

Travaux Dirigés N°4 Question

Cours 9-14: Immunologie méthodologie et applications médicales

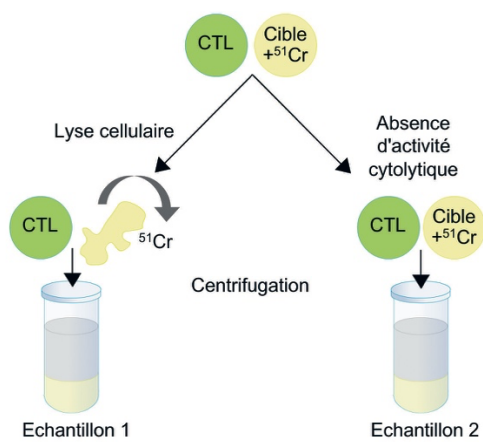
Question 9.1.1

Lors de l'essai de relargage de chrome 51 (figure), l'on quantifie la capacité de lyse des cellules T cytotoxiques.

Indiquer où se trouve le chrome 51 dans les échantillons 1 et 2 (surnageant ou culot).

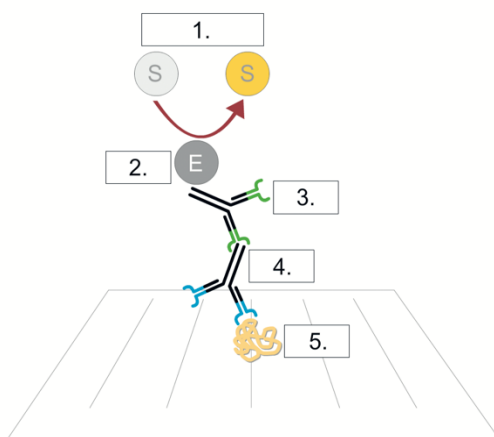
A. 1: culot 2: surnageant

B. 1: surnageant 2: culot



Question 9.2.1

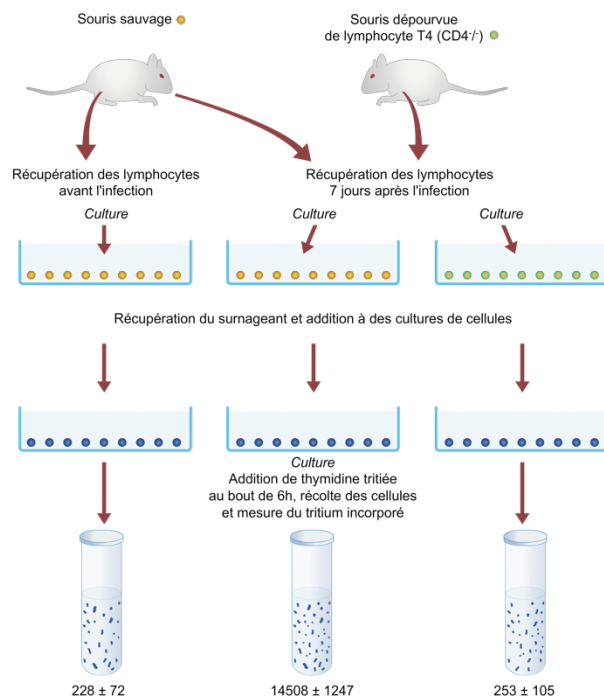
Annoter le schéma avec les termes suivants : protéine d'intérêt, anticorps primaire, anticorps secondaire couplé à une enzyme, peroxydase (HRP, horseradish peroxydase), substrat chimiluminescent.



Question 9.3.1

Les lymphocytes sont isolés de la rate d'une souris sauvage ou d'une souris mutée CD4^{-/-} après infection par un virus et mis en culture (figure). Le surnageant des trois cultures est ajouté à une suspension de lymphocytes puis on ajoute de la thymidine tritiée. Après 6 h de culture, on réalise un culot des cellules par centrifugation, et l'on mesure la quantité de radioactivité incorporée dans les cellules.

Expliquer les résultats obtenus.



