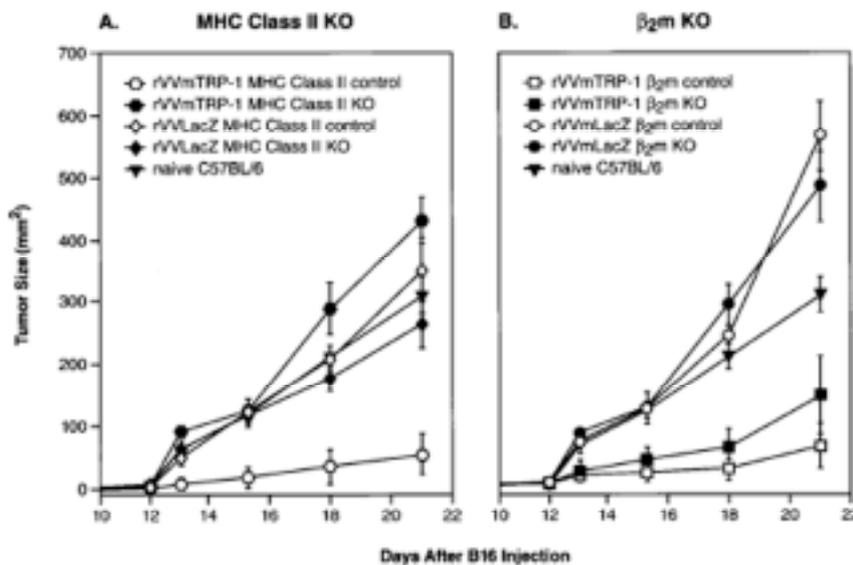


Figure 7 :

β2m knockout mice, MHC class II knockout mice, or respective nontransgenic litter mates were immunized with 2.10⁷ plaque-forming units of either rVvLacZ or rVvMTRP-1, boosted 3 weeks later and challenged with 1.10⁵ B16 s.c. after an additional 3 weeks. MHC class II knockout mice never developed vitiligo after immunization with rVvMTRP-1 when nontransgenic littermates did (A). In the same experiment, both β2m knockout mice and nontransgenic littermates receiving rVvMTRP-1 developed vitiligo (B).

Une autre stratégie de vaccination est mise en œuvre afin d’induire une réponse immunitaire contre la lignée de mélanome B16. Des bactéries *Salmonella typhimurium* atténuées sont transfectées avec un plasmide porteur de différentes constructions de vaccin ADN. *S.typhimurium* est ici utilisée comme vecteur pour délivrer l’ADN plasmidique dans les macrophages infectés.

10⁸ bactéries ainsi transfectées par des constructions plasmidiques codant les épitopes d’antigènes de mélanocyte gp100₂₅₋₃₃ et TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ de souris (pUb-M) ou humain (pUb-H) sont ajoutées à l’alimentation des souris trois fois à deux semaines d’intervalle. On précise que les épitopes gp100₂₅₋₃₃ de souris (EGSRNQDWL) et humain (KVPRNQDWL) sont présentés par H-2D^b ; les épitopes TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ de souris (VYDFFVWL) et humain (VYDFFVWL) sont présentés par H-2K^b. Les souris sont alors soumises à l’injection de 10⁵ cellules de la lignée de mélanome B16. Les résultats sont présentés sur la Figure 8.

Le rôle des lymphocytes CD8⁺ dans la protection contre la croissance de la tumeur de mélanome est testé dans une expérience de transfert à des souris *scid*. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la **Figure 9**. La fonction des cellules CD8⁺ est ensuite déterminée dans un test de cytotoxicité *in vitro* (**Figure 10**) et par dosage de l'IFN- γ sécrété (**Figure 11**).

Question 2. Analysez et interprétez les résultats de cette deuxième série d'expériences

Question 3. Comparez les résultats des deux séries d'expériences

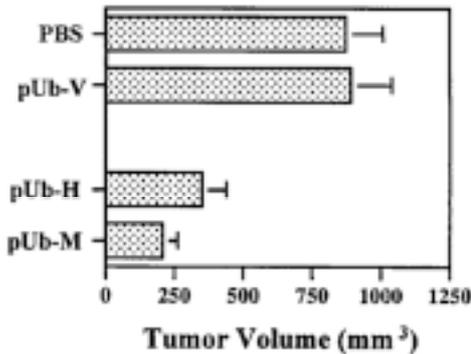


Figure 8

Induction of tumor-protective immunity. C57BL/6J mice (n=8) received three vaccinations of 10⁸ attenuated *S. typhimurium* harboring DNA vaccines by oral gavage at 2-week intervals. Experimental groups were immunized with vaccines encoding murine gp100₂₅₋₃₃ and TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ peptide epitopes (pUb-M), human gp100₂₅₋₃₃ and TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ epitopes (pUb-H). Control groups of mice (n=8) included those treated with PBS or a vaccine containing only the empty vector (pUb-V). Mice were challenged with 1.10⁵ B16 murine melanoma cells 1 week after the final vaccination. Bars represent means and standard deviations of eight mice per group. Differences in tumor volume between experimental groups treated with either pUb-M or pUb-H and all control groups were statistically significant (P<0.01).

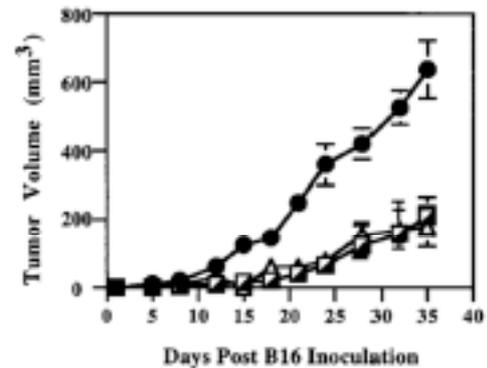


Figure 9

Horizontal transfer of tumor immunity by adoptive transfer of T lymphocytes. CD8⁺ T cells were isolated from C57BL/6J mice successfully immunized with pUb-M DNA vaccine or pUb-V empty vector control. All donor animals were killed 1 week after tumor cell challenge, and their CD8⁺ T cells were isolated from their pooled splenocyte suspensions. At 48h before *i.v.* challenge with 1.10⁵ wild-type B16 cells, naïve syngeneic SCID mice were reconstituted with a total of 4.5.10⁷ CD8⁺ T cells by *i.v.* injection of 1.5.10⁷ T cells on days 23, 21, and 13. Tumor growth was analyzed in mice receiving CD8⁺ T cells either from animals vaccinated with pUb-M (●) or pUb-H (▲) or from mice vaccinated with the empty vector control (◻). Tumor growth was determined by microcaliper measurements, and tumor volume was calculated according to 0.5 x width² x length.

