

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

*UE BMC423
Immunologie Fondamentale (IF2008)
11 février au 8 mars 2008*

Travaux Dirigés

Travaux Dirigés

***IF2008 TD-IF 0 : Méthodologie d'analyse scientifique
Organisation des analyses d'articles***

IF2008 TD-IF 1 : Techniques avancées en immunologie

IF2008 TD-IF 2 : Développement du système immunitaire

IF2008 TD-IF 3 : Structure/Fonction des récepteurs de l'immunité

IF2008 TD-IF 4 : Interface Immunité innée/Immunité adaptative

IF2008 TD-IF 5 : Cytokines & Chimiokines

IF2008 TD-IF 6 : Reconnaissances non-classiques

IF2008 TD-IF 7 : Diversité et sélection des répertoires

IF2008 TD-IF 8 : Sélection et Tolérance

IF2008 TD-IF 9 : Révisions/Questions – Sujet d'examen IF2006 juin

IF2008 TD-IF 0 :
Introduction
Distribution de documents
Méthodologie

Introduction : Distribution de documents & Méthodologie d'analyse scientifique

- Distribution de la plaquette de présentation de l'UE
 - Responsables de l'UE
 - Equipe enseignante et secrétariat pédagogique
 - Calendrier
 - Objectif du module
 - Programme du cours
 - Programme des Travaux Dirigés
 - Analyse d'article (oral)
 - Questionnaire d'évaluation
- Distribution et explication du planning
- Notification des modalités de contrôle des connaissances
- Inscription en binôme et choix des articles pour l'étude bibliographique
- Méthodologie d'analyse scientifique

IF2008 TD-IF 1 :
Techniques avancées en immunologie

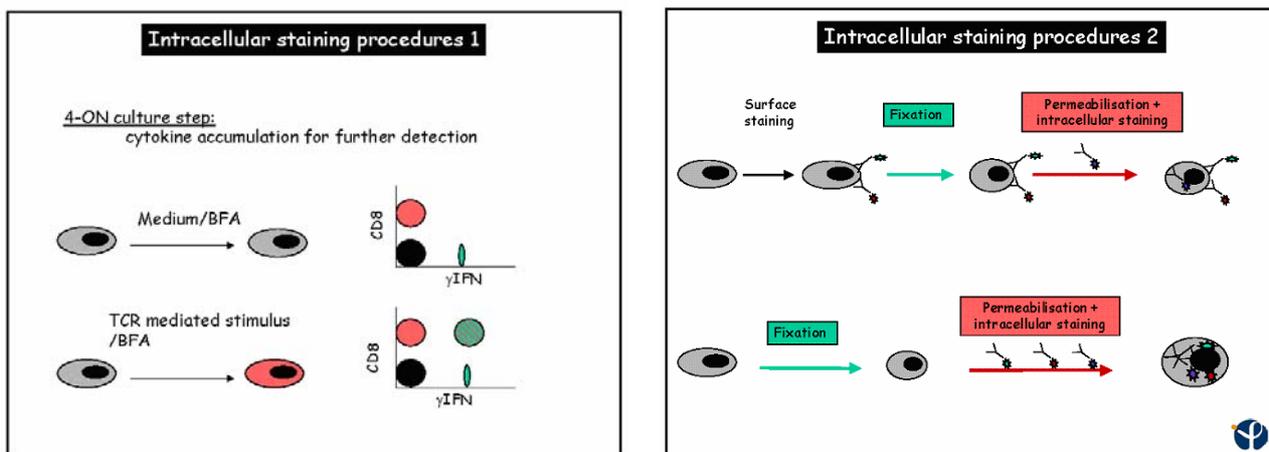
Techniques d'études des réponses immunitaires

I. Principes

(d'après Hernandez-Fuentes M. P. et al. (2003) *J. Immunol. Methods* 196:247 ; éléments du polycopié de TP : The 2nd PSU International Teaching Platform on Tumour Immunology and Immunotherapy, Sylvie Garcia, Institut Pasteur)

Partie I

1. Détection de cytokines intracellulaires par cytométrie de flux



2. Détection de la production de cytokines par la technique ELISPOT

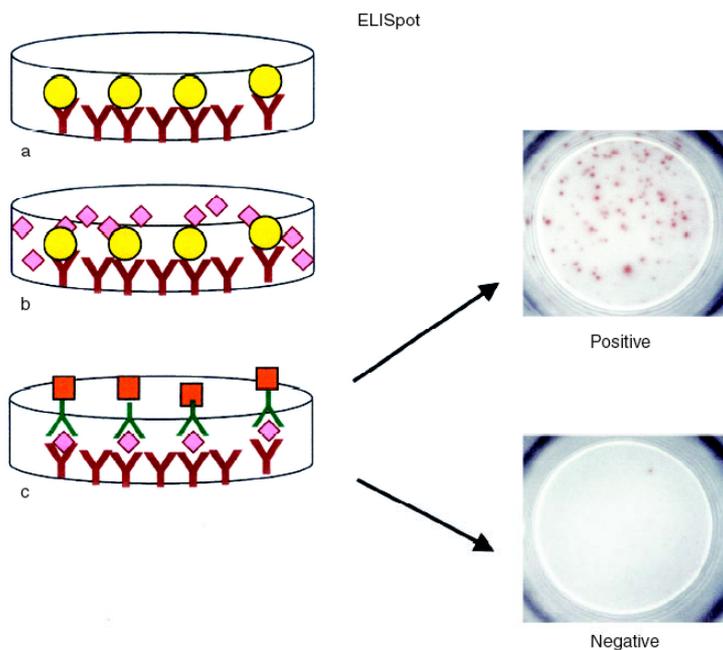


Fig. 3. ELISPOT procedure. (A) Culture wells are coated with the capture antibody and cells are then added. (B) Cultures are incubated for 24–48 h, and the cytokine is produced by the cells. Cells are then removed from the plate, and the cytokine remains bound to the antibody. (C) A detection biotinylated antibody is then added, followed by a conjugate of an enzyme with streptavidin. In the final step, the substrate precipitates where the secondary antibody was bound, forming spots that correspond to cells producing the cytokine.

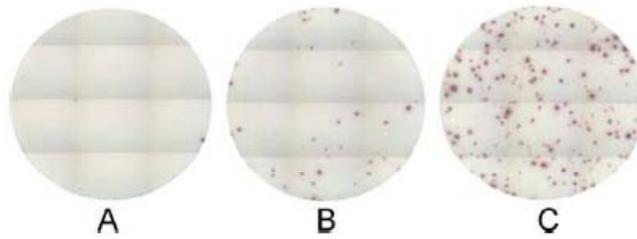


Fig. 1. Wells with different spot counts depicted in the study. (A) Very low spot counts; (B) medium spot counts, and (C) high spot counts.

Partie II

1. Etude de la division cellulaire par cytométrie de flux (marquage au CFSE)

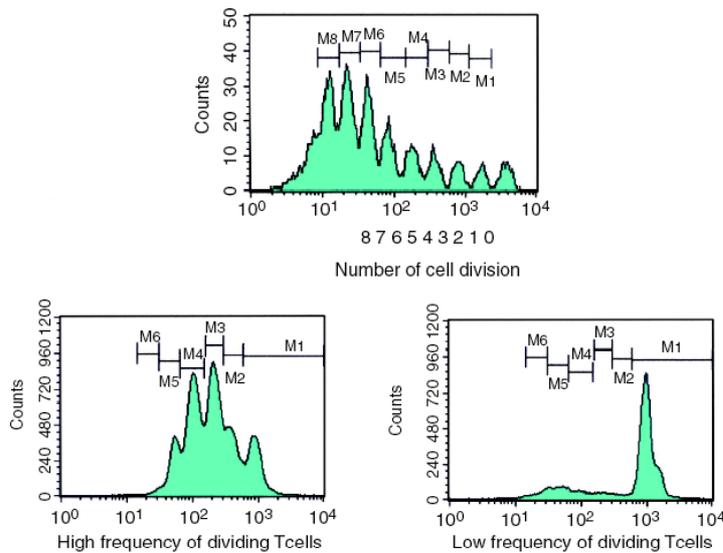
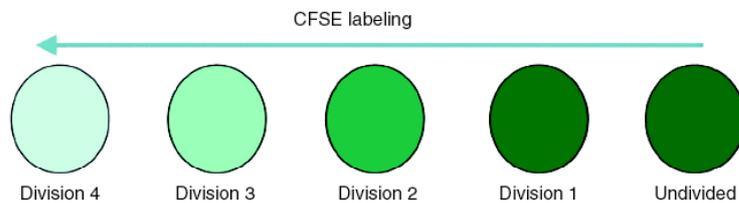
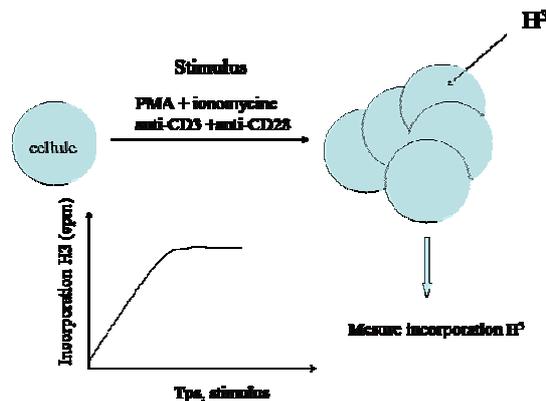


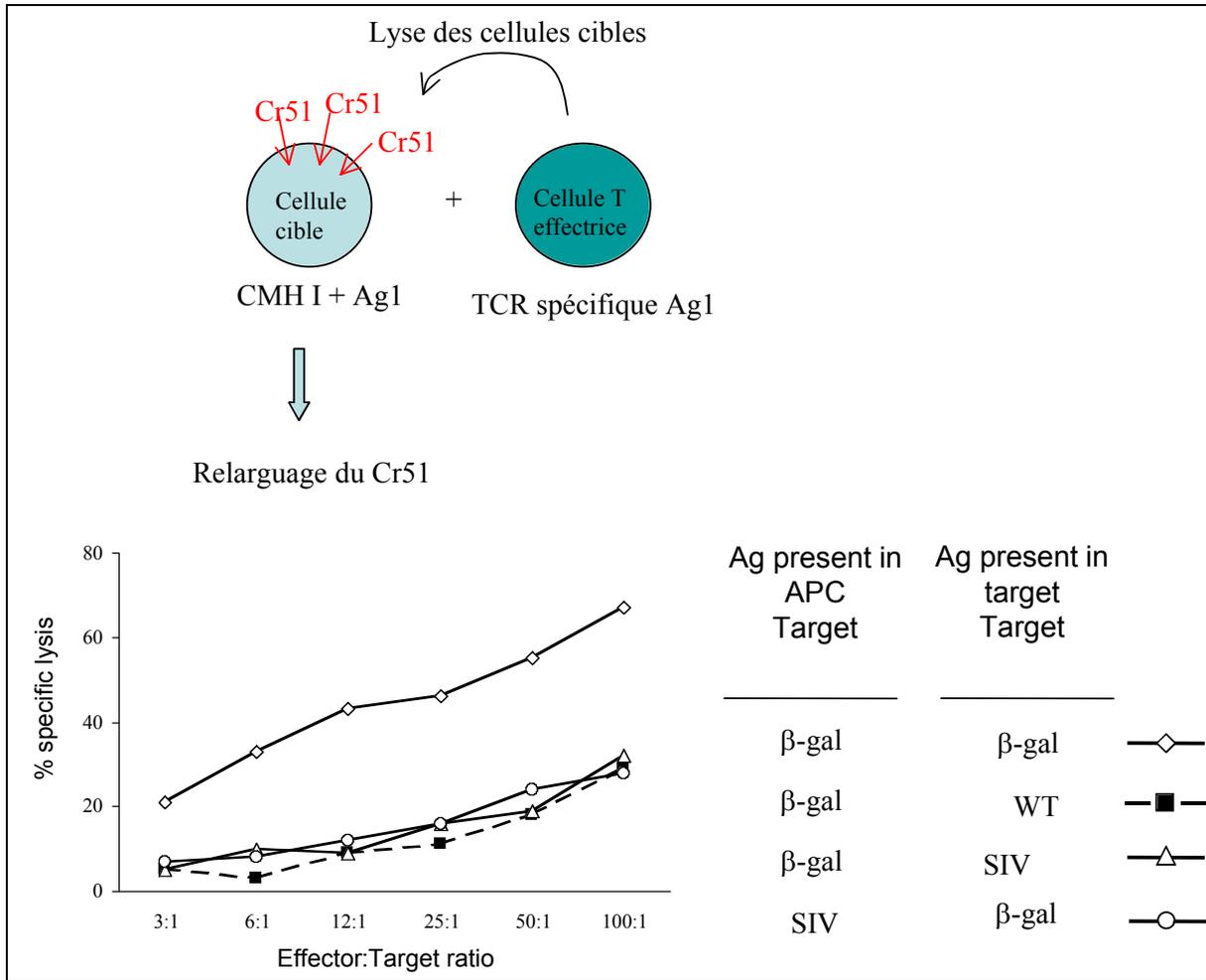
Fig. 4. Flow cytometry analysis of cell division: carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling. Cells are labeled with CFSE prior to culture, and with each division cell fluorescence intensity halves. In T lymphocytes, up to eight cell divisions can accurately be distinguished. Applying methods to calculate exact number of cells, we can find out the number of precursors. By relating precursors to the number of cells seeded a frequency can be obtained. The advantage of this method is that two populations of cells can be studied simultaneously, as long as they can be identified with different surface markers.

2. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée



Partie III

1. Tests fonctionnels d'analyse des lymphocytes T CD8+ (CTL)



2. Analyse des lymphocytes T CD8+ par cytométrie de flux après marquage par les tétramères

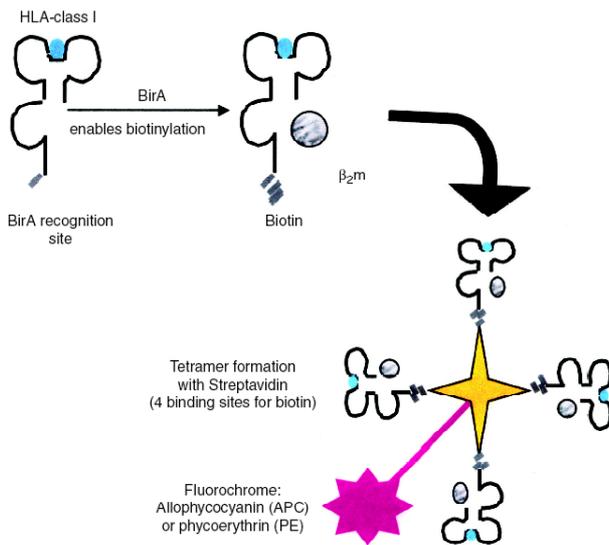


Fig. 6. Flow cytometry analysis of determinant-specific T cells: tetramer-staining. Purified class I MHC molecule-peptide complexes are enzymatically biotinylated by incubation with purified BirA. The heavy-chain fusion protein is folded *in vitro* in the presence of β_2 -microglobulin. The complex is then multimerized by mixing the biotinylated protein with phycoerythrin- or allophycocyanin-labeled streptavidin at specific molar ratios. Multimeric peptide-MHC complexes are able to bind more than one T-cell receptor on a specific T cell and, thus, have slower dissociation rates, which allows the identification by flow cytometry of T cells specific for the peptide-MHC molecule complex.

II. Applications

Exercice I

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

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

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

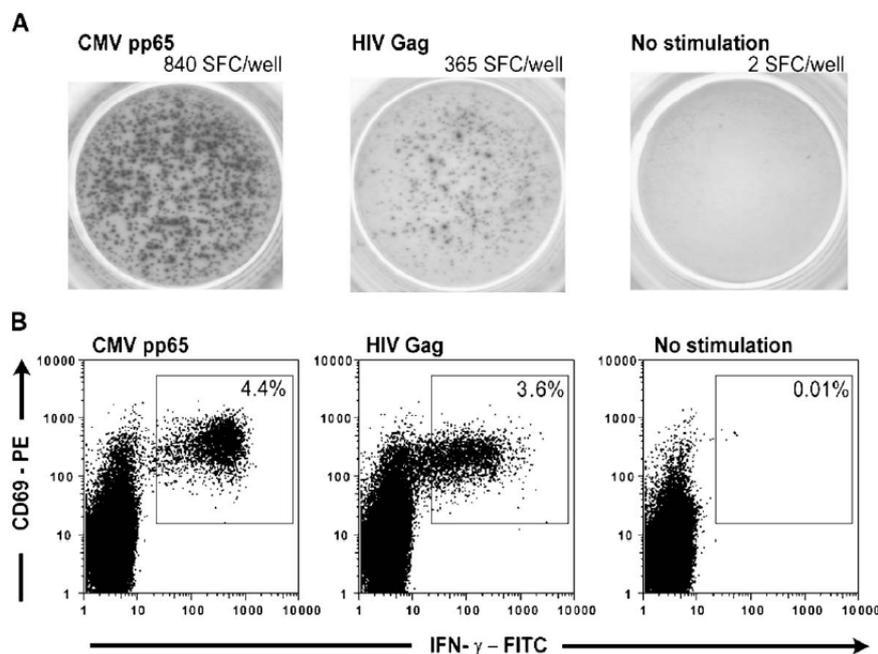


Fig. 1. Responses to CMV pp65 and HIV-Gag (SF2) peptide pools as detected by ELISPOT and CFC assays. The response to no stimulation is also included as a negative control. (A) In the ELISPOT assay, IFN- γ -producing T cells were identified in each well (of a 96-well microtiter plate) as spots with a fuzzy border and a brown color. Triplicate wells of plated PBMC (at a concentration of 2×10^5 cells/well along with antigens and controls) were analyzed and the mean is referred to as SFC/well. (B) In the CFC assay, data were first gated on viable CD3⁺ T cells and then the percentage of CD69⁺ IFN- γ -producing CD3⁺ T cells was obtained.

Figure 1

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

Question 2. Commentez les résultats obtenus

Pour comparer les résultats, les données de l'ELISPOT ont été exprimées en « Spot Forming Cell » SFC/ 10^6 lymphocytes (**Figure 2A**), et les données de CFC en pourcentages de lymphocytes T CD3+ producteurs d'IFN γ (**Figure 2B**).

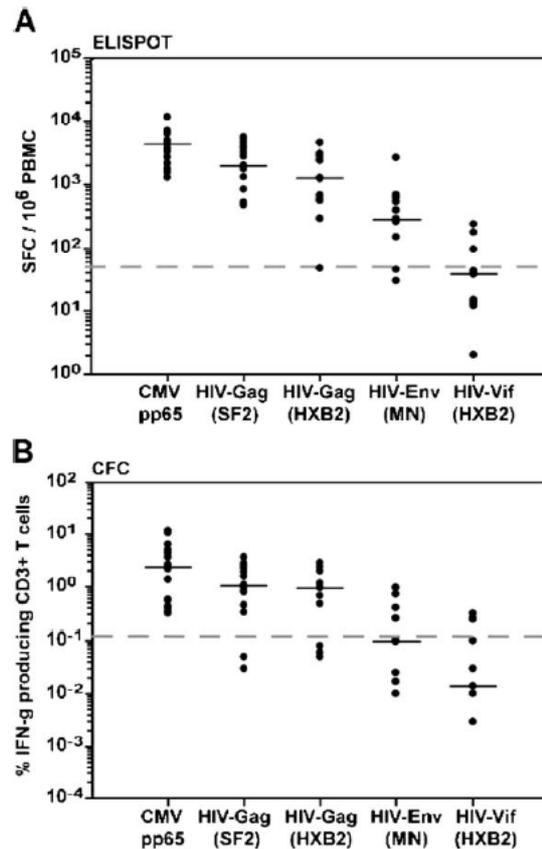


Fig. 2. Magnitude of antigen-specific T cells expressed as (A) SFC/10⁶ PBMC in the ELISPOT assay and (B) the percentage of IFN- γ -producing CD3⁺ T cells in the CFC assay. Only subjects with results obtained using both assays are included. A dashed line indicates the cutoff value for each assay.

Figure 2

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

Exercice II

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

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

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

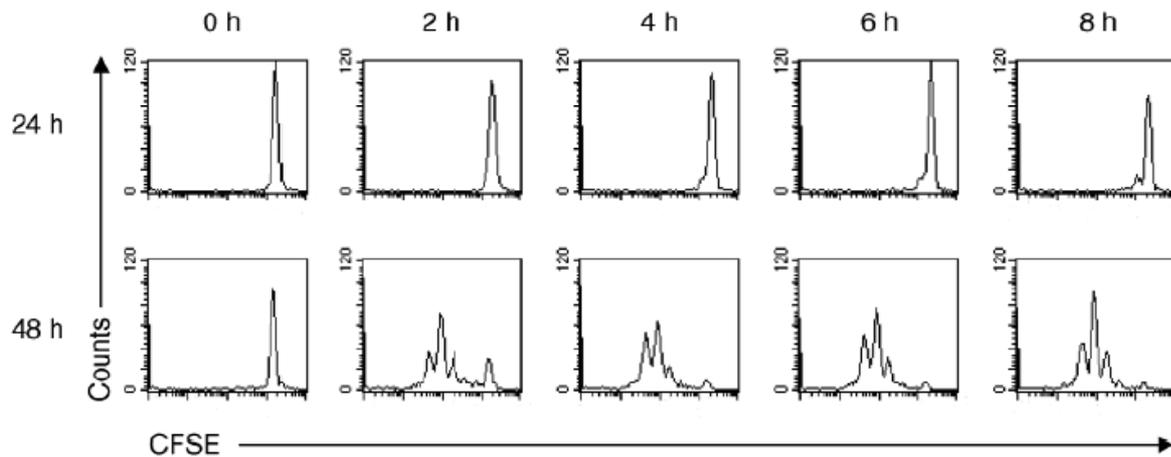


Figure 3

Question 4. Quelles sont les différences observées aux temps 24h et 48h ? Quelles conclusions tirez-vous de cette expérience ?