Question 9.3.2

Le lipopolysaccharide (LPS) est reconnu chez les mammifères par le récepteur transmembranaire TLR-4. Une protéine adaptatrice appelée MYD88 fonctionne en aval de TLR4 dans la transduction de signal pour activer NF- κ B. On analyse la réponse au LPS chez des cellules déficientes pour le gène MYD88 (-/-).

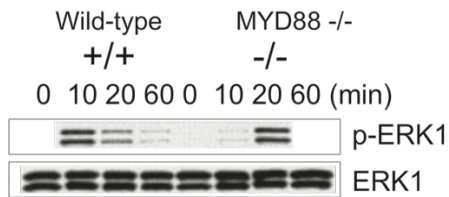
Dans une première étape, on analyse par Western blot le niveau de phosphorylation de la MAPK ERK1. Des cellules sauvages ou MYD88 ^{-/-} sont incubées en présence de lipopolysaccharide (LPS) pendant différents temps d'incubation. Les cellules sont lysées et les lysats sont déposés sur un gel SDS-PAGE.

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane. La membrane est incubée soit en présence d'un anticorps anti ERK1 soit en présence d'un anticorps anti-phosphotyrosine, qui reconnaît la forme phosphorylée de ERK (p-ERK1). Ces anticorps sont couplés à une enzyme qui transforme son substrat en un produit coloré. Le résultat est montré dans la figure ci-dessous.

a) Décrire l'état de phosphorylation de la protéine ERK1 dans les cellules sauvages ou MYD88 -/- en fonction du temps d'incubation avec les LPS. En déduire l'impact de MYD88 sur la phosphorylation d'ERK1.

b) Sachant que la protéine ERK n'est pas phosphorylée en réponse au LPS chez les mutants TLR4 -/-, comparer l'importance de la protéine adaptatrice MYD88 et de TLR4 en ce qui concerne la réponse au LPS.

c) Décrire l'expression de la protéine ERK1 dans les deux types cellulaires en fonction du temps d'incubation avec les LPS. Quel est le contrôle essentiel qui n'est pas présenté sur la figure et qui serait utile pour répondre à la question précédente ?



Analyse par Western blot de la phosphorylation de ERK1.

Question 10.1.4

Citer le nom d'un gène de susceptibilité aux maladies auto-immunes.

Rang

Réponses

1

2

3

4

5

6

Question 10.2.6

Expliquer pourquoi la tolérance périphérique est importante pour prévenir l'auto-immunité

Question 10.2.4

Donner deux exemples de mécanismes de tolérance périphérique pour les lymphocytes T.

Question 11.1.1

Les réactions allergiques sont des hypersensibilités de type :

- A. I.
- B. II
- C. III
- D. IV

Question 11.1.3

Concernant l'hypersensibilité de type I, indiquer la proposition suivante qui est vraie.

- A. L'allergie peut entraîner une réaction sévère (allant jusqu'à la mort) chez un individu exposé pour la première fois à un allergène donné.
- B. La phase immédiate de l'hypersensibilité de type I est caractérisée par la dégranulation de cellules éosinophiles relâchant des amines vasoactives et des médiateurs de l'inflammation dans la circulation.
- C. La probabilité de développer des allergies dépend de facteurs génétiques.
- D. La phase tardive de l'hypersensibilité de type I est similaire à l'hypersensibilité de type IV (hypersensibilité cellulaire dite « retardée »).

Question 11.1.7

Indiquer si les éléments suivants sont des facteurs protecteurs (<), à risque (>) ou sans effet (=) pour les allergies :

- a) Utilisation d'antibiotiques chez les 0-2 ans
- b) Famille nombreuse
- c) Petit poids à la naissance
- d) Allaitement
- e) Exposition à la poussière de ferme

Question 11.1.8

Associer chaque type d'hypersensibilité (I, II, III, IV) avec les termes suivants :

- 1) Complexes immuns
- 2) Cytotoxique
- 3) Retardée, médiée par les lymphocytes T
- 4) Immédiate

