



**HAL**  
open science

# Etude expérimentale et modélisation mathématique de la réponse lymphocytaire T

Fatima Zahra El Hentati

► **To cite this version:**

Fatima Zahra El Hentati. Etude expérimentale et modélisation mathématique de la réponse lymphocytaire T. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2009. Français. NNT: . tel-00466660

**HAL Id: tel-00466660**

**<https://theses.hal.science/tel-00466660>**

Submitted on 24 Mar 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre : 546 GP

## THÈSE

présentée par

**Fatima-Zahra EL HENTATI**

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des Procédés

### **Etude expérimentale et modélisation mathématique de la réponse lymphocytaire t**

Soutenue à Saint-Etienne le 24 Novembre 2009

#### Membres du jury

Président :	Didier Bernache	Professeur, Ecole des Mines, Saint-Étienne
Rapporteurs :	Pierre BONGRAND	PU-PH, Hôpital de la Conception, Marseille
	Bruno GUY	Ingénieur, Sanofi Pasteur, Lyon
Examineur(s) :	Stéphane GENYES	Maitre de conférence, Université Claude Bernard Lyon I
	Gilles THIBAUT	Professeur, Faculté de Médecine, Tours
Directeur(s) de thèse :	Frédéric GRUY	Maitre de recherche, Ecole des Mines, Saint-Étienne
	Claude LAMBERT	Médecin (HDR), CHU, Saint-Étienne

**Spécialités doctorales :**

SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX  
 MECANIQUE ET INGENIERIE  
 GENIE DES PROCÉDES  
 SCIENCES DE LA TERRE  
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT  
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES  
 INFORMATIQUE  
 IMAGE, VISION, SIGNAL  
 GENIE INDUSTRIEL  
 MICROELECTRONIQUE

**Responsables :**

J. DRIVER Directeur de recherche – Centre SMS  
 A. VAUTRIN Professeur – Centre SMS  
 G. THOMAS Professeur – Centre SPIN  
 B. GUY Maître de recherche – Centre SPIN  
 J. BOURGOIS Professeur – Centre SITE  
 E. TOUBOUL Ingénieur – Centre G2I  
 O. BOISSIER Professeur – Centre G2I  
 JC. PINOLI Professeur – Centre CIS  
 P. BURLAT Professeur – Centre G2I  
 Ph. COLLOT Professeur – Centre CMP

**Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)**

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BENABEN	Patrick	PR 2	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
BERNACHE-ASSOLANT	Didier	PR 0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR 2	Informatique	G2I
BOUCHER	Xavier	MA	Génie Industriel	G2I
BOUDAREL	Marie-Reine	MA	Génie Industriel	DF
BOURGOIS	Jacques	PR 0	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BRODHAG	Christian	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BURLAT	Patrick	PR 2	Génie industriel	G2I
COLLOT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR 0	Génie des Procédés	DF
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DARIEULAT	Michel	IGM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DECHOMETS	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
DESRAYAUD	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DELAFOSSÉ	David	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	G2I
DRAPIER	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	SMS
DRIVER	Julian	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FEILLET	Dominique	PR 2	Génie Industriel	CMP
FOREST	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
FORTUNIER	Roland	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	CR	Génie des Procédés	SPIN
GIRARDOT	Jean-Jacques	MR	Informatique	G2I
GOEURIOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GOEURIOT	Patrice	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
GROSSEAU	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GUILHOT	Bernard	DR	Génie des Procédés	CIS
GUY	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
INAL	Karim	MR	Microélectronique	CMP
KLÖCKER	Helmut	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
LAFORÉST	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et Ingénierie	SMS
LI	Jean-Michel	EC (CCI MP)	Microélectronique	CMP
LONDICHE	Henry	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
MOLIMARD	Jérôme	MA	Mécanique et Ingénierie	SMS
MONTHEILLET	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean-Charles	PR 0	Image, Vision, Signal	CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	DF
THOMAS	Gérard	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
VALDIVIESO	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VAUTRIN	Alain	PR 0	Mécanique & Ingénierie	SMS
VIRICELLE	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS

**Glossaire :**

PR 0 Professeur classe exceptionnelle  
 PR 1 Professeur 1<sup>ère</sup> catégorie  
 PR 2 Professeur 2<sup>ème</sup> catégorie  
 MA(MDC) Maître assistant  
 DR (DR1) Directeur de recherche  
 Ing. Ingénieur  
 MR(DR2) Maître de recherche  
 CR Chargé de recherche  
 EC Enseignant-chercheur  
 IGM Ingénieur général des mines

**Centres :**

SMS Sciences des Matériaux et des Structures  
 SPIN Sciences des Processus Industriels et Naturels  
 SITE Sciences Information et Technologies pour l'Environnement  
 G2I Génie Industriel et Informatique  
 CMP Centre de Microélectronique de Provence  
 CIS Centre Ingénierie et Santé

# Remerciements

Au cours de cette longue traversée incertaine qu'est la thèse, j'ai appris au contact des uns, partagé des moments intenses avec des autres. En espérant n'oublier personne, je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont entouré durant mes années de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, **Frédéric Gruy** et **Claude Lambert** pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me laissant une grande autonomie, tout en me guidant. Leur gentillesse, leur générosité et leur disponibilité m'ont toujours beaucoup touchée. Je les remercie sincèrement pour leurs conseils et discussions scientifiques qui m'ont toujours été profitables.

Je remercie également le Pr **Christian Genin** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire d'Immunologie clinique du CHU de Saint-Etienne. Je tiens aussi à remercier **Stéphane Paul** pour ses conseils et discussions scientifiques, d'avoir toujours répondu à mes questions très rapidement dans les grands moments de solitude

Je tiens à remercier Mr **Didier Bernache** d'avoir accepté d'être le président du jury en ce moment de jugement final et non dernier .... Je remercie également Mr **Pierre Bongrand** et Mr **Bruno Guy** de me faire l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, me permettant ainsi de bénéficier de leur expertise. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré pour juger ce travail et je tiens à leur exprimer ma respectueuse considération et ma sincère gratitude. Je tiens également à remercier **Stéphane Genyes** et **Gilles Thibault** d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

Un grand remerciement à Dr **Roland Liblau** responsable du laboratoire d'Auto-immunité et Immunorégulation de l'unité 563 de m'avoir accueilli dans son équipe lors de mon séjour à Toulouse. Merci à **Sabine Desbois**, de m'avoir donné l'opportunité de travailler à ses côtés, pour le temps qu'elle m'a accordé, son aide précieuse dans les manips, sa rugueur scientifique et sa qualité humaine.

Une thèse, c'est également un travail dans un laboratoire où j'ai partagé non seulement des connaissances scientifiques mais aussi des vrais échanges humains. Les membres du laboratoire d'immunologie clinique : je tiens à remercier **Pascale**, les deux **Martine**, **Michelle**, **Nadine**, **Christine**, **Françoise**, **Cristina** et mon meilleur co-bureau **Marie-Laure**. Merci pour votre gentillesse et bonne humeur au labo, les crises de fou rire qu'on a eues en se racontant les potins. Merci d'avoir supporté mes moments de stress et d'angoisse. Ces années d'études parfois longues et difficiles ont été facilitées par leur présence. Je suis heureuse de les avoir traversées avec eux. Je garderai de cette période de beaux souvenirs, une belle solidarité et une profonde amitié.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'école des Mines de Saint-Etienne : **Caroline Bidot** pour son aide, mes supers collègues de bureau **Sandra Jacquier**, **Sylvain Tabone** et l'incontournable **Le ba Hung** avec qui l'ambiance de travail a été toujours studieuse et amicale. Je remercie également les voisins de couloir : **Jean-Pierre Bigot**, **Andrée-Aimé Toucas**, **Gilles Fevotte**, **Alain lallemand**, **Paul Jouffrey**, **Jérôme Mancuso**, **Ana Cameiro**, **Richard Drogo**. Merci à **Françoise Bresson** pour son aide administrative précieuse, sa présence et sa bonne humeur.

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées à l'école des mines. Difficile de citer tout le monde, je m'en excuse par avance. Beaucoup sont devenus des amis. Merci à **Tonio, Thierry, Hanane, Franck** et **Marie, Wilfried, Najih, Sorina, Malick, Yamina, Ahmed, Carole, Virginie, Amina, Nessrine, Marthe, J-C, Narcisse, Amara, Mathieu, Arthur, Geoffroy** ..... et un remerciement spécial pour **Fahd** pour sa gentillesse, son amitié et son soutien de tous les jours pendant toute cette épreuve et tout le reste....

Enfin, je souhaite rendre un hommage tout particulier à mes parents, mes frères et sœur. A mes parents, **El Kebira** et **Brahim**, que je ne pourrai jamais assez remercier de tout ce qu'ils ont fait pour moi. Tout l'amour et le bonheur que vous me donnez m'ont portée pendant ces longues années d'études. J'ai vraiment une chance fabuleuse d'avoir des parents comme vous et une famille formidable. Je vous dédie cette thèse, qui n'aurait jamais pu aboutir sans votre soutien et votre confiance constante et sans bornes. A **Amine, Malik** et surtout **Salima** pour sa présence, son soutien et surtout son aide précieuse à la préparation du pot ;) .

A ma **grande mère** et **hadj Moussa** et à toute la famille merci d'avoir été présents jusqu'à aujourd'hui.

Merci pour tout.

*A ma famille*

**« Se donner du mal pour les petites choses, c'est parvenir aux grandes, avec le temps »**

Samuel Beckett

# Sommaire

<i>Avant-propos</i>	1
<i>Liste des abréviations</i>	3
<i>Liste des Figures</i>	5
<i>Liste des Tableaux</i>	9
<i>Introduction</i>	11
<b><i>Première partie : Etude bibliographique</i></b>	<b>15</b>
<b><i>I. Les lymphocytes T</i></b>	<b>17</b>
1. Origine et développement	17
2. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)	19
3. Structure et fonction du TCR	22
4. Le complexe TCR/CD3	23
<b><i>II. Les sous populations des lymphocytes T effectrices et leurs fonctions</i></b>	<b>25</b>
1. Les lymphocytes T CD4+	27
2. Les lymphocytes T CD8+ :	29
<b><i>III. Les cellules dendritiques</i></b>	<b>31</b>
1. Les différentes populations de DC	31
1.1. Les DC myéloïdes	33
1.2. Les DC plasmocytoïdes	33
2. Maturation des DC	34
3. Migration et maturation des DC	36
4. Apprêtement des antigènes	37
<b><i>IV. Contact Lymphocyte T/ Cellules dendritiques</i></b>	<b>39</b>
1. Sensibilité et spécificité des TCR :	39
2. Le modèle de « kinetic proofreading »: (McKeithan 1995)	40
3. Le modèle des engagements consécutifs « Serial Triggering ou Serial engagement»	41
<b><i>V. La synapse immunologique</i></b>	<b>45</b>
1. Architecture de la synapse immunologique	45
2. La synapse immunologique est une structure dynamique	47
2.1. Dynamique à la synapse	47
2.2. Dynamique de l'interaction lymphocyte T/CPA pendant la formation de la synapse	50
2.3. « Ségrégation cinétique » « kinetic segregation » ou l'organisation de zones privilégiées au site de contact LT/APC	52
3. Rôle de la synapse immunologique dans la maintenance d'un pool de lymphocytes T naïfs périphériques	53