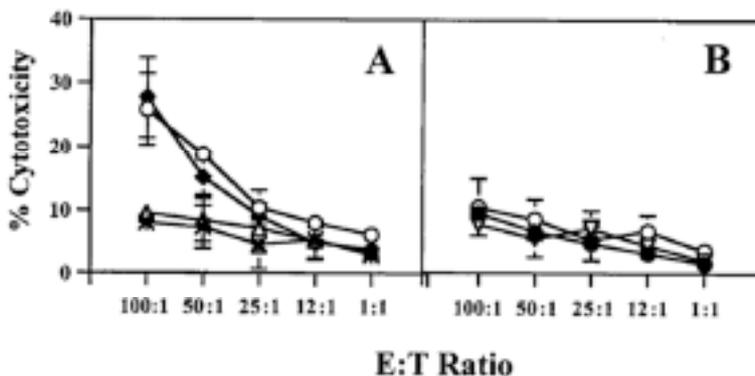


Figure 10

Cytotoxicity induced by CD8⁺ T cells of C57BL/6J mice against murine B16 melanoma cells after immunization with DNA vaccines

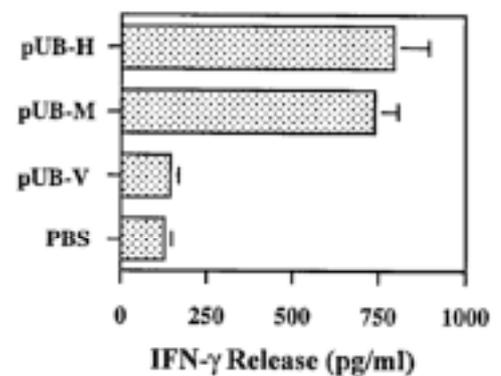


Figure 11

Cytokine release by CD8⁺ T cells isolated from splenocytes of C57BL/6J mice treated

encoding melanoma-specific epitopes. Splenocytes were isolated 1 week after the third vaccination, and CD8⁺ T cells were analyzed for their lytic activity in a 4-h ⁵¹Cr-release assay at different effector-to-target cell ratios (E:T) ratios.

(A) Specific lysis mediated by CD8⁺ T cells from different experimental groups of mice: pUb-H (μ), pUb-M (ν), empty vector pUb-V (ρ), and PBS (*).

(B) Lysis mediated by CD8⁺ T cells was blocked by anti-MHC class I antibody (H-2K^b/D^b) after immunization with the pUb-M (ν) and pUb-H (μ) DNA vaccines. Nonspecific syngeneic prostate cancer target cells (TRAMP-C1) were not lysed by pUb-M-specific CD8⁺ T cells (σ).

with DNA vaccines. Release of IFN- γ by CD8⁺ T cells isolated from splenocytes of C57BL/6J mice was measured by solid-phase sandwich ELISA. Splenocytes were obtained from mice immunized with either pUb-H or pUb-M DNA vaccines and from control mice treated with either PBS or the empty vector (pUb-V). Bars represent means and standard deviations of eight mice per group. Differences in IFN- γ release observed between experimental groups treated with either pUb-M or pUb-H and all control groups were statistically significant (P <0.01).

Le principe de vaccination par un antigène du soi pour induire une réponse anti-tumorale est appliqué dans un essai clinique chez l'homme. Les protéines HSP (*heat shock protein*) gp96 ont été isolées à partir de biopsies tumorales chez 16 patients atteints de tumeurs avancées réfractaires à la thérapie recommandée. Ces patients ont été immunisés, quatre fois à une semaine d'intervalle, de manière sous-cutanée, avec 25 μ g de protéine gp96 autologue. Les caractéristiques cliniques des patients sélectionnés sont présentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 :

Patients immunized with autologous tumor-derived gp96 preparations. Status of patients as of October 1999 is shown.

Patient	Age (years)	Sex	Tumor type and stage	Tumor volume used for vaccine (ml)	Toxicity	Clinical course of disease
AA	65	F	Pleural mesothelioma, stage III	8.5	None	Progression, death 14 months after immunization
AB	64	F	Pancreatic carcinoma, stage IV	4	Pain (G1), Fever (G1)	Progression, death 11 weeks after immunization
AC	71	F	HCC, stage III	3	None	Tumor necrosis to .50% of original size
			Breast carcinoma, stage IV	5	Hot flashes (G1) Hyperuricemia + Hyperpotassemia (G4) Kidney failure (G2)	Progression, death 3 weeks after immunization for breast cancer
AD	53	F	Adenocarcinoma of sigmoid colon, stage IV	22.5	Hot flashes (G1)	Disease-free since surgery (4 years), alive to date
AE	56	M	Poorly differentiated HCC, stage IV	5	None	Dropped out after 2 nd immunization
AF	39	M	Rectal carcinoma, stage IV	5	Pain (G1)	Progression, death 27 weeks after immunization
AG	48	M	Signet-cell carcinoma of cecum, stage IV	1	None	Progression, death 25 weeks after immunization
AH	42	F	Follicular thyroid cancer, stage IV	4	Hot flashes (G1)	Disease stabilization for 7 months, followed by progression, death 28 months after immunization
AI	32	F	Adenocarcinoma of transverse colon, stage IV	11	None	Progression, death 11 months after immunization
AJ	33	M	HCC, stage IVB	2	None	Disease-free for .2 years; reoccurrence; alive to date
AK	69	F	Poorly differentiated papillary thyroid cancer, stage IVB	3	None	Stabilization of disease for 13 weeks, followed by progression; alive to date
AL	53	M	Poorly differentiated adenocarcinoma of rectum, stage IV	8	None	Death after 2nd immunization
AM	25	F	Signet-cell carcinoma of stomach, stage IV	8	Neutropenia (G1)	Stabilization of disease for 6 months, followed by clinical signs of progression, death 11 months after immunization
AN	66	M	Adenocarcinoma of transverse colon, stage IV	10	Neutropenia (G1)	Stabilization of disease for 6 months, followed by progression, death 11 months after immunization
AO	56	F	Poorly differentiated adenocarcinoma of endometrium, stage IV	3	None	Progression, death 8 months after immunization
AP	71	F	Anaplastic thyroid cancer	8	None	Progression, death 19 weeks after immunization

L'activité anti-tumorale des cellules CD8⁺ est analysée au cours de l'essai par la technique Elispot pour l'IFN- γ comme présenté dans le **Tableau 2** et sur la **Figure 12**.

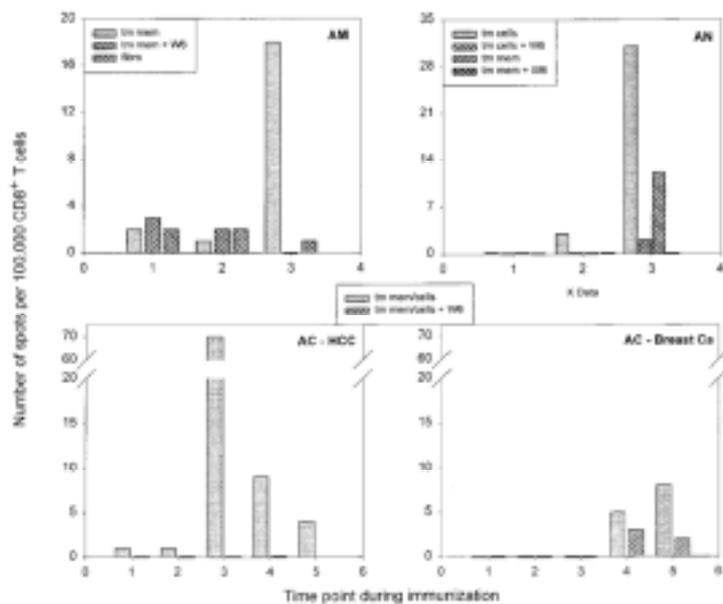
Tableau 2 : Anti-tumor reactivity of CD8 cells from 12 patients immunized with autologous, tumor-derived gp96 preparations as determined by IFN- γ Elispot assay¹

