

Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo

NEFTI Lydia



GERART Sarah

Sommaire

Introduction

Partie I : Localisation des deux sous ensemble de population des DCs

Partie II : Présentation antigénique

Partie III : Activation cellulaire T

Partie IV : Qu'est-ce qui est impliqué dans la présentation antigénique différentielle entre les deux sous ensembles?

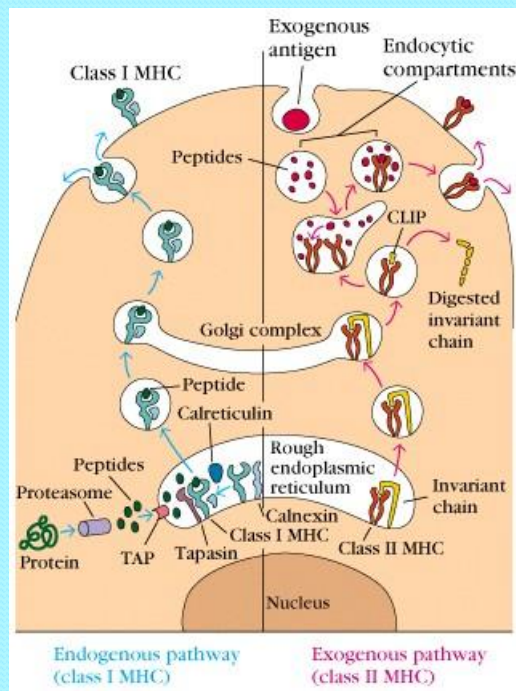
Conclusion

Introduction

Définition des cellules dendritiques (DCs) :

- Cellules phagocytaires
- Présentatrices d'antigènes
- Capables de stimuler une réponse primaire des lymphocytes T (LTs)
- Elles induisent une réponse immunitaire adaptative à l'antigène qu'elles présentent
- Elles maintiennent une tolérance centrale du soi dans le thymus

Mécanisme de la présentation antigénique



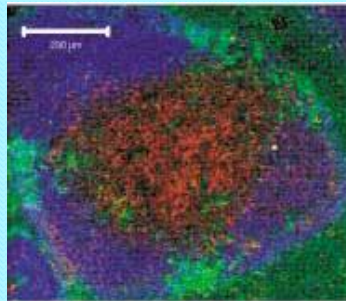
Partie I

Localisation des deux sous ensemble
de population des DCs

On distingue deux sous ensemble de DCs :

- Un premier sous ensemble de DCs qui exprime à sa surface CD8 et une lectine de type C : CD205. On les notent donc CD8+DEC205+
- Un second sous ensemble de DCs qui exprime à sa surface 33D1 mais n'exprimant pas CD8. On les notent donc CD8-33D1+

On peut localiser , au niveau de la rate, ces deux sous ensemble de DCs par immunohistochimie.



B220/DEC205/33D1

Fig 1 : Micrograph shows immunohistochemistry of 33D1 (green), αDEC205 (red), and αB220 (blue).