4. Rôle de la synapse immunologique dans la signalisation intracellulaire	54
<b>VI. Activation des lymphocytes T</b>	<b>57</b>
1. Activation des lymphocytes T et valence des TCR	57
1.1. Le modèle d'hétérodimérisation du TCR :	57
1.2. Le modèle de pseudodimérisation du TCR :	58
1.3. Le modèle des TCR multivalents :	58
2. Changement conformationnel du TCR	59
3. Baisse d'expression membranaire du TCR engagés « downregulation »	59
4. Les molécules de co-stimulation	61
5. Dynamique d'un lymphocyte avant et après rencontre de DC	62
6. Marqueurs membranaires d'activation	65
6.1. CD69 marqueur précoce d'activation	65
6.2. CD25 marqueur tardif d'activation	65
6.3. Rôle de l'interleukine-2 dans l'activation des lymphocytes T	66
7. Les conséquences de l'activation : l'expansion clonale	67
8. Rôle des cytokines dans l'expansion clonale :	69
<b>VII. Modélisation de la réponse immunitaire</b>	<b>71</b>
1. Modélisation de l'activation lymphocytaire T	72
2. Schémas réactionnels	73
3. Ecriture des équations	77
4. Variantes du modèle d'activation	78
5. « Modaly_T », un programme pour la résolution numérique des modèles d'activation T	79
6. Point de vue sur la bibliographie	81
6.1. Groupe de Coombs	81
6.2. Groupe de Chakraborty	85
6.3. Groupe de Dushek	86
6.4. Groupe Arkhipov	86
6.5. Groupe Arnacha Casal	87
6.6. Groupe Sousa et Carneiro	88
<b>Deuxième partie : Matériels et Méthodes</b>	<b>91</b>
<b>I. Echantillons :</b>	<b>93</b>
1. Les lignées de souris transgéniques	93
1.1. La lignée CL4-TCR	93
1.2. Production et conditions d'élevage de ces lignées	93
1.3. Identification des animaux transgéniques	94
2. Les cellules mononuclées	94
2.1. Cellules mononuclées du sang	94
2.2. Cellules mononuclées de la rate et ganglions de souris	95
3. Les cellules dendritiques	95
3.1. Préparation des cellules dendritiques à partir de la moelle osseuse de souris	95
3.2. Culture des cellules dendritiques	95
3.3. Pureté des cellules dendritiques	95
<b>II. Mesure d'absorption du peptide hémagglutinine par les cellules dendritiques</b>	<b>96</b>
1. Description de la HPLC-MS	96
2. Incubation des cellules dendritiques avec le peptide Hémagglutinine	96
2.1. Peptides	96

2.2. Chargement des cellules dendritiques par le peptide HA _____	96
<b>3. Dosage du peptide Hémagglutinine par HPLS-MS _____</b>	<b>97</b>
3.1. Précipitation des protéines : _____	97
3.2. Quantification du peptide hémagglutinine par HPLC-MS _____	97
<b>III. Cinétique d'activation des lymphocytes _____</b>	<b>98</b>
1. Activation des lymphocytes par cellules dendritiques chargées _____	98
2. Activation des lymphocytes T par stimulation non spécifiques _____	98
<b>IV. Caractérisation des populations de LT par cytométrie en flux : _____</b>	<b>98</b>
1. Marquage direct des cellules _____	98
1.1. Marquage direct sur sang total chez l'homme et la souris _____	98
1.2. Marquage direct sur PBMC _____	99
2. Marquage indirect des cellules « QIFIKIT® » _____	101
2.1. Principe du QIFIKIT® _____	101
2.2. Marquage des billes de fenêtrage et de calibration _____	101
2.3. Marquage des Lymphocytes T _____	101
3. Paramètres de l'analyse _____	102
4. Analyses statistiques _____	102
<b>V. Microscopie électronique à balayage : _____</b>	<b>102</b>
<b>VI. Dosage IL2 par ELISA _____</b>	<b>103</b>
<b>Troisième partie : Résultats _____</b>	<b>105</b>
<b>I. Niveau d'expression des récepteurs membranaires chez l'homme _____</b>	<b>107</b>
1. Introduction _____	107
2. But _____	107
3. Patients et Méthodes _____	107
4. Résultats _____	108
5. Conclusion _____	110
<b>II. Etude de la variabilité de l'expression des CD3 membranaires et la capacité d'activation des lymphocytes T chez l'homme _____</b>	<b>111</b>
1. Introduction _____	111
2. But _____	112
3. Patients et Méthodes _____	112
4. Résultats _____	113
4.1. Présentation des résultats de cytométrie _____	113
4.2. La large distribution des CD3 membranaires au niveau des lymphocytes T _____	115
4.3. La variabilité de la distribution des CD3 a été observée sur tous les isotopes des lymphocytes T _____	117
4.4. La distribution des CD3 est fonction des colonotypes TCR V $\beta$ des lymphocytes T _____	119
4.5. La variabilité d'expression d'autres récepteurs membranaires _____	121
4.6. Le niveau d'expression de CD3 ne dépend que partiellement de la taille des cellules _____	123
4.7. Les conséquences fonctionnelles de la différence d'expression de CD3 à la surface des LT _____	126
5. Conclusions : _____	129
<b>II. Etude de la cinétique d'activation des récepteurs membranaires chez la souris et confrontation avec la modélisation mathématique _____</b>	<b>133</b>
1. Introduction _____	133

---

<b>2. Cinétique d'absorption du peptide HA par les cellules dendritiques</b>	<b>133</b>
2.1. But	134
2.2. Méthodes	134
2.3. Résultats	134
2.4. Conclusions	139
<b>3. Cinétique d'Activation des lymphocytes T</b>	<b>143</b>
3.1. Introduction	143
3.2. But	143
3.3. Méthodes	143
3.4. Résultats	144
3.5. Conclusions	156
<b>4. Confrontation des résultats expérimentaux avec les simulations numériques</b>	<b>159</b>
4.1. Introduction	159
4.2. But	159
4.3. Modèles et méthodes	159
4.4. Résultats	164
a) Confrontation avec le modèle:	169
b) Correction du modèle :	171
4.5. Conclusions	178
<b>III. Interprétation des expériences de cytométrie en flux</b>	<b>181</b>
1. Introduction	181
2. La modélisation	181
3. Extraction des données expérimentales	185
3.1. Densité de la population CD3	187
3.2. Densité de la population CD69	188
3.3. Densité de la population CD25	189
4. Confrontation des résultats expérimentaux aux simulations	191
5. Conclusions	195
<b>IV. Comparaison de l'expérience à la modélisation dans l'intervalle temps [0-6h]</b>	<b>197</b>
<b>Quatrième partie : Conclusions et perspectives</b>	<b>203</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>211</b>
<b>Annexe I</b>	<b>233</b>
<b>Annexe II</b>	<b>241</b>
<b>Annexe III</b>	<b>267</b>
<b>Annexe IV</b>	<b>279</b>

# Avant-propos

Ce travail est l'objet d'une collaboration entre le département CIS (Centre d'Ingénierie et Santé) de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne et le laboratoire d'Immunologie du CHU (centre Hospitalier Universitaire) de Saint-Etienne.

Il a été amorcé par Bernard Guy, Claude Lambert et Frédéric Gruy. Une première étude a été faite par Claire-Sophie Haudin dans le cadre d'un stage à l'Ecole des mines, suivie d'une thèse de Caroline Bidot sur la modélisation de la réponse lymphocytaire T.

Les intervenants de cette collaboration viennent de disciplines scientifiques différentes. Bernard Guy est intéressé dans la modélisation mathématique des systèmes naturels.

Frédéric Gruy est un spécialiste de la dynamique des populations de grains et cristaux.

Claude Lambert est un immunologiste spécialiste de la cytométrie des lymphocytes T.

L'école des Mines de Saint-Etienne a créée, en 2004, un centre d'enseignement et de recherche dédié à l'interaction entre la biologie et les sciences de l'ingénieur : le CIS (Centre d'Ingénierie et Santé), en partenariat avec le CHU. Les thèmes couverts sont : la Biomécanique et les Biomatériaux, l'Imagerie et la Morphologie, le Génie industriel hospitalier, la Dynamique des systèmes biologiques, et le bio-environnement industriel.

Le présent travail s'inscrit dans l'axe de recherche *Dynamique des systèmes biologiques* de ce nouveau centre.



# Liste des abréviations

ABC: Antibody Binding Capacity  
ACN: Acétonitrile  
ADN / ARN : acide désoxyribonucléique / acide ribonucléique AF : Acide formique  
Ag : Antigène  
AIRE: Auto-Immune Regulator  
APC: Allophycocyanine  
APECED : Polyendocrinopathie auto-immune de type 1  
APL: Altered Peptide Ligand  
BCR : Récepteur de lymphocyte B  
BSA: Serum Albumine Bovine  
CAP: Cluster association probabilities  
CD: cluster of differentiation  
CDP: Cluster dissociation probabilities  
CDR: Complementarity Determining Regions  
CHU : Centre Hospitalo Universitaire  
CIS : Centre d'Ingénierie et Santé  
CL4-TCR : Lignée de souris clone-4 CTL  
CMF : Cytométrie à flux  
CMH : complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CPA ou APC: Cellule Présentatrice d'antigène  
cSMAC: Central Supra Molecular Activation Cluster  
cTec : Cellule épithéliale corticale  
CTL : Lymphocyte T cytotoxique  
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4  
CV: Coefficient de variance  
DC : Cellule dendritique  
DN : Double négatif  
DP : Double positif  
dSMAC: Distal Supra Molecular Activation Cluster  
EDO : Equations différentielles Ordinaires  
EDP : Equations Différentielles Partielles  
EDTA : Acide éthylène diamine tetra acétique  
EFS : Etablissement français du sang  
EOPS : Exemptes d'organismes pathogènes spécifiques  
FITC: Fluoresceine Iso Thio Cyanate  
FRET: Fluorescence Resonance Energie Transfert  
FSC: Forward scattering  
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor  
HA: Hémagglutinine

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution  
HBV : Hepatitis B virus  
HCL : Acide chloridrique  
HCV: Hepatitis C virus  
HIV: Human Immunodeficiency Virus  
HLA: Human Leukocyte Antigen  
HPLC-MS: High-performance liquid chromatography/mass spectroscopy  
HTLV: Human T-lymphotropic virus  
IFN $\gamma$ : Interféron  $\gamma$   
Ig: Immunoglobuline  
IL: Interleukine  
ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs  
Lck: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase  
LCMV: Lymphocytic Choriomeningitis Virus  
LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen-1  
LPS: Lipopolysaccharide  
LT : Lymphocyte T  
MdFI : Médiane d'Intensité de Fluorescence  
MdFSC-H : Médiane d'intensité du Forward Scattering  
MFI : Moyenne d'Intensité de Fluorescence  
mTec : Cellule épithéliale médullaire  
NK: Natural killer  
PAMP: Pathogen Association Molecular Pattern  
PBMC : Cellules mononuclées  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
pCMH : Peptide lié au complexe majeur d'histocompatibilité  
PE: Phycoérythrine  
PerCP: Peridinin Chlorophyll Protein  
PFA : Para-formaldéhyde  
PHA : Phytohaemagglutinin  
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase  
PIP3: Phosphatidylinositol (3, 4,5)-trisphosphate  
PKC $\theta$  : Protein kinase C  $\theta$   
pSMAC: Peripheral supra molecular activation cluster  
SI : Synapse immunologique  
SN : Sélection négative  
SP: Sélection positive  
SSC: Side scattering $\theta$   
SVF : Sérum de veau fœtal  
TCR : Récepteur de lymphocyte T  
Th: Lymphocyte T helper  
TL: complexe lymphocyte T/Ligand  
TLR: Toll-like récepteurs  
TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
ZAP-70: Zeta-chain-associated protein kinase 70

# Liste des Figures

<b>Figure 1 :</b> Etapes du développement des thymocytes.	17
<b>Figure 2 :</b> Les complexes majeurs d'histocompatibilité murin et humain.	20
<b>Figure 3 :</b> La structure des CMH de classe I et de classe II.	21
<b>Figure 4 :</b> Diversité structurale du TCR.	23
<b>Figure 5 :</b> Le complexe TCR/CD3.	24
<b>Figure 6 :</b> Les caractéristiques structurale des corécepteurs CD4 et CD8.	26
<b>Figure 7 :</b> les sites d'interaction de CD4 et CD8 sur les molécules du CMH de classe II et I.	26
<b>Figure 8 :</b> Représentation schématique de l'induction et de la régulation des lymphocytes Th1 et Th2.	28
<b>Figure 9 :</b> Orientation de la machinerie lytique au site de contact CTL-CPA.	30
<b>Figure 10 :</b> Développement, diversité, maturation et fonction des cellules souche hématopoïétique CD34+	32
<b>Figure 11 :</b> Principaux changement morphologiques, phénotypiques et fonctionnels au cours de la maturation des cellules dendritiques.	34
<b>Figure 12 :</b> Rôle des DC dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative.	35
<b>Figure 13 :</b> Mécanismes de capture antigénique des cellules dendritiques.	36
<b>Figure 14 :</b> Apprêtement et Présentation des antigènes par les molécules du CMH-I et les molécules du CMH-II.	38
<b>Figure 15 :</b> Schématisation du modèle de « Kinetic Proofreading » pour la signalisation du TCR.	40
<b>Figure 16 :</b> Modèle d'engagement en série des TCR ou « Serial triggering ».	42
<b>Figure 17 :</b> Représentation schématique de la synapse immunologique mature.	46
<b>Figure 18 :</b> Vue de face (côté lymphocyte T) de la synapse immunologique mature.	46
<b>Figure 19 :</b> Formation des micro-groupes de TCR suite à la reconnaissance antigénique.	48
<b>Figure 20 :</b> Dynamique de l'interaction entre un lymphocyte T et une CPA.	49
<b>Figure 21 :</b> Le modèle de kinetic segregation.	53
<b>Figure 22 :</b> Rôle de la synapse immunologique dans la dégradation, l'internalisation des TCR et l'induction de la signalisation.	60
<b>Figure 23 :</b> Dimensions des molécules impliquées dans la formation de la zone privilégiée.	63
<b>Figure 24 :</b> Les différentes phases de l'activation des lymphocytes T in vivo.	64
<b>Figure 25 :</b> Schéma représentant le récepteur de l'interleukine-2 avant et après activation.	66
<b>Figure 26 :</b> Rôle autocrine de l'interleukine-2 dans l'activation des lymphocytes T.	67
<b>Figure 27 :</b> Les trois phases de la réponse immune.	68
<b>Figure 28 :</b> Présentation de l'antigène.	73
<b>Figure 29 :</b> Processus d'activation du lymphocyte T : relation entre les différents états des protéines.	77
<b>Figure 30 :</b> Interface du programme Modaly_T.	80
<b>Figure 31 :</b> Modèle géométrique lors du contact entre LT et CPA.	82
<b>Figure 32 :</b> Schéma réactionnel de l'internalisation du TCR.	84