Patient	Stimulator	Number of spots per 100,000 CD8 ⁺ T cells in wells with			
		CD8 ⁺ cells alone	CD8 ⁺ + stimulator	CD8 ⁺ + stimulator +W6/32	CD8 ⁺ + fibroblasts
AA	Tumor cells	0—0—0	2—2—3	0—0—0	ND
AB	Tumor cell membranes	2—0—2	0—2—0	2—2—0	ND
AC	Tumor cell membranes (HCC)	1—0—0—1—2	2—1—70—10—6	0—0—0—0—0	ND
	Tumor cells (breast carcinoma)	1—0—0—1—2	0—0—0—6—10	0—0—0—3—2	ND
AD	Tumor cell membranes	0—0—0	1—1—0	0—0—0	ND
AF	Tumor cell membranes	2—0—0	1—0—0	0—0—2	ND
AG	Tumor cell membranes	2—6—7	3—4—7	8—7—7	ND
AH	Tumor cells	3—3—0	1—10—3	1—2—3	ND
AI	Tumor cells	0—ND—0	0—ND—6	0—ND—0	0—ND—0
AJ	Tumor cell membranes	1—0—0	0—0—3	0—0—1	ND
AK	Tumor cell membranes	0—2—1	0—6—2	0—0—2	ND
AM	Tumor cell membranes	0—1—0	2—2—18	3—3—0	2—3—1
AN	Tumor cell line	1—1—4	1—4—35	0—1—6	ND
	Tumor cell membranes	1—1—4	1—0—16	0—1—1	ND

¹Values represent the mean of triplicate determinations of spots per 100,000 CD8⁺ T cells in time-dependent order (first value 5 mean spot number before first immunization; second value 5 mean spot number before third immunization; third value 5 mean spot number 2 weeks after fourth immunization; fourth and fifth values are shown for patient AC as she was immunized with gp96 from 2 different primary tumors). Mean values were rounded. In patient AN, 2 different stimulators were used. Patient AC was tested against 2 different tumors as indicated. ND, not determined. W6/32 is an anti-HLA class I antibody.

Figure 12 :

Tumor-specific CD8⁺ responses measured by an IFN- γ Elispot assay. Results from patients with strong response to tumor antigens are shown (patients AM, AN, AC). Control wells with medium alone, cancer cells or membranes alone, W6/32 anti-HLA class I antibody alone or cancer cells or membranes with W6/32 antibody alone had no spots/well. Time points are (1) before first immunization, (2) before second immunization, (3) 2 weeks after third immunization (patients AM, AN; upper panel). In patient AC (lower panel), these time points refer to immunization with HCC-derived gp96, whereas (4) is before the third immunization and (5) is 2 weeks after the third immunization with breast cancer-derived gp96. Background spots (CD8 alone) were subtracted. Stimulators used in each patient are indicated.



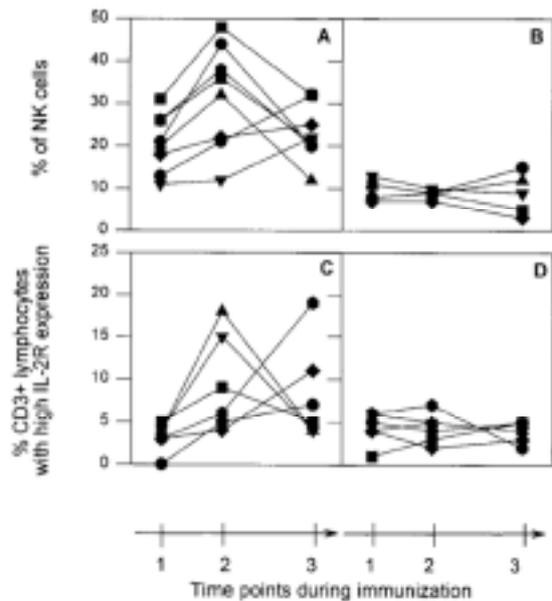
Enfin le pourcentage de cellules NK ainsi que le pourcentage de cellules CD3⁺ exprimant un fort taux de IL-2R est mesuré chez ces patients. Les résultats sont présentés sur la **Figure 13**.

Figure 13

General immunological parameters of gp96-immunized patients before the first immunization (1), before the third immunization (2) and 2 weeks after the fourth immunization (3).

(a,b) NK cells in the peripheral blood of 13 immunized patients. Numbers of NK cells, as determined by expression of surface markers CD16 and CD57, are shown as percentage of total lymphocytes. Eight patients showed a significant increase of NK cells above normal levels upon immunization ($p=0.00015$, a). In 5 patients, no changes above normal values were observed (b).

(c,d) Number of lymphocytes with high expression of IL-2 receptor in the peripheral blood of immunized patients. The parameter was determined in 12 patients. Six patients (c) showed a significant increase of lymphocytes with high IL-2 receptor expression upon immunization ($p=0.003$), though none showed an increase above normal levels. Six patients (d) showed no significant change.



Question 4. Analysez et interprétez ces résultats

Question 5. Cette stratégie de thérapie anti-tumorale vous paraît-elle prometteuse ?

Exercice II (noté sur 6 points)

(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 ?

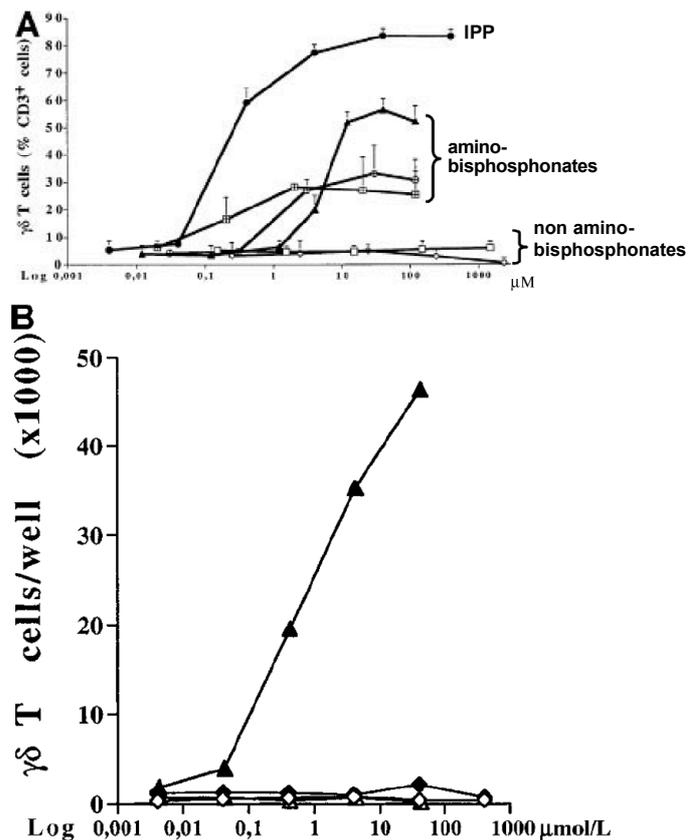
Question 2. Quelles sont les manifestations cliniques généralement observées chez ces patients ?