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

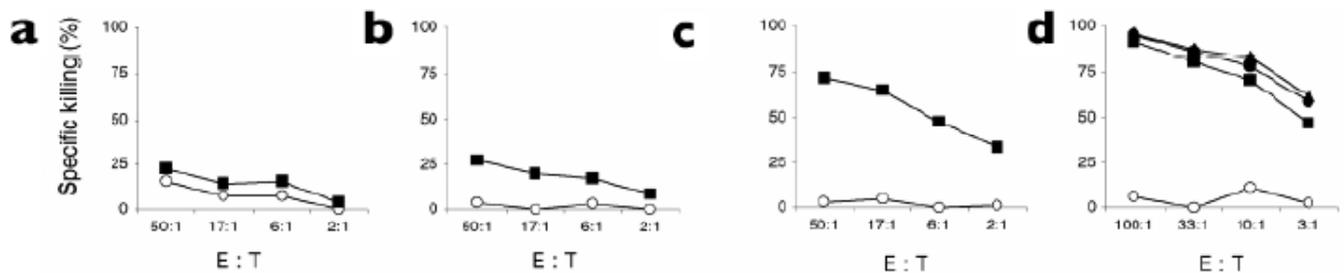


Figure 4

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

Question 5. Schématisez l'expérience réalisée

Question 6. Quelles informations complémentaires ces résultats apportent-ils ?

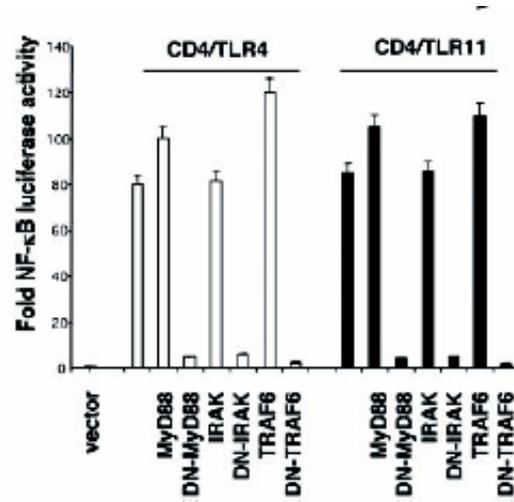
Exercice III

Les auteurs de la présente étude ont cloné un nouveau membre de la famille des « Toll-like receptor ». Il s'agit du TLR11, qui est exprimé spécifiquement par le foie et les reins. Pour étudier la fonctionnalité du TLR11, les auteurs ont surexprimé une protéine de fusion CD4/TLR11 (TLR11 est ainsi constitutivement activé) dans des cellules 293 qui ont été transfectées de façon stable avec

un plasmide permettant l'expression du gène reporter luciférase sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription NF- κ B. L'activation de NF- κ B dans ces cellules a été déterminée ainsi que dans des cellules 293 surexprimant la protéine de fusion CD4/TLR4. Les résultats sont montrés sur la **Figure 5**.

Figure 5

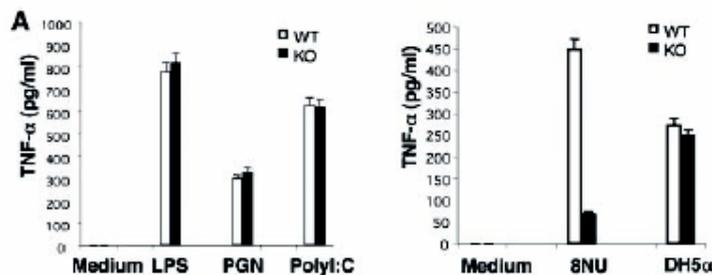
L'activité luciférase a été mesurée dans les cellules 293 exprimant soit la protéine de fusion CD4/TLR4 soit CD4/TLR11. L'expérience a été réalisée dans des cellules de type sauvage, ou dans des cellules exprimant soit MyD88 ou un mutant de MyD88 (DN-MyD88), soit IRAK ou un mutant de IRAK (DN-IRAK), soit TRAF6 ou un mutant de TRAF6 (DN-TRAF6).



Question 7. *Interprétez cette expérience (5 lignes maximum). A l'aide d'un schéma, décrivez la voie de transduction du signal activée par TLR11.*

Des souris déficientes pour TLR11 ont été obtenues (TLR11^{-/-}). Les macrophages isolés chez des souris de type sauvage ou des souris TLR11^{-/-} ont été stimulés *in vitro* avec plusieurs ligands, dont le LPS, le PGN (peptidoglycane), le polyI:C (mime l'ARN double brin) ou par les souches 8NU ou DH5 α d'E. Coli. Le TNF- α produit par les macrophages a été mesuré dans les surnageants de culture (**Figure 6**).

Figure 6



Question 8. *D'après cette expérience, quel(s) est (sont) le(s) ligand(s) de TLR11 ? Pourquoi ?*

IF2008 TD-IF 2 :
Développement du système immunitaire

Développement du système immunitaire

I.

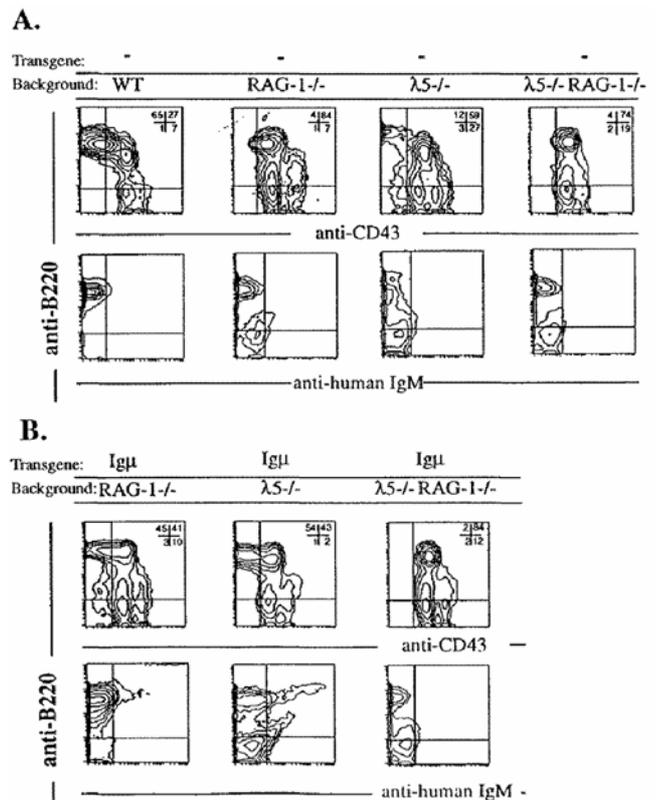
(d'après Papavasiliou, F. *et al.* (1996) *J.Exp.Med.* 184:2025)

Les auteurs de cette étude ont examiné le rôle de différents composants du récepteur pré-BCR dans le développement des cellules B. Ils ont introduit plusieurs transgènes d'immunoglobuline (Ig) dans des souris RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et double mutants (RAG^{-/-} λ5^{-/-}). Tous les transgènes sont des gènes réarrangés sous contrôle du promoteur VH et de l'enhancer IgH. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes :

Figure 1 : Analyse par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris âgées de 6 à 8 semaines.

- A. Souris sauvages (WT) et mutantes (RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et double mutants RAG^{-/-} λ5^{-/-}).
- B. Souris chez lesquelles on a introduit un transgène codant la forme membranaire de la chaîne μ humaine (Igμ).

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



- Question 1. Quel est l'effet de l'introduction du transgène Igμ dans les mutants RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et RAG^{-/-} λ5^{-/-} ?
- Question 2. Que suggèrent ces expériences quant aux éléments nécessaires à l'expression de la chaîne μ à la surface et quant à son effet sur le développement des cellules B ?
- Question 3. Donner les raisons qui ont conduit à l'utilisation des souris mutantes RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et double mutants RAG^{-/-} λ5^{-/-}.
- Question 4. D'après les résultats présentés aux Figure 3 et Figure 4 que peut-on conclure quant au rôle des chaînes légères dans l'assemblage, le transport et la fonction du récepteur pré-B ?

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

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

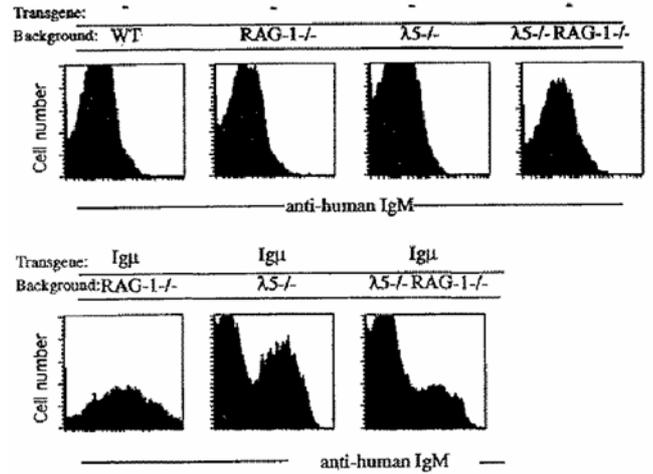


Figure 3 : Analyse du complexe pré-BCR par des expériences d'immunoprécipitation.

Des lignées de précurseurs B immortalisées par le virus d'Abelson ont été obtenues à partir de la moelle de souris de type sauvage (WT), mutantes ($RAG-1^{-/-}$), ($\lambda 5^{-/-}$) et ($RAG-1^{-/-} \lambda 5^{-/-}$) ainsi que de souris mutantes exprimant le transgène $Ig\mu$ humain : ($m\mu RAG-1^{-/-}$), ($m\mu \lambda 5^{-/-}$) et ($m\mu RAG-1^{-/-} \lambda 5^{-/-}$). Les complexes Ig ont été immunoprécipités avec un immunosérum anti-IgM humain et analysés par la technique de Western blot. Les protéines ont été révélées avec des anticorps anti-IgM humain (hIgM); anti-Ig α (Ig α) et anti-Ig β (Ig β). s.f. : forme membranaire; c.f. : forme cytoplasmique. Après surexposition, on voit apparaître sur un blot une bande correspondant à la forme membranaire (s.f.) de la protéine Ig β dans la 1^{ère} piste ($m\mu \lambda 5^{-/-}$).

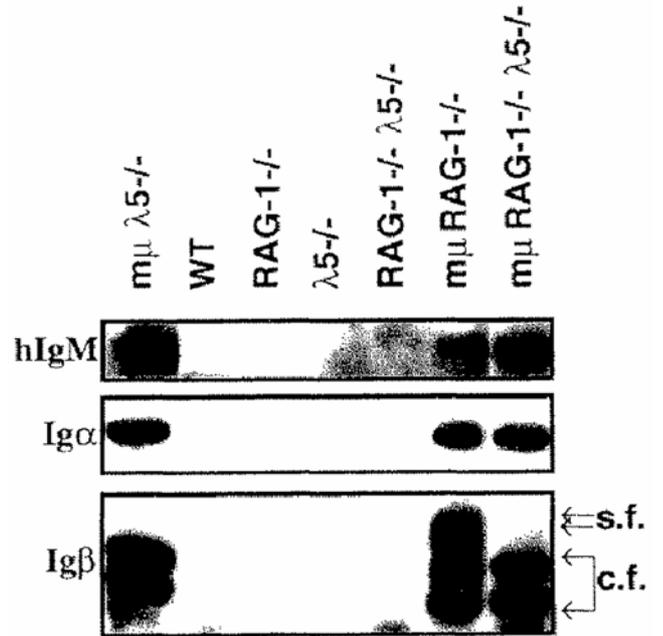
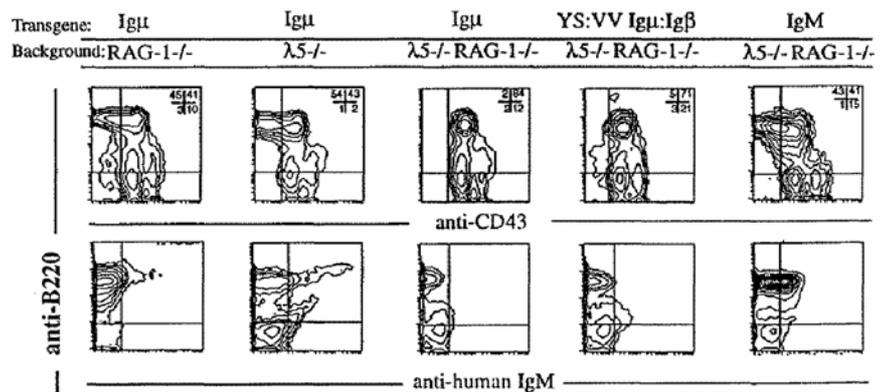


Figure 4 : Analyse par FACS des cellules de la moelle provenant de souris mutantes dans lesquelles on a introduit soit le transgène $Ig\mu$ comme précédemment, soit un transgène YS:VV $Ig\mu:Ig\beta$ codant pour une protéine chimérique $Ig\mu-Ig\beta$, soit un transgène IgM codant pour une immunoglobuline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

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



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

II. Rôle de Notch1 dans le développement T

(d'après [Wolfer, A. et al. \(2002\) Immunity 16:869](#))

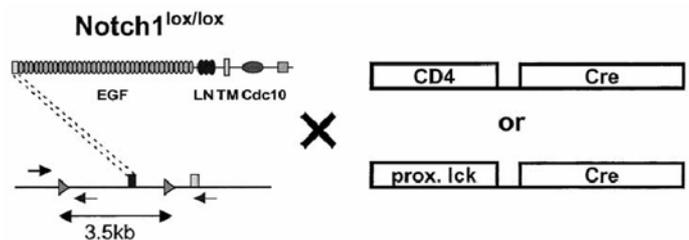
Les protéines Notch sont des récepteurs transmembranaires intervenant dans les choix de différenciation cellulaire chez plusieurs organismes. Leurs domaines extracellulaires contiennent des motifs de type EGF (*epidermal growth factor*) impliqués dans des interactions avec leurs ligands. Le domaine intracellulaire est clivé lors de la reconnaissance du ligand et transféré dans le noyau où son hétérodimérisation avec RBP-J κ (*recombinaison signal sequence binding protein* pour J κ) convertit RBP-J κ de sa forme répresseur en activateur de transcription ; ceci conduit à la transcription des gènes cibles.

Notch1, *Notch2* et *Notch3*, comme les ligands *Jagged1*, *Jagged2* et *δ -like-4*, sont exprimés sur les thymocytes et l'épithélium thymique. Pendant le développement lymphoïde, la signalisation par Notch1 est essentielle pour le choix de différenciation d'un précurseur bipotent T/B vers le lignage T ; son rôle dans les étapes postérieures du développement T ($\alpha\beta$ vs. $\gamma\delta$; CD4 vs. CD8) reste controversé. Les expériences présentées ci-dessous apportent des précisions quant au rôle de *Notch1* aux différentes étapes du développement thymique.

Une souris *Notch1*^{lox/lox}, obtenue précédemment a été croisée avec des souris transgéniques pour la recombinaise Cre sous le contrôle des promoteurs de CD4 ou de p56^{lck}. Les constructions utilisées sont schématisées sur la Figure 5. L'inactivation de *Notch1* chez ces souris est étudiée par PCR dans différentes sous-populations thymiques comme montré sur la Figure 6.

Figure 5 : Constructions utilisées pour obtenir l'inactivation conditionnelle de *Notch1*

Des souris *Notch1*^{lox/lox} ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur de CD4 (*CD4-Cre*) ou de p56^{lck} (*lck-Cre*) (à droite). L'organisation génomique schématisée du locus *Notch1*^{lox/lox} est montré à gauche ; l'exon codant pour le peptide leader (rectangle noir) est flanqué de deux séquences loxP (triangles gris) suivies des exons codant pour les motifs EGF (rectangle gris). Les flèches indiquent la position des amorces utilisées pour détecter la délétion de la région de 3.5 kb contenue entre les deux sites loxP.

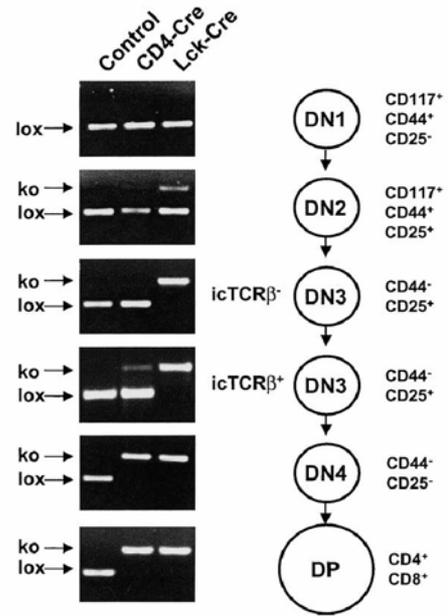


Question 1. Expliquer pour quelle(s) raison(s) ces différentes constructions ont été utilisées.

Question 2. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 6.

Figure 6 : Inactivation conditionnelle de *Notch1* au cours du développement thymique

La délétion de la région de 3.5 kb contenue entre les deux sites loxP a été déterminée par PCR (cf. position des amorces sur la Figure 5) pour les sous-populations thymiques indiquées (DN1–DN4 et DP), isolées chez des souris *Notch1*^{lox/lox} (control), *Notch1*^{lox/lox} x *CD4-Cre* (CD4-Cre), ou *Notch1*^{lox/lox} x *Lck-Cre* (Lck-Cre) souris. L'amplification de l'allèle *Notch1*^{lox/lox} aboutit à un fragment de 350 bp (lox), tandis que l'allèle délété donne une bande de 470 bp (ko). Les thymocytes DN3 ont été triés en deux sous-populations précoces et tardives selon l'expression cytoplasmique pour la chaîne TCRβ (icTCRβ⁻ ou icTCRβ⁺).



L'influence de *Notch1* sur la différenciation thymique est ensuite étudiée chez les souris *Notch1*^{lox/lox} x *lck-Cre* (dénommée *Notch1*^{-/-} dans la suite de l'exercice) par comparaison aux souris *Notch1*^{lox/lox} (control). Les résultats de l'analyse des sous-populations thymiques par cytométrie de flux chez ces souris sont présentés à la Figure 7.

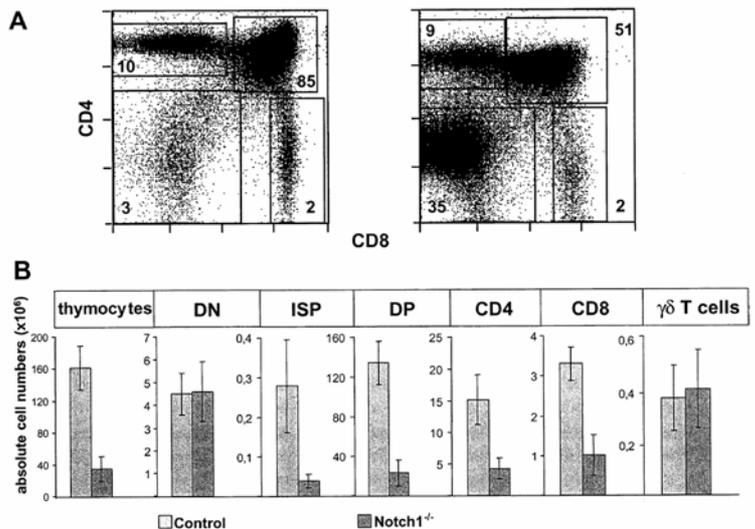
Question 3. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 7.

Question 4. Quelle(s) sous-population(s) sont-elles affectées par l'inactivation de *Notch1* chez les souris *Notch1*^{-/-} ?

Figure 7 : Sous-populations thymiques chez les souris *Notch1*^{-/-} et control

(A) Une analyse de cytométrie de flux des thymocytes des souris *Control* (à gauche) ou *Notch1*^{-/-} (à droite) est présentée pour les marqueurs CD4 et CD8. Les pourcentages de cellules CD4 SP, CD4⁺CD8⁺ (DP), CD8 SP, et CD4⁺CD8⁻ (DN) sont indiqués dans chaque cadran.

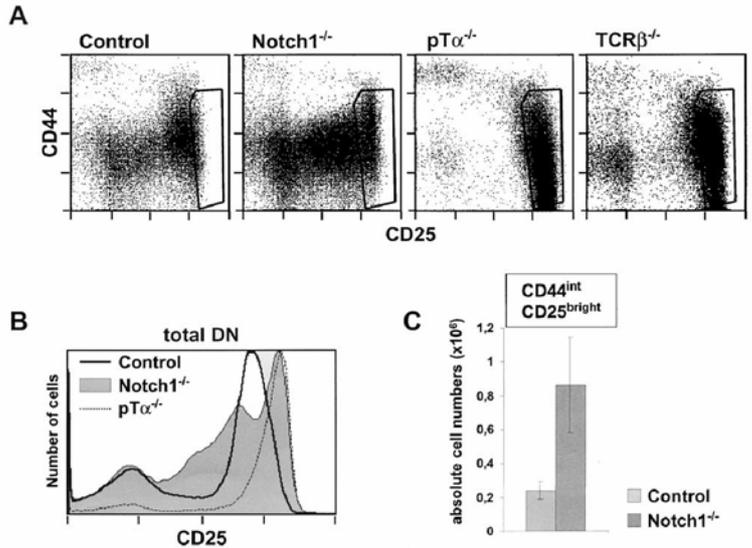
(B) Les nombres absolus de cellules ont été déterminés pour les thymocytes totaux et les différentes sous-populations de thymocytes décrites en (A), en plus des cellules ISP (CD4⁺CD8⁺CD3⁻) et les cellules Tγδ matures. Les écarts-types sont indiqués (n=20 pour chaque groupe).