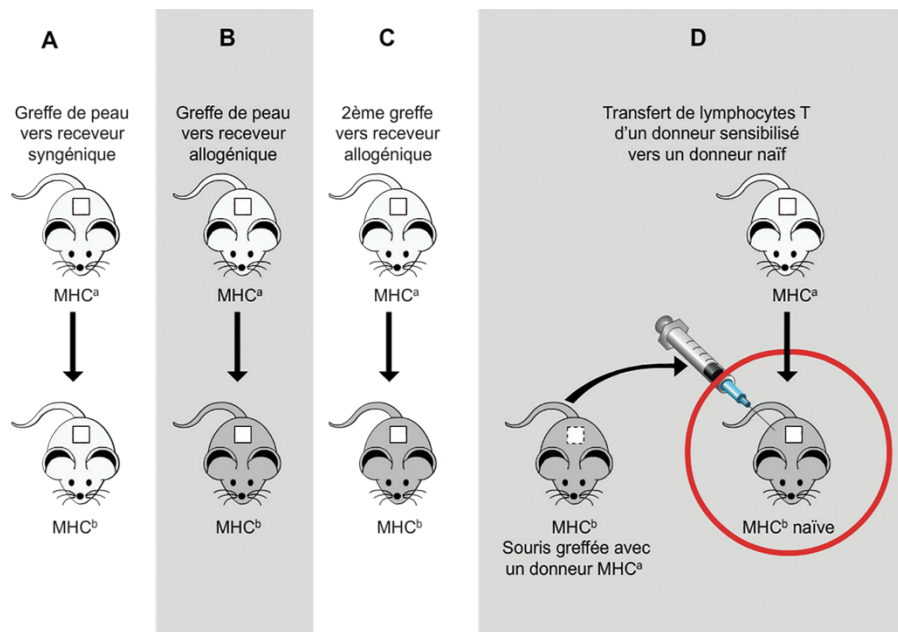
Question 11.2.10

Le syndrome de Goodpasture est causé par l'existence d'auto-anticorps qui ciblent la membrane basale des glomérules rénaux et alvéolaires. Il se traduit par une glomérulonéphrite et/ou hémorragie pulmonaire.

- a) Indiquer le type d'hypersensibilité causant le syndrome de Goodpasture.
- b) Proposer une méthode pour traiter ces patients.
- c) Un facteur de risque du syndrome de Goodpasture est la présence d'un haplotype HLA-DRB1*1501 ou DRB1*1502. Expliquer pourquoi certains haplotypes HLA peuvent favoriser l'émergence de telles maladies auto-immunes.

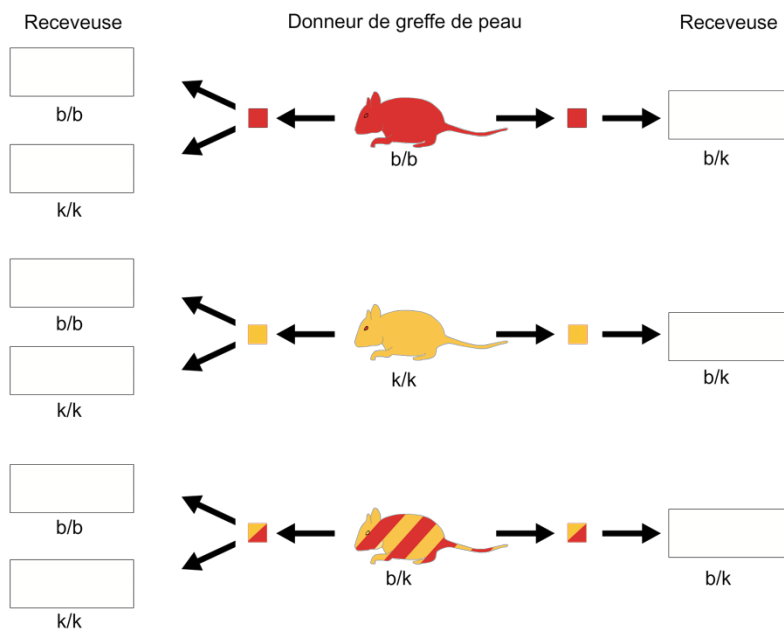
Question 12.2.2

Indiquer dans le schéma ci-dessous (conditions A, B, C, D) si la greffe est tolérée, rejetée en 10 jours ou rejetée en 5 jours.



Question 12.2.11

Donner les résultats des expériences de rejet des greffes suivantes (Nb : b et k sont des allèles différents du MHC).



Question 13.1.7

Indiquer si chacune des affirmations suivantes est vraie ou fausse.

- A. Un vaccin vivant atténué n'induit que des réponses B T-indépendantes.
- B. Un vaccin polysaccharidique n'induit que des réponses B T-indépendantes.
- C. Un vaccin conjugué n'induit que des réponses B T-indépendantes.

Question 13.2.2

- a) Comparer l'immunisation passive à l'immunisation active.
- b) Citer un exemple où l'immunisation passive peut sauver la vie d'une personne.
- c) Quels sont les effets secondaires d'une immunisation passive ?

Question 13.2.7

Des vaccins vivants atténués sont utilisés pour des programmes de vaccination. Décrire une méthode d'atténuation des agents pathogènes vivants.

Question 14.1.5

Quel nom donne-t-on à des lymphocytes T présents dans les tumeurs et reconnaissant des antigènes tumoraux ?

Question 14.1.6

- Parmi les propositions suivantes concernant les TILs, lesquelles sont justes ?
- a) Les TILs sont des T CD4 Th1.
 - b) Les TILs peuvent reconnaître des néo-antigènes tumoraux.
 - c) Les TCR des TILs ont souvent une faible affinité pour l'antigène tumoral.
 - d) Les TILs produisent de l'IL-4 et l'IL-5.
 - e) Les TILs sont des cellules T anti-tumeur présentes dans les organes lymphoïdes secondaires.

Question 14.2.3

Un enfant est atteint d'un lymphome B, les médecins préconisent une thérapie anti-CD20 (rituximab). CD20 est une protéine trouvée à la surface des cellules B.

- a) Expliquer le principe d'une telle thérapie.
- b) Quel nom donne-t-on aux antigènes comme CD20 ?
- c) Quel est le risque d'une telle thérapie et comment contrecarrer ce risque ?

Question 14.2.7

- a) Expliquer le principe général des inhibiteurs de checkpoints dans l'immunothérapie.
- b) Citer deux inhibiteurs de checkpoints utilisés en immunothérapie anti-cancéreuse.
- c) Quels effets secondaires peuvent présenter des inhibiteurs de checkpoints ?

Inspiré de Problème 21 (relatif au chapitre 13)

Breukels et al., (2001) *Infection and Immunity*, vol. 69, p7583–7587.

La protection contre les infections à *Streptococcus pneumoniae* (pneumocoque) dépend de la présence d'anticorps contre certains polysaccharides de la capsule de la bactérie (PPS = Pneumococcal polysaccharides) qui facilitent la phagocytose. Les patients aspléniques (sans rate) ont un risque accru de pneumonies aux pneumocoques car le site majeur de production d'anticorps contre les PPS est la rate. Par conséquent, la vaccination avec des vaccins anti-pneumocoques polysaccharidiques est recommandée avant la splénectomie. Mais une telle vaccination n'est pas toujours possible, par exemple lorsque l'asplénie (perte de la rate) fait suite à un traumatisme. Une équipe utilise des rats normaux ou splénectomisés pour tester l'effet d'un vaccin anti-pneumocoque conjugué (PCV) et le compare à une vaccination classique contre les PPS. Pour cela, ils injectent des rats avec ou sans rate avec 0.5 ml d'un vaccin composé de PPS (un mélange des sérotypes de PPS 4, 6B, 9V, 14 et 19F et 23F) dissous dans 0,9% NaCl (5ug/ml) ou avec un vaccin conjugué composé des sérotypes 6B, 14, 19F et 23F conjugué à l'anatoxine du tétanos (dérivé inactivé de la toxine avec du phosphate d'alun comme adjuvant). Ils mesurent la production d'IgG contre les PPS de type 6B et 19F au cours du temps.

Question 21.1

- Décrire et analyser la figure 44.
- En vous basant sur ces résultats obtenus à l'aide d'un modèle animal, quel type de vaccination préconiserez-vous de développer pour traiter les patients victimes d'une asplénie suite à un accident ?

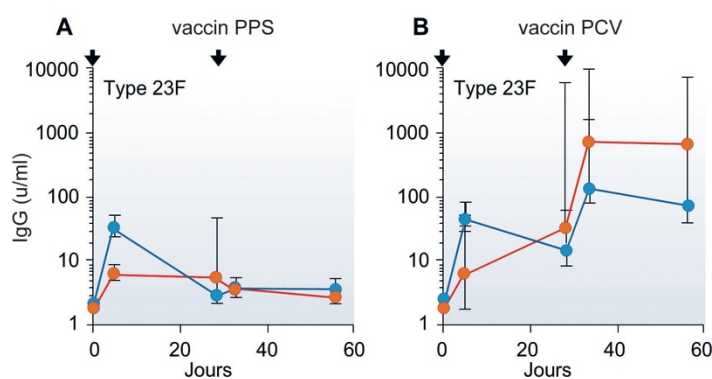


Figure 44 Réponses IgG à la vaccination par les PPS (A) et par le vaccin conjugué PCV (B) chez des rats « contrôle » et splénectomisés. Rats témoins (ronds bleus) et rats splénectomisés (ronds orange) ont été vaccinés par injection intraveineuse et sous-cutanée aux jours 0 et 28 (flèches) soit avec le vaccin classique PPS soit avec un vaccin conjugué tétravalent PCV. La réponse des anticorps aux sérotypes 23F est montrée mais les réponses aux sérotypes 4 et 9V 6B sont similaires. Les titres moyens d'anticorps (unité/ml) et les erreurs standard des moyennes sont représentés en unités par millilitre.

Les chercheurs analysent l'impact du mode d'injection du vaccin sur la protection. Pour cela, ils mesurent la production d'anticorps anti-PPS chez des rats avec ou sans

rate après deux modes de vaccination par le PCV, soit sous-cutanée, soit sous-cutanée et intraveineuse à la fois (fig. 45).

Question 21. 2

- Décrire les résultats.
- Expliquer pourquoi les rats non splénectomisés ont une réponse anticorps plus forte avec le mode injection intraveineuse et sous-cutanée à la fois que sous-cutanée à 5 jours.
- Tenant compte de l'ensemble de ces résultats obtenus à l'aide d'un modèle animal, quel mode d'injection préconiserez-vous pour vacciner les patients victimes d'une asplénie suite à un accident ?

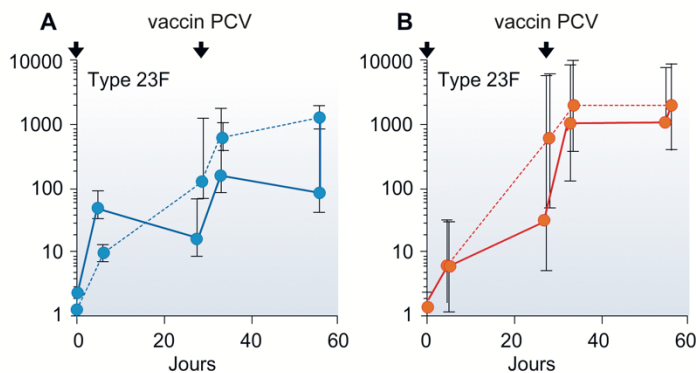


Figure 45 Réponses IgG anti-pneumocoques (anti-PPS 23F) après vaccination au PCV soit par injection sous-cutanée (trait en pointillé) soit par injection sous-cutanée et intraveineuse (trait continu). Les rats témoins (cercles bleus, panneau de gauche) et splénectomisés (cercles orange, panneau de droite) ont été vaccinés aux jours 0 et 28 avec le PCV (indiqué par un). Des résultats similaires ont été obtenus pour les IgG reconnaissant les autres sérotypes.

Problème 20 (relatif aux chapitres 8 et 13): Mise au point d'un vaccin contre la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par *Mycobacterium tuberculosis*. Le seul vaccin contre la tuberculose actuellement autorisé chez l'homme est le vaccin Bacillus Calmette-Guérin (BCG) qui est une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* administrée par voie intradermique en dose unique chez le nouveau-né. Cependant, la voie d'administration intradermique actuellement utilisée exige un personnel qualifié et soulève des problèmes liés à la réutilisation des seringues dans les pays en voie de développement, avec le risque associé de SIDA et de transmission d'hépatite. Une des pistes actuellement envisagée pour réduire ce risque est la vaccination par voie orale. Pour s'assurer de l'efficacité du vaccin, les chercheurs procèdent à des tests d'immunogénicité du vaccin.

Question 20.1

Sachant que *M. tuberculosis* est un pathogène intracellulaire qui persiste dans le phagosome des macrophages, quel(s) marqueur(s) sanguin(s) vous semble(nt) les plus importants pour évaluer le pouvoir protecteur de la réponse immunitaire induite par la vaccination ?

- IgG sérique
- IgM sérique

- c) Production d'IFN- γ par les cellules sanguines
- d) Production d'IL-4 par les cellules sanguines

Des prélèvements sanguins sont effectués 1 semaine avant le début du protocole vaccinal chez tous les volontaires ainsi que 1 semaine et 2 mois après vaccination orale et intradermique avec le BCG. Les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées et cultivées dans des puits de culture en présence de milieu de culture supplémenté ou non avec un extrait de lyse de *M. tuberculosis*. Cinq jours plus tard, les surnageants de culture sont récoltés pour y doser la quantité d'IFN- γ . La quantité produite par les cellules avant vaccination est soustraite des valeurs post-vaccinales.

Question 20.2

Analyser les résultats de la figure 42. Que pouvez-vous en tirer concernant l'efficacité de la vaccination orale ?

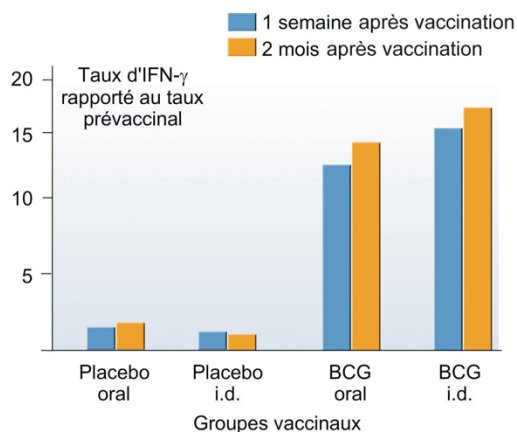


Figure 42 Taux d'IFN γ produits selon les groupes vaccinaux (i.d. intradermique, BCG: Bacille de Calmette-Guérin).

Question 20.3

Quelles cellules mononucléées du sang sont les plus à même de produire l'interféron- γ dans le cadre du test in vitro réalisé 1 semaine après vaccination et dans le test réalisé 2 mois après vaccination (cocher les cases appropriées) ?

**Cellules récoltées
1 semaine post-vaccination**

- monocytes
- lymphocytes T Naïfs
- lymphocytes T effecteurs
- lymphocytes T mémoires
- lymphocytes B Naïfs
- lymphocytes B effecteurs
- lymphocytes B mémoires
- cellules NK

**Cellules récoltées
2 mois post-vaccination**

- monocytes
- lymphocytes T Naïfs
- lymphocytes T effecteurs
- lymphocytes T mémoires
- lymphocytes B Naïfs
- lymphocytes B effecteurs
- lymphocytes B mémoires
- cellules NK

Le test de Mantoux consiste en une injection intradermique à la face antérieure de l'avant-bras de 5 unités de tuberculine PPD, sous un volume de 0,1 ml. Le bras du patient est examiné 48 à 72 h après l'injection. Une réaction positive à la tuberculine est caractérisée par une induration supérieure à 10 mm (tuméfaction palpable) autour du site d'injection. Très fréquemment autour de l'induration apparaît un halo rougeâtre. Une induration dont le diamètre est inférieur à 5 mm est considérée comme un résultat négatif. Pour votre information, sachez que si le test de Mantoux permet d'évaluer la réponse vaccinale induite par le BCG, il est surtout utilisé comme aide au dépistage de la tuberculose.

Question 20.4

Expliquer l'origine de l'induration dans un test de Mantoux positif parmi les propositions suivantes en indiquant les réponses justes.

- a) Accumulation de liquide biologique
- b) Prolifération locale de cellules résidentes
- c) Infiltration de monocytes
- d) Infiltration de cellules T naïves
- e) Infiltration de cellules T mémoires

Le test de Mantoux est pratiqué chez les enfants des groupes intradermal (i.d.) et oral deux mois après la vaccination BCG. Les résultats montrent que tous les enfants qui ont reçu le vaccin BCG par voie intradermique développent un test de Mantoux positif caractérisé par une induration supérieure à 10 mm. À l'inverse, les enfants qui ont reçu le vaccin BCG par voie orale ne développent que des indurations dont le diamètre est inférieur à 5 mm (résultat négatif).

Question 20.7

Quelle est l'hypothèse la plus plausible pouvant expliquer l'absence de réactivité à la tuberculine chez les volontaires du groupe oral ?

- a) Anergie des lymphocytes T spécifiques.
- b) Absence de migration des lymphocytes T spécifiques au site d'injection.
- c) Absence de lymphocytes T spécifiques.
- d) Problème d'inoculation lors du test de Mantoux

Vous voilà recruté dans l'étude vaccinale comme chercheur stagiaire pour élucider l'absence de migration des lymphocytes T mémoires spécifiques au site d'injection de la tuberculine. Pour tester vos connaissances, votre tuteur décide de vous soumettre à

une série de question.

Question 20.8

L'extravasation des leucocytes est un processus comportant une séquence de 4 étapes d'adhésion et/ou de signalement. Laquelle de ces séquences est correcte ?

- a) roulement – adhésion ferme – diapédèse – activation
- b) adhésion ferme – activation – diapédèse – roulement
- c) roulement – activation – adhésion ferme – diapédèse
- d) activation – adhésion ferme – roulement – diapédèse

Question 20.10

a) Décrire les résultats de la figure 43.

b) Sachant que l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est impliquée dans le tropisme des cellules vers l'intestin

et la molécule CLA vers la peau, expliquer pourquoi la vaccination orale n'induit pas de réaction positive au test de Mantoux.

c) Quelles conclusions tirer des résultats du FACS (indiquer la ou les réponses justes) ?

- i) L'absence de CLA prévient la migration des cellules T spécifiques dans la peau.
- ii) La vaccination par voie orale induit l'expression de $\alpha 4\beta 7$.
- iii) La vaccination par voie intradermique induit l'expression de CLA.
- iv) L'expression de $\alpha 4\beta 7$ est nécessaire à la migration des cellules T dans la peau.

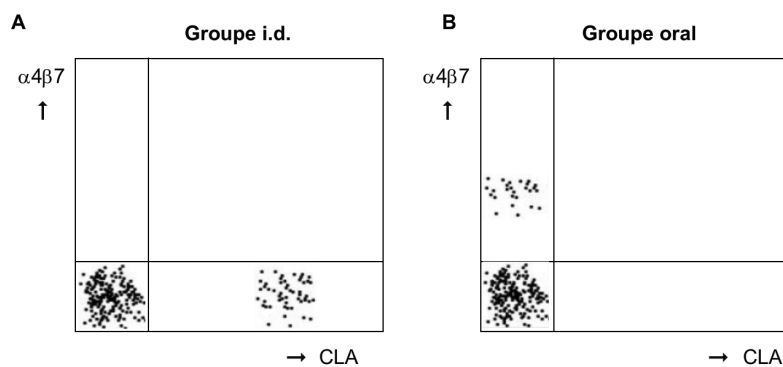


Figure 43 Analyse par FACS de l'expression des molécules de domiciliation CLA (Cutaneous lymphocyte antigen) et $\alpha 4\beta 7$ (intégrine).