<b>Figure 33</b> : Schéma réactionnel de l'internalisation du TCR. _____	84
<b>Figure 34</b> : Structure d'un spectromètre de masse. _____	96
<b>Figure 35</b> : Courbes simulées de l'évolution de la quantité membranaire de CD3 pour la concentration de 1093 pCMH. a) avant correction du modèle (TCR=30 000, CD8/4=70 000, CD28= 500 et $r=3,5\mu\text{m}$ ), b) après correction du modèle (TCR=22 000, CD8/4=55 000, CD28=8 000 et $r=5\mu\text{m}$ ). _____	109
<b>Figure 36</b> : Courbes simulées de l'évolution de la concentration de l'interleukine 2 pour la concentration de 1093 pCMH. a) avant correction du modèle (TCR=30 000, CD8/4=70 000, CD28=8 000 et $r=3,5\mu\text{m}$ ), b) après correction du modèle (TCR=22 000, CD8/4=55 000, CD28=8 000 et $r=5\mu\text{m}$ ). _____	109
<b>Figure 37</b> : Courbes simulées de l'évolution de la concentration membranaire de CD69 et CD25 pour la concentration de 1093 pCMH.a) avant correction du modèle (TCR=30 000, CD8/4=70 000et $r=3,5\mu\text{m}$ ), b) après correction du modèle (TCR=22 000, CD8/4=55 000, CD28=8 000 et $r=5\mu\text{m}$ ). _____	109
<b>Figure 38</b> : Représentation graphique de la taille et de la granulosité des cellules. _____	113
<b>Figure 39</b> : Représentation graphique représentant la fluorescence relative du CD4 par rapport à celle du CD3. _____	114
<b>Figure 40</b> : Représentation graphique d'un histogramme illustrant la fluorescence relative du CD3 par rapport au nombre d'événements sur la population lymphocytaire. _____	114
<b>Figure 41</b> : La grande variabilité de l'intensité de fluorescence du CD3 FITC sur les LT périphériques. _____	116
<b>Figure 42</b> : La distribution de l'expression de CD3 sur les lymphocytes T $\gamma\delta$ périphériques. _____	118
<b>Figure 43</b> : La grande variabilité d'expression du récepteur CD3 sur les lymphocytes $\alpha\beta$ . _____	119
<b>Figure 44</b> : La grande variabilité d'expression du CD3 sur les LT CD4 et CD8 (CD4-) sur les lymphocytes $\alpha\beta$ . _____	120
<b>Figure 45</b> : La médiane d'intensité de fluorescence du CD3 varie en fonction des colonotypes des LT. _____	120
<b>Figure 46</b> : L'analyse des CD4 ou CD8; CD45 et le FSC selon l'intensité de fluorescence du CD3. _____	122
<b>Figure 47</b> : Relation entre le FSC et la taille des particules de polystyrène. _____	124
<b>Figure 48</b> : La simulation numérique de la cinétique d'activation des lymphocytes T pour différentes densités initiales de CD3/TCR (20 000-50 000 CD3/TCR complexes par cellule) et différentes taille de cellules (rayon de 5 à 6 $\mu\text{m}$ ). _____	126
<b>Figure 49</b> : Les cellules mononuclées du sang périphérique frais de 13 donneurs sains ont été activées pendant 30h avec des billes anti-CD3/CD28. _____	128
<b>Figure 50</b> : Gamme étalon du peptide HA _____	135
<b>Figure 51</b> : Dosage par HPLC de la cinétique d'absorption du peptide HA restant dans le milieu après contact avec les cellules dendritiques en échelle log. _____	136
<b>Figure 52</b> : Courbe représentant la capacité d'absorption des cellules dendritiques. _____	137
<b>Figure 53</b> : Courbe représentant la capacité d'absorption des cellules dendritiques en fonction de la concentration du peptide HA en échelle log. _____	139
<b>Figure 54</b> : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression du CD69 en médiane de fluorescence, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ ). _____	144
<b>Figure 55</b> : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression du CD25 en médiane de fluorescence, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ ). _____	145

<b>Figure 56 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du récepteur CD69 sur des lymphocytes T CD8+ en médiane de fluorescence pour huit concentrations de peptide (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 µg/ml).	146
<b>Figure 57 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du récepteur CD25 sur des lymphocytes T CD8+ en médiane de fluorescence pour huit concentrations de peptides du virus d'influenza (HA 512-520) (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 µg/ml).	146
<b>Figure 58 :</b> Mesure par analyse en cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression de récepteur CD3 en médiane de fluorescence sur des lymphocytes T CD8+ pour 3 concentrations de peptide.	147
<b>Figure 59 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD3 sur des lymphocytes T CD3/CD8-.	148
<b>Figure 60 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD3 sur des lymphocytes T CD3/CD8.	148
<b>Figure 61 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD8 sur des lymphocytes T issues de CL4 pour trois concentrations de peptide du virus d'influenza (HA 512-520) (2.5, 5, 10µg/ml).	149
<b>Figure 62 :</b> Schéma représentatif de la distribution bimodale de l'expression de CD3	150
<b>Figure 63 :</b> Mesure par analyse en cytométrie en flux de l'activation spécifique des lymphocytes T CD3.	150
<b>Figure 64:</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD3 (sur pic 2) en pourcentage pour trois concentrations.	151
<b>Figure 65 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du récepteur CD3 (sur pic 2) en pourcentage pour huit concentrations.	152
<b>Figure 66 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression du CD69 en % de cellules, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml).	153
<b>Figure 67 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du % de cellules exprimant le CD25, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml)	154
<b>Figure 68 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de pourcentage de cellules exprimant les 2 récepteurs CD69 etCD25, suite à l'activation des lymphocytes CD3/CD8 avec le peptide HA 512-520.	155
<b>Figure 69 :</b> Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du pourcentage de cellules exprimant les 2 récepteurs CD69 etCD25, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml).	155
<b>Figure 70 :</b> Dosage de la sécrétion de l'interleukine-2 en pg/ml par les lymphocytes T suite à la stimulation avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml).	156
<b>Figure 71 :</b> Nombre de complexes pCMH sur le lymphocyte B en fonction de la concentration de peptide (nM).	162
<b>Figure 72 :</b> Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet de l'évolution au cours du temps de $[CD3]/[CD3]_{t=0}$ .	165
<b>Figure 73 :</b> Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet après correction. $S_1=2,9.10^{-5}s^{-1}$ , et $k_{i1}=0,00015 s^{-1}$ .	166
<b>Figure 74 :</b> Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet après correction. $S_1=2,4.10^{-5}s^{-1}$ et $k_{i1}=0,00015 s^{-1}$ .	167
<b>Figure 75 :</b> Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet après correction. $S_1=1,8.10^{-5}s^{-1}$ et de $k_{i1}=0,00015 s^{-1}$ .	168

<b>Figure 76</b> : Dosage de la sécrétion de l'interleukine-2 en mol/m <sup>3</sup> par les lymphocytes T suite à la stimulation avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml).	169
<b>Figure 77</b> : Comparaison des résultats simulés avec les données expérimentales.	170
<b>Figure 78</b> : Schéma représentatif du volume extérieur d'IL2 d'un lymphocyte T.	171
<b>Figure 79</b> : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 pour la concentration de 10µg/ml avec les courbes simulées du modèle après correction de V <sub>ext</sub> .	172
<b>Figure 80</b> : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 pour la concentration de 5µg/ml avec les courbes simulées du modèle après correction de V <sub>ext</sub> .	172
<b>Figure 81</b> : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 pour la concentration de 2,5µg/ml avec les courbes simulées du modèle après correction de V <sub>ext</sub> .	173
<b>Figure 82</b> : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 avec les courbes simulées du modèle après correction de K <sub>e2</sub> = 3,4.10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> et K <sub>e4</sub> = 8,2.10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> .	174
<b>Figure 83</b> : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 avec les courbes simulées du modèle après correction de K <sub>e2</sub> = 3,8.10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> et K <sub>e4</sub> = 7,6.10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> .	175
<b>Figure 84</b> : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 avec les courbes simulées du modèle après correction de K <sub>e2</sub> =3,8.10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> et K <sub>e4</sub> = 5,9.10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> .	176
<b>Figure 85</b> : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression des récepteurs CD69 et CD25 en médiane de fluorescence pour une concentration de 10µg/ml de peptide HA <sub>512-520</sub> .	177
<b>Figure 86</b> : Courbes simulées de concentrations totales de CD69 et IL2R <sub>M</sub> (CD25) pour la concentration de 10µg/ml (1106 pCMH).	177
<b>Figure 87</b> : Schéma simplifié de la prolifération lymphocytaire T (T) suite à la rencontre avec un ligand (L).	184
<b>Figure 88</b> : Nombre total de cellules concernées en fonction du temps.	186
<b>Figure 89</b> : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD3 entre 0 et 4 heures.	187
<b>Figure 90</b> : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD3 entre 4 et 48 heures.	188
<b>Figure 91</b> : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD69 entre 0 et 4 heures.	188
<b>Figure 92</b> : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD69 entre 4 et 48 heures.	189
<b>Figure 93</b> : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD25 entre 0 et 4 heures.	189
<b>Figure 94</b> : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD25 entre 4 et 48 heures.	190
<b>Figure 95</b> : Schéma détaillé de la prolifération lymphocytaire T	191
<b>Figure 96</b> : Evolution de la densité de population relative à CD3.	192
<b>Figure 97</b> : Evolution de la densité de population relative à CD69.	192
<b>Figure 98</b> : Evolution de la densité de population relative à CD25.	193

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Différentes familles de molécules co-stimulatrices identifiées. _____	62
<b>Tableau 2 :</b> Définition des variables utilisés dans notre modèle. Ce qu'elles représentent, où se localisent-elles, et qu'elles sont leurs unités. _____	74
<b>Tableau 3 :</b> Paramètres cinétiques du modèle d'activation du lymphocyte T. _____	76
<b>Tableau 4 :</b> variantes du modèle d'activation du lymphocyte T _____	78
<b>Tableau 5 :</b> Différents anticorps utilisés pour le marquage des cellules chez la souris. _____	99
<b>Tableau 6 :</b> Différents anticorps utilisés pour le marquage des cellules chez l'homme. _____	100
<b>Tableau 7 :</b> Evaluation de la cinétique d'absorption du peptide HA par les DC. _____	137
<b>Tableau 8 :</b> Evaluation de la capacité d'absorption du peptide HA par les cellules dendritiques en faisant varier leur nombre. _____	138
<b>Tableau 9 :</b> Evaluation de la capacité d'absorption du peptide HA par les CD en faisant varier sa concentration. _____	138
<b>Tableau 10 :</b> Valeurs numériques des paramètres du modèle de C.Bidot _____	161
<b>Tableau 11 :</b> Calculs issus de la régression linéaire effectuée sur les données de Valitutti et coll. 1999. _____	163



# Introduction

Le terme immunité (du latin *immunis* : protégé de...) veut dire au premier abord les mécanismes que notre corps développe à l'encontre des microorganismes.