Partie II

Présentation antigénique

Régulation du traitement antigénique et activation cellulaire T

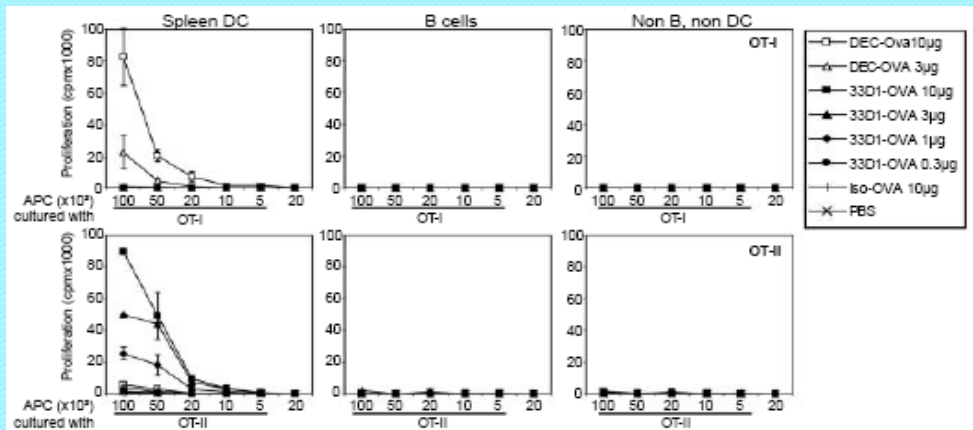


Fig 2 : Graphs show [3H]thymidine incorporation by 105 OT-I (upper panels) or OT-II T cells (lower panels) cultured with the indicated numbers of DCs, B cells, or non-B non-DCs purified from C57BL/6 mice injected with 10 µg of 33D1-OVA, αDEC-OVA, or Iso-OVA 12 hours earlier.

Etude de l'internalisation des anticorps

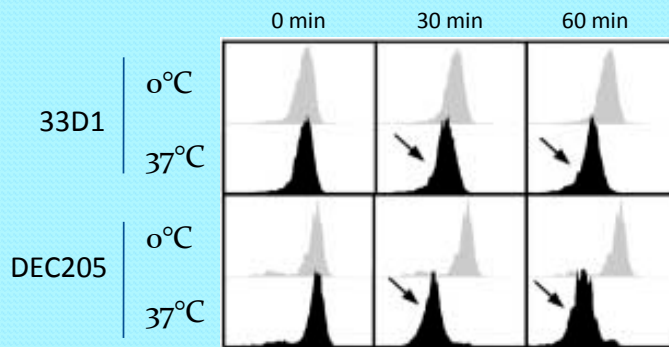


Fig 3: Histograms show internalization of purified rat 33D1 or rat α DEC205 antibodies after incubation at 37°C for 0, 30, or 60 min (black), or cell surface expression after incubation on ice for a further 0, 30, or 60min (gray). Cells were gated on CD11c+CD8⁻ and CD11c+CD8⁺ DCs.

=> La cinétique de l'internalisation de 33D1 est moins rapide que celle de DEC205.

=> La quantité de DEC205-OVA internalisé est plus importante que celle de 33D1-OVA.

⇒ In vivo, la présentation de l'antigène par les deux sous ensemble est équivalente.

⇒ La différence est seulement due à leur capacité de présenter l'antigène par le CMH I ou le CMH II in vitro.

Partie III

Activation cellulaire T

Mesure de la prolifération des cellules T transgéniques OT-I et OT-II

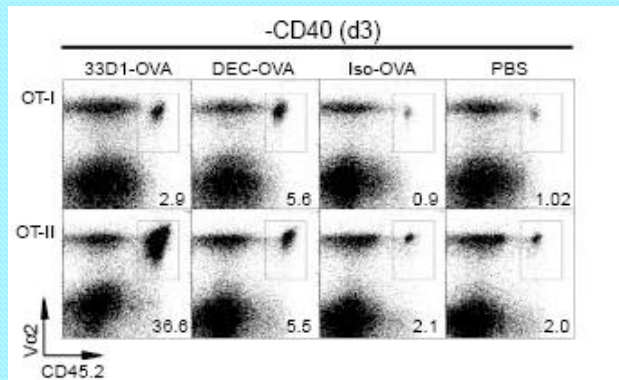


Fig 4 : Dot plots show the relative numbers of OT-I (upper panels) or OT-II (lower panels) T cells remaining in spleen 3 days after injection of 300 ng of 33D1-OVA, α DEC-OVA, or Iso-OVA. Numbers indicate percentages of gated CD4+ or CD8+ that were Va2+CD45.2+.

Mesure de la durée de la prolifération après présentation antigénique

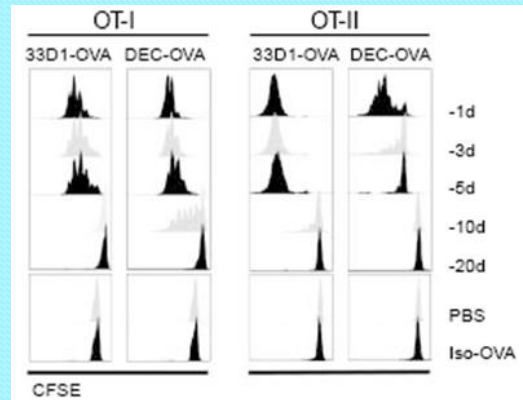


Fig 5 : Histograms show proliferation as measured by CFSE dye dilution by OT-I (left) or OT-II (right) T cell transfer was performed 1, 3, 5, 10, or 20 days after injection of 3 μ g of 33D1-OVA, α DEC-OVA, or Iso-OVA.