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 14**.

Figure 14

- 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⁺ a été mesuré en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C δ 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 chlodonate (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.
 ▲ chlodonate ; ▲ chlodonate + IL-2 ;
 ● pamidronate ; ● pamidronate + IL-2.

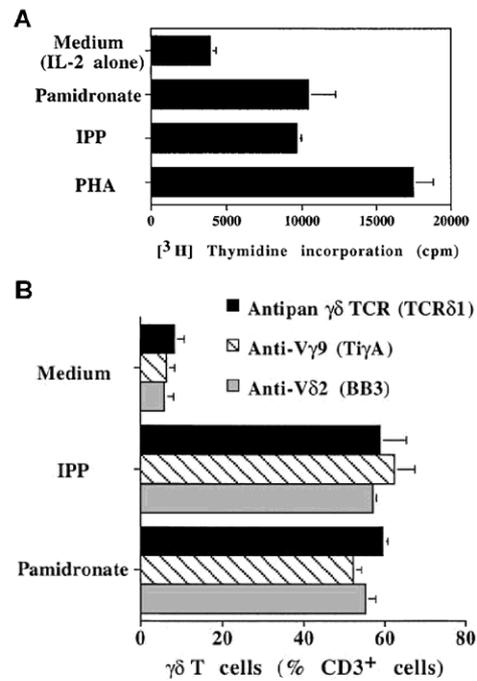


Question 3. *Interprétez les résultats de cette expérience. On notera qu'aucune autre population cellulaire parmi les PBMC ne prolifère dans les conditions de l'expérience. (8 lignes maximum)*

Dans une deuxième expérience, l'expression de V γ 9 et V δ 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 15**.

Figure 15

- A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en l'absence (Medium) ou en présence de 4 μ M d'IPP, 4 μ M de pamidronate ou 4 μ 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 μ M d'IPP ou de pamidronate, en présence d'IL-2. Après 7 jours, les cultures ont été analysées en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C δ (Anti- $\gamma\delta$ TCR), anti-V γ 9 ou anti-V δ 2.



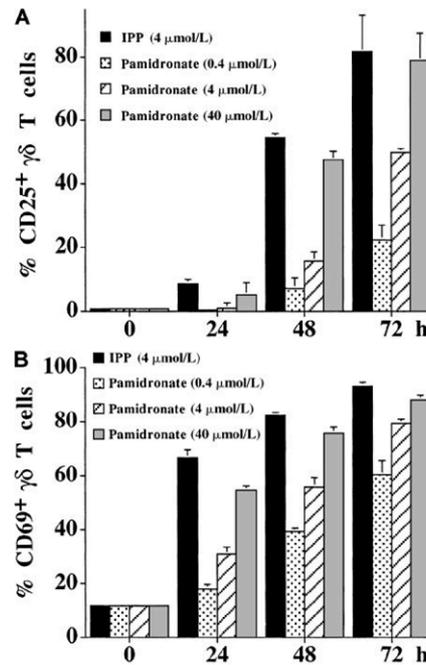
Question 4. *Qu'apportent les résultats de cette expérience ? (5 lignes maximum)*

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 16**.

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 16

Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en présence de 4 μ M d'IPP ou de 0,4, 4 et 40 μ 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 δ et anti-CD25(A) ou anti-CD69 (B).

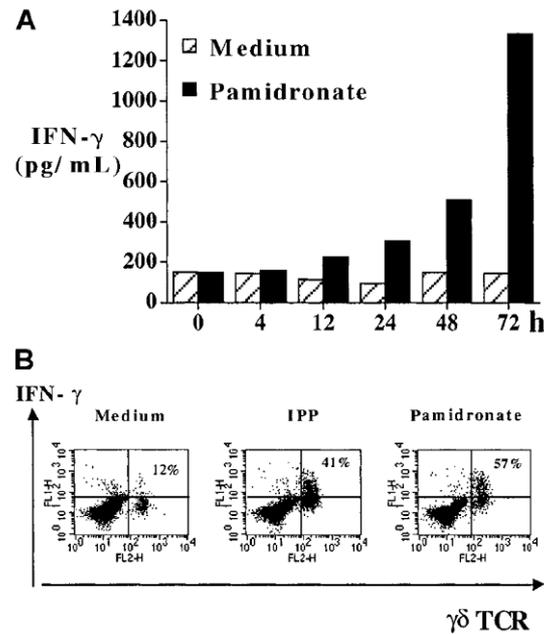


La production d'IFN γ par les cellules T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 17**.

Figure 17

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

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



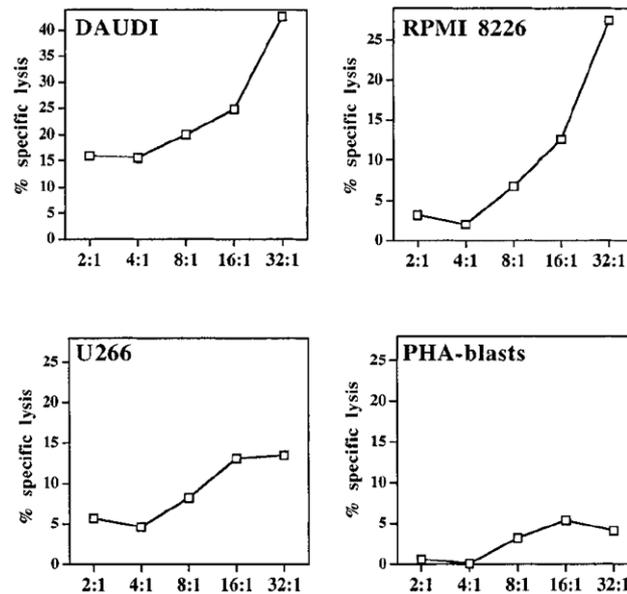
Question 6. Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 17B. (5 lignes maximum)

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 18**.

Figure 18

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 Cr⁵¹. 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 souhaité disposer afin de préciser votre interprétation. (5 lignes maximum)

Pour finir, des cellules de moelle osseuse de 24 patients atteints de myélome multiple ont été cultivées en milieu seul (Medium), en présence d'IPP ou de pamidronate, en présence d'IL2. Pour une proportion significative de patients (14/24), on observe une augmentation de l'expression de CD25 par les cellules T $\gamma\delta$ en présence de pamidronate et d'IPP. Le nombre de cellules plasmocytaires vivantes après culture a été déterminé et exprimé en pourcentage du nombre de cellules cultivées en milieu seul. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Activité anti-plasmocytaire de l'IPP et du pamidronate chez des patients atteints de myélome multiple

Treatment	Plasma cells (%)	P
Medium (n = 24)	100	—
IPP (n = 24)	87.0 ± 28.4	.0345
Pamidronate (n = 24)	65.9 ± 38.4	.0002
Pamidronate (patients with activation of BM- $\gamma\delta$ T cells) (n = 14)	54.8 ± 28.8	.0001

n : nombre de patients ; p : valeur de signification du test de Student par rapport à la culture en milieu seul.

Question 9. Quelle information complémentaire cette expérience apporte-t-elle ? Quelle perspective d'application thérapeutique peut-on envisager. (8 lignes maximum)

Question 10. A l'aide d'un tableau comparatif vous indiquerez en quoi la reconnaissance des lymphocytes T $\gamma\delta$ diffère de celle des lymphocytes T $\alpha\beta$.