La notion de système quant à elle désigne un ensemble d'éléments qui vont interagir de façon hiérarchisées et intégrées afin d'assurer une fonction complexe. La plupart des organismes vivants possèdent un système de défense contre les agressions extérieures. Les plus sophistiqués sont chez les mammifères mais on peut les trouver également chez les animaux inférieurs voir, les plantes.

Le système immunitaire d'un organisme est un ensemble coordonné d'éléments qui permet de discriminer le « soi » du « non-soi » potentiellement dangereux. Mais le système immunitaire doit aussi pouvoir distinguer selon la « dangerosité » de la cible. En effet, certains microorganismes sont favorables à l'organisme (saprophytes), notamment dans les voies digestives, alors que des éléments du soi peuvent être dangereux parce qu'ils sont infectés (virus, bactéries intra-cytoplasmiques) ou dégénérés (cancer). Pour cela un ensemble de mécanismes cellulaires et moléculaires doit préserver l'intégrité de l'organisme. Ainsi, une infection virale ou bactérienne, l'apparition et le développement d'une tumeur ou une greffe allogénique d'un organe ou d'un tissu induisent une activation du système immunitaire qui le plus souvent se résout par le rejet ou la destruction de la cible.

L'immunité cellulaire a deux composantes fonctionnelles : l'immunité innée et adaptative. Pour la première il s'agit d'une réaction rapide, sans mémoire, non spécifique de l'antigène. La réaction adaptative, est spécifique des antigènes, et consiste en la sélection de clones de lymphocytes, capables de cibler ce qui est perçu comme une menace. Cette réponse adaptative est lente, strictement dépendante des antigènes, et possède une mémoire immunitaire.

L'immunité cellulaire adaptative met en jeu les lymphocytes T et B. Les différents types de réactions immunitaires sont: les réactions de type humorale ou cellulaire. L'immunité humorale implique des facteurs solubles tels que les anticorps produits par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes.

Les lymphocytes B reconnaissent l'antigène sous sa forme native par leur récepteur BCR (B cell receptor) alors que le TCR (T cell receptor) des lymphocytes T reconnaît seulement les fragments antigéniques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) disposés à la

surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). De nombreuses molécules interviennent dans cette coopération cellulaire, sous le mode de liaisons ligand-récepteur, plus ou moins sélectives et avec des effets activateurs ou régulateurs.

Il existe deux types de lymphocytes T : les lymphocytes  $T\alpha\beta$  très fortement majoritaires et les lymphocytes  $T\gamma\delta$  (5% du total des lymphocytes T dans le sang périphérique). Ces derniers présentent un tropisme particulier pour les épithéliums (intestinal, respiratoire, uro-génital, peau) et semblent jouer un rôle important dans les réponses antibactériennes et antiparasitaires mais également dans les réponses antitumorales.

La réponse lymphocytaire T, spécifique, est complexe, car elle fait intervenir plusieurs acteurs et dépend de plusieurs paramètres externes et internes difficile à appréhender, surtout du point de vue dynamique et à analyser dans les situations médicales pathologiques ou d'immuno-intervention (vaccins, désordres immunitaires...). Les connaissances sur ces mécanismes seront détaillées plus loin.

La nature des cibles potentielles est extrêmement diversifiée et de nouvelles cibles apparaissent dans le temps (par évolution naturelle souvent liée à des mutations, ou par manipulations biochimiques ou génétiques artificielles...). Le système immunitaire doit faire face à cette multiplicité et doit pouvoir s'adapter à la variabilité (plasticité). Le niveau de réponse doit être adapté à la gravité de l'agression et à la dynamique même de l'agent pathogène. Une réponse insuffisante laisse le pathogène gagner du terrain. Inversement, une réponse excessive peut entraîner des dégâts tissulaires pouvant être dangereux en soi. Des effets incontrôlés sont la source ou un mécanisme aggravant de nombreuses maladies; Ces données dynamiques doivent donc être absolument maîtrisées dans les interventions médicales sur le système immunitaire (immunothérapie) soit préventives (vaccins, sérothérapies) soit curatives (immuno modulation, vaccins thérapeutiques).

Les techniques d'analyse biologique ne permettent pas à l'heure actuelle de cerner la complexité des processus régissant la réponse immunitaire adaptative.

La réponse immunitaire individuelle (un clone pour un motif antigénique) dépend de liaisons ligand-récepteur multiples dont la dynamique peut être quantifiée. La réponse globale du système<sup>1</sup> est le résultat des réponses individuelles avec des contraintes de compétition et de limitation de la taille de la population totale. Il est impossible d'imaginer une interaction aussi complexe de tous ses facteurs intriqués en utilisant les outils informatiques actuels qui permettent de calculer simultanément les

---

<sup>1</sup> Plusieurs clones activés par quelques motifs antigéniques au sein d'une population d'autres clones non concernés par cette sollicitation

vitesse de réactions multiples et de reproduire la réaction globale. Un support mathématique permettrait de reproduire la réaction selon les données de départ et de simuler différentes situations. La modélisation et la simulation numériques permettraient de tester des hypothèses, de dessiner de nouvelles conditions expérimentales et in fine d'optimiser des protocoles thérapeutiques. Un modèle mathématique mimant la réponse adaptative T a été proposé par C Bidot dans une thèse précédente (Bidot *et al.* , 2008). Le modèle utilise des paramètres publiés et les confrontations avec des données expérimentales validées dans la littérature montrent qu'il est réaliste. Cependant, il reste encore imprécis car certains paramètres ne sont pas déterminés.

Dans le travail présent, nous avons cherché à déterminer certains paramètres manquants à partir de modèles expérimentaux. Nous avons aussi cherché à mesurer le comportement des lymphocytes T pour des stimulations spécifiques (peptide). Nous nous sommes limités aux lymphocytes T $\alpha\beta$ .

L'objectif de cette thèse était donc de mettre au point un modèle in-vitro qui permettrait de tester la dynamique précoce des mécanismes de l'activation des lymphocytes T, et la confronter aux données numériques pour ajuster le modèle numérique développé dans la thèse de Caroline BIDOT. Pour maîtriser au mieux les conditions expérimentales, nous avons proposé un modèle d'activation in vitro. Afin d'obtenir des lymphocytes T spécifiques d'un peptide caractérisé, en quantité suffisante et de pouvoir les stimuler avec des cellules dendritiques congéniques, nous nous sommes résolus à utiliser un modèle murin, transgénique pour un récepteur T contre un peptide viral.



**Première partie :**  
**Etude bibliographique**

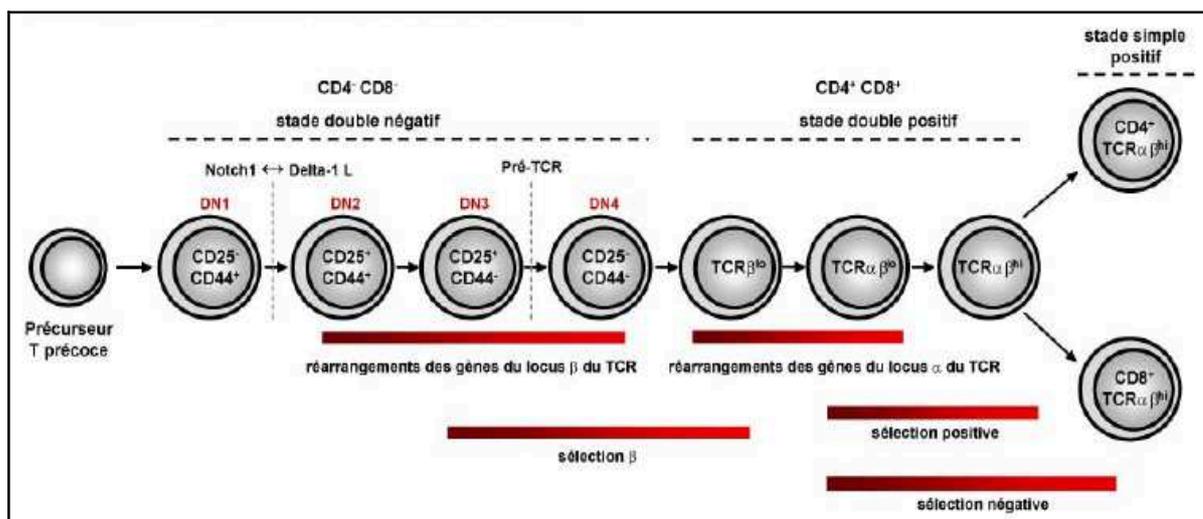


# I. Les lymphocytes T

## 1. Origine et développement

Les lymphocytes T dérivent d'une cellule souche pluripotente<sup>2</sup> provenant de la moelle osseuse. Les progéniteurs hématopoïétiques migrent vers le thymus (organe lymphoïde primaire), où ils subissent une intense prolifération, permettant ainsi la constitution d'un grand nombre de thymocytes immatures. Le développement des thymocytes est caractérisé par l'expression ordonnée de plusieurs molécules de surface, incluant les TCR et les co-récepteurs CD4 et CD8.

La maturation des thymocytes peut être divisée en trois grandes étapes : La première étape de cette maturation est caractérisée par la présence de cellules doubles négatives (DN) CD4-CD8-. Suite à ceci, la deuxième étape est symbolisée par le développement de cellules doubles positives (DP) CD4+CD8+ et enfin, la dernière étape constitue la formation de cellules matures simples positives (SP) avec exclusion mutuelle : CD4+CD8- ou CD8+CD4- (Figure 1). Toutes ces étapes sont sous la direction d'une molécule prédominante : le TCR (T cell receptor). En effet, le récepteur des cellules T est le facteur qui va permettre de sélectionner les thymocytes suivant leur spécificité.



**Figure 1: Etapes du développement des thymocytes.** Le processus de maturation intra-thymique des précurseurs T a pour objectif la génération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> matures. Adapté de (Sebzda *et al.*, 1999).

<sup>2</sup> Qui donne naissance à toutes les cellules sanguines

Le TCR est constitué de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans un premier temps, à l'étape double négative (DN), les thymocytes immatures (constituant approximativement 1-5% des thymocytes totaux) réarrangent le locus codant la chaîne  $\beta$  du TCR, emmenant ainsi à l'expression de cette même chaîne  $\beta$  qui en association avec un substitut de la chaîne  $\alpha$  ( $pT\alpha$ ) à la surface des thymocytes formera le complexe pré-TCR. Ce dernier entraînera la prolifération et l'expansion de ces thymocytes; un processus nommé la sélection  $\beta$  ((Saint-Ruf *et al.* , 1994, von Boehmer & Fehling. , 1997, von Boehmer & Fehling. , 1997).

Les signaux transmis par le complexe pré-TCR non seulement induisent l'expansion, mais aussi le réarrangement du gène de la seconde chaîne (alpha) du TCR $\alpha$ , et de manière parallèle l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Les thymocytes, à l'étape double positif CD4+CD8+, représentent 80-90% des thymocytes totaux. Après avoir acquis l'expression d'un TCR $\alpha\beta$  mature, les thymocytes CD4+CD8+ seront sélectionnés pour leur capacité à reconnaître des antigènes présentés par les molécules du CMH du soi. Ainsi, cette étape du développement est appelée *la sélection positive* et a lieu dans une région périphérique du thymus, le cortex. Les thymocytes entrent donc en interaction avec des cellules stromales thymiques telles que les cellules épithéliales corticales (cTec) qui leur serviront de cellules présentatrices avec des leurres de peptides provenant du patrimoine génétique de la cellule épithéliale (Benoist & Mathis. , 1989, Marrack & Kappler. , 1997). Ces interactions au niveau du thymus ont d'ailleurs été illustrées par des études in vitro en microscopie biphotonique (Bousso *et al.* , 2002).

Par la suite, les thymocytes sélectionnés positivement sont soumis à une nouvelle sélection qui dépendra de leur faculté à reconnaître trop fortement des antigènes du soi, synonyme de danger potentiel pour l'organisme. En effet, les thymocytes possédant un TCR auto-réactif sont éliminés, c'est *la sélection négative*. Les thymocytes migrent alors après la sélection positive vers un autre territoire thymique plus central, qui est le siège de cette sélection, la medulla. Afin d'étayer ceci, Bravo et Coll ont montré que des souris déficientes pour RelB, présentaient une atrophie de la medulla, et un défaut de la sélection négative qui s'accompagnait d'une auto-immunité en périphérie (Weih *et al.* , 1995).