Etude de la prolifération en réponse à une deuxième stimulation

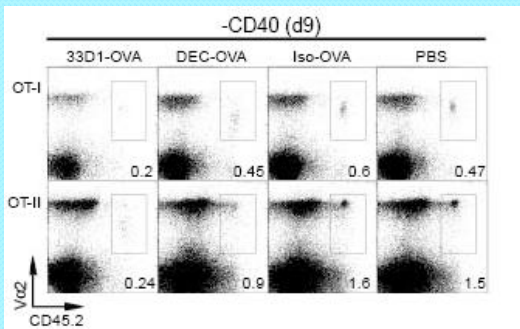


Fig 6 : Dot plots show the relative numbers of OT-I (upper panels) or OT-II (lower panels) T cells remaining in spleen 9 days after injection of chimeric antibodies.

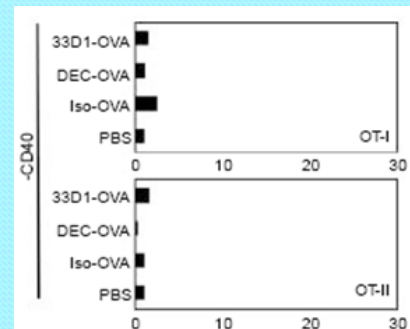


Fig 7 : Bar graphs show [3H]thymidine incorporation by CD4 or CD8 T cells purified on day 9 after injection of 3 μ g of 33D1-OVA, α DEC-OVA, or Iso-OVA and challenged with antigen in vitro.

Etude de la prolifération en réponse à une deuxième stimulation

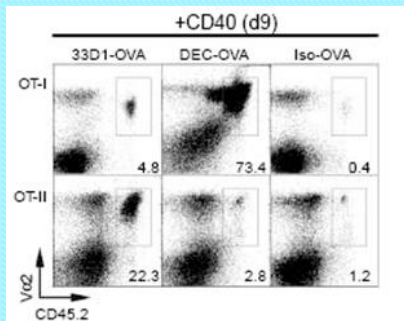


Fig 8 : Dot plots show the relative numbers of OT-I (upper panels) or OT-II (lower panels) T cells remaining in spleen 9 days after injection of chimeric antibodies (50 µg of αCD40 antibody was injected with the targeting antibodies to induce DC maturation).

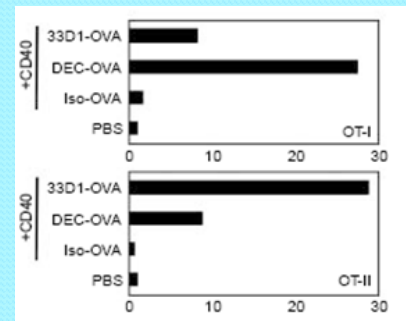


Fig 9 : Bar graphs show [3H]thymidine incorporation by CD4 or CD8 T cells purified on day 9 after injection of 3 µg of αDEC-OVA, or Iso-OVA and challenged with antigen in vitro and 50 µg of αCD40 antibody was injected with the targeting antibodies to induce DC maturation.

⇒ La présentation d'un antigène à un état stable induit une tolérance cellulaire T

⇒ La présentation d'un antigène en association avec la maturation des DCs par la liaison à CD40 entraîne une expression des clones cellulaires T qui restent sensibles à l'antigène.

Parti IV

Qu'est-ce qui est impliqué dans la présentation antigénique différentielle entre les deux sous ensemble?