Afin de préciser le point de blocage du développement thymique observé chez les souris *Notch1*^{-/-}, la sous-population CD4⁺CD8⁻ (DN) est plus particulièrement étudiée chez ces souris par comparaison aux souris *Control* et à des souris déficientes pour pTα (pTα^{-/-}) ou TCRβ (TCRβ^{-/-}). Les résultats sont présentés à la Figure 8 :

Figure 8 : Analyse phénotypique des cellules CD4⁺CD8⁻ (DN) chez les souris Notch1^{-/-}

(A) Analyse en cytométrie de flux des thymocytes DN pour les marqueurs CD44 et CD25 chez les souris Control, *Notch1*^{-/-}, *pTα*^{-/-} et *TCRβ*^{-/-}. La fenêtre dessinée met en évidence l'accumulation de thymocytes DN3 CD44^{int}CD25^{bright}.
 (B) Histogrammes des profils d'expression de CD25 pour la sous-population de thymocytes DN totale chez les souris Control (ligne pleine), *Notch1*^{-/-} (en grisé), et *pTα*^{-/-} (pointillé).
 (C) Nombres absolus de thymocytes CD44^{int}CD25^{bright} chez les souris Control (gris clair) et *Notch1*^{-/-} (gris foncé). Les écarts-types sont indiqués pour les souris Control (n=10) et *Notch1*^{-/-} (n=13).



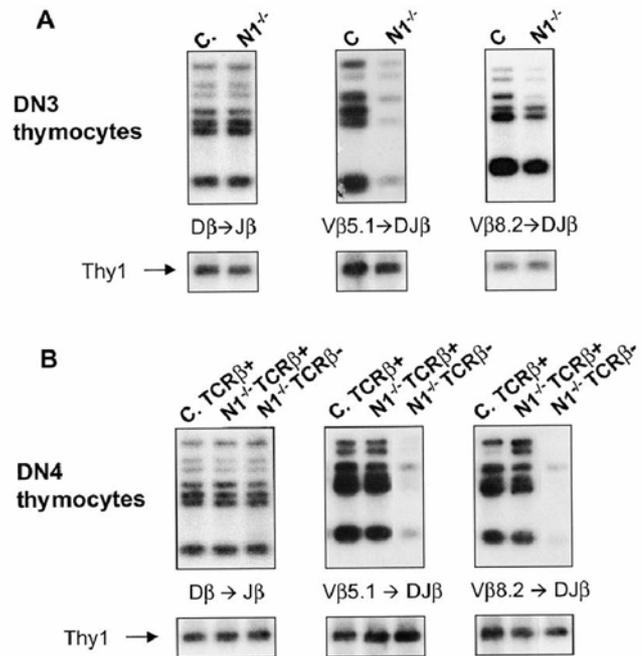
Question 5. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 8.

Question 6. A quel stade le blocage de la différenciation des thymocytes a-t-il lieu ?

La fréquence des réarrangements au niveau du locus TCRβ est étudiée au niveau de l'ADN génomique. Les résultats sont présentés sur la Figure 9 :

Figure 9 : Analyse des réarrangements TCRβ

(A) L'ADN génomique de thymocytes DN3 triés de souris Control (C.) ou *Notch1*^{-/-} (N1^{-/-}) a été analysé par PCR pour la présence de réarrangements Dβ-Jβ, Vβ5.1-Jβ et Vβ8.2-Jβ. Les produits d'amplification ont été révélés par la technique de Southern blot à l'aide d'une sonde Dβ2-Jβ2.6. Le gène témoin Thy1 est révélé après PCR et hybridation avec une sonde Thy1.
 (B) Les thymocytes DN4 de souris Control ou *Notch1*^{-/-} ont été triés pour l'expression cytoplasmique de la chaîne TCRβ (icTCRβ). Les réarrangements TCRβ ont été analysés comme précédemment pour les cellules DN4 des souris Control icTCRβ⁺ (C.TCRβ⁺), *Notch1*^{-/-} icTCRβ⁺ (N1^{-/-}TCRβ⁺) ou *Notch1*^{-/-} icTCRβ⁻ (N1^{-/-}TCRβ⁻).



Question 7. Analyser et interpréter les résultats présentés à la Figure 9.

Question 8. Quel serait l'effet de l'introduction d'un transgène codant une chaîne TCRβ réarrangée chez les souris *Notch1*^{-/-} ?

IF2008 TD-IF 3 :
Structure/Fonction des récepteurs de l'immunité

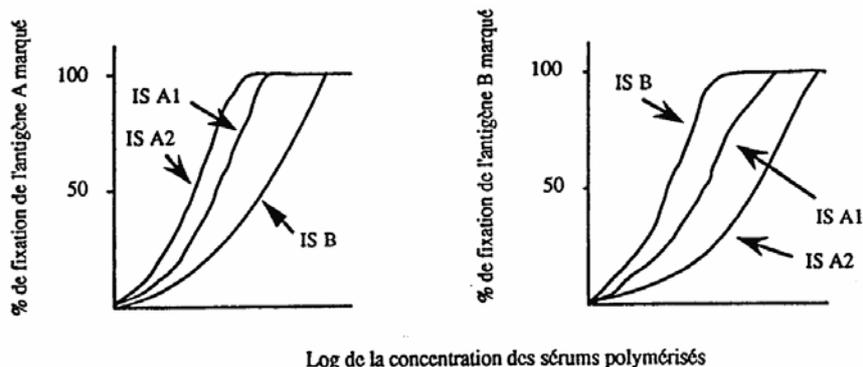
Structure/Fonction des récepteurs de l'immunité

I.

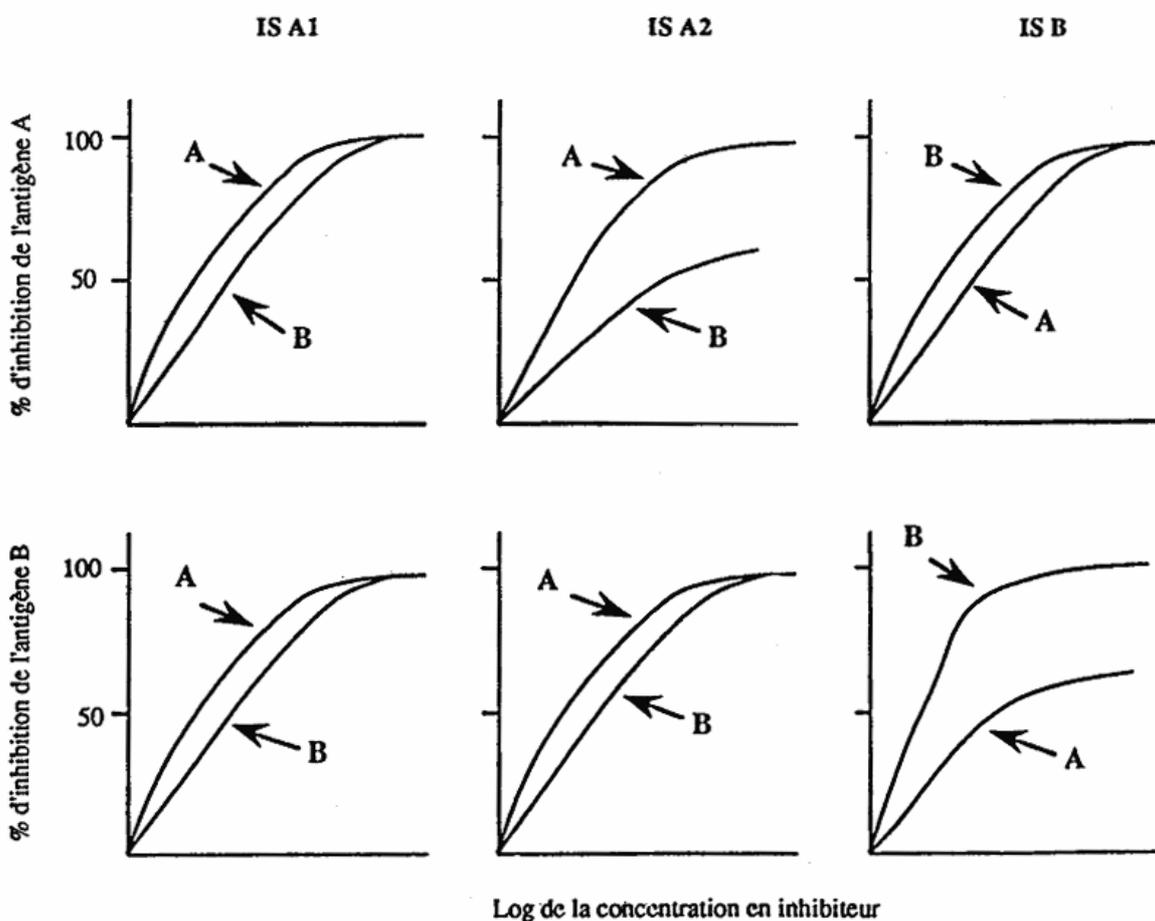
Des immunsérums sont préparés contre deux antigènes A et B :

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

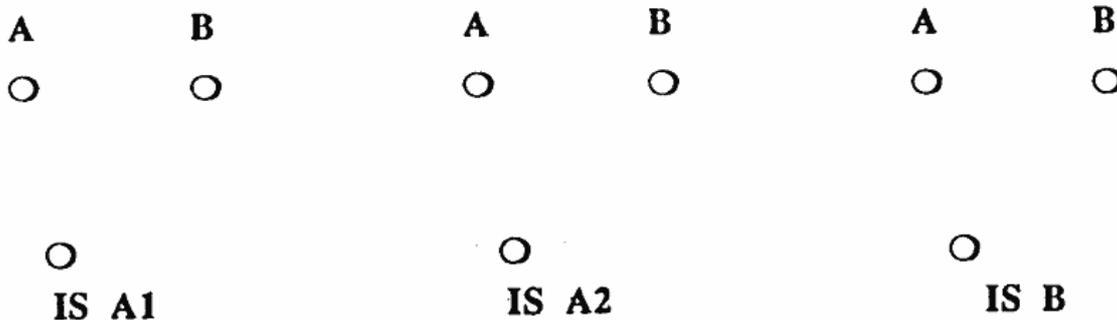
Ces trois immunsérums précipitent en milieu liquide les antigènes A et B. Les courbes de fixation des antigènes marqués sur les sérums insolubilisés sont les suivantes :



L'inhibition de la fixation des antigènes marqués sur les différents immunsérums, par A et B froids, donne les résultats suivants :



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ? Complétez, sur la base de ces conclusions, les schémas suivants (précipitation en milieu gélifié) :

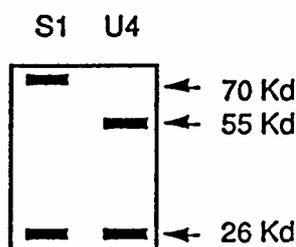


II.

L'hybridome S1 a été obtenu en fusionnant les cellules d'un myélome non sécréteur avec les cellules spléniques d'une souris immunisée contre la phosphorylcholine (PC) couplé à de l'hémocyanine. S1 synthétise un anticorps d'isotype μ, κ . Après un nouveau clonage de l'hybridome S1, 30000 clones sont obtenus, l'un d'eux (U4) est particulièrement étudié.

Les cellules S1 ou U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S . Les immunoglobulines sécrétées sont précipitées par un sérum de lapin anti- κ , puis réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. L'autoradiographie de ce gel est présentée sur la **Figure 1** :

Figure 1



Question 1. Proposer au moins deux hypothèses pour expliquer ces résultats.

La spécificité des immunoglobulines sécrétées par U4 est analysée par des tests d'hémagglutination. Une éventuelle activité anti-PC est recherchée vis-à-vis de la phosphorylcholine couplée aux globules rouges de mouton (PC-GRM). Les titres agglutinants obtenus sont présentés dans le **Tableau 1** :

Tableau 1

Surnageant de culture	GRM	PC-GRM	Hémagglutination de PC-GRM en présence d'un sérum amplificateur	
			Anti-IgM	Anti-IgG1
S1	0*	7	7	7
U4	0	0	0	5

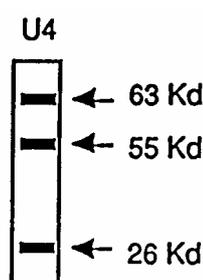
* Titre d'hémagglutination

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

Les cellules U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S , puis lysées. Les immunoglobulines ainsi synthétisées sont précipitées par un anti- κ , réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. La **Figure 2** ci-dessous présente l'autoradiographie obtenue.

Question 3. Comment expliquer la présence des deux chaînes lourdes ? Est-ce compatible avec le caractère monoclonal des hybridomes ?

Figure 2



N.B. : La séquence partielle NH₂-terminale des deux chaînes lourdes est identique au VH de S1.

III.

Une protéine de myélome, de souris BALB/c, appelée TEPC15, et qui possède une spécificité anti-phosphorylcholine (PC), est injectée à une souris de souche A/He. Les splénocytes immuns sont fusionnés aux cellules d'un myélome non sécréteur de souris BALB/c. La spécificité des anticorps monoclonaux anti-T15 est analysée en inhibant l'interaction T15 radioactif/anticorps monoclonaux par d'autres anticorps monoclonaux ou des protéines de myélomes tous d'origine BALB/c (**Tableau 2**).

Tableau 2

Hybridomes	Inhibiteurs											
	a	T15	167	603	HPCM2	G1	G3	61	558	104	109	315
	b	κ, α	κ, α	κ, α	κ, μ	$\kappa, \gamma 1$	$\kappa, \gamma 3$	κ, α	λ, α	λ, μ	κ, α	λ, α
c	PC	PC	PC	PC	PC	PC	Lev	Lev	Dex	Lev	TNP	
S1 60	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	
S1 04	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
2E8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

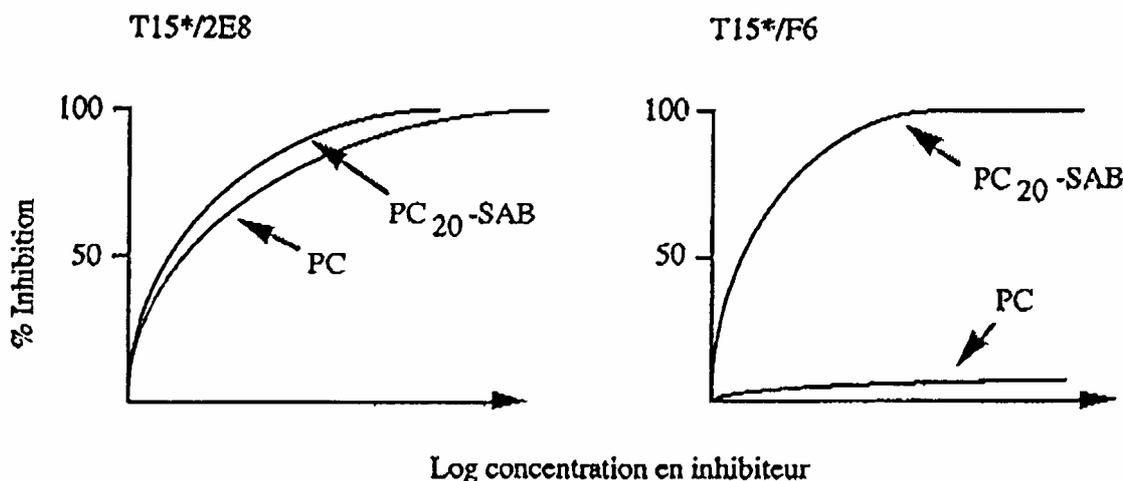
a: Nomenclature des inhibiteurs,
 b: Isotype des chaînes légère et lourde,
 c: Nature de l'antigène reconnu
 PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.
 + = inhibition, - = pas d'inhibition.

Question 1. Quelle peut être la spécificité de chaque anticorps monoclonal ?

L'interaction T15 radioactif/anticorps 2E8 ou anticorps F6 est étudiée en présence de l'antigène PC ou de ce dernier couplé à la sérum albumine bovine (PC₂₀-SAB). La Figure 3 résume les caractéristiques de ces inhibitions.

Question 2. Interpréter ces résultats.

Figure 3



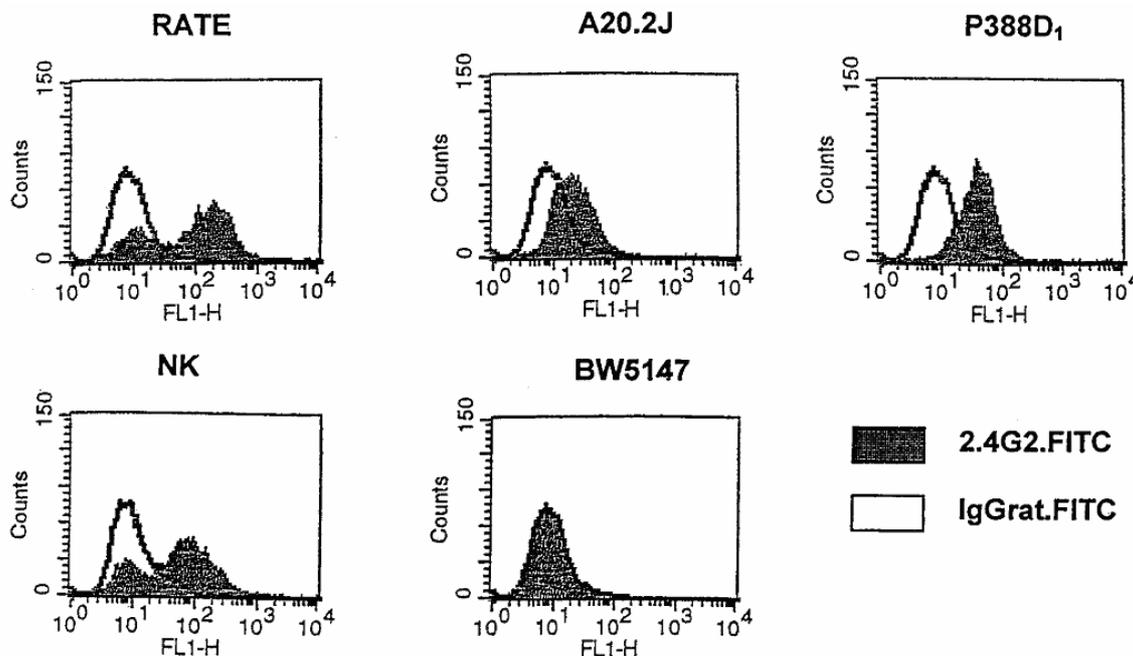
IV.

Il existe, chez la souris, deux types de récepteurs Fc γ liant les complexes immuns à IgG, les RFc γ II et RFc γ III qui sont codés par deux gènes distincts. Les RFc γ II et RFc γ III sont des glycoprotéines transmembranaires qui présentent une forte identité de séquence dans les régions extracellulaire et transmembranaire mais pas dans les régions cytoplasmiques.

On analyse l'expression et la nature de ces récepteurs sur les cellules du système immunitaire de la souris. On utilise des cellules de rate, différentes lignées cellulaires : lignée de macrophages (P388D1), de cellules B (A20.2J), de cellules T (BW5147), et des cellules NK obtenues par culture de cellules de rate pendant 5 jours en présence d'IL2.

Dans une première expérience, on réalise un test d'immunofluorescence avec un anticorps monoclonal de rat anti-RFc γ II et anti-RFc γ III (2.4G2) ou avec une IgG monomérique contrôle couplés à de la fluorescéine. L'analyse des suspensions cellulaires au FACS donne les résultats présentés dans la **Figure 4**.

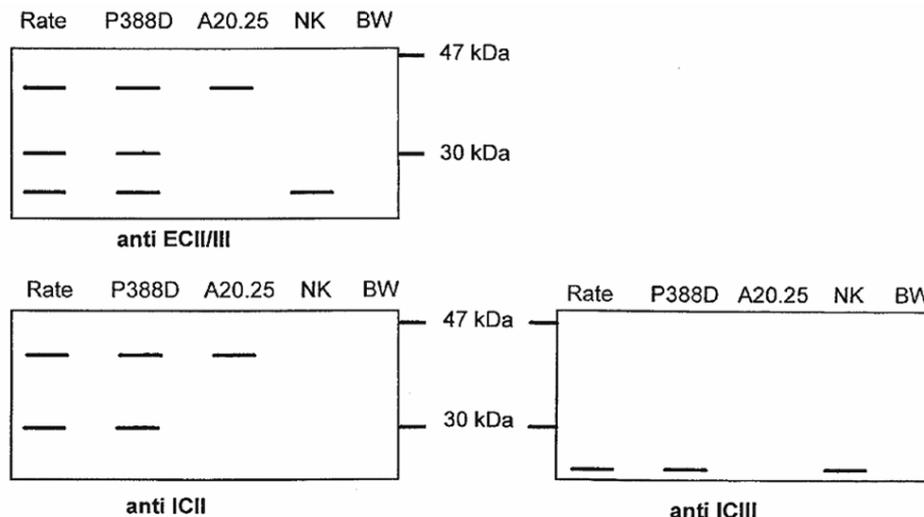
Figure 4



Question 1. Que concluez-vous ?