Deux types cellulaires interviennent dans la sélection négative des lymphocytes T : les cellules épithéliales médullaires (mTec) et des CPA de la medulla (majoritairement des cellules dendritiques, DC). Les mTec présentent des antigènes issus de la synthèse de protéines du soi

normalement synthétisées en périphérie. Cette expression ectopique est sous la dépendance de la protéine AIRE<sup>3</sup> (autoimmune regulator) (Anderson *et al.* , 2002, Villasenor *et al.* , 2005).

Les thymocytes reconnaissant les antigènes présentés par les mTéc sont rendus fonctionnellement inactifs (anergiques). Parallèlement à ceci, les thymocytes reconnaissant les antigènes à la surface des CPA sont, quant à eux, délétés (Page *et al.* , 1996). La délétion clonale et l'anergie des thymocytes font partie de ce qui est appelé la tolérance centrale. Malgré ces étapes de sélection, certains lymphocytes auto-réactifs parviennent à être exportés hors du thymus. Ils sont alors contrôlés par les mécanismes d'activation périphérique. Ils peuvent encore subir un mécanisme de tolérance dite périphérique, impliquant notamment les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+.

Deux types de lymphocytes T dits « naïfs » sortent du thymus : les lymphocytes T CD4+ restreints aux antigènes présentés exclusivement par le CMH II (Berg *et al.* , 1989, Kaye *et al.* , 1989) et le lignage des lymphocytes T CD8+ restreints aux antigènes présentés exclusivement dans le contexte du CMH I (Sha *et al.* , 1988, Teh *et al.* , 1988).

## 2. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité codent pour des molécules qui s'expriment à la surface des cellules. Cette molécule est faite de deux paires de domaines. Une paire est analogue aux domaines des immunoglobulines. L'autre paire forme le site actif qui ressemble à un groove<sup>4</sup> servant à fixer le peptide (Garboczi *et al.* , 1996, Garcia *et al.* , 1996b). Ces molécules appartiennent au système HLA (« Human Leukocyte Antigen ») chez l'humain, qui est le système impliqué dans le rejet des greffes inter-individus non identiques génétiquement (allogéniques). Les gènes HLA se retrouvent sur le chromosome 6, tandis que chez la souris, les gènes codant pour les CMH sont appelés H-2 et se retrouvent sur le chromosome 17 (Figure 2) (Benjamini, E. 1996; ). On distingue trois classes de gènes qui s'assemblent pour former des molécules différentes : CMH de classe I, II et III. Parmi les gènes des CMH de classe I, on retrouve les HLA-A, B et C chez l'humain et H-2K, D et L chez la souris, tandis que les gènes des CMH de classe II, on retrouve les HLA-DP, DQ et DR chez l'humain et I-A et I-E chez la souris (Schreuder, G.M. 1999; ). La plupart de ces gènes sont très polymorphiques et chaque

---

<sup>3</sup> Le déficit en AIRE peut causer des maladies auto-immunes rares tel que le syndrome APECED ou polyendocrinopathie de type 1 (Autoimmune polyendocrinopathy with candidiasis and ectodermal dystrophy).

<sup>4</sup> Sillon

allèle s'exprime en co-dominance, ce qui permet la disparité entre individus d'une même espèce. Les gènes des CMH de classe III codent pour des facteurs impliqués dans le système du complément et d'autres systèmes n'ayant aucune fonction immunitaire.

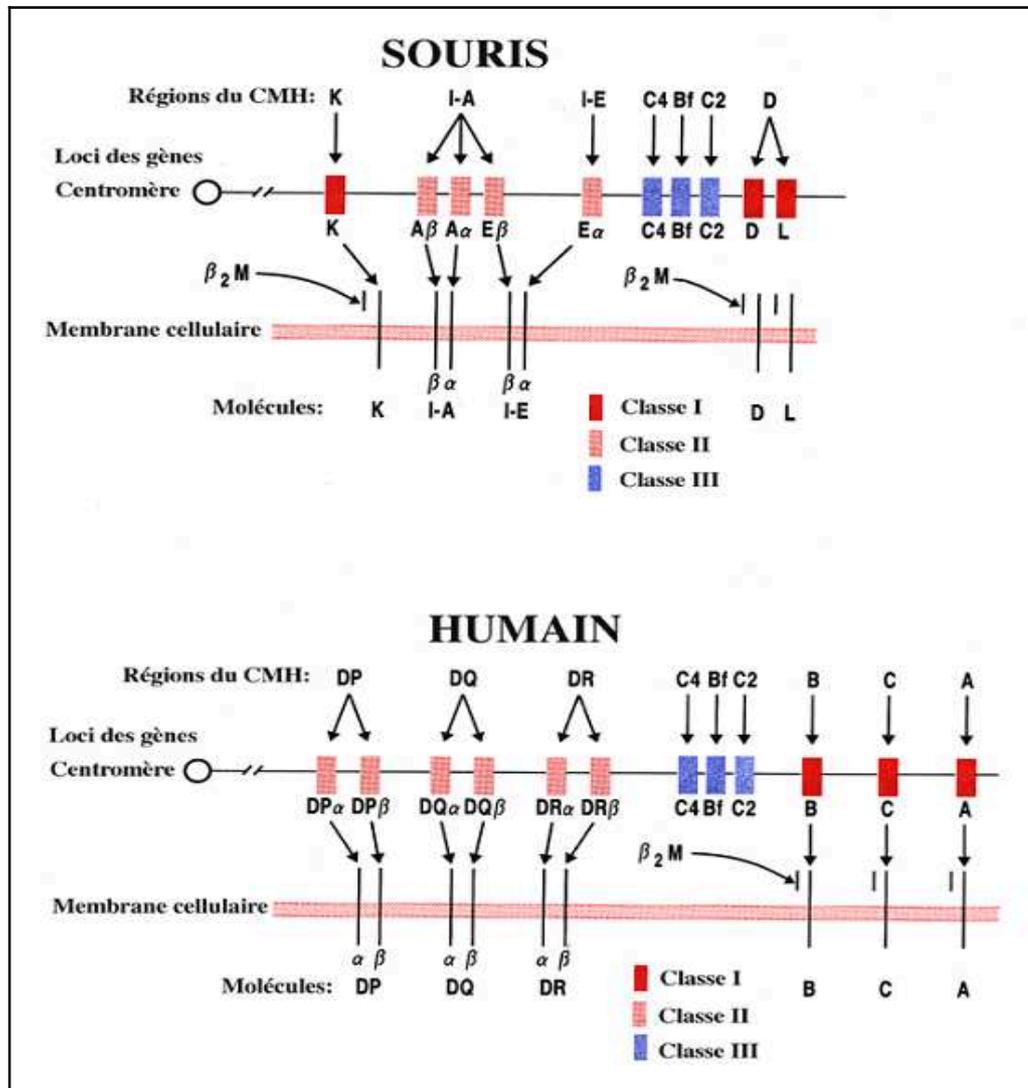
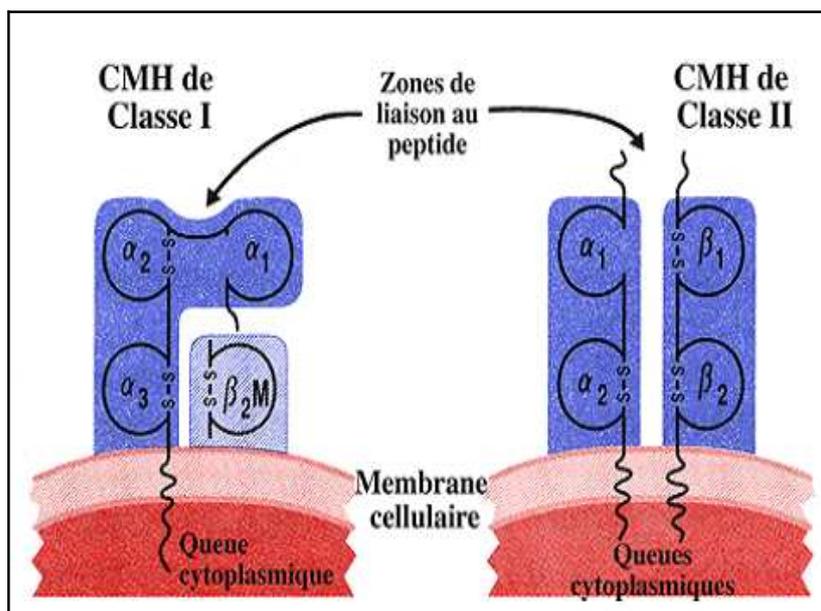


Figure 2 : Les complexes majeurs d'histocompatibilité murin et humain. D'après (Benjamini, 1996).

Les molécules des CMH de classe I sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires composées d'une chaîne  $\alpha$  de 44 kDa et d'une chaîne légère appelée  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2M$ , non codée par le locus CMH) de 12 kDa (Kubo & Grey, 1976). La partie extracellulaire de la chaîne  $\alpha$  est divisée en trois domaines globulaires :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ . Les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  servent à la liaison d'un antigène et sont des régions variables, tandis que le domaine  $\alpha_3$  est essentiellement conservé (Figure 3). La variabilité des domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  permet la liaison d'un grand nombre de peptides aux molécules de CMH.



**Figure 3 : La structure des CMH de classe I et de classe II. D'après (Benjamini. , 1996).**

Les CMH de classe I sont exprimés sur toutes les cellules somatiques nucléées. Les peptides, présentés par les CMH de classe I, sont endogènes et ils sont généralement synthétisés à l'intérieur de la cellule (comme les antigènes viraux). Ces antigènes sont découpés en peptides par le protéasome dans le cytosol. La longueur des peptides capables de se lier à la niche peptidique du CMH de classe I varie de 8 à 12 acides aminés (Engelhard. , 1994). Le polymorphisme de la niche peptidique des différents allèles génère une variation chimique permettant ainsi différentes affinités à différents peptides. D'autres résidus polymorphiques de la molécule de CMH classe I forment des contacts avec les récepteurs des cellules T (TCR). Ainsi, les TCR interagissent spécifiquement avec les CMH et le peptide qu'ils présentent.

Les CMH de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires de 55-60 KDa (Benjamini. , 1996), composés de deux chaînes polypeptidiques associées de façon non-covalente ( $\alpha$  et  $\beta$ ) (Figure 3). Ces deux chaînes sont codées aux locus des CMH de classe II. Comme les molécules de classe I, les CMH de classe II possèdent un polymorphisme élevé et chaque allèle est exprimé en co-dominance. Cette expression co-dominante permet l'association des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des deux allèles, générant ainsi plusieurs ( $n = 2$ ) molécules différentes pouvant être exprimées à la surface d'une même cellule. La distribution des molécules de classe II est plus limitée que celle de classe I. Les molécules de classe II s'expriment de manière constitutive seulement sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) comme les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les cellules de l'épithélium thymique. Plusieurs autres types cellulaires, dont les

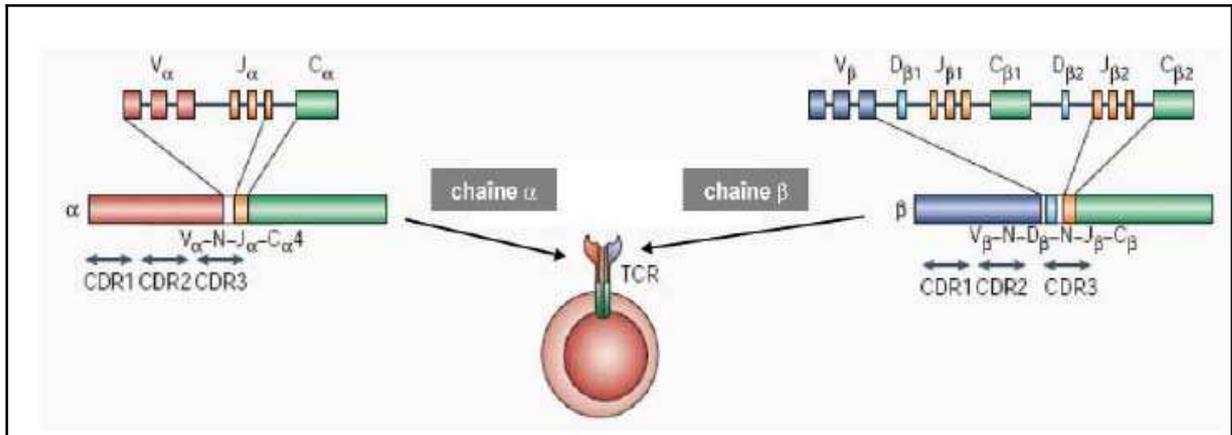
macrophages et les myoblastes, expriment le CMH de classe II sous induction par des facteurs comme l'interféron- $\gamma$ . La liaison d'un CMH de classe II est restreinte à un TCR exprimé sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La fonction phagocytaire des CPA, exprimant les CMH de classe II, permet la présentation de peptides exogènes de 10 à 20 acides aminés par ces molécules (Rudensky *et al.*, 1992). Les particules phagocytées par les CPA se retrouvent dans les endosomes pour être clivées par des protéases. Les endosomes fusionnent avec les vésicules de l'appareil de Golgi contenant les CMH de classe II (Abbas *et al.*, 1991).