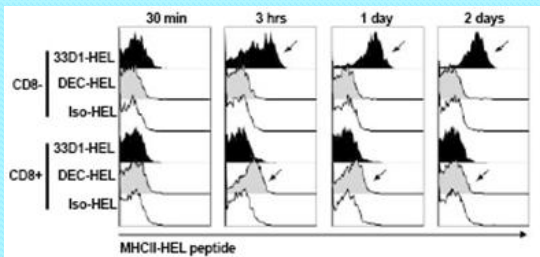


Fig 10: Histograms show MHCII-p on CD8+DEC205+ and CD8-33D1+ DCs 30 min, 3 hours, and 1 or 2 days after intravenous injection of 10 μ g of α DEC205-HEL or 33D1-HEL or Iso-HEL control in B10.BR

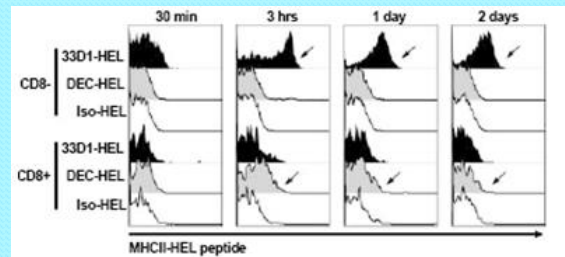


Fig 11 : Histograms show MHCII-p on CD8+DEC205+ and CD8-33D1+ DCs 30 min, 3 hours, and 1 or 2 days after intravenous injection of 10 mg of α DEC205-HEL or 33D1-HEL or Iso-HEL control in C3H/HeJ mice.

=> L'antigène 33D1 est présenté plus efficacement par le CMH II dans les cellules CD8- que l'antigène DEC205 dans les cellules CD8+

=> La présentation de l'antigène par le CMH II est une propriété intrinsèques de la cellule indépendante des récepteurs ciblés par les différents anticorps.

Détermination des différences intrinsèques entre les deux sous ensembles



Fig 12 et 13 : Distinct expression pattern of MHC class I– and MHC class II–associated molecules. Affymetrix gene array analysis showing relative amounts of mRNAs associated with the MHC class II (fig 13) and MHC class I (fig 12) processing pathways expressed by CD8+DEC205+ and CD8–33D1+ DCs purified from WT- (–) and Flt3L-melanoma– (+) injected mice. Each bar represents the mean of three individual gene arrays prepared from distinct mRNA samples.

=> L'expression préférentielle des différents composants du CMH I et CMH II est en accord avec la capacité des CD8- à produire le CMH II et inciter la réponse cellulaire T

Confirmation par technique de Western Blot

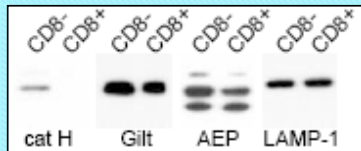


Fig 14 : Western blots for cathepsin H, Gilt, and AEP on extracts of purified CD8+DEC205+ and CD8-33D1+ spleen DCs.

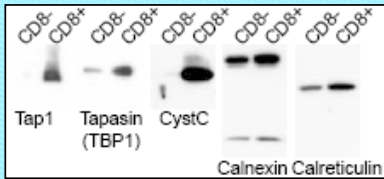


Fig 15 : Western blots for Tap-1, tapasin, cystatin C, calnexin, and calreticulin on extracts of purified CD8+DEC205+ and CD8-33D1+ spleen DCs. (D) Lysosomal marker LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein 1)



Fig 16 : Western blots for Tap-1, tapasin, cystatin C, calnexin, and calreticulin on extracts of purified CD8+DEC205+ and CD8-33D1+ spleen DCs. β -actin are shown as loading controls.

=> Les différences d'expression des protéines impliquées dans la présentation antigénique dans les deux sous ensembles des DCs est en accord avec le traitement préférentiel des antigènes.

Conclusion

⇒ Les DCs initient les réponses immunitaires et entraînent la tolérance aux antigènes du « soi ».

⇒ Deux sous ensemble de DCs distincts localisés à différents endroits dans les organes lymphoïdes.

⇒ Les CD8+ présente l'antigène préférentiellement par le CHM I et les CD8- par le CHM II.

⇒ La présentation antigénique préférentielle est due à des différences intrinsèques de l'expression de protéines dans les deux sous ensemble.