On réalise ensuite une expérience de Western blot. Pour cela, on immunoprécipite, à l'aide de l'anticorps 2.4G2, les Rf γ II et Rf γ III à partir d'extraits membranaires préparés par traitement des cellules au détergent triton X100. On traite les immunoprécipités par la PNGase, une enzyme qui hydrolyse les groupements N-glycosylés et on réalise une migration des échantillons dans un gel d'acrylamide en présence de SDS. On transfère les protéines sur un filtre de nitrocellulose. On fait ainsi migrer trois gels contenant la même série d'échantillons. On incube ensuite chacun des filtres soit avec des anticorps de lapin dirigés contre le domaine extracellulaire des Rf γ II et Rf γ III (anti-ECII/III), soit avec des anticorps de lapin dirigés contre les régions cytoplasmiques des Rf γ II (anti-ICII) ou des Rf γ III (anti-ICIII). On révèle les anticorps fixés sur les trois filtres à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase et d'un système de révélation approprié. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 5**.

Figure 5



Question 2. Comment interprétez-vous ces résultats ?

V. Vrai ou Faux ? [pour information]

- **Vrai ou Faux :** Une molécule anticorps a un type donné de site anticorps.
- **Vrai ou Faux :** Différentes molécules d'anticorps peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Différents récepteurs T peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Les immunoglobulines et les récepteurs des cellules T présentent des analogies structurales.
- **Vrai ou Faux :** Un haptène peut stimuler la production d'anticorps mais ne peut pas se combiner à des anticorps.
- **Vrai ou Faux :** La classe prédominante lors d'une réponse secondaire est IgM.
- **Vrai ou Faux :** Dans une immunoglobuline, la région "charnière" relie les chaînes légères aux chaînes lourdes.
- **Vrai ou Faux :** La région VH est deux fois plus longue que la région VL.
- **Vrai ou Faux :** Le site anticorps se compose principalement de la chaîne légère.
- **Vrai ou Faux :** Les molécules IgG1 et IgG2 sont définies par les différences de séquences en acides aminés dans les chaînes légères.
- **Vrai ou Faux :** Une cellule B peut présenter différentes molécules anticorps à sa surface.
- **Vrai ou Faux :** La spécificité des cellules T cytotoxiques est généralement restreinte aux antigènes d'histocompatibilité de classe II.
- **Vrai ou Faux :** Des facteurs génétiques autres que ceux liés aux gènes codant pour les immunoglobulines interviennent lors d'une réponse immunitaire.

IF2008 TD-IF 4 :
Interface Immunité innée/Immunité adaptative

Interface Immunité innée/Immunité adaptative

I. Les récepteurs Nod

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

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

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

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

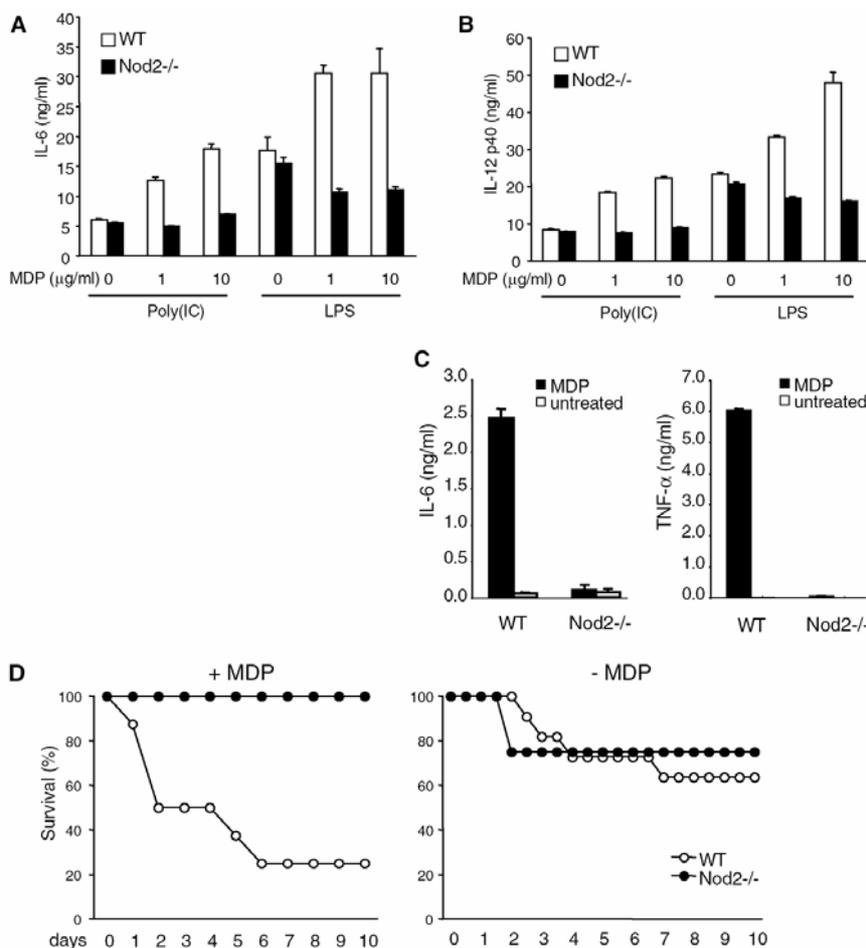


Figure 1

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

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

D : Courbes de survie de souris WT ou Nod2^{-/-} après injection de LPS en présence ou en absence de MDP.

Question 2. Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 1. (15 lignes maximum)

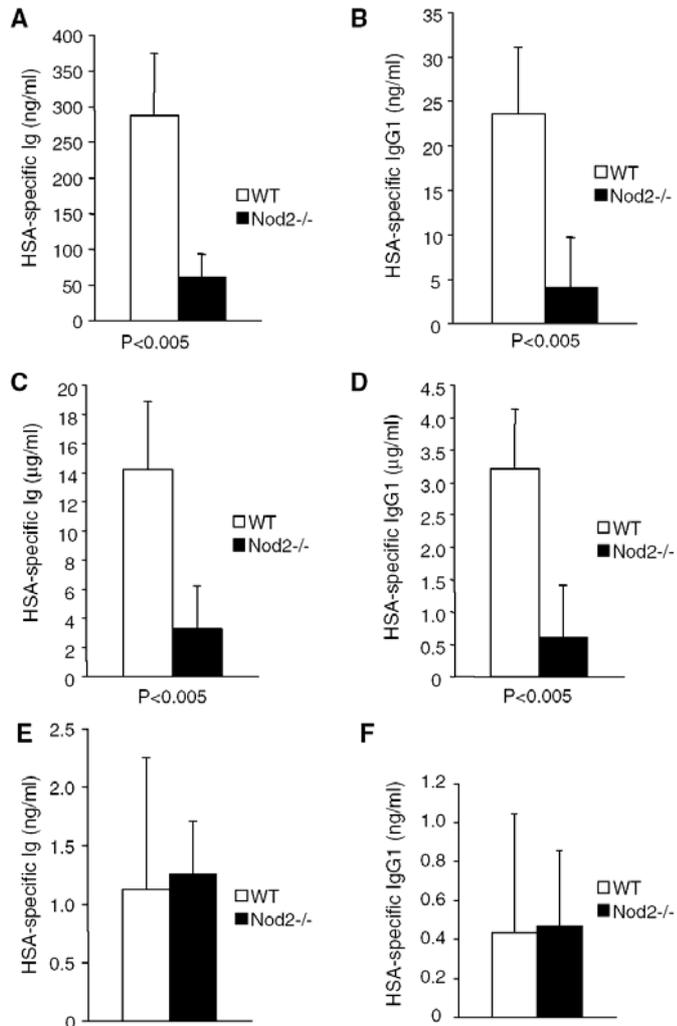
Question 3. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous avancer pour rendre compte de ces résultats quant au rôle de Nod2. (5 lignes maximum)

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

Figure 2

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

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



Question 4. Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 2. (10 lignes maximum)

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

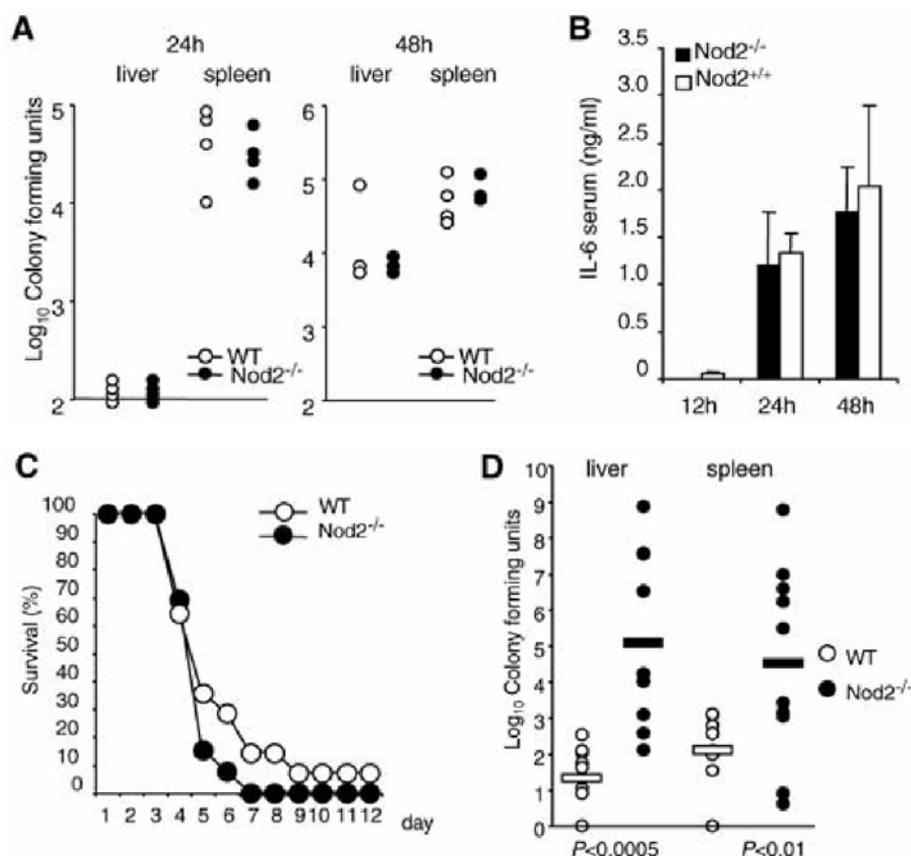


Figure 3

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

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

C : La survie de souris WT ou Nod2^{-/-} est mesurée après infection par *L. monocytogenes* par voie intrapéritonéale.

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

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

Question 5. Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 3. (10 lignes maximum)

Question 6. Que concluez-vous quant au rôle de Nod2 dans la protection contre des pathogènes bactériens. (5 lignes maximum)

II. Les récepteurs Toll-like

(D'après Lund, J. M., *et al.* (2004) *PNAS* 101:5598)

Les infections virales chez les mammifères mettent en jeu les voies d'activation de l'immunité innée impliquant notamment les TLR (*Toll-like receptors*).

Question 1. *Rappelez les caractéristiques fonctionnelles des TLR. (5 lignes maximum)*

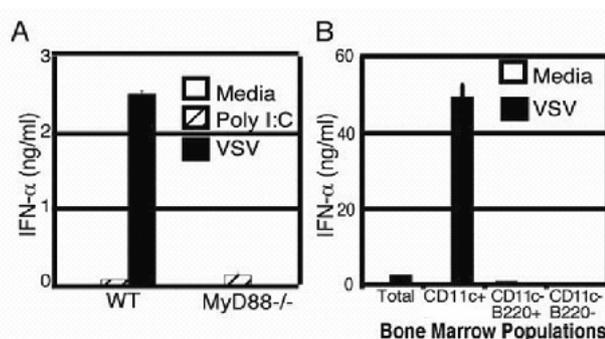
La présente étude s'intéresse à la voie d'activation mise en jeu en réponse à l'infection par des virus à ARN simple-brin comme le VSV (*vesicular stomatitis virus*) et le virus de la grippe (*influenza*). Dans une première expérience, les auteurs mesurent par ELISA la production d'IFN- α par des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88^{-/-}) cultivées en présence de VSV ou de PolyI:C, un ARN double-brin synthétique. Dans un deuxième temps, une expérience similaire est réalisée à partir de populations de moelle osseuse triées comme indiqué. Les résultats sont montrés sur la **Figure 4**. Par ailleurs, des cellules de moelle osseuse incubées en présence d'ARN simple brin synthétique produisent des quantités comparables d'IFN- α à celles observées pour VSV chez les souris WT et MyD88^{-/-}.

Figure 4

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour le gène MyD88 (MyD88^{-/-}) ont été cultivées en présence de VSV ou de PolyI:C, un ARN double-brin synthétique, ou sans stimulus (Media). Après 18h de culture, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA.

B : La même expérience est réalisée à partir de populations triées de moelle osseuse (Total ; CD11c⁺B220⁻ ; CD11c⁻B220⁺ ; CD11c⁻B220⁻).

N.B : La faible production d'IFN- α observée en réponse à polyI:C est néanmoins significative.



Question 2. *A l'aide d'un tableau comparatif, rappelez le principe de l'ELISA et d'une autre technique permettant de mesurer la production de cytokines.*

Question 3. *Analysez ces résultats en comparant les voies d'activation mises en jeu par les ARN double-brin et simple-brin. (5 lignes maximum)*

Question 4. *Quelle population pensez-vous être activée par le VSV ? (5 lignes maximum)*

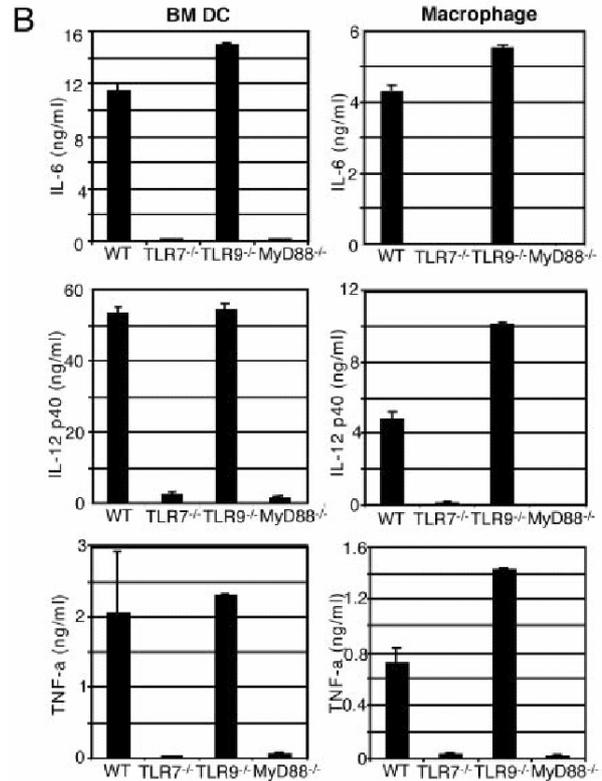
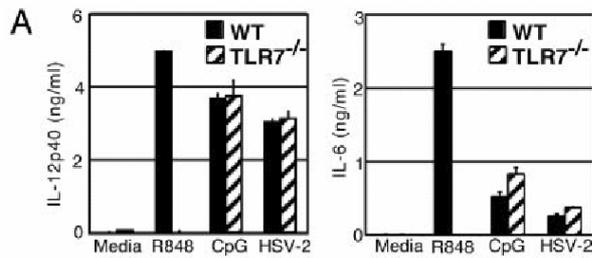
De nombreux TLR sont exprimés par les cellules dendritiques. Etant donné que le mode d'infection du VSV implique un mécanisme d'endocytose, les auteurs ont porté leur attention sur TLR7 et TLR9 qu'on retrouve au niveau des endosomes. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse ou de macrophages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

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

Figure 5

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage (WT) ou invalidées pour TLR7 (TLR7^{-/-}) ont été cultivées en présence de R848 (un ligand synthétique de TLR7), d'ADN CpG ou de HSV2 (un virus à ADN) ou sans stimulus (Media). Après 18h de culture, l'IL-12 et l'IL-6 produites ont été mesurées dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules dendritiques de moelle osseuse (BM DC) et des macrophages de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, invalidées pour le gène TLR9 (TLR9^{-/-}), ou MyD88^{-/-} ont été cultivées en présence de R848. Après 48h de culture, l'IL-6, l'IL-12 et le TNF-α produits ont été mesurés dans les surnageants de culture par ELISA.



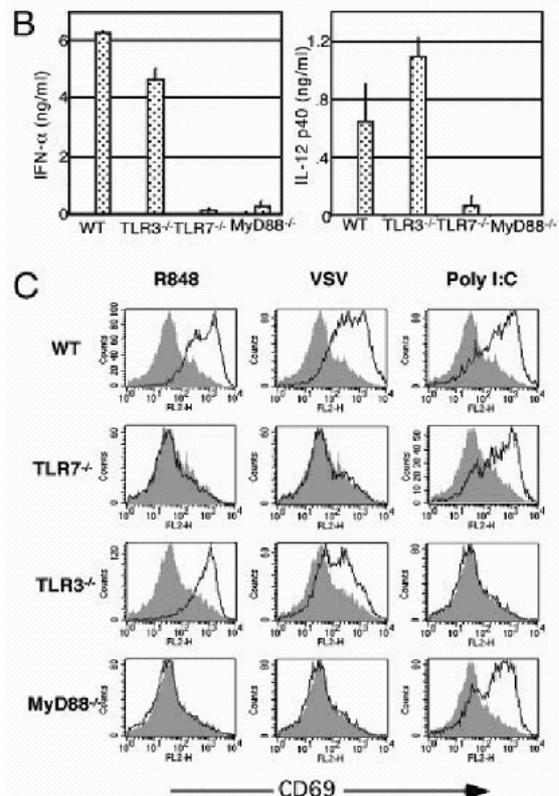
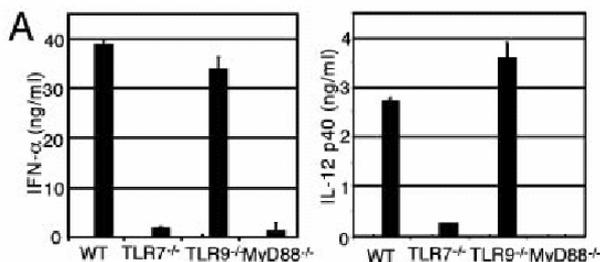
Les auteurs étudient ensuite le rôle de TLR7 pour la production d'IFN-α en réponse aux virus VSV et influenza. La réponse de cellules dendritiques de moelle osseuse a été étudiée chez des souris de type sauvage, TLR7^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR3^{-/-} ou Myd88^{-/-} (Figure 6).

Figure 6

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

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

C : Des splénocytes de souris de type sauvage (WT), TLR7^{-/-}, TLR3^{-/-} ou MyD88^{-/-} ont été cultivés en présence de R848, de virus VSV ou de PolyI:C. Après 18h de culture, les cellules sont analysées par cytométrie de flux avec un anticorps anti-CD69. Les histogrammes montrent le profil d'expression des cellules B220⁺. Les profils ombrés correspondent au témoin sans stimulus.



Question 6. Qu'apportent ces nouveaux résultats ? (10 lignes maximum)

Après liaison sur son récepteur membranaire, la particule virale VSV pénètre par endocytose ; après fusion avec un lysosome, l'environnement acide entraîne la fusion de la membrane virale avec la membrane du lysosome et la nucléocapside virale est libérée dans le cytosol. Afin de préciser la localisation cellulaire où a lieu l'activation de TLR7 par VSV, les auteurs étudient l'activation de cellules dendritiques de souris de type sauvage par VSV en présence de chloroquine, un inhibiteur de l'acidification des lysosomes (**Figure 7**).

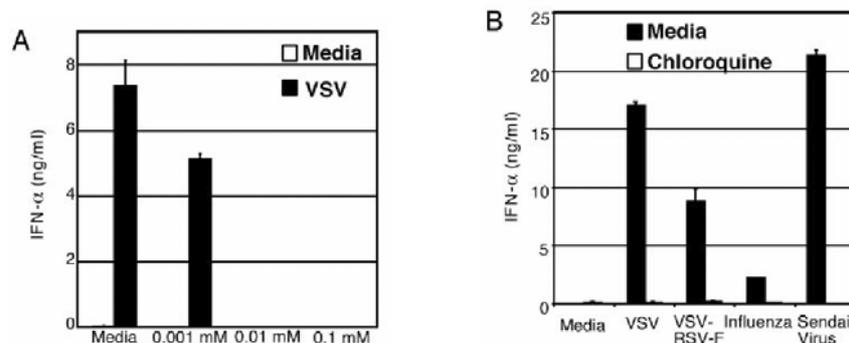


Figure 7

A : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage ont été prétraitées pendant 2h en présence de milieu seul (Media) ou de concentrations croissantes de chloroquine comme indiqué. Les cellules ont alors été infectées par le virus VSV. Après 18h, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA.

B : Des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage prétraitées pendant 2h en présence de milieu seul (Media) ou de chloroquine (0,1 mM) ont été stimulées par les virus VSV, VSV-RSV-F, Influenza ou Sendai. Après 18h, l'IFN- α produit a été mesuré dans les surnageants de culture par ELISA. VSV-RSV-F est un virus VSV recombinant exprimant la protéine F du virus RSV (*respiratory syncytial virus*) qui permet la pénétration du virus par fusion avec la membrane plasmique de manière indépendante du pH ; VSV-RSV-F exprime toujours la protéine G de VSV impliquée dans la pénétration du virus par la voie lysosomale dépendante du pH. Le virus Sendai est un autre virus à ARN simple-brin qui pénètre exclusivement par fusion avec la membrane plasmique.