IPP2005 TD-IPP 8 :
Vaccination
Thérapeutiques immunologiques

Vaccination ; Thérapeutiques immunologiques

Utilisation des Adénovirus en Immunothérapies et Vaccination

Les adénovirus sont avec les rétrovirus les vecteurs de prédilection pour la thérapie génique. En effet, ces virus à ADN (adénovirus) peuvent transférer de grandes portions d'ADN et sont capables d'infecter un grand nombre de types cellulaires avec une efficacité proche de 100%. A la différence de la plupart des rétrovirus, les adénovirus sont capables d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, ne s'intègrent que très rarement au génome de la cellule infectées et peuvent être facilement produits en grande quantité, en culture. Ces virus sont peu pathogènes provoquent cependant de fortes réactions inflammatoires et immunitaires. Ces caractéristiques, intéressantes pour les techniques de thérapie génique *in situ* et *in vivo*, ont également été retenues pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques immunologiques ou la génération de nouveaux candidats vaccins.

I. Induction *in vivo* d'une réponse immunitaire spécifique d'un antigène porté par le vecteur adénoviral recombinant

Caractéristiques de la réponse induite

(d'après Yang, T.C., *et al.* (2003) *J. Virology*. 77:13407)

Dans cette première étude, les auteurs ont généré un vecteur adénoviral, déficient pour la réplication après délétion des gènes E1 et E3, et porteur d'une séquence cDNA codant pour la protéine de fusion SIINFEKL-Luc. SIINFEKL est un épitope H-2Kb restreint dérivé de l'ovalbumine de l'œuf de poulet fusionné en position N-terminale avec la luciférase. Le pouvoir immunogène du vecteur est évalué chez la souris après injection par voie intramusculaire de 10^8 pfu de AdSIINFEKL-Luc.

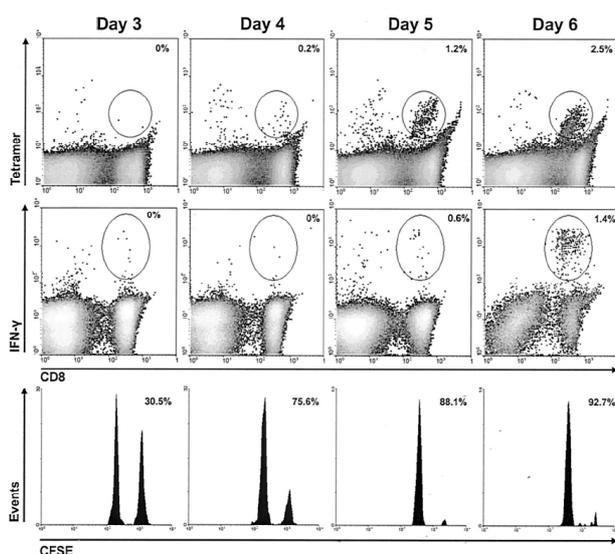
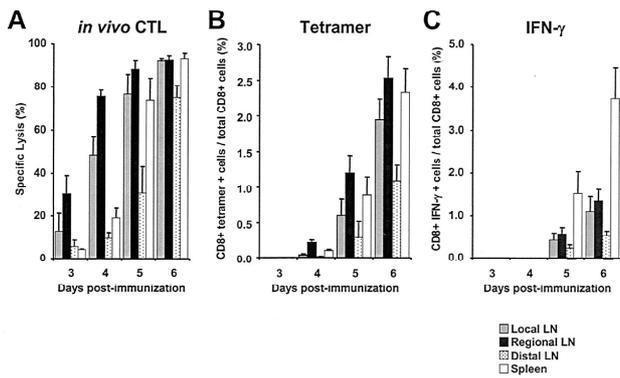


Figure 1 : Analysis of effector function within ileac lymph nodes at early times postimmunization.

Cells were obtained from the regional lymph nodes 3 to 6 days following intramuscular immunization with 10^8 PFU of AdSIINFEKL-Luc. Upper panels, cells were stained directly with tetramer, and the number in the upper-right corner of each tetramer plot is the frequency of SIINFEKL-reactive $CD8^+$ T cells (determined using the gate shown)/total $CD8^+$ cells in the experimental group minus the frequency of SIINFEKL-reactive $CD8^+$ T cells/total $CD8^+$ cells in naive controls; Middle panels, cells were immediately restimulated with SIINFEKL or KAVYNFATM peptide for intracellular cytokine staining, and the number in the upper-right corner is the frequency of IFN- γ -producing $CD8^+$ T cells (determined using the gate shown)/total $CD8^+$ following stimulation with SIINFEKL minus the frequency of IFN- γ -producing $CD8^+$ T cells/total $CD8^+$ cells following stimulation with KAVYNFATM; Lower panels, CFSE-labeled target cells were adoptively transferred into immunized recipient for *in vivo* CTL 4 h prior to harvesting tissues, and the number in the upper-right corner represents the percent specific lysis relative to naive controls. Target were coated with either SIINFEKL (specific peptide) or KAVYNFATM (irrelevant peptide) and labeled with 5 and 0.5 μ M CFSE (Molecular Probes), respectively. The two target cell populations were mixed at a 1:1 ratio and injected intravenously into mice. These histograms and density plots are representative of five mice, and the calculated values in all



panels represent the means for the five mice.

Figure 2 : Analysis of effector function within lymph nodes and spleens at early times postimmunization.

Cells were obtained from local, regional, and distal lymph nodes and spleens 3 to 6 days following intramuscular immunization with 10^8 PFU of AdSIINFEKL-Luc. On the day of each harvest, CFSE-labeled target cells were adoptively transferred into mice for the *in vivo* CTL assay, and tissues were harvested 4 h later. (A) *In vivo* CTL assay; (B) tetramer analysis with Kb/SIINFEKL; (C) intracellular cytokine stain analysis for IFN- γ after 5 h of peptide stimulation *ex vivo*. Each histogram represents the mean \pm standard error of the mean for five mice

The LNs were separated into the following groups based on their relative distance from the injection site: (i) local (popliteal and inguinal), (ii) regional (ileac), and (iii) distal (axial and brachial).

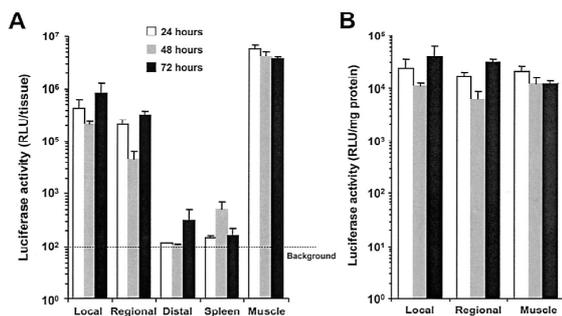


Figure 3 : Gene expression *in vivo* following intramuscular injection of AdSIINFEKL-Luc.

Muscles, lymph nodes, and spleens were harvested 24 (open bars), 48 (grey bars), and 72 h (closed bars) following intramuscular injection with 10^8 PFU of AdSIINFEKL-Luc. Three groups of lymph nodes were harvested: local lymph nodes, regional lymph nodes, and distal lymph nodes. Luciferase activity was measured in tissue homogenates. (A) Luciferase activity per tissue. (B) Luciferase activity per tissue normalized to the amount of protein in the homogenate. Each histogram represents the mean [plusmn] standard error the mean for three to six samples.