Le polymorphisme élevé des molécules du CMH de classe I et II contribue grandement au rejet des greffes entre individus. C'est pour cette raison que la caractérisation de ces molécules, préalablement à une greffe, est essentielle pour déterminer les donneurs les plus compatibles avec un individu receveur donné afin de diminuer l'intensité du rejet.

### 3. Structure et fonction du TCR

Le TCR est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques glycosylées ( $\alpha$  et  $\beta$ ), qui sont liées l'une à l'autre de façon covalente par des ponts disulfures (Garcia *et al.*, 1996b, Schumacher, 2002) (Figure 5). Chaque chaîne est composée d'un domaine variable (V) aminoterminal et d'un domaine constant (C) carboxyterminal. Concrètement et sur la base du modèle de réarrangement des gènes des Ig, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR sont générées par la recombinaison de segments dits *variable* (V), *diversity* (D) et *joining* (J) ajoutés à un segment de la région *constante* (C) pour le locus  $\beta$  et une association des segments V-J-C seulement pour le locus  $\alpha$  (Nikolich-Zugich *et al.*, 2004) (Figure 4). L'association de la partie variable des deux chaînes du TCR est le siège de reconnaissance du complexe CMH/peptide. Ces sites de liaison antigénique ont été prédits comme analogues aux CDR (complementarity-determining regions) des immunoglobulines (Chothia *et al.*, 1988).

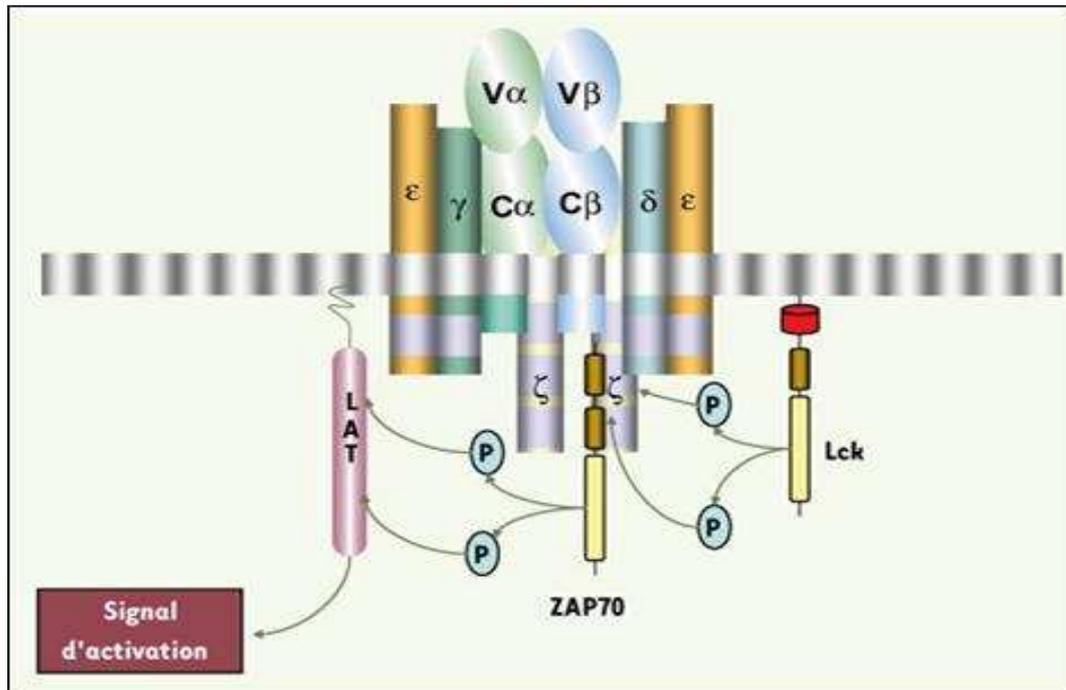
Les CDR1 et 2 se lient préférentiellement au CMH alors que le CDR3 se lierait préférentiellement au peptide antigénique (Jorgensen *et al.*, 1992, Sant'Angelo *et al.*, 1996). L'intensité de cette liaison dépend de son niveau d'avidité. En effet, au niveau des lymphocytes T, l'avidité joue un rôle essentiel dans l'efficacité de leur réponse. Les LT CD8<sup>+</sup> d'un même clone (ayant le même TCR) peuvent répondre différemment selon l'avidité à un antigène. Ainsi, une cellule de haute avidité peut être activée par de faibles concentrations de peptide alors que celle de faible avidité nécessite un plus grand nombre de complexe pCMH pour pouvoir devenir efficace (Santamaria, 2003a, Santamaria, 2003b).



**Figure 4: Diversité structurale du TCR.** La chaîne  $\beta$  est composée à partir d'une recombinaison des segments V (variable), D (diversity), J (joining) et C (constant), alors que la chaîne  $\alpha$  est composée des segments V-J-C. La diversité recombinatoire est de plus amplifiée par l'addition ou la délétion de nucléotides (N) aux jonctions entre les segments. D'après (Nikolich-Zugich *et al.*, 2004).

#### 4. Le complexe TCR/CD3

Des expériences utilisant des anticorps dirigés contre le récepteur ont permis l'identification de quatre polypeptides distincts qui étaient associés de façon non covalente avec l'hétérodimère du TCR : les chaînes CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  et CD3 $\epsilon$  et l'homodimère de la chaîne  $\zeta$  (Clevers *et al.*, 1988, Samelson *et al.*, 1985). Les chaînes CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  et CD3 $\epsilon$  sont constituées d'un domaine extracellulaire aminoterminal de type Ig, d'un domaine transmembranaire chargé négativement qui permet aux chaînes CD3 d'interagir avec le TCR et enfin d'un domaine intracytoplasmique carboxyterminal. La chaîne CD3 $\zeta$  quant à elle possède un très court domaine extracellulaire mais un long domaine intracytoplasmique. Il faut noter que le TCR ne possède qu'un court domaine cytoplasmique dépourvu de toute activité enzymatique intrinsèque. La fonction de signalisation sera donc assurée par le complexe CD3. En effet, les domaines intracytoplasmiques contiennent des séquences renfermant des motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs : YxxL(X)<sub>6</sub>-8YxxL). Après avoir été phosphorylés, ces ITAMs servent de points d'ancrage pour des protéines importantes de la signalisation (Samelson *et al.*, 1985).



**Figure 5: Le complexe TCR/CD3.** Le récepteur T de l'antigène est constitué d'un hétérodimère ( $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$ ) associé à 4 protéines transmembranaires : CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  et CD3 $\zeta$ . Les chaînes CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  et CD3 $\zeta$  forment des modules dimériques  $\delta\epsilon$ ,  $\gamma\epsilon$  et  $\zeta\zeta$ . Chaque chaîne  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$  présente dans sa partie intracytoplasmique des motifs ITAM (en violet) qui sont phosphorylés sur les résidus tyrosine par la tyrosine kinase Lck. La phosphorylation des ITAM de  $\zeta$  permet l'association de ZAP70 à cette chaîne par l'intermédiaire des 2 domaines SH2 (en marron) portés par cette kinase et secondairement sa phosphorylation par Lck. ZAP70 ainsi activée phosphoryle à son tour l'adaptateur. D'après (Call & Wucherpfennig, 2005).

La stœchiométrie du complexe TCR/CD3, la séquence de son assemblage aussi bien que la nature des interactions entre les sous unités ont longtemps été énigmatiques. Il semble que le complexe TCR/CD3 soit constitué d'hétérodimères TCR $\alpha\beta$ , CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\epsilon\delta$  et de l'homodimère CD3 $\zeta\zeta$  chez l'homme ainsi que chez la souris (figure 5) (Call *et al.*, 2002, Call & Wucherpfennig, 2005).

La formation du complexe se réalise dans le réticulum endoplasmique selon des mécanismes rigoureusement contrôlés. La chaîne  $\alpha$  du TCR tout d'abord s'associe avec l'hétérodimère CD3 $\epsilon\delta$ , tandis que la chaîne  $\beta$  s'associe avec le CD3 $\epsilon\gamma$ . Les deux trimères ainsi formés s'associent via un pont disulfure entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  pour former l'hexamère TCR $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon\gamma$ CD3 $\epsilon\delta$ . Après association avec l'homodimère  $\zeta\zeta$ , le complexe TCR/CD3 fonctionnel est exporté à la surface de la cellule (Alarcon *et al.*, 1988, Huppa & Ploegh, 1997). Non seulement le complexe CD3 est nécessaire pour la signalisation en aval du TCR mais il permet aussi l'expression stable du TCR en surface.

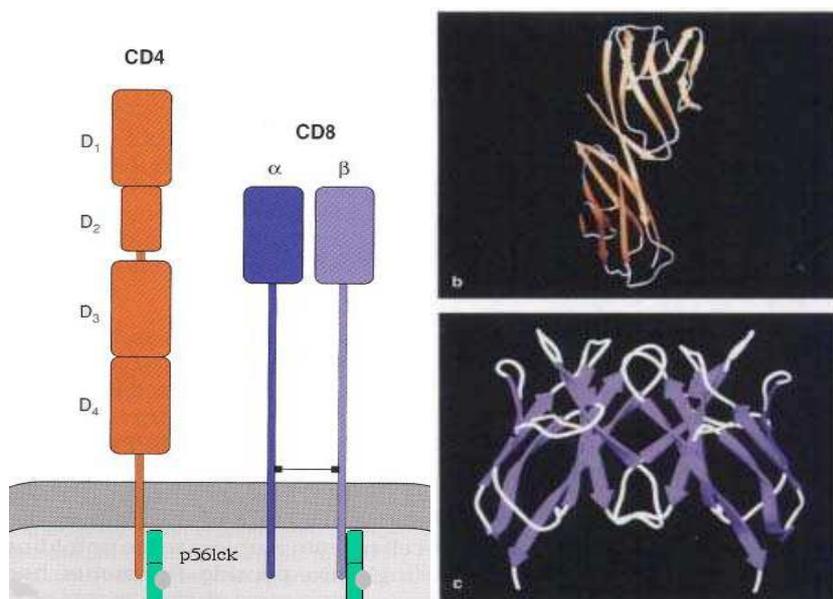
## **II. Les sous populations des lymphocytes T effectrices et leurs fonctions**

Suite à leur maturité dans le thymus, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> naïfs (figure 7) migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, amygdales...) où ils rencontrent des cellules dendritiques leur présentant des complexes CMH/peptides. Ces interactions si efficaces entraînent l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. ainsi, les cellules T CD4<sup>+</sup> reconnaissant les peptides dans le contexte du CMH II (figure 7) se différencient en lymphocytes T de deux types : les T helpers 1 (th1) et les th2.