Question 7. Analysez soigneusement ces résultats. (5 lignes maximum)

Question 8. A l'aide d'un schéma récapitulatif, résumez la voie TLR activée par les virus à ARN simple-brin.

IF2008 TD-IF 5 :
Cytokines & Chimiokines

Cytokines & Chimiokines

I.

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

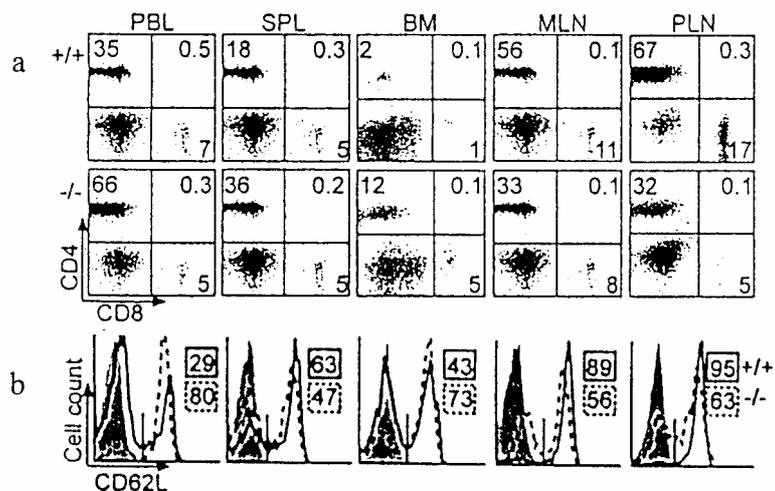
Dans le but d'étudier la régulation de la circulation des leucocytes dans l'organisme, des souris déficientes pour le récepteur CCR7 de chimiokine ont été générées par recombinaison homologue. Dans tous les cas, les animaux mutés sont viables et fertiles. On se propose d'étudier les conséquences de la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

Chez les souris CCR7^{-/-}, la dissection des principaux organes lymphoïdes secondaires montre des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer de petites tailles alors que les rates sont généralement très volumineuses. Pour étudier la distribution tissulaire des lymphocytes T au sein de ces organes, des expériences de double marquage sont réalisées à l'aide d'anticorps (AC) anti-CD4/anti-CD8 ou anti-CD3/anti-CD62L couplés à des fluorochromes. Les lymphocytes sont isolés à partir du sang ou des organes lymphoïdes de souris de type sauvage (+/+) ou déficientes en CCR7 (-/-). La **Figure 1** montre les résultats des analyses de cytométrie en flux (FACS).

Figure 1

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

Il est précisé que seules les cellules CD3⁺ sont analysées sur la Figure 1b et que les cellules CD62L⁺ expriment la L-sélectine et sont majoritairement des lymphocytes T naïfs.

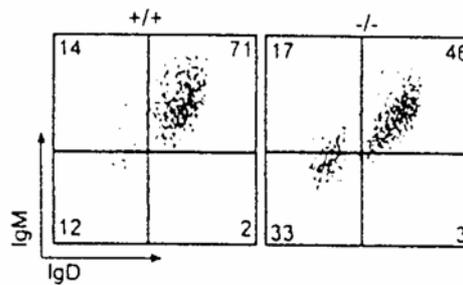


Question 1. Commentez l'ensemble des résultats.

Afin de compléter cette analyse, les cellules extraites des ganglions lymphatiques de souris de type sauvage (+/+) ou déficientes en CCR7 (-/-) sont marquées avec des AC couplés à des fluorochromes et spécifiques des lymphocytes B. L'analyse par FACS du double marquage anti-IgD/anti-IgM de la population cellulaire B220⁺ est montrée sur la **Figure 2**.

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

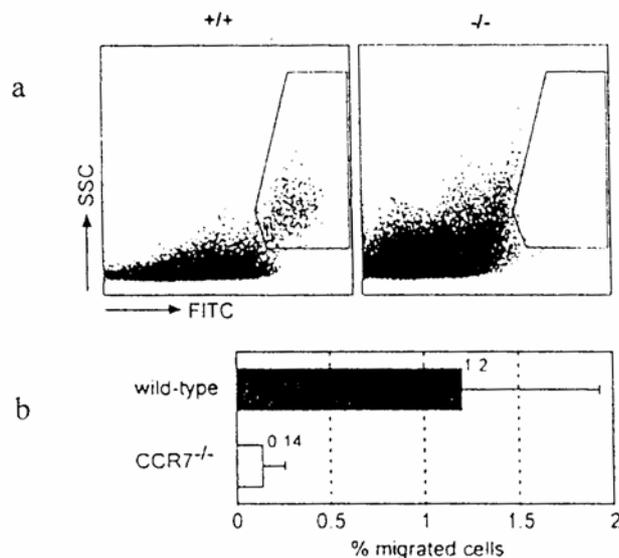
Figure 2



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

De l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est appliquée à forte concentration sur des portions de l'épiderme du thorax et de l'abdomen de souris de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7^{-/-}. Après 24 heures de traitement, les ganglions lymphatiques de drainage sont prélevés (ganglions lymphatiques inguinaux, axillaires et brachiaux) et les cellules extraites des organes sont analysées par FACS. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 3** ; les pourcentages moyens des cellules contenues dans le contour d'intérêt de la **Figure 3a** sont établis avec précision sur la **Figure 3b**.

Figure 3



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

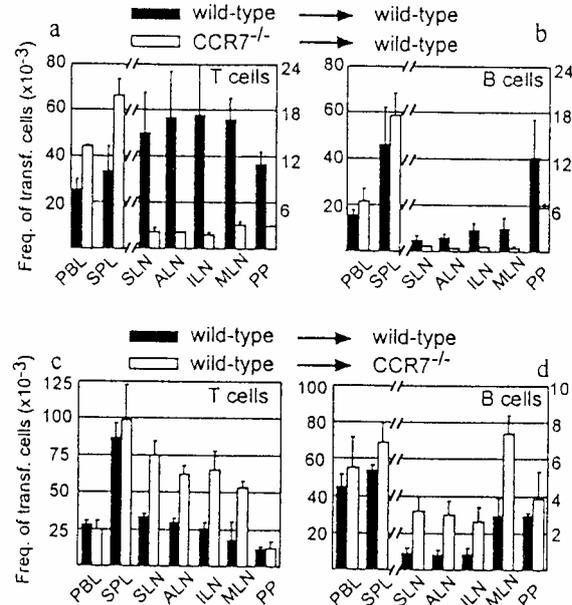
Les lymphocytes T (Thy-1⁺) et B naïfs (IgD⁺) fluorescents, issus de souris de type sauvage ou mutantes CCR7^{-/-} sont injectés à des animaux de type sauvage (**Figure 4a et b**) ; par ailleurs, les lymphocytes T (Thy-1⁺) et B naïfs (IgD⁺) fluorescents, issus de souris de type sauvage sont injectés à des animaux de type sauvage ou mutants CCR7^{-/-} (**Figure 4c et d**). Cinq heures après le transfert cellulaire, les animaux receveurs sont sacrifiés, saignés et leurs principaux organes lymphoïdes secondaires sont prélevés. Les proportions de lymphocytes T et B fluorescents provenant des animaux donneurs sont déterminées par FACS et les résultats de l'analyse sont montrés sur la **Figure 4**.

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

Question 5. Pourquoi réalise-t-on les expériences inverses de transfert décrites sur les **Figure 4c et d** ? Quelle conclusion peut-on émettre ?

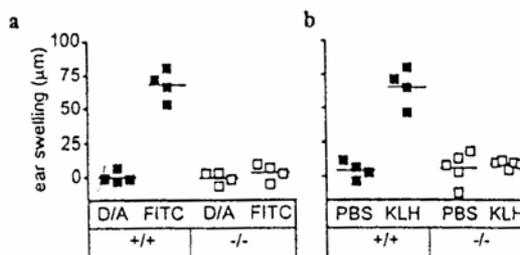
Figure 4

PBL: lymphocytes du sang périphérique; SPL: rate; SLN: ganglions lymphatiques submandibulaires; ALN: ganglions lymphatiques axillaires; ILN: ganglions lymphatiques inguinaux; MLN: ganglions lymphatiques mésentériques; PP: plaques de Peyer.



L'application cutanée d'une forte dose de FITC au niveau du thorax et de l'abdomen de souris de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7 (-/-) est réalisée (expérience a). L'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée (HR) est d'autre part étudiée en injectant de l'hémocyanine (KLH) par voie sous-cutanée aux animaux de type sauvage ou mutantes CCR7-/- (expérience b). Après 4 jours, la réaction est révélée par application d'une faible quantité de FITC (expérience a) ou par l'injection sous-cutanée de KLH (expérience b) dans un territoire cutané différent de celui utilisé lors de l'étape de sensibilisation. On mesure à 24 heures le diamètre de l'érythème et de l'induration. Les résultats obtenus sont décrits sur la **Figure 5**.

Figure 5



D/A: Dibutylphthalate/Acétone

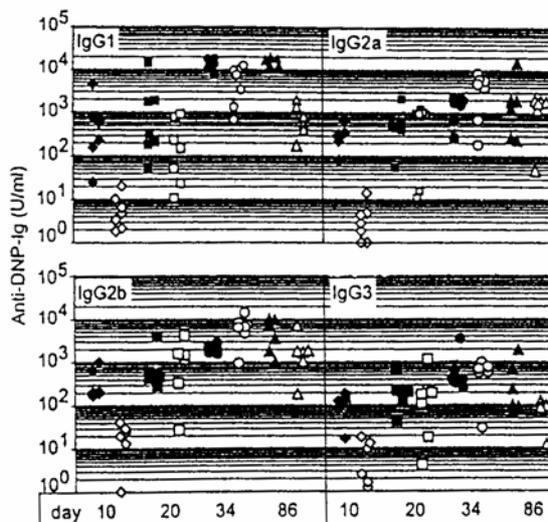
Question 6. Rappelez brièvement les différentes étapes provoquant l'inflammation locale d'un tissu. Pourquoi réalise-t-on ces expériences ? Que permettent-elles de confirmer ?

Les souris de type sauvage (+/+) ou mutantes CCR7 (-/-) sont immunisées avec 100 µg de DNP-KLH, puis rappelées au bout de 3 semaines avec le même antigène administré en quantité équivalente. La cinétique de la réponse anti-DNP est établie en quantifiant par ELISA les différents isotypes produits dans le sérum des animaux de type sauvage (symboles noirs) ou mutantes CCR7-/- (symboles clairs). La **Figure 6** montre le résultat de cette analyse.

Question 7. *Interprétez les résultats obtenus. Que peut-on en conclure quant aux rôles attribués au récepteur CCR7 ?*

Figure 6 :

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



II.

(Examen d'Immunologie Fondamentale - septembre 2002. D'après Sallusto, F. *et al.* (1997) *Science* 277:2005 ; Lloyd, C.M. *et al.* (2000) *J.Exp.Med.* 191:265)

La régulation de la migration des leucocytes est un processus complexe qui implique la participation de molécules d'adhésion comme les sélectines et les intégrines, ainsi que des chimiokines et leurs récepteurs.

L'action combinée des molécules d'adhésion et des chimiokines gouverne la migration des cellules du système immunitaire vers différents sites anatomiques (moelle osseuse, thymus, sang, peau, lymphes, organes lymphoïdes secondaires...).

Il existe deux catégories de lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes de type « Th1 » et les lymphocytes de type « Th2 ».

Question 8. *Rappelez, à l'aide d'un tableau comparatif synthétique, les caractéristiques principales de ces deux sous-populations de lymphocytes T.*

Les cellules « Th1 » et « Th2 » ne migrent pas vers les mêmes tissus. On constate que les sites où ont lieu les réactions allergiques contiennent des cellules « Th2 » en plus de polynucléaires éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB).

On sait par ailleurs que la chimiokine Eotaxine est produite par les cellules épithéliales et les phagocytes. Elle est un chimio-attractant pour les PNE et les PNB qui expriment CCR3, le récepteur de l'Eotaxine.

L'objectif des expériences suivantes est de comprendre par quel mécanisme les lymphocytes « Th2 » sont attirés dans les sites de réactions allergiques cutanées.

Expérience 1 :

Des expériences préliminaires ont permis de démontrer que dans le sang adulte, environ 1% des lymphocytes T expriment CCR3 (ceci n'est pas vrai dans le sang de cordon ombilical)

- A l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CCR3 et anti-CD3 couplés à un fluorochrome, on marque les cellules du sang adulte ou des lignées dérivées de ces cellules, et on analyse par

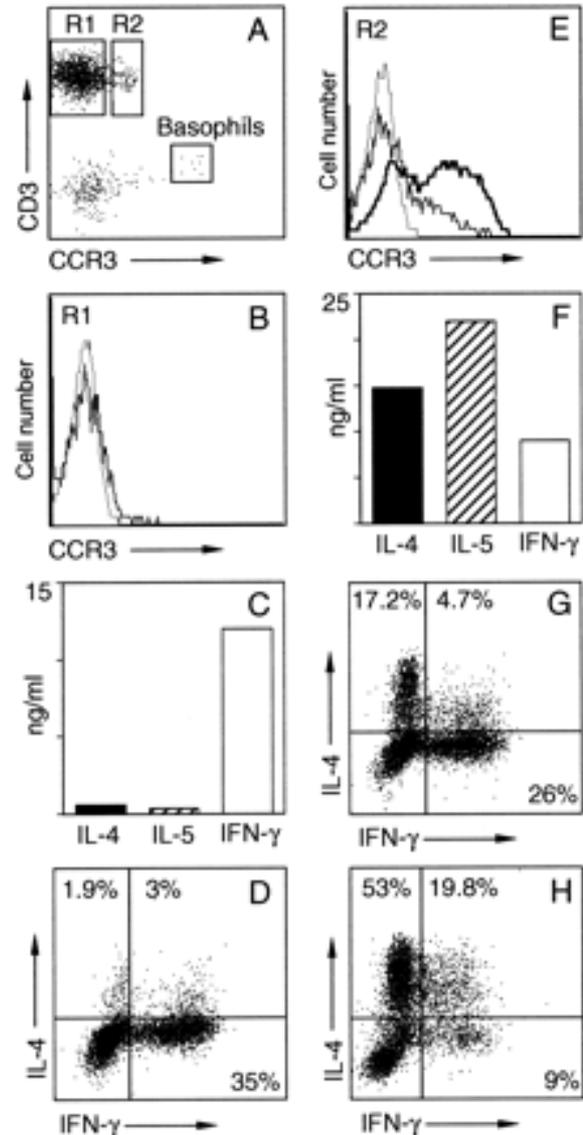
cytométrie de flux quelles cellules sont marquées par ces anticorps. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7** (cadrans A, B et E).

- On utilise deux méthodes pour mesurer les cytokines produites par ces cellules : on dose les cytokines IL-4, IL-5 et IFN- γ dans les surnageants cellulaires par un test ELISA, et la production d'IL-4 et d'IFN- γ par un marquage intracellulaire des cellules des fenêtres R1 et R2 (**Figure 7A**). Les résultats sont présentés sur la **Figure 7** (cadrans C, F, G, D et H).

Figure 7

- A. Expression de CD3 et CCR3 par les cellules du sang
- B. Expression de CCR3 par la lignée polyclonale issue des cellules de la fenêtre R1 (lignée R1)
- E. Expression de CCR3 par la lignée polyclonale issue des cellules de la fenêtre R2 (lignée R2)
- C. Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la lignée R1
- F. Production d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- γ (mesurée par test ELISA) par les cellules de la lignée R2
- D. Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par les cellules de la lignée R1
- G. Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par les cellules de la lignée R2
- H. Production des cytokines (IL-4 et IFN- γ) intracellulaires par des cellules triées sur la lignée R2 qui expriment CCR3

N.B. : Sur les cadrans B et E, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligne grisée). Sur le cadran E, la ligne noire correspond au marquage avec l'anticorps anti-CCR3 pour les cellules étudiées dans le cadran H.



Question 9. Comment les marquages membranaires et intracellulaires sont-ils effectués ?

Question 10. Quelles sont les cellules qui expriment le récepteur CCR3 ?

Question 11. Quelles conclusions pouvez-vous tirer de l'ensemble de ces expériences ?

Expérience 2 :

On cherche à déterminer les facteurs qui induisent l'expression de CCR3. Pour cela, des lymphocytes T naïfs, provenant de sang de cordon ombilical, n'exprimant pas CCR3, sont mis en culture avec de la PHA, un activateur polyclonal des lymphocytes T :

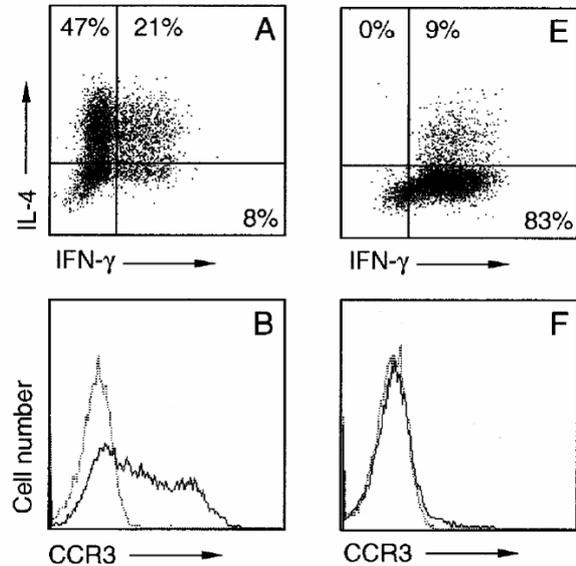
- soit en présence d'IL-12 et d'anticorps anti-IL-4 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules « Th1 »
- soit en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IL-12 ce qui permet aux lymphocytes de se différencier en cellules « Th2 »

Les résultats sont présentés sur la **Figure 8** :

Figure 8

- A. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th2
- B. Expression de CCR3 par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th2.
- E. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées dans des conditions induisant des Th1
- F. Expression de CCR3 par les cellules cultivées dans des conditions de polarisation Th1

N.B. : Sur les cadrans B et F, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligné grisée).



Question 12. *Quels nouveaux éléments ces expériences apportent-elles ?*

Expérience 3 :

On sait que les cytokines IFN- α et TGF- β peuvent interférer avec la différenciation Th2. On cherche à savoir si ces cytokines vont également interférer avec l'acquisition de l'expression de CCR3.

Des lymphocytes T de sang de cordon ombilical ont été cultivés en présence d'IL-4 et d'anti-IL-12, avec de l'IFN- α ou du TGF- β . Les résultats sont présentés sur la **Figure 9**.

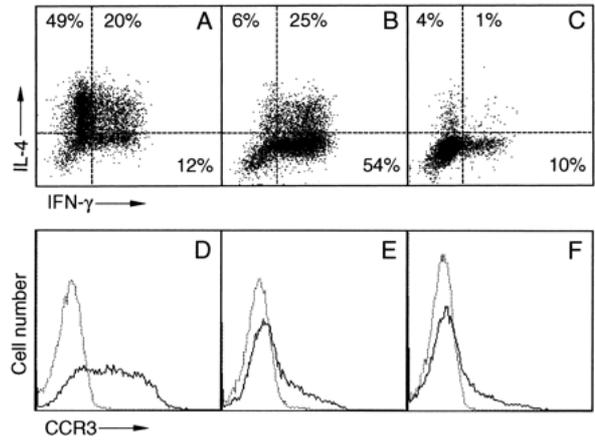
Question 13. *Quels sont les effets respectifs de l'IFN- α et du TGF- β sur l'induction de la polarisation Th1 et Th2, et sur l'acquisition de CCR3 ?*

Question 14. *Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre sachant que l'Eotaxine est surexprimée dans les sites de réactions allergiques ?*

Figure 9

- A. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12
- B. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN- α
- C. Détection des cytokines intracellulaires IL-4 et IFN- γ par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF- β
- D. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4 et anti-IL12
- E. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et IFN- α
- F. Expression de CCR3 par les cellules cultivées avec IL-4, anti-IL12 et TGF- β

N.B. : Sur les cadrans B et F, la ligne pointillée correspond au marquage avec un anticorps contrôle de même isotype que l'anticorps anti-CCR3 (ligné grisée).



Expérience 4 :

Il a également été montré que CCR4, le récepteur de la chimiokine MDC, produite par les macrophages, était exprimé par les lymphocytes Th2 et non pas Th1. On s'intéresse ici aux rôles fonctionnels respectifs des couples Eotaxine/CCR3 et MDC/CCR4 dans le recrutement des lymphocytes Th2 sur les sites de réactions allergiques dans un modèle de maladie respiratoire allergique :

- Les lymphocytes T d'une souris transgénique pour le TCR- α/β DO11.10 spécifique du peptide 323–339 de l'ovalbumine de poulet (OVA) présenté par I-A^d, sont cultivés en présence d'IL-12 et d'anticorps anti-IL-4 pour obtenir des cellules polarisées de type Th1, ou en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IL-12 pour obtenir des cellules polarisées de type Th2 ;
- $2 \cdot 10^6$ cellules polarisées Th1 ou Th2 sont injectées par voie intraveineuse à des souris BALB/c (H-2^d) ;
- Les souris BALB/c reçoivent alors une injection quotidienne de l'antigène OVA (ou du PBS pour les souris contrôles) par voie aérienne ;
- Les souris sont sacrifiées aux jours 4 ou 7 après le transfert cellulaire et l'intensité de l'inflammation est déterminée dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) et les tissus pulmonaires (cf. **Figure 10**) ;
- Les résultats sont présentés sur les **Figure 11** et **Figure 12**.