Question 1. Justifiez la création d'un tel vecteur pour l'évaluation des réponses immunitaires induites.

Question 2. Présentez le principe et l'avantage des tests immunologiques utilisés dans la Figure 1 pour évaluer la réponse effectrice CD8 induite.

Question 3. D'après les Figure 2 et Figure 3, décrivez les caractéristiques de la réponse induite : expression antigénique, cinétique de la réponse CTL, localisation et état d'activation des lymphocytes T CD8⁺ spécifique de l'épitope.

1- Application à la vaccination antitumorale

(d'après Toes, R.E.M., et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:14660)

La stratégie vaccinale anti-tumorale repose ici sur le ciblage spécifique des protéines oncogènes, associées généralement à la tumorigenèse et au développement du cancer. Or pour ce type d'immunothérapie, l'injection dans l'organisme de vecteurs viraux porteurs des gènes codant pour ces oncoprotéines n'est pas envisageable en raison des forts risques de tumorigenèse associée. C'est pourquoi est ici développée une stratégie vaccinale utilisant des adénovirus recombinants délétés en E1 et porteurs d'épitopes dérivés de diverses oncoprotéines connues. Ces différents épitopes restreints au système H-2 (rAd-1) ou HLA (rAd-2) sont assemblés sur un même mini-gène, utilisé pour créer les adénovirus recombinants respectifs (Figure 4).

Question 4. Indiquez les principales étapes nécessaires pour l'activation des CTL après injection du vecteur adénoviral

Les souris sont immunisées par voie intra-péritonéale avec 10^8 pfu de l'adénovirus recombinant rAd-1 ou r-Ad2. Deux semaines plus tard, les réponses CTL spécifiques des épitopes dérivés de E1 sont analysées (Figure 5) et l'immunité protectrice anti-tumorale est déterminée après injection d'épreuve de cellules tumorales exprimant les protéines Ad5E1A (Figure 6).

Question 5. Interprétez la Figure 5. Indiquez les résultats attendus si les splénocytes des souris immunisées sont restimulés avec les cellules tumorales HPV16-MEC.

Question 6. Classez et commentez l'efficacité des différents immunogènes utilisés pour induire une immunité anti-tumorale protectrice.

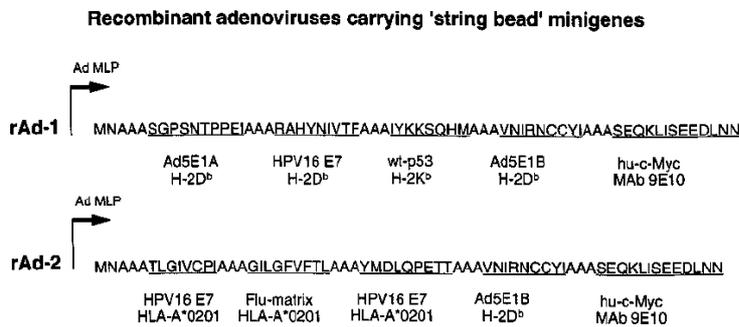


Figure 4 : Minigenes encoding several CTL epitopes, linked by a spacer of three alanines.

The first minigene (rAd-1) encodes the H-2Db-restricted peptide E1A234-243, the H-2Db-restricted peptide HPV16E749-57, the H-2Kb-restricted peptide p53158-166, the H-2Db-restricted peptide E1B192-200, and a Myc tag. The second minigene (rAd-2) encodes the HLA-A*0201-restricted CTL epitope HPV16 E786-93, the HLA-A*0201-restricted peptide Flu-matrix58-66, the HLA-A*0201-restricted peptide HPV16 E711-20, the H-2Db-restricted peptide E1B192-200, and a Myc tag. Both minigenes are placed behind the Ad5 major late promoter (Ad-LMP), which in this configuration is linked to the Ad5 immediate early enhancer, resulting in immediate early expression of the minigenes.

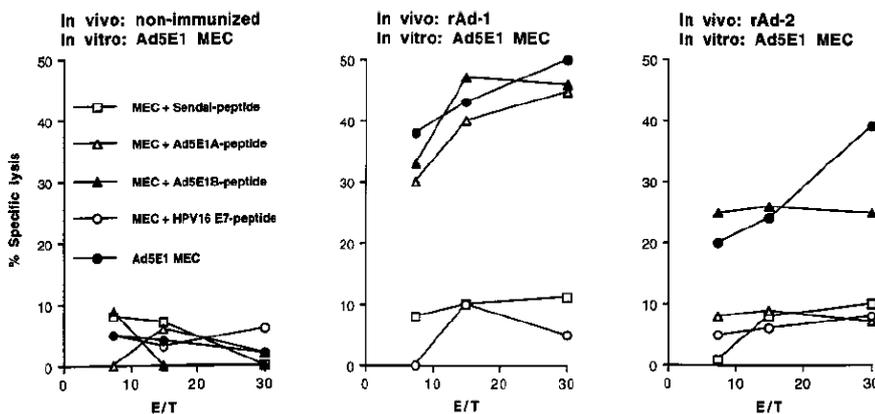


Figure 5 :

B6 mice were left nonimmunized, were immunized with rAd-1, harboring minigene 1, or were immunized with rAd-2, harboring minigene 2. Two weeks later, spleen cells of these animals were taken and restimulated with Ad5E1-transformed tumor cells to propagate E1A- and E1B-specific CTL. Lytic activity of bulk CTL cultures was tested 6 days later on Ad5E1 MEC, untransformed B6 MEC loaded with the Sendai-virus encoded control CTL epitope FAPGNYPAL, the E1A-encoded CTL epitope, the E1B-encoded CTL epitope, or the HPV16 E7-encoded CTL epitope. Percent specific lysis at different effector to target cell ratios is shown.

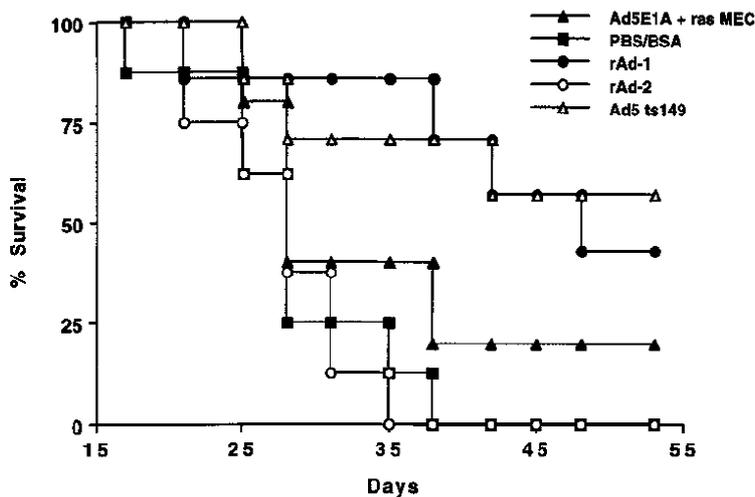


Figure 6 :

B6 mice were immunized intraperitoneally with rAd-1 (n = 7), rAd-2 (n = 8), or the Ad5 mutant (Ad5E1A-positive) Ad5ts149 (n = 7) or were injected with PBS/BSA (n = 8) only. Two weeks later, the mice received a subcutaneous challenge of 0.4×10^6 Ad5E1A + Ras cells.