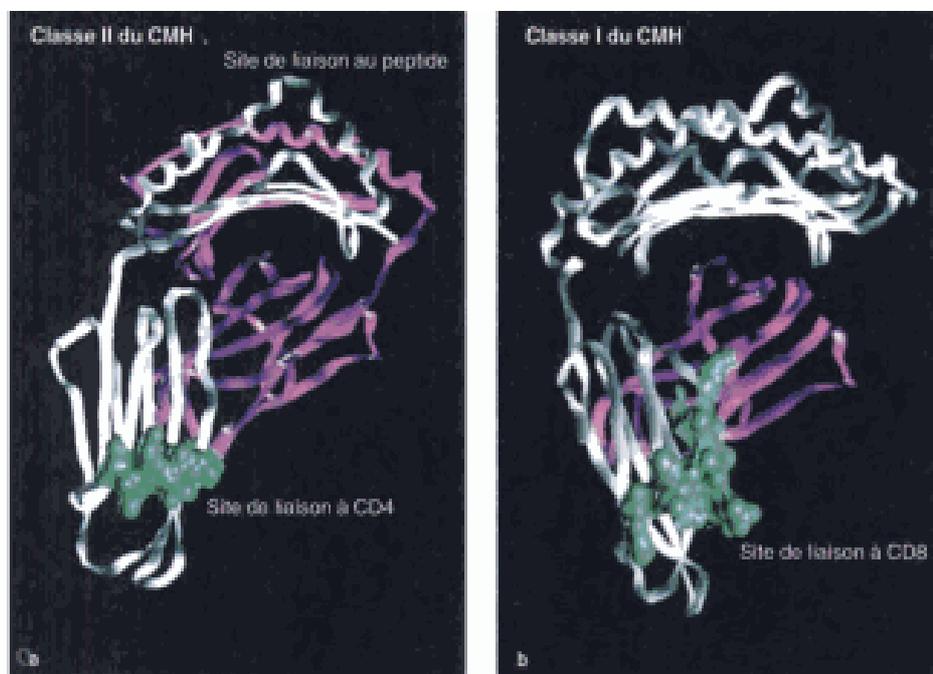
Les lymphocytes Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires, comme l'interleukine-2 (IL2), l'interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) impliquées dans la réponse contre les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries...) en agissant entre autres sur la CPA, et surtout sur les CD8, alors que les lymphocytes Th2 sécrétant de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 sont plutôt impliqués dans la lutte contre les pathogènes extracellulaires (helminthes ...) et la production d'Ig. Ajouté à ceci, les Th2 ont un rôle dans l'activation des éosinophiles par l'intermédiaire de l'IL-5 et 13 mais aussi dans l'inhibition des réponses inflammatoires (IL-4, 10 et 13).

Récemment, il a été découvert un nouveau lignage, les Th17 produisant de l'IL-17 et de l'IL6 (Weaver *et al.*, 2006).

De manière parallèle, les cellules T CD8<sup>+</sup> reconnaissant les antigènes présentés par le CMH I (figure 7) se différencieront en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui auront pour but d'éliminer les cellules infectées par un virus ou les cellules cancéreuses.



**Figure 6 : Les caractéristiques structurales des corécepteurs CD4 et CD8.** La molécule CD4 contient quatre domaines proches des immunoglobulines, comme on le voit dans le schéma du panneau a et dans le diagramme en ruban du panneau b. La molécule CD8 (panneaux a et c) est un hétérodimère dont les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont unies de manière covalente par un pont dissulfure. Il existe une forme alternative de CD8 : un homodimère comprenant deux chaînes  $\alpha$ . L'hétérodimère est représenté dans le panneau a, tandis que le diagramme en ruban dans le panneau c représente l'homodimère



**Figure 7 : les sites d'interaction de CD4 et CD8 sur les molécules du CMH de classe II et I.**

## 1. Les lymphocytes T CD4+

CD4 est une molécule formée par une simple chaîne composée de quatre domaines semblables à ceux des immunoglobulines (Marrack & Kappler. , 1975) (Figure 6). Les deux premiers domaines (D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>) de la molécule CD4 sont étroitement empaquetés ensemble pour former un bâton rigide de 60 Å de long, qui est relié par une charnière flexible à un bâton similaire formé par les troisième et quatrième domaines (D<sub>3</sub> et D<sub>4</sub>).

CD4 se fixe aux molécules du CMHII (0.1µM (Bajenoff *et al.* , 2006)) par une région localisée principalement sur la face latérale du premier domaine, D. Puisque CD4 se lie à un site dans le domaine β2 de la molécule du CMH de classe II qui est éloigné du site où le récepteur des cellules T se lie (Figure 7), la molécule CD4 et le récepteur des cellules T peuvent lier le même complexe peptide : CMH de classe II.

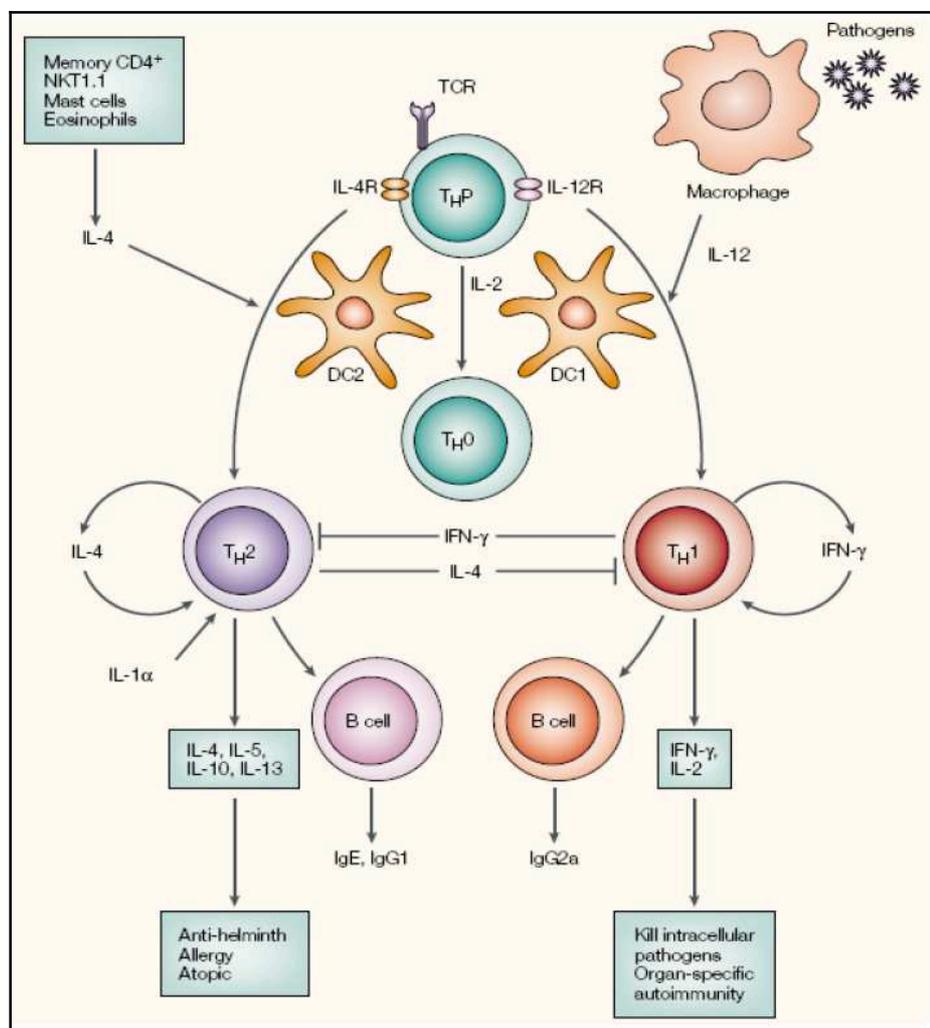
CD4 interagit fortement avec une tyrosine kinase cytoplasmique appelée Lck, qui peut rapprocher des éléments qui transmettent les signaux venant du récepteur des cellules T. Lors du contact des TCR avec le complexe CMHII/peptide le signal généré est fortement amplifié. La sensibilité de la cellule T à l'antigène présenté par les molécules du CMH de classe II est remarquablement augmentée, la cellule T pouvant alors s'activer avec 100 fois moins d'antigène (Demotz *et al.* , 1990).

Il a été formellement montré en 1986 que les cellules CD4+ pouvaient être divisées en deux groupes, désignés Th1 et Th2 sur la base de leur profil de production de cytokines (Mosmann *et al.* , 1986). Cette conclusion a ensuite été étendue à l'Homme (Parronchi *et al.* , 1991).

Plusieurs facteurs jouent un rôle prépondérant dans le développement Th1/Th2. Tout d'abord il a été montré dans les années 1990 que l'IL-4 était essentielle pour l'induction de cellules Th2 à partir de précurseurs naïfs (Le Gros *et al.* , 1990). Puis en 1993, Hsieh et coll. montraient que l'IL12 était requise pour l'induction de cellules Th1 (Hsieh *et al.* , 1993). Ces observations établissaient que les cellules Th1 et Th2 possédaient un précurseur commun et que le micro-environnement cytokinique était le facteur déterminant dans le développement du lignage Th (Figure 8).

Cependant, des travaux mettaient en valeur que plusieurs autres facteurs pouvaient influencer le développement sélectif des cellules T Th1 et Th2. Ceux-ci incluaient la dose d'antigène (Constant *et al.* , 1995, Parish. , 1972), l'affinité pour les antigènes, l'haplotype du CMH et les facteurs co-stimulateurs. En accord avec cette dernière idée, une pensée émergente prône qu'il existerait 2 types distincts de cellules dendritiques (DC) : les DC1 et les DC2 induisant respectivement les lymphocytes T Th1 et Th2 (Rissoan *et al.* , 1999). Ainsi, les facteurs

de co-stimulation liés à la membrane, tels que B7-1 (CD80)/B7-2 (CD86) (Kuchroo *et al.*, 1995) et ICOS (inducible T-cell co-stimulator) (Coyle *et al.*, 2000) ont aussi été montrés comme facteurs d'influence du développement Th1/Th2.



**Figure 8 : Représentation schématique de l'induction et de la régulation des lymphocytes Th1 et Th2.** Fonctionnellement, les cellules T Th1 médient la destruction de pathogènes intracellulaires et l'auto-immunité spécifique d'organe via l'activation de cellules cibles par l'IFN $\gamma$ . Les Th2, pour leur part, sont anti-helminthes et peuvent augmenter les réactions allergiques via l'IL-4, 5 et les IgE. D'après (Liew., 2002).

L'IL-12 et l'IL-4 ont pour principale origine la réponse immunitaire. Les macrophages et les DC sont les principaux producteurs d'IL-12 (Macatonia *et al.*, 1995). Il est beaucoup moins bien établi quelles sont les sources initiales de l'IL-4 ainsi que ses mécanismes d'induction. Plusieurs candidats sont toutefois cités : les cellules NKT (natural killer T cells) (Yoshimoto & Paul., 1994), les mastocytes (Plaut *et al.*, 1989), les basophiles (Seder *et al.*, 1991), ainsi que des lymphocytes T CD4+ matures (Schmitz *et al.*, 1994).

Pour conclure, il est important de noter que l'IFN $\gamma$  et l'IL-4 produits respectivement par les lymphocytes T Th1 et Th2 peuvent agir comme facteurs de croissance autocrine pour le groupe d'intérêt mais aussi comme facteurs inhibiteurs pour le groupe opposé (Figure 8).

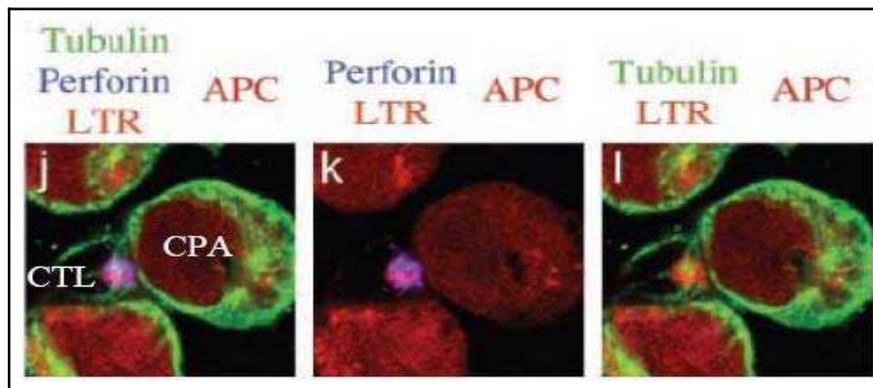
## 2. Les lymphocytes T CD8+ :

La molécule CD8 se lie faiblement 1 à 200 pM à un site invariable dans le domaine  $\alpha_3$  de la molécule du CMH de classe I (Rudolph *et al.*, 2006) (Figure 6), lequel est équivalent au site des molécules du CMH de classe II sur lequel CD4 se fixe. Bien que seule l'interaction de la chaîne CD8 $\alpha$  avec le CMH de classe I soit bien connue, on suppose que le site de liaison du CMH de classe I à l'hétérodimère  $\alpha : \beta$  CD8 est formé de l'interaction des chaînes CD8 $\alpha$  et  $\beta$ . De plus, CD8 interagit avec des résidus situés à la base du domaine  $\alpha_2$  de la molécule du CMH de classe I. Dans ce type de liaison, CD8 laisse la partie supérieure de la molécule du CMH de classe I exposée et libre d'interagir simultanément avec le récepteur des cellules T. Comme pour le CD4, le CD8, par l'extrémité cytoplasmique de la chaîne  $\alpha$ , fixe Lck et le rapproche du récepteur TCR. Comme pour CD4, la présence de CD8 augmente d'environ 100 fois la sensibilité des cellules T à l'antigène. Donc, CD4 et CD8 ont des fonctions similaires et se lient à des sites dont la localisation est équivalente dans les molécules du CMH de classe I et celle de classe II, même si les structures des deux corécepteurs sont faiblement apparentées (Figure 6).