Figure 10

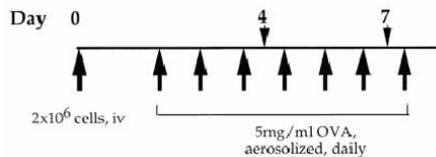
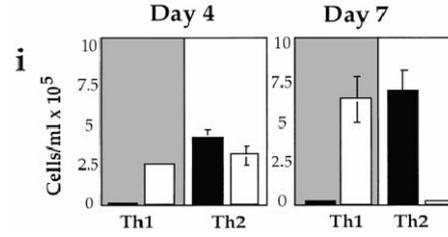


Figure 11 :

i. Numération des éosinophiles (barres noires) et basophiles (barres blanches) récupérés dans les BAL des souris BALB/c ayant reçu une injection de cellules effectrices transgéniques polarisées Th1 ou Th2, suivie d'injections quotidiennes par voie aérienne de l'antigène OVA. Les résultats sont donnés aux jours 4 et 7 après l'injection des cellules effectrices.



ii. Pourcentage d'éosinophiles (barres noires) et basophiles (barres blanches) dans les infiltrats cellulaires observés au niveau des tissus pulmonaires pour les mêmes conditions que ci-dessus (i).

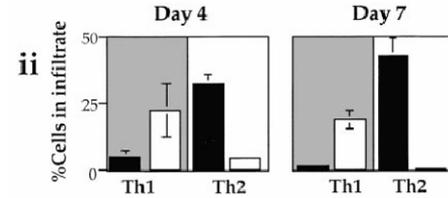
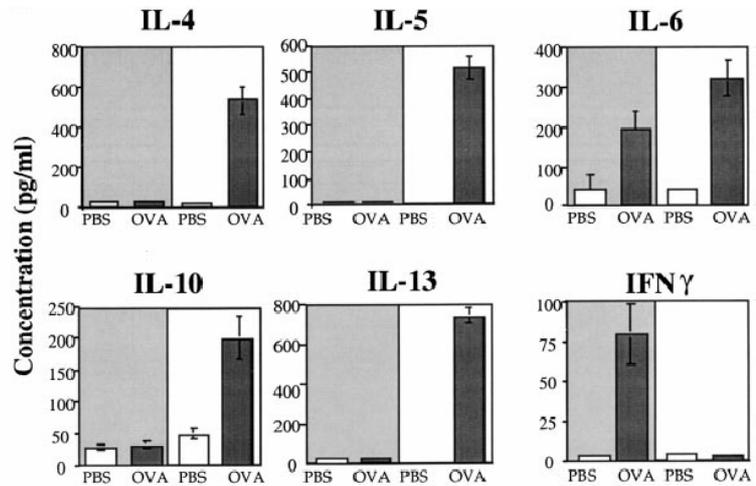


Figure 12 :

Mesure par ELISA de la production de cytokines dans les BAL des souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 (cadres grisés) ou Th2 (cadres blancs), et ayant subi un challenge avec l'antigène OVA (barres grisées) ou du PBS (barres blanches).

N.B. : Chaque résultat correspond à la moyenne (± écart-type) des mesures faites pour un groupe de cinq souris au jour 4 après l'injection des cellules effectrices.



Question 15. A l'aide d'un tableau comparatif, analysez soigneusement ces résultats ; en particulier, mettez en évidence les différences observées chez les souris ayant reçu des cellules polarisées Th1 ou Th2.

IF2008 TD-IF 6 :
Reconnaisances non classiques

Reconnaitances non-classiques

I.

(d'après Kunzmann, V. *et al.* (2000) *Blood* 96:384)

Les cellules malignes plasmocytaires causent une maladie appelée myélome multiple. C'est une maladie des os parce que les tumeurs se développent dans la moelle osseuse. Au fur et à mesure que les masses tumorales s'étendent, elles entraînent des érosions locales de l'os et l'apparition sur les radiographies de lésions osseuses multiples.

Question 1. Quelles modifications concernant l'hématopoïèse et la composition sérique en immunoglobuline observe-t-on chez les patients atteints de myélome multiple ?

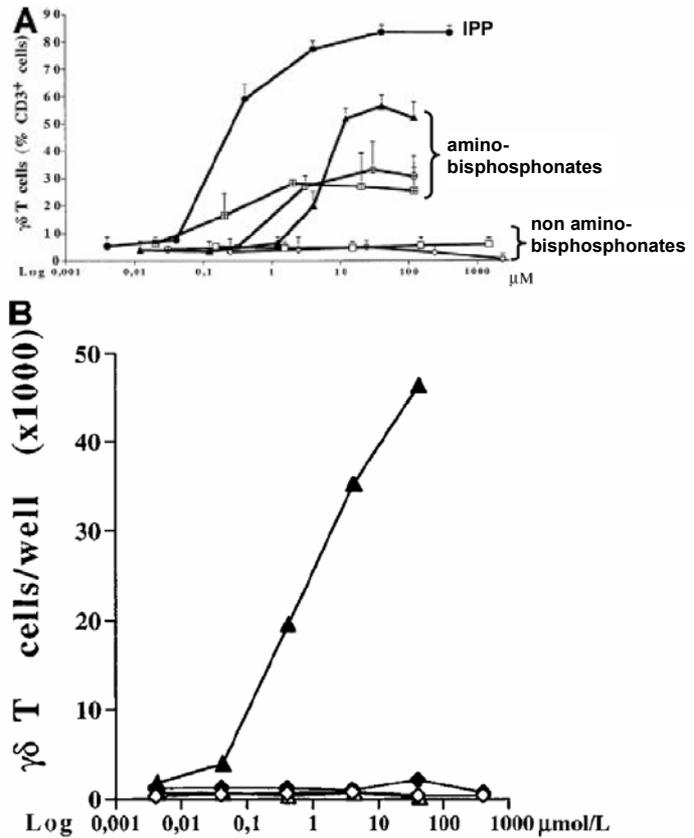
Question 2. Quelles sont les manifestations cliniques généralement observées chez ces patients ?

Les bisphosphonates sont un traitement de choix pour les maladies qui impliquent une résorption osseuse excessive ; ils ont été notamment montrés efficaces dans la prévention de l'ostéolyse chez des patients atteints de myélome multiple. Les bisphosphonates sont des analogues synthétiques de pyrophosphates endogènes. Cependant, les mécanismes d'inhibition de la résorption osseuse par les bisphosphonates ne sont pas connus. Les expériences présentées ci-dessous s'attachent à préciser leur mode d'action.

Il existe des relations structurales entre les bisphosphonates et certains ligands identifiés des lymphocytes T $\gamma\delta$. Sur la base de cette observation, la capacité de stimulation des lymphocytes T $\gamma\delta$ par les bisphosphonates a été évaluée. Les résultats sont présentés à la **Figure 1**.

Figure 1

- A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés avec des concentrations croissantes de différents bisphosphonates en présence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le pourcentage de cellules T $\gamma\delta$ parmi les cellules CD3⁺ 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 chlodronate (non amino-bisphosphonate) ou de pamidronate (amino-bisphosphonate), en présence ou en absence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le nombre absolu de cellules T $\gamma\delta$ dans chaque culture a été mesuré.
 ◇ : chlodronate ; ◆ : chlodronate + IL-2 ;
 ▲ : pamidronate ; ▲ : pamidronate + IL-2.

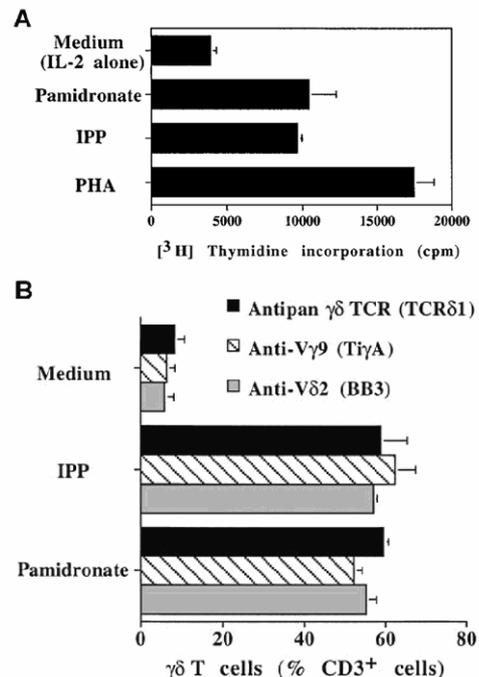


Question 3. *Interprétez les résultats de cette expérience. On notera qu'aucune autre population cellulaire parmi les PBMC ne prolifère dans les conditions de l'expérience. (8 lignes maximum)*

Dans une deuxième expérience, l'expression de V 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 2.

Figure 2

- 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.



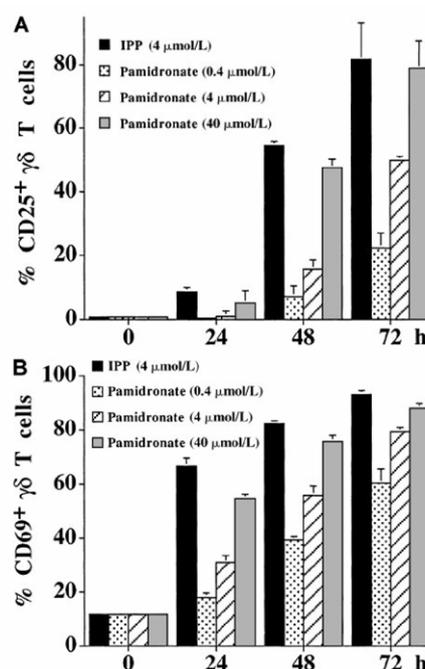
Question 4. Qu'apportent les résultats de cette expérience ? (5 lignes maximum)

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 3**.

Question 5. Analyser ces résultats. En particulier, discutez du rôle de l'IL-2 dans la prolifération ou l'activation des cellules T $\gamma\delta$ par le pamidronate. (8 lignes maximum)

Figure 3

Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en présence de 4 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).

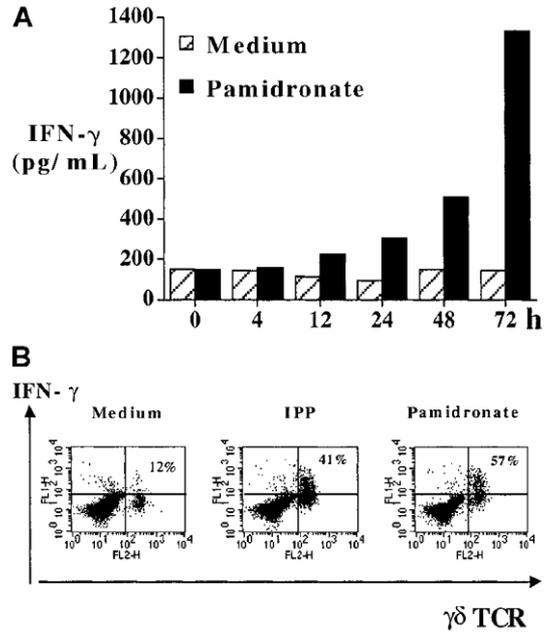


La production d'IFN γ par les cellules T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 4**.

Figure 4

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 .



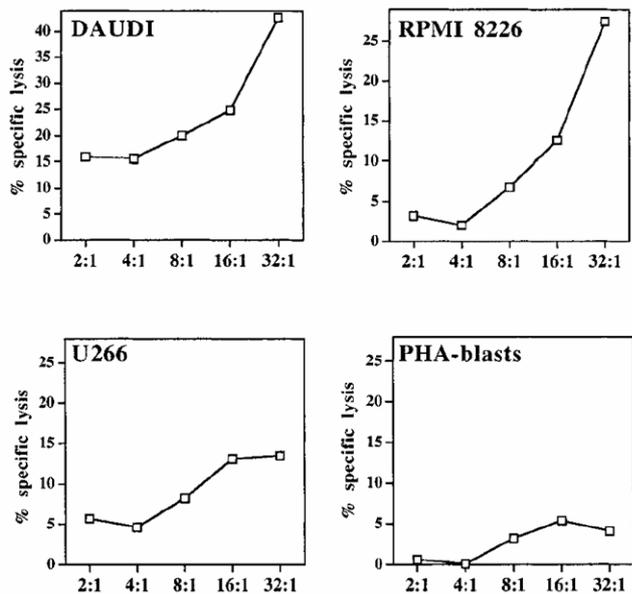
Question 6. Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 4B. (5 lignes maximum)

Question 7. Analysez ces résultats. (8 lignes maximum)

La capacité de cytolyse *in vitro* d'une lignée T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée vis-à-vis de différentes lignées tumorales. Les résultats sont présentés dans la Figure 5.

Figure 5

La cytotoxicité d'une lignée T $\gamma\delta$ activée par le pamidronate a été testée vis-à-vis de cellules de la lignée de lymphome DAUDI, des lignées de myélome RPMI 8826 et U266 ou de PBMC allogéniques activés par la PHA, préalablement chargés en 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 souhaités disposer afin de préciser votre interprétation. (5 lignes maximum)

Question 9. A l'aide d'un tableau comparatif vous indiquerez en quoi la reconnaissance des lymphocytes T $\gamma\delta$ diffère de celle des lymphocytes T $\alpha\beta$.

II.

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

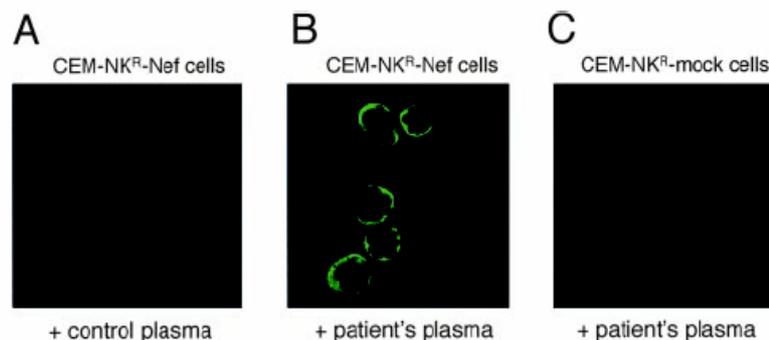
La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC « Ab-dependent cellular cytotoxicity ») et les activités cytotoxiques des lymphocytes T sont deux mécanismes qui jouent un rôle important dans la protection contre les infections virales. Dans le cas de l'infection par le VIH, l'ADCC peut inhiber la réplication 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 pathogenèse de l'infection à VIH. Cette protéine peut être exprimée à la surface des cellules infectées. Les auteurs de cette étude ont montré qu'un peptide de Nef, très conservé et exprimé à la surface de cellules infectées, pouvait servir d'épitope pour une réponse anticorps. De plus, il a été montré que le taux plasmatique d'anticorps dirigés contre ce peptide chez les patients infectés est corrélé avec la progression de la maladie.

Pour élucider les mécanismes de cette corrélation, les auteurs ont réalisé les expériences suivantes :

Des cellules CEM-NK^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 anticorps secondaire anti-Ig humaine couplé à la fluorescéine. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale (**Figure 6**).

Figure 6 :



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

Des cellules CEM-NK^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 1**) 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 7**).

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.

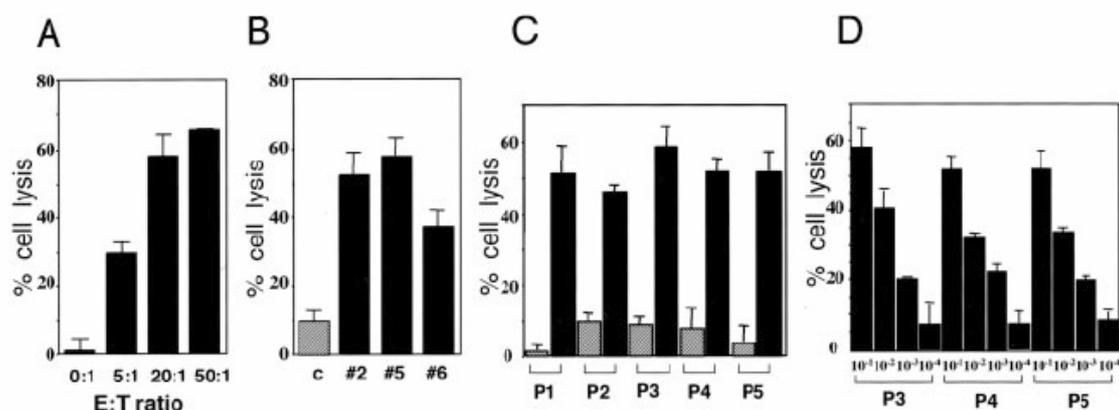


Figure 7 :

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?

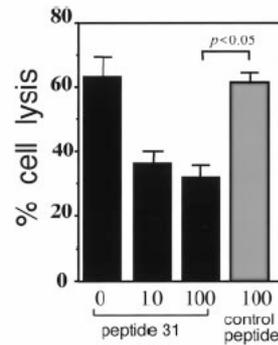
Question 3. Que permettent de mettre en évidence les expériences présentées dans la Figure 7 ?

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 8**).

Figure 8 :

Lyse spécifique en présence de PBMC du patient 3 (ratio 20:1), de plasma du patient LTNP 5 et du peptide 31 (0 à 100 µg/ml, colonnes noires) ou d'un peptide contrôle (100 µg/ml colonne hachurée).



Question 5. Que pouvez-vous conclure de cette expérience ?

Des PBMC de 41 patients infectés par le VIH et de 16 donneurs sains ont été analysés par cytométrie de flux. Les nombres de cellules NK (CD3-, CD19-, CD16+, CD56+) et le pourcentage de cellules NK exprimant la perforine ont été déterminés (**Figure 9**).

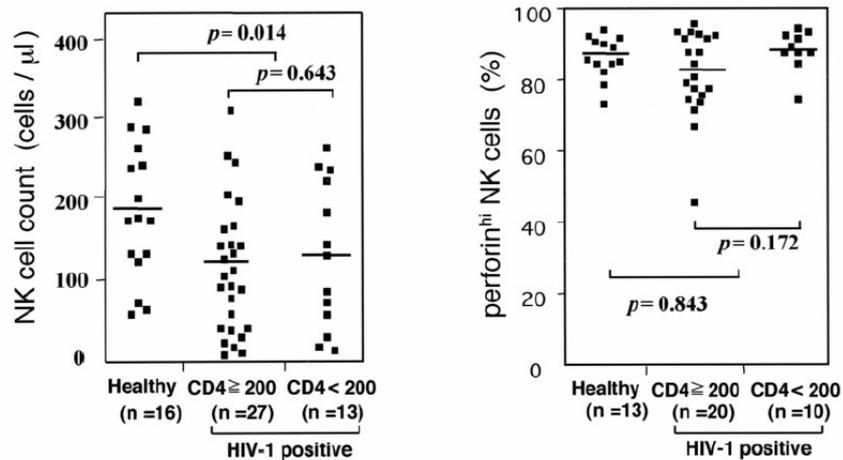


Figure 9 :

A. Nombre de cellules NK parmi les PBMC de donneurs sains et les PBMC de patients infectés par le VIH, ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4+ par µl de sang. B. Pourcentages de cellules NK exprimant la perforine parmi les PBMC de donneurs sains et de patients infectés par le VIH ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4+ par µl de sang.

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

IF2008 TD-IF 7 :
Diversité et sélection des répertoires

Diversité et sélection des répertoires

I.

A partir de cellules isolées de moelle osseuse de souris, une lignée cellulaire est immortalisée par transfection avec le virus d'Abelson. Après six semaines de culture, la lignée C est clonée et trois sous-clones (C1, C2, C3) sont particulièrement étudiés. Un marquage direct des cellules avec des anticorps anti-isotypiques couplés à la fluorescéine donne les résultats suivants :

Anticorps couplés à la fluorescéine	Lignées cellulaires			
	C	C1	C2	C3
Anti- μ	-	-	+	-
Anti- κ	-	-	+	-

Ces lignées sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S . Une expérience d'immunoprécipitation à l'aide d'anti- μ est réalisée à partir du lysat cellulaire de chaque lignée. L'immunoprécipité est réduit et alkylé puis déposé sur un gel d'électrophorèse en présence de SDS. Après migration, le gel est autoradiographié. L'autoradiographie est présentée sur la Figure 1 :

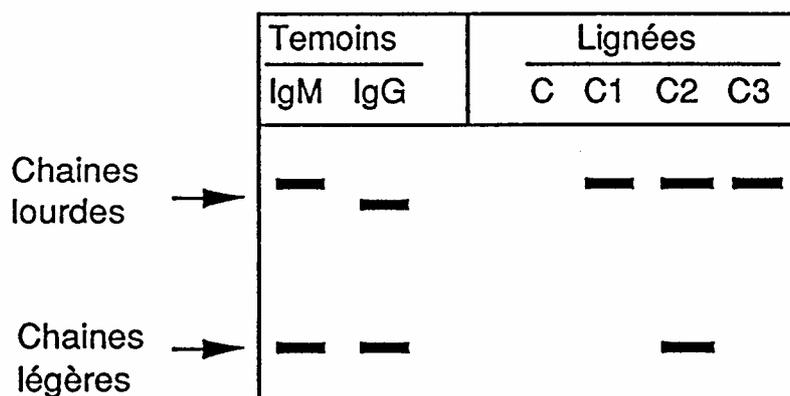


Figure 1

Question 1. Analyser les résultats.