II. Stratégies de vaccination « prime-boost adénoviral »

(d'après Tritel, M., *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:2538)

Alors que les réponses immunitaires humorales sont efficacement induites après injection d'agents pathogènes vivants atténués ou inactivés, ou de vaccins sous-unitaires protéiques ; les vaccins vivants atténués sont les principaux candidats pour induire des réponses immunitaires cellulaires efficaces. Plus récemment, dans le cadre de la vaccination génétique, la technique de « prime-boost » semble être une stratégie efficace pour induire à la fois une réponse cellulaire et humorale. Cette approche consiste à injecter une première fois l'Ag sous forme ADN (prime) suivi de l'administration d'un vecteur viral recombinant exprimant ce même Ag (boost). Les adénovirus peuvent constituer des vecteurs de choix pour la réalisation du boost. Plus récemment, il a pu être montré que l'injection simultanée de séquences riches en CpG, mixées aux séquences d'ADN codant pour l'Ag lors du prime, permet d'amplifier considérablement les réponses immunitaires induites.

Dans cette étude, les auteurs ont cherché à caractériser les réponses immunitaires dirigées contre Gag du HIV, lors d'une stratégie vaccinale proche de celle du « prime-boost classique », mais injectant en première intention et de façon répétée la protéine Gag entière en présence ou non de séquence CpG, puis un adénovirus recombinant exprimant la protéine Gag de HIV-1. Le protocole d'immunisation est le suivant : 3 injections sous-cutanées à 3 semaines d'intervalle de (i) la protéine Gag en présence de CpG, (ii) de la protéine Gag seule, (iii) de CpG uniquement ou en contrôle de PBS. Une partie des souris est sacrifiée 10 jours après le dernier prime (Pre-boost) alors que l'autre est injectée 4 semaines après avec l'adénovirus recombinant. L'analyse Post-boost est réalisée 1,5 (peak), 6 (memory 1) ou 11 semaines (memory 2) après le boost adénoviral.

Question 1. Précisez les conséquences de l'injection de séquences CpG lors du prime.

Question 2. Quel est, selon vous, le principal intérêt d'utiliser pour le prime l'Ag immunisant sous une forme protéique et non une séquence d'ADN.

Question 3. Décrivez et interprétez l'effet du boost adénoviral sur les réponses CD4, CD8 et anticorps spécifiques de Gag HIV-1.

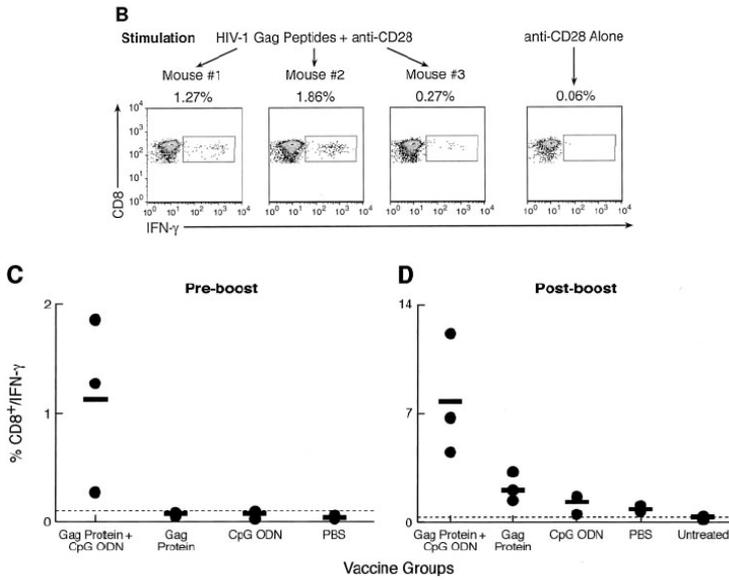


Figure 7 :

The frequency of HIV-1 Gag-specific, IFN γ ⁺ cells within CD8⁺ T cells following protein + CpG ODN immunization. Cells were initially gated on lymphocytes using forward/side scatter. CD4⁺, CD8⁺ cells were then gated and the frequency of IFN γ ⁺ cells within this population was determined. B, Representative FACS plots of preboost responses. Mice were vaccinated as indicated. Splenocytes were prepared and stimulated with HIV-1 Gag pooled peptides and costimulatory Ab (anti-CD28) or anti-CD28 alone. CD8⁺ and IFN γ ⁺ cells were detected by intracellular cytokine staining. C and D, Graphic depiction of pre-boost (C) and postboost (D) responses. •, Individual mice; horizontal bars, group averages. The background (dotted line) is defined as the percentage of cells responding to costimulatory Ab alone.

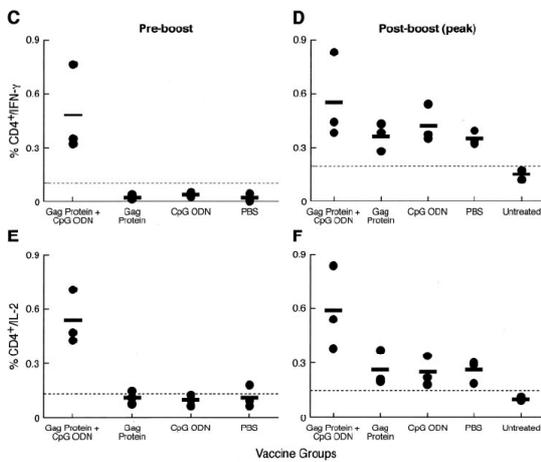


Figure 8 : Frequency of HIV-1 Gag-specific, IFN γ ⁺ and IL-2⁺ cells within CD4⁺ cells following protein + CpG ODN immunization.

C and D. Graphic representation of the frequency of IFN γ ⁺ cells within the CD4⁺ T cell population before (C) and after (D) adenovirus boost. Values for individual mice (•) and group averages (horizontal bars) are depicted. E and F, Graphic representation of the frequency of IL-2⁺ cells within the CD4⁺ T cell population before (E) and after (F) adenovirus boost.

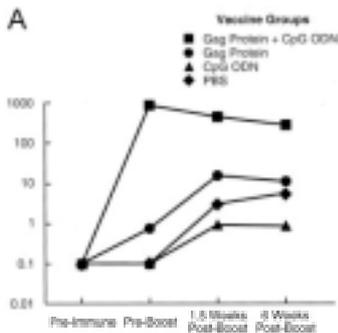


Figure 9 :

A, HIV-1 Gag-specific Ab responses following protein + CpG ODN prime-boost immunization. Mice were vaccinated as indicated before and were bled 1.5 wk after the third priming injection or 1.5 or 6 wk after the adenovirus boost. Anti-HIV-1 Gag Ab titers (total IgG) were determined by ELISA.