La rencontre des lymphocytes T CD8 naïfs avec une CPA présentant le complexe CMH/peptide agoniste, déclenche une activation suivie d'une différenciation des CD8 à l'aide des lymphocytes Th1 producteurs d'IL2 et autres, ainsi les CD8 deviennent des lymphocytes T cytotoxique (CTL).

Les CTL ont pour but de débarrasser l'organisme de cellules infectées par un virus ou des cellules cancéreuses. Pour cela les CTL utilisent plusieurs mécanismes. Tout d'abord, les cytokines (comme le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  ayant une action cytotoxique) sont sécrétées à proximité des cellules cibles entraînant ainsi leur mort (Yannelli *et al.*, 1986).

Le mécanisme cytotoxique de référence est la voie perforine/granzyme (voie dominante dans les CTL). Suite à la rencontre avec l'antigène, les CTL polarisent leur machinerie lytique vers le site de contact CTL/cellule cible (Yannelli *et al.*, 1986) (Figure 9).



**Figure 9 : Orientation de la machinerie lytique au site de contact CTL-CPA.** La Perforine (bleu) et le LTR (Lyso Tracker red) (rouge), marqueurs des lysosomes sécrétoires sont orientés au site de contact CTL/CPA chargé en peptide antigénique, vu par microscopie confocale. D'après (Faroudi *et al.*, 2003)

Suite à cette polarisation, la perforine est relargée par les CTL et induit la mort des cellules cibles formant des pores au niveau de la membrane plasmique (Henkart & Henkart. , 1982). Une détérioration des cellules est remarquée, cette dernière est médiée par des serines protéases appelées granzymes (Lowin *et al.* , 1995, Heusel *et al.* , 1994). Ces protéases induisent une apoptose rapide des cellules cibles (Heusel *et al.* , 1994) après leur entrée dans ces mêmes cellules facilitée par les pores membranaires formés par la perforine (Peters *et al.* , 1991). Les granzymes prédominants dans la lyse médiée par les CTL sont les granzymes A et B. Les granzymes B induisent l'apoptose de la cellule cible via une voie dépendante des caspases (Sutton *et al.* , 2003) tandis que les granzymes A emmènent à un programme de mort cellulaire indépendant des caspases (Beresford *et al.* , 2001).

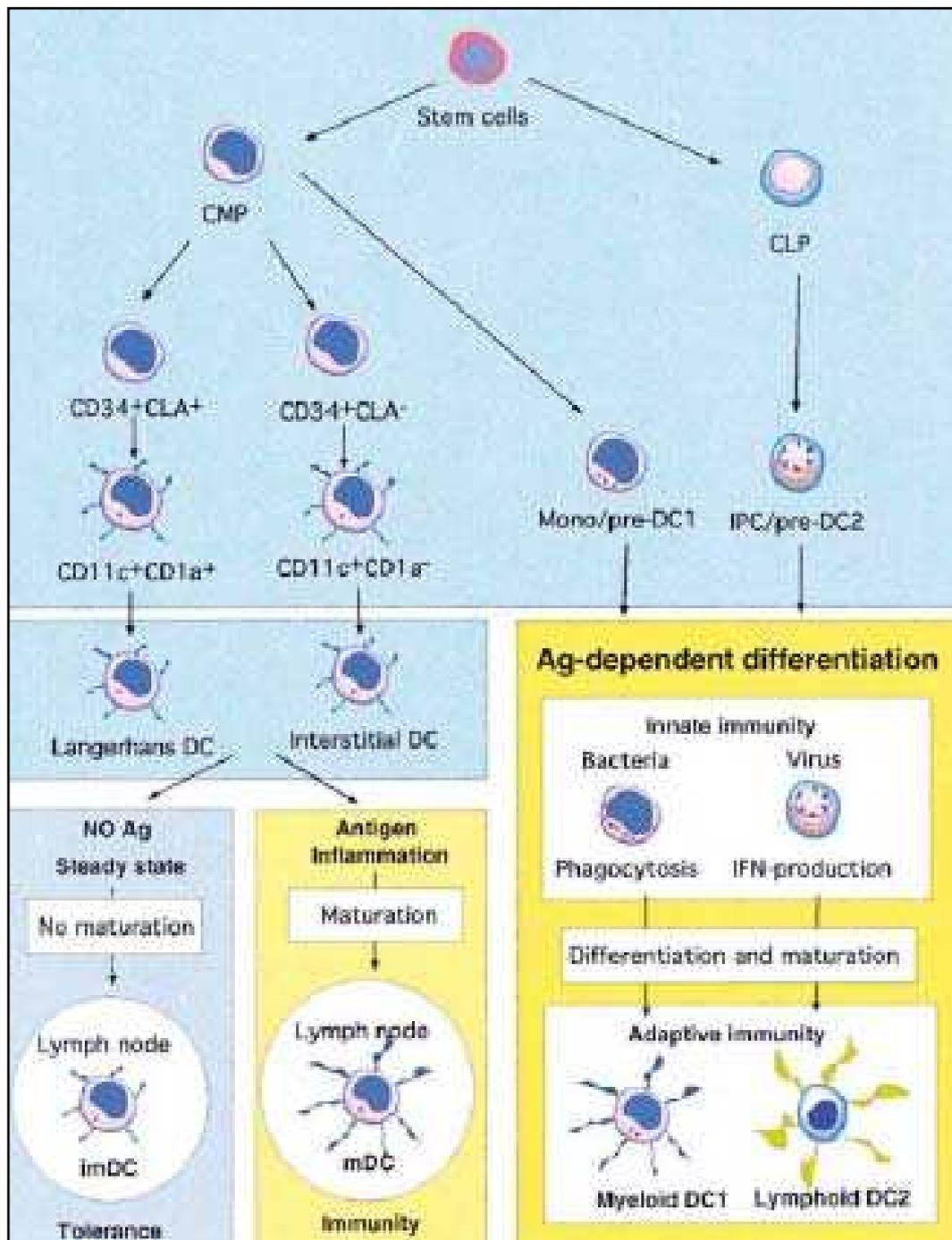
Il existe d'autres voies par lesquelles les CTL opèrent pour détruire les cellules cibles comme la voie Fas/Fas-ligand (Ostergaard *et al.* , 1987), cette voie est dépendante des caspases et plus précisément la caspase 8 (Scaffidi *et al.* , 1998). Cependant la voie Perforine/Granzyme reste la plus utilisée par les CTL due à sa rapidité et à son efficacité (Henkart & Henkart. , 1982, Lowin *et al.* , 1995).

### **III. Les cellules dendritiques**

Initialement identifiées dans la peau en 1868, les cellules dendritiques ont été décrites dans d'autres tissus comme élément critiques de la réponse immunitaire (Steinman & Cohn. , 1973). Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes qualifiées de professionnelles et ont une fonction centrale dans l'induction et la régulation des réponses immunitaires. Elles expriment toutes des taux élevés de molécules du CMH de classe I/II et des protéines membres de la famille de costimulation B7. Les cellules dendritiques sont impliquées à la fois dans l'initiation de la réponse immunitaire mais également dans les phénomènes de tolérance. Elles sont issues de précurseurs hématopoïétiques médullaires CD34+ et sont présentes, à l'état immature, dans la quasi-totalité des organes et plus particulièrement aux interfaces avec le milieu extérieur (peau, muqueuse) (Banchereau & Steinman. , 1998, Cella *et al.* , 1997, Moser. , 2001), où elles exercent leur rôle de sentinelle vis-à-vis des antigènes extérieurs, qu'ils soient pathogènes ou non.

#### **1. Les différentes populations de DC**

Comme ce qui a été déjà signalé, toutes les DC ont en commun un même progéniteur hématopoïétique CD34+ qui est aussi celui de toutes les cellules sanguines. A partir de ce progéniteur (CD34+), les différents types de DC sont produits, selon la voie de différenciation empruntée, conduisant à 2 grandes variétés de DC dont les fonctions diffèrent : ce sont les DC myéloïdes d'une part et les DC plasmocytoïdes d'autre part (Figure 10).



**Figure 10 : Développement, diversité, maturation et fonction des cellules souche hématopoïétique CD34+ en précurseur myéloïde (common myeloid progenitor, CMP) et en précurseur lymphoïde (common lymphoid progenitor, CLP). D'après (Liu, , 2001).**

### 1.1. Les DC myéloïdes

Anciennement appelées CD1 (Figure 10) car elles orientent la réponse immunitaire vers la production de cytokines de type 1 producteurs de l'interféron alpha et gamma. Elles expriment comme marqueur de surface le CD11c+CD123<sup>lo</sup>, et appartiennent à la lignée monocyttaire.

Le progéniteur myéloïde génère des précurseurs circulants dans le sang et la lymphe qui se déplacent ensuite vers les tissus périphériques où après différenciation ils résident sous forme immature. La différenciation à partir des progénitures (CD34+) révèle in vitro 2 voies myéloïdes possibles qui passent par 2 précurseurs différents:

- les précurseurs CD1a+ deviennent des cellules de Langerhans de la peau

- les précurseurs CD14+ deviennent des cellules dendritiques (aussi appelées interstitielles et qui sont situées dans la plupart des tissus ainsi qu'au niveau du derme) Ces précurseurs peuvent aussi générer des monocytes qui peuvent être eux mêmes à l'origine de DC immatures, qui elles mêmes selon l'environnement (facteurs de croissance et cytokines) deviennent des DC matures ou bien des macrophages.

Les DC myéloïdes immatures sont localisées dans les tissus périphériques où elles ont la capacité de capturer les antigènes. Mais en cas d'inflammation, ces cellules deviennent matures et migrent vers les ganglions lymphatiques.

### 1.2. Les DC plasmocytoïdes

CD11c-CD123<sup>hi</sup> (anciennement appelées CD2 car elles orientent la réponse immunitaire vers la production de cytokines de type 2: IL-4 et IL-5 ; elles portent d'autres noms : pDC, DC lymphoïdes, CD11c-) (Figure 10). C'est en 1997 qu'elles ont été rattachées à la lignée dendritique:

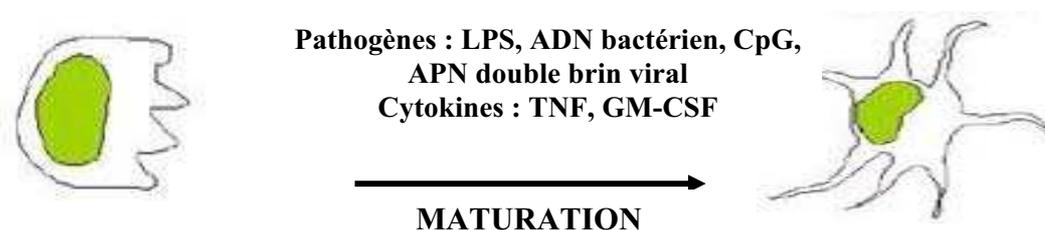
- On trouve ces cellules dans les ganglions, le sang, la moelle osseuse et le thymus. Leur morphologie est particulière; avec du cytoplasme abondant et un noyau excentré

- Elles ressemblent aux plasmocytes sécréteurs d'anticorps. C'est l'origine de leur autre nom initial de cellules plasmocytoïdes.

- Elles possèdent une grande plasticité fonctionnelle en intervenant dans les mécanismes de tolérance aux auto-antigènes, en contribuant aux défenses innées virales et bactériennes et en induisant une réponse immune adaptative.

## 2. Maturation des DC

Dispersées dans tout l'organisme, les DC sont spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Banchereau & Steinman. , 1998, Banchereau *et al.* , 2000). Ces fonctions clés des DC s'exercent en deux temps, Les DC possèdent des propriétés différentes selon leur stade de maturation. Les DC immatures sont ainsi spécialisées dans la capture des antigènes et les DC matures dans la présentation antigénique et la stimulation lymphocytaire. La figure 11 rend compte des particularités des DC en fonction de leur stade de maturation.