L'ADN de chaque lignée est préparé puis coupé par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI*. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse. Après migration, l'ADN est transféré sur des filtres de nitrocellulose. Trois sondes radioactives présentées sur la Figure 2 sont utilisées pour des expériences d'hybridation (technique de Southern) :

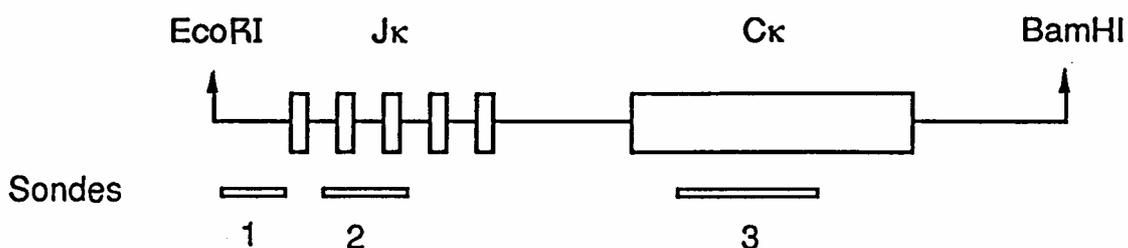


Figure 2

L'autoradiographie des filtres est présentée sur la Figure 3 :

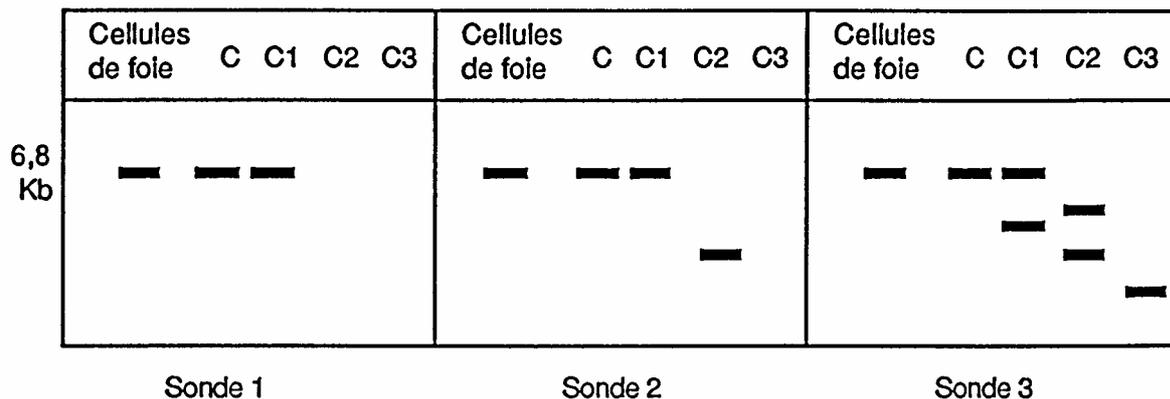


Figure 3

Question 2. Etablissez une corrélation entre l'expression des chaînes d'immunoglobuline et la présence de bandes d'hybridation.

Les lignées C1 et C3 sont cultivées pendant six semaines puis de nouveau clonées. Les mêmes expériences (marquage, immunoprécipitation et technique de Southern) sont réalisées pour l'étude de ces sous-clones. L'ensemble des résultats est présenté sur le Tableau II et les Figures 4 et 5 :

Anticorps couplés à la fluorescéine	Sous-clones de C1			Sous-clones de C3		
	C11	C12	C13	C31	C32	C33
Anti-μ	-	+	+	-	+	+
Anti-κ	-	+	+	-	-	-

Tableau II

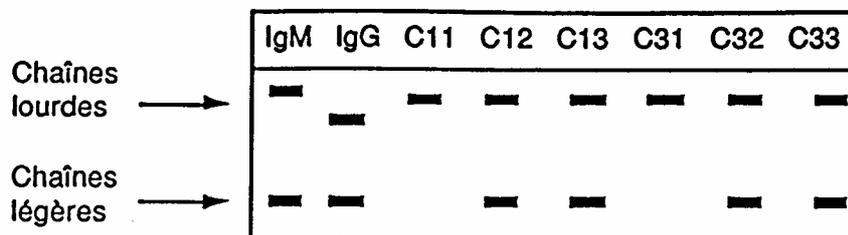


Figure 4: Electrophorèse en présence de SDS

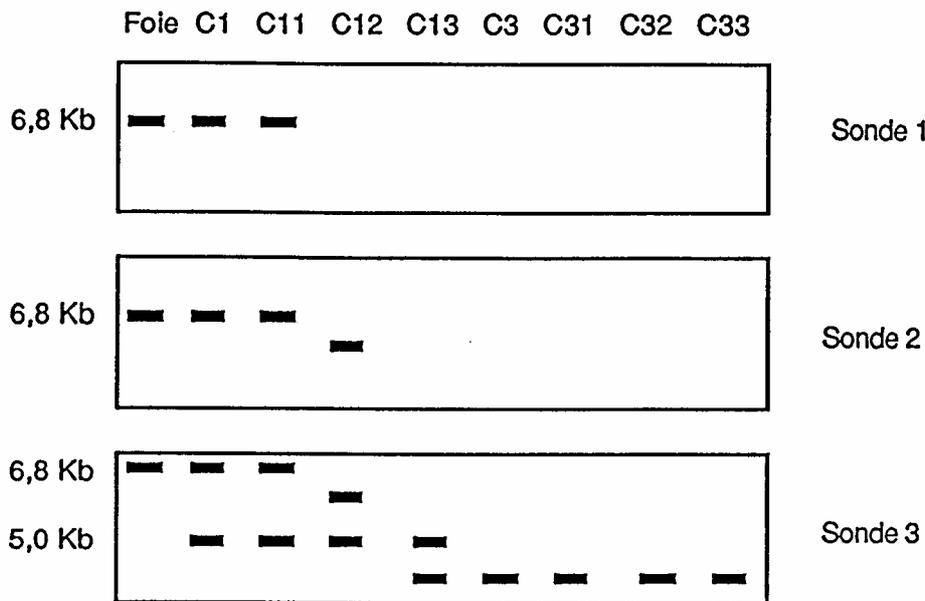


Figure 5: Hybridation de l'ADN génomique digéré

Question 3. Analyser ces résultats. Proposer un schéma explicitant les événements de recombinaison qui se sont produits dans les différentes lignées cellulaires.

II.

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

Dans cette étude, les auteurs analysent la réponse lymphocytaire T contre le virus de l'Herpes (HVH-1) dans deux lignées de souris consanguines. Les auteurs ont montré au préalable que, chez ces souris la réponse est principalement dirigée contre un peptide particulier, le peptide HSV-8p, dérivé d'une protéine du virus, la glycoprotéine B.

Les lignées de souris étudiées sont les lignées C57BL/6 (B6), d'haplotype du CMH H2^b, et B6.C-H-2^{bm8} (bm8), d'haplotype du CMH H2^{bm8}. Ces deux lignées de souris sont génétiquement identiques hormis pour le gène codant la molécule de CMH de classe I H-2K. Les molécules H-2K^b et H-2K^{bm8} diffèrent de quatre acides aminés au niveau du site de fixation du peptide. Ces molécules sont par conséquent identiques pour ce qui est des régions de contact direct avec le TCR mais peuvent différer dans leur capacité à fixer et à présenter certains peptides ; elles peuvent donc différer dans leur capacité à induire les réponses T.

Question 1. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le mode de reconnaissance de l'antigène par le TCR.

Dans une première expérience, la survie des souris B6 et bm8, infectées par des doses croissantes du virus HVH-1, a été observée (Figure 1A). Dans une seconde expérience, les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose donnée de HVH-1 et la survie des souris a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K (Figure 1B).

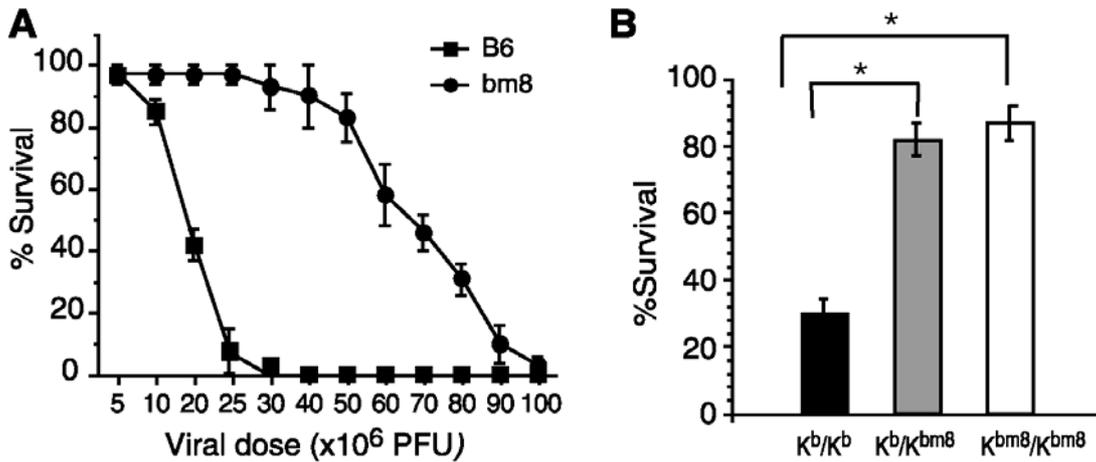


Figure 1 : (A) Les souris B6 et bm8 ont été infectées par des doses croissantes du virus HVH-1 (viral dose). La survie des souris (%survival) a été observée 100 jours après l’infection. (B) Les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose de 25.10⁶ pfu de HVH-1. La survie des souris, 100 jours après l’infection, a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K : K^b/K^b, K^b/K^{bm8} ou K^{bm8}/K^{bm8}. Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

Question 2. Analyser les résultats présentés sur la Figure 1. (10 lignes maximum)

Question 3. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre pour rendre compte de ces observations ? (8 lignes maximum)

Dans la suite de leur étude, les auteurs analysent la survie des souris B6 ou bm8 déficientes en cellules T CD8 (Figure 2A) ou en cellules NK (Figure 2B) après infection avec une dose donnée de HVH-1. Dans une autre expérience, la survie de souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8, après transfert, ou non, de cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 ou de souris bm8, a été observée après infection avec une dose létale de HVH-1 (Figure 2C).

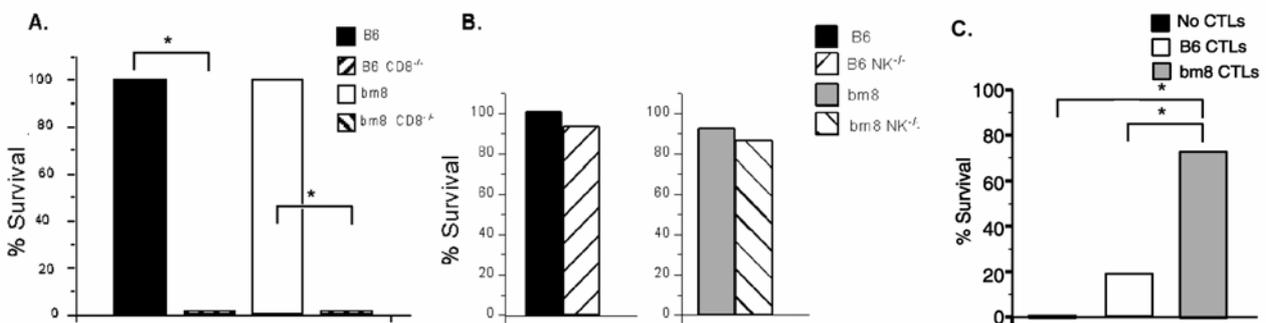


Figure 2 : (A) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules T CD8 (B6 CD8^{-/-} et bm8 CD8^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10⁶ pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (B) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules NK (B6 NK^{-/-} et bm8 NK^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10⁶ pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (C) Des souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8 ont reçu, ou non (no CTLs), des cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 (B6 CTLs) ou de souris bm8 (bm8 CTLs). Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

Question 4. Citer deux moyens par lesquels les auteurs ont pu obtenir des souris déficientes en cellules T CD8. (5 lignes maximum)

- Question 5. Pour quelle raison les auteurs choisissent-ils d'étudier des souris déficientes en cellules T CD8 ou en cellules NK ? (5 lignes maximum)*
- Question 6. Analyser les résultats présentés sur la Figure 2. (15 lignes maximum)*
- Question 7. Ces résultats confirment-ils les hypothèses émises à la Question 3 ? (5 lignes maximum)*

Dans une dernière expérience, les auteurs ont étudié le répertoire TCR β des cellules T CD8 de souris B6 ou bm8 infectées par le virus HVH-1 ou par un autre virus, le virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p chez les souris infectées par HVH-1 (Figure 3A) et parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide « Inf-ASN » chez les souris infectées par le virus Influenza (Figure 3B). On précise que, chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide « Inf-ASN » présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

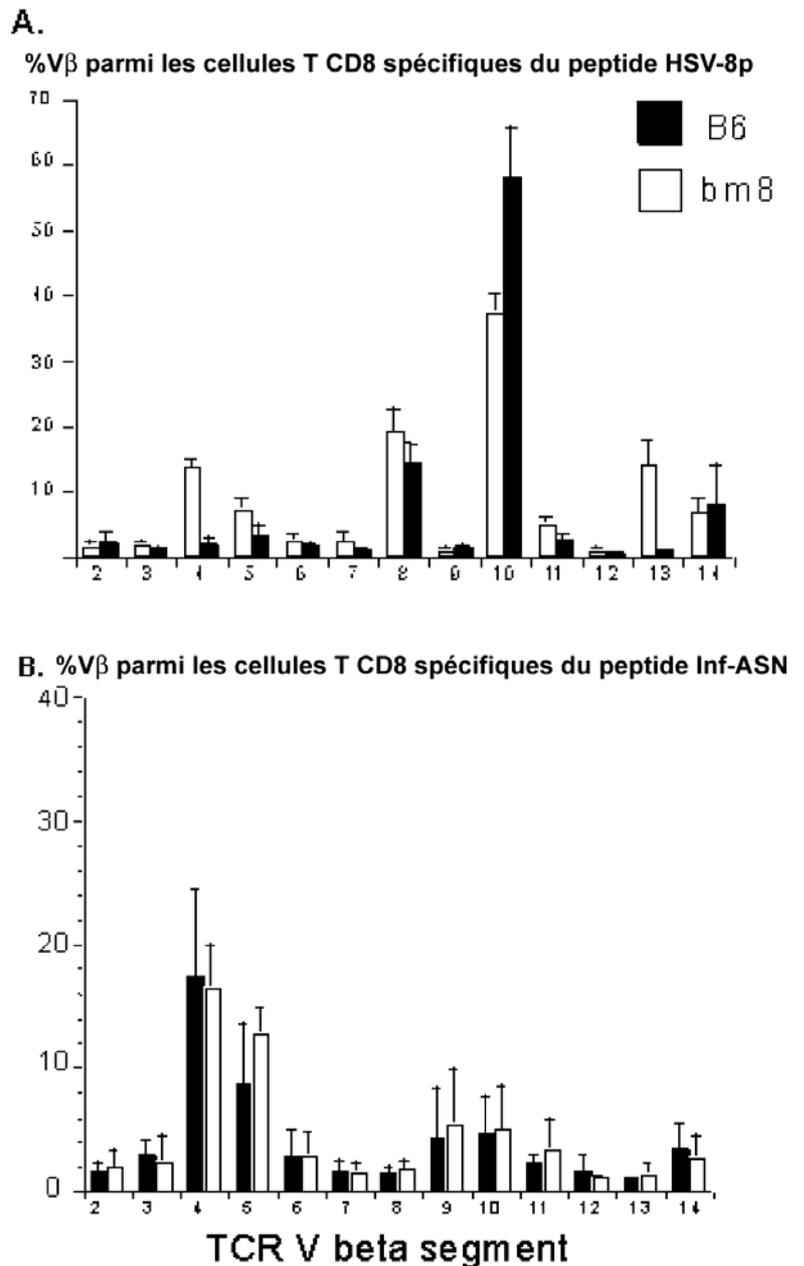


Figure 3: (A) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par le virus HVH-1. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p. (B) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par un virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide Inf-ASN. N.B. : Chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide Inf-ASN présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

- Question 8. A l'aide d'un schéma uniquement, résumez le mécanisme de génération de la diversité des anticorps et TCR.
- Question 9. Analysez les résultats présentés sur la Figure 3. (8 lignes maximum)
- Question 10. Sur la base de ces derniers résultats, comment interprétez-vous la différence de susceptibilité à l'infection par le virus HVH-1 chez les souris B6 et bm8 ? (8 lignes maximum)

IF2008 TD-IF 8 :
Sélection et Tolérance

Sélection et Tolérance

I. Problème n°2 du sujet d'examen de juin 1997

1) On introduit dans des ovocytes fécondés de souris C57BL/6 d'haplotype H-2^b deux transgènes contenant les gènes réarrangés codant respectivement pour la chaîne α et la chaîne β du TcR d'un clone T spécifique du peptide 257-264 de l'ovalbumine (pOVA 257-264) présenté par H-2 K^b. Ce TcR utilise les segments de gènes V α 2 et V β 5. Les souris transgéniques ainsi obtenues sont croisées avec des souris de même haplotype, déficientes en β 2 microglobuline (β 2m^{-/-}). On obtient ainsi des souris TcRtg β 2m^{+/-} et des souris TcRtg β 2m^{-/-}. On réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V α 2 et anti-V β 5 couplés à des fluorochromes sur les thymocytes des différentes souris non transgéniques et transgéniques. Le résultat de cette expérience vous est présenté sur la **Figure 1** :

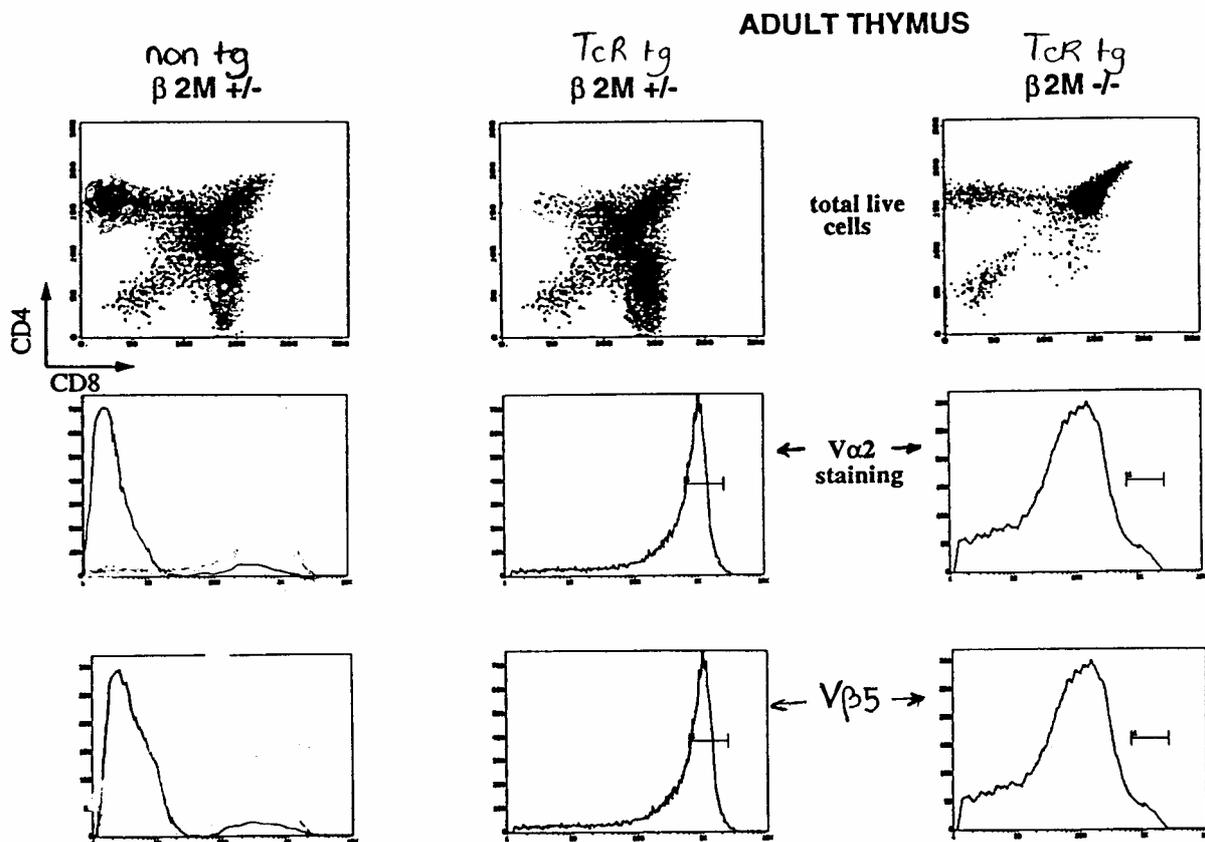


Figure 1 : Marquage des thymocytes de souris non transgéniques β 2m^{+/-} (non tg), TcRtg β 2m^{+/-} et TcRtg β 2m^{-/-} avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V α 2 et anti-V β 5.

Question 1. Analysez ces résultats en comparant et en expliquant les proportions de cellules simple-positives CD8⁺ dans les thymus des différentes souris.

2) On peut cultiver *in vitro* des lobes thymiques fœtaux. Ces cultures organotypiques de thymus fœtal (FTOC) permettent d'observer et de manipuler *in vitro* la maturation et la sélection des thymocytes. On réalise des cultures organotypiques de lobes thymiques fœtaux de souris TcRtg

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

Les mêmes cultures sont réalisées en présence de concentrations différentes du peptide pOVA. On mesure les nombres de thymocytes $CD4^{+}CD8^{+}$ récupérés à l'issue des 7 jours de culture en fixant arbitrairement à 1 les nombres de cellules observés dans les cultures en absence de peptide ajouté (**Figure 3**).