III. Utilisation in vitro des adénovirus comme agent de transfection des APC et déclenchement des réponses immunitaires in vivo

(d'après Brown, K. et al. (2003) J. Immunology 171:6875)

De façon plus classique, les adénovirus peuvent être utilisés *in vitro* pour transduire efficacement les APC et notamment les cellules dendritiques (DC). L'immunisation est alors réalisée par réinjection des DC transfectées présentant l'antigène. Dans cette étude, les auteurs ont immunisé des singes non-

infectées par SIV et ont analysé les réponses immunitaires induites après plusieurs injections intradermales ou intranodales des DC transduites par l'adénovirus porteur des séquences p17 ou p45 de la protéine Gag du SIV.

Question 1. Proposez des expériences qui permettraient de vérifier l'expression de Gag dans les DC et de mettre en évidence la bonne présentation des épitopes dérivés ?

Question 2. Précisez l'importance des conditions de culture des DC.

Question 3. A partir des Figure 10 et Figure 11, analyser la spécificité des réponses obtenues.

L'injection répétée des adénovirus peut, selon la souche virale, poser problème en raison de la préexistence ou de la génération d'anticorps neutralisants dirigés contre l'adénovirus. Cette immunité acquise peut limiter considérablement l'efficacité du transfert de gène. Les auteurs ont, ici, cherché à déterminer s'il la réponse lymphocytaire T spécifique des adénovirus pouvait limiter le transfert des DC transduites par les adénovirus. La réponse spécifique de l'adénovirus est étudiée chez le singe, avant et après immunisation, à partir des PBMC restimulés en présence de DC transduites par L'adénovirus recombinant, l'adénovirus natif ou en présence de DC immatures.

Question 4. Interprétez la Figure 12 et précisez les conséquences de l'injection répétée des DC transduites sur l'immunité acquise.

Question 5. Quels tests complémentaires permettraient d'évaluer in vivo l'absence d'interférence des injections répétées des DC avec leur capacité à stimuler efficacement le système immunitaire ?

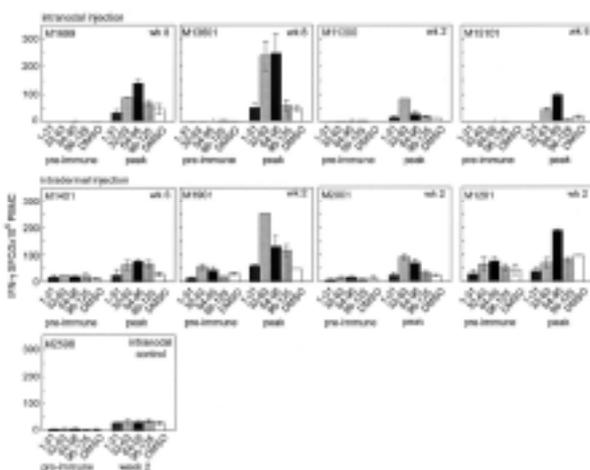


Figure 10 : DC-based vaccination results in broad Gag-specific T cell responses in monkeys.

PBMC were incubated with DMSO or pools containing SIV Gag peptides p1-p31, p32-p63, p64-p95, or p96-p125, and IFN γ -producing cells were quantified by ELISPOT 24 h later. Shown are responses from samples taken before immunization (preimmune) and at the time of peak response (peak) in monkeys immunized by intradermal or intranodal injection with Gag-expressing DC, or following intranodal injection of DC infected with the control vector Ad ψ 5. Graphs are composites of several experiments, and data are expressed as mean \pm SEM of duplicate or triplicate samples. SFC = spot-forming cell. DC were cultured from purified blood monocytes of normal monkeys, as described. For adenoviral infection of DC, viruses were added directly to cells in culture at a multiplicity of infection of 200 and incubated for 45 min at room temperature in a reduced volume of medium. Cells were cultured for 24 h, washed to remove free virus, and then cultured with GM-CSF and IL-4 and recombinant human trimeric CD40 ligand (1 μ g/ml; Immunex, Seattle, WA) for an additional 16 h. Individual 15-mer peptides overlapping by 11 aa representing the Gag sequence of SIVmac239 (National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program) were dissolved in DMSO at 10 mg/ml and used in pools of 30–32 peptides (final concentration 3.1–3.3 μ g/ml)

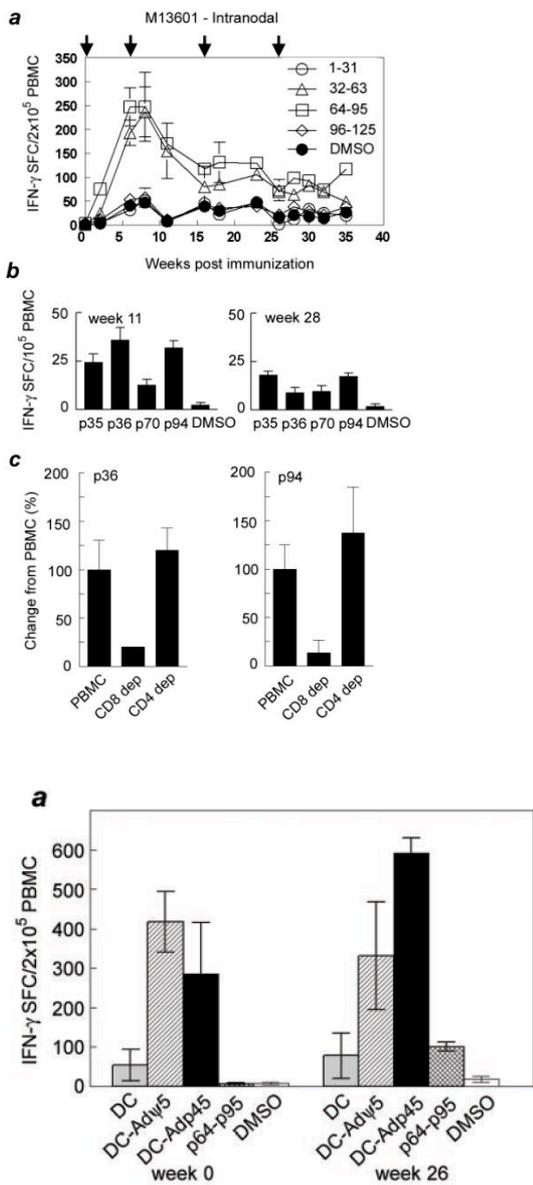


Figure 11 :

a, IFN γ responses to each of four Gag peptide pools or DMSO during the course of vaccination of M13601. Immunizations were given at times marked by arrows. Graphs are composites of several experiments, and data are expressed as mean \pm SEM of duplicate or triplicate samples.

b, IFN γ responses of PBMC to individual peptides or DMSO tested at times indicated after vaccination. Shown are mean \pm SEM or triplicate determinations.

c, Relative IFN γ response of PBMC with and without depletion of CD8⁺ or CD4⁺ T cells in an ELISPOT assay to the indicated peptides. Shown are mean \pm SEM of triplicate determinations. SFC = spot-forming cells.

Figure 12 :

a, PBMC from monkey M13601 taken at the indicated times before and after vaccination were cultured with CD40 ligand-matured autologous DC with or without prior infection with Ad ψ 5 or Adp45. Alternatively, PBMC were cultured with peptides p64-p95 or DMSO control. IFN γ -secreting cells were detected by ELISPOT assay. Results are expressed as mean \pm SEM of triplicate determinations. SFC = spot-forming cells.