Question 2. Analysez l'ensemble de ces résultats. A quel processus est due la diminution du nombre de cellules DP ? Explicitez en particulier ce qui se produit dans les lobes TcRtg $\beta 2m^{-/-}$.

Figure 2 :

Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ (+/- lobes) et de souris TcRtg $\beta 2m^{-/-}$ (-/- lobes) avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8.

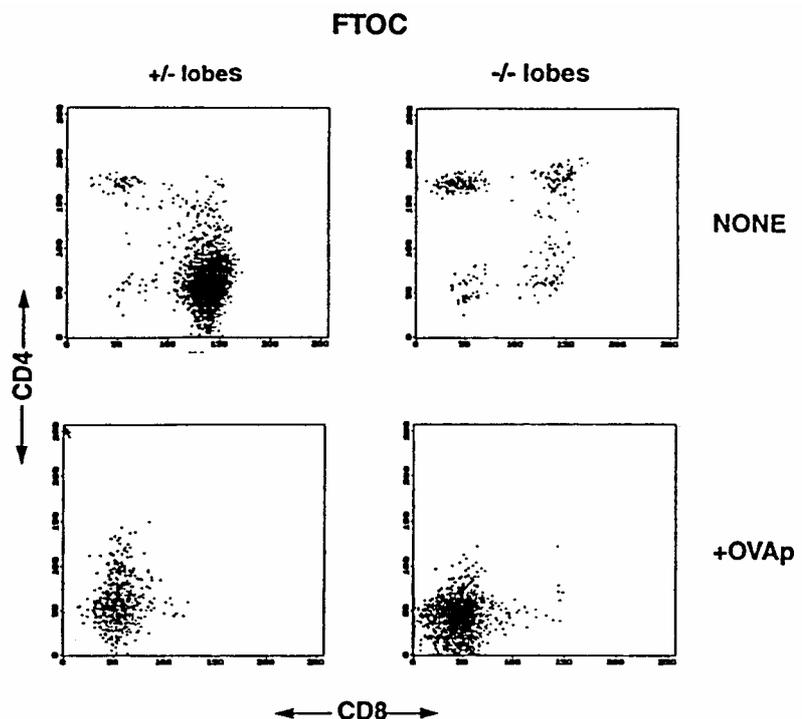
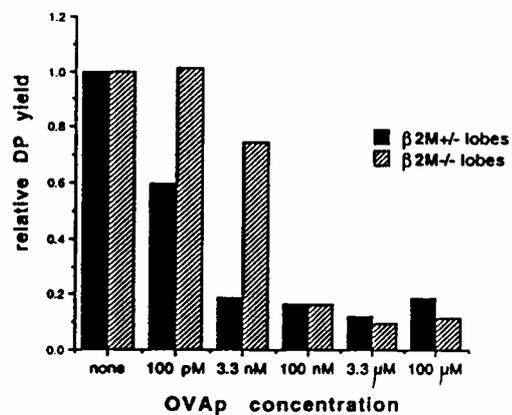


Figure 3 :

Nombre de cellules DP ($CD4^{+}CD8^{+}$) dans les lobes thymiques de souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ ($\beta 2m^{+/-}$ lobes) et de souris TcRtg $\beta 2m^{-/-}$ ($\beta 2m^{-/-}$ lobes) cultivés en présence de concentrations croissantes de pOVA.



3) On réalise des expériences similaires en ajoutant, au lieu de pOVA, aux cultures organotypiques, deux autres peptides tous deux capables de se fixer sur K^b avec la même affinité que le peptide pOVA :

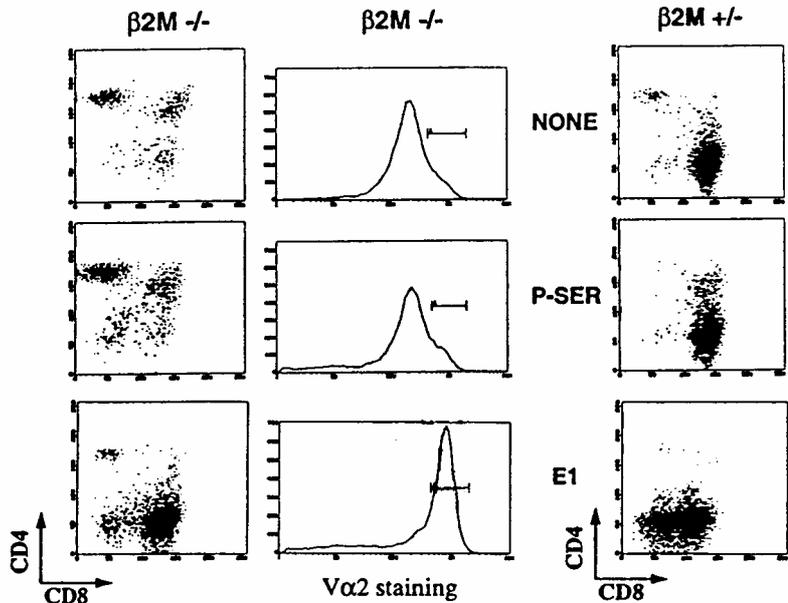
P-SER (S S Y S Y S S L) n'est jamais reconnu par le TcR transgénique.

E1 (E I I N F E K L) est un variant du peptide pOVA (S I I N F E K L).

Le résultat du marquage des thymocytes extraits des cultures organotypiques est montré à la **Figure 4** :

Figure 4 :

Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ ($\beta 2m^{+/-}$) et de souris TcRtg $\beta 2m^{-/-}$ ($\beta 2m^{-/-}$) cultivés en absence ou en présence de 20 μM de P-SER ou E1 avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-V $\alpha 2$.

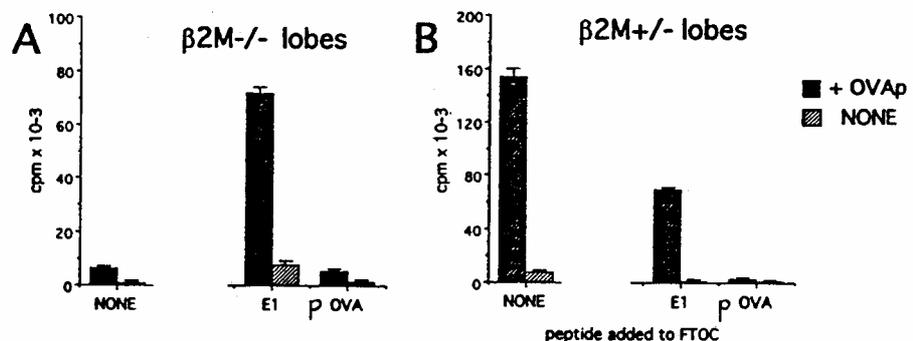


Question 3. Quels rôles jouent les peptides P-SER et E1 sur la sélection des cellules T exprimant le TcR transgénique dans les lobes des souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ et TcRtg $\beta 2m^{-/-}$?

4) Les cellules extraites des cultures organotypiques sont mises en culture *in vitro* en présence de cellules EL4 (qui expriment K^b) irradiées en absence (NONE) ou en présence de 10 nM du peptide pOVA (+ OVAp). Après 48h, on ajoute de la thymidine tritiée aux cultures et on évalue l'incorporation de thymidine tritiée 8 heures après. Les résultats sont présentés à la **Figure 5** :

Figure 5 :

Réponse des thymocytes extraits des FTOC au peptide antigénique pOVA.



Question 4. Que pouvez-vous en conclure sur les aptitudes fonctionnelles des cellules T extraites des différents types de FTOC, et pourquoi ?

5) A partir des souris TcRtg $\beta 2m^{+}$, on dérive un clone T cytotoxique spécifique du peptide pOVA présenté par H-2 K^b. Ce clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement

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

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

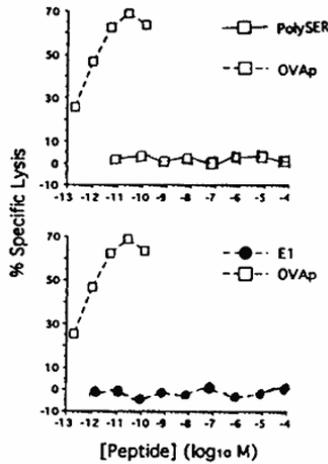


Figure 6

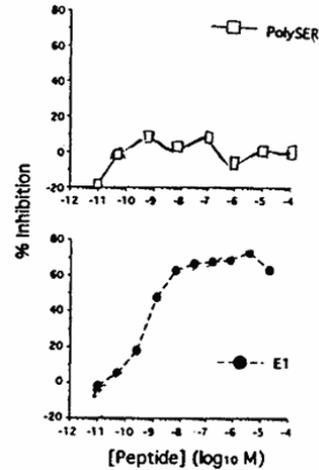


Figure 7

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

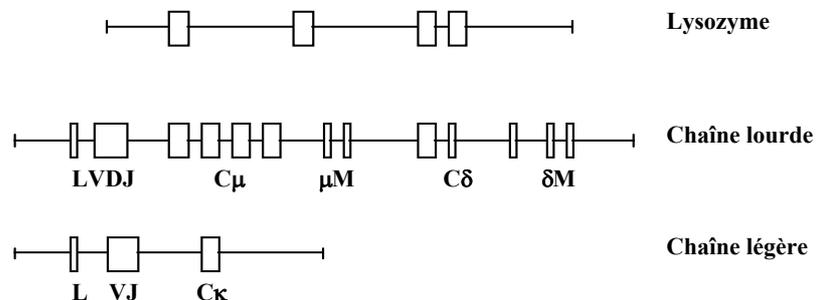
Question 6. Que suggère l'ensemble de ces résultats quant à la nature des peptides impliqués dans le processus de sélection positive dans le thymus ?

II.

(D'après Goodnow, C.C., et al. (1998) *Nature* 334:676 ; Adams, E., et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5687).

Trois types de souris transgéniques sont obtenus avec les transgènes présentés sur la **Figure 8** :

Figure 8



Les souris Lys-Tg possèdent le transgène lysozyme qui s'exprime de façon ubiquitaire dès le stade embryonnaire. Les souris Ig-Tg possèdent les transgènes codant les chaînes lourde et légère d'un anticorps anti-lysozyme. Les souris double-transgéniques (Dbl-Tg) possèdent l'ensemble des transgènes.

La réponse contre le lysozyme est étudiée dans des souris Lys-Tg, dans les lignées C57BL/6 (B6) ou C57BL/6 x CBA. Les souris sont immunisées avec le lysozyme seul ou le lysozyme couplé à des

globules rouges de cheval (GRC). Après immunisation, le titre anticorps anti-lysozyme est déterminé ainsi que la capacité des lymphocytes ganglionnaires à proliférer en présence de cellules présentatrices d'antigène et de lysozyme (**Tableau 1**).

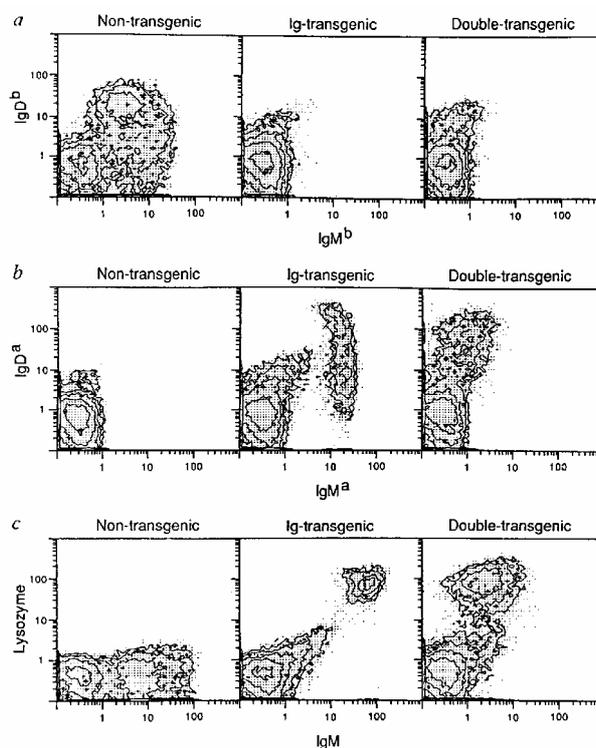
Question 1. Expliquer la différence de comportement entre les souris B6 et B6 x CBA ainsi que l'effet du transgène dans ces souris.

L'expression des transgènes d'immunoglobuline est étudiée dans les souris Ig-Tg ou Dbl-Tg par immunofluorescence sachant que les transgènes proviennent d'un hybridome issu de BALB/c (Igh^a) et que les souris B6 sont d'haplotype Igh^b.

Souris immunisées	Antigène immunisant	Titre anticorps en µg/ml	Incorporation thymidine (cpm)
B6	Lysozyme	<1	2 000
	Lysozyme-GRC	1 000	4 000
B6 Lys-Tg	Lysozyme	<1	2 200
	Lysozyme-GRC	<1	1 800
B6 x CBA	Lysozyme	1 200	40 000
	Lysozyme-GRC	1 500	48 000
B6 x CBA Lys-Tg	Lysozyme	<1	1 800
	Lysozyme-GRC	<1	1 900

Tableau 1

Figure 9



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

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

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

Tableau 2

Question 3. Ces résultats sont-ils en accord avec l'analyse d'immunofluorescence présentée à la Question 2 ? Expliquer.

Des expériences de transfert de cellules sont effectuées dans des souris receveurs B6 irradiés. 10⁵ cellules spléniques de souris non-immunisées normales ou transgéniques sont transférées avec 5.10⁶ cellules spléniques de souris B6 ayant été immunisées contre des globules rouges de cheval. Après immunisation avec du lysozyme-GRC, le titre sérique anti-lysozyme est déterminé dans les souris receveurs (**Tableau 3**).

Cellules transférées		Antigène lysozyme-GRC	Titres anticorps anti-lysozyme
10 ⁵ cellules	5.10 ⁶ cellules "sensibilisées aux GRC"		
B6	B6	-	<1
B6 Ig-Tg	B6	-	<1
B6 Dbl-Tg	B6	-	<1
B6	B6	+	<1
B6 Ig-Tg	B6	+	40
B6 Dbl-Tg	B6	+	<1

Tableau 3

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

IF2008 TD-IF 9 :
Révisions/Questions – Sujet d'examen IF2007 juin

Révisions/Questions

Epreuve d'Immunologie Fondamentale – juin 2007

Exercice I (noté sur 10 points)

Des souris sont stimulées (stimulus 1) avec DNP-OVA (haptène DNP couplé à l'ovalbumine, OVA), ou GGB (γ -globulines bovines), ou GGH (γ -globulines humaines), ou non stimulées (normal). On mélange des cellules de rate provenant d'une souris ayant reçu le stimulus 1 DNP-OVA avec des cellules de rate d'une autre souris ayant également reçu un stimulus 1, comme indiqué dans le tableau ci-dessous. On transfère ensuite ces mélanges dans des souris syngéniques préalablement irradiées. Ces dernières sont alors stimulées (stimulus 2) par DNP-OVA, ou DNP-GGB, ou (DNP-GGB + GGH), ou (DNP-GGH + GGB). La réponse anti-DNP, mesurée 7 jours après la stimulation, est montrée dans le tableau ci-dessous :

Stimulus 1 : Stimulus des cellules mêlées & transférées	Réponse anti-DNP après stimulus 2 :			
	DNP-OVA	DNP-GGB	DNP-GGB + GGH	DNP-GGH + GGB
DNP-OVA + normal	1. +	2. -	3.	4.
DNP-OVA + GGB	5.	6.	7.	8.
DNP-OVA + GGH	9.	10.	11.	12.
DNP-OVA + DNP-OVA	13.	14.	15.	16.

Abréviations :

- « + » = réponse anti-DNP positive ; « - » = pas de réponse anti-DNP.
- Haptène = DNP (2,4-dinitrophénol).
- Protéines porteuses = OVA (ovalbumine) ; GGB (γ -globulines bovines) ; GGH (γ -globulines humaines). DNP-OVA, DNP-BBG et DNP-GGH indiquent que le DNP est couplé à la protéine porteur correspondante.

Question 1. Qu'est-ce qu'un haptène ? (5 lignes maximum)

Question 2. A l'aide d'un schéma uniquement, résumez le plan expérimental mis en œuvre dans cette expérience.

Question 3. Rappelez le principe d'un test permettant de mesurer la « réponse anti-DNP ». (5 lignes maximum)

Question 4. Complétez le tableau ci-dessus.

Question 5. Illustrer ces résultats à l'aide d'un schéma uniquement sur la base de la coopération cellulaire dans le système immunitaire.

Exercice II (noté sur 10 points)

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

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

Grâce à ces souris et aux lignées supplémentaires de souris B6 RAG-2^{-/-} H-2Aβ^b et B6 RAG-2^{-/-} β2m⁻, on a également pu obtenir les lignées de souris *Marilyn* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^b ou H-2^kβ2m⁻ ou H-2^bxk ou H-2Aβ^bx^b ou H-2Aβ^bx^k, toutes de fonds génétique B6.

Question 6. A l'aide d'un schéma de croisements uniquement, expliquer comment ces dernières lignées de souris ont été obtenues :

- *Marilyn* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^b
- *Marilyn* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^kβ2m⁻
- *Marilyn* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^bx^k
- *Marilyn* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^bx^b
- *Marilyn* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^bx^k

Question 7. Rappelez l'effet de la mutation RAG-2^{-/-}. (5 lignes maximum)

Le développement lymphocytaire T a été étudié chez des souris femelles de ces différentes lignées de souris, dans le thymus et la rate, par cytométrie en flux avec les anticorps anti-TCRβ, anti-CD4 et anti-CD8 (**Figure 1**).

Question 8. A l'aide d'un tableau comparatif (cf. modèle ci-dessous), vous résumerez et analyserez ces résultats en précisant, pour chaque lignée,

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

Question 9. A la fin de ce tableau comparatif, vous terminerez votre analyse en indiquant quelle(s) population(s) supplémentaire(s) vous attendriez-vous à observer

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

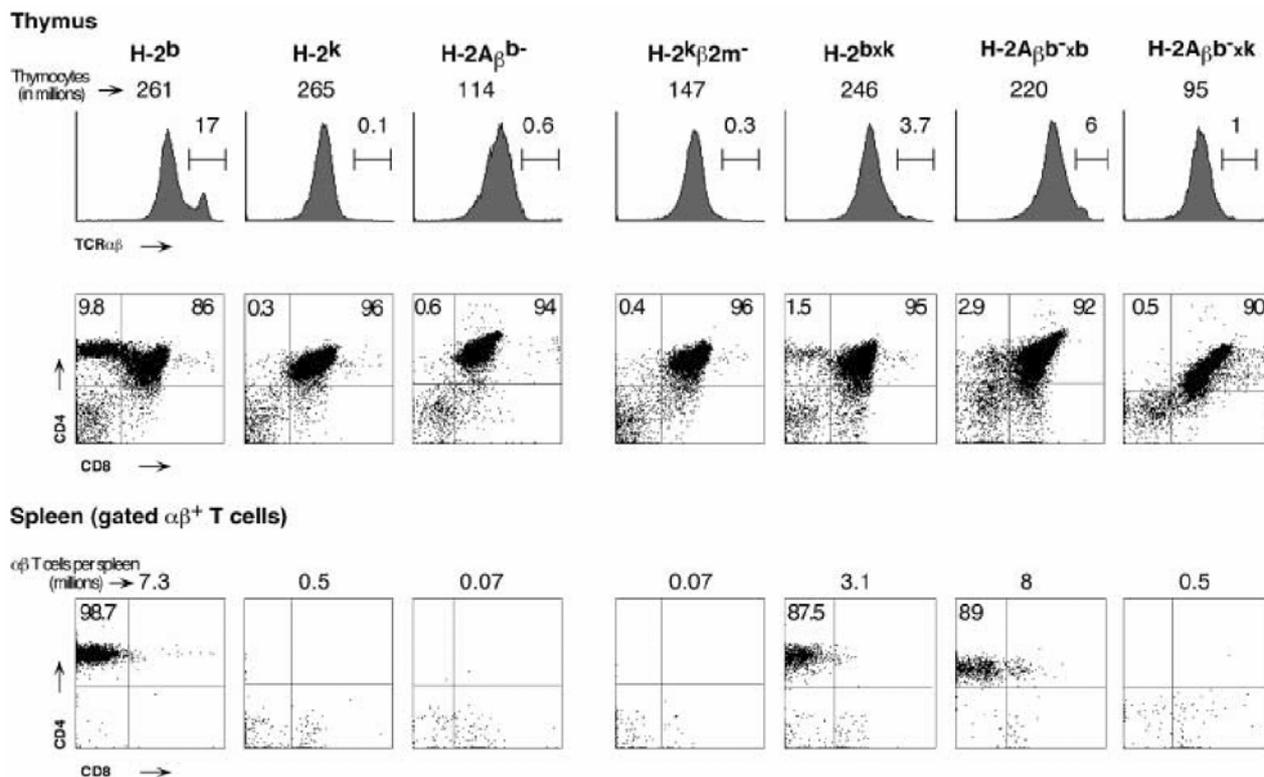


Figure 1

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

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

Modèle de tableau pour la réponse aux Question 8 et Question 9 :

	H-2 ^b	H-2 ^k	H-2Aβ ^{b-}	H-2 ^k β2m ⁻	H-2 ^{b/k}	H-2Aβ ^{b-xb}	H-2Aβ ^{b-xk}
Expression CMH I							
Expression CMH II							
Cellularité thymus							
Cellularité rate							
Populations thymus							
Populations rate							
Interprétation développement T							
Prédiction injection thymique antigène H-Y							
Prédiction RAG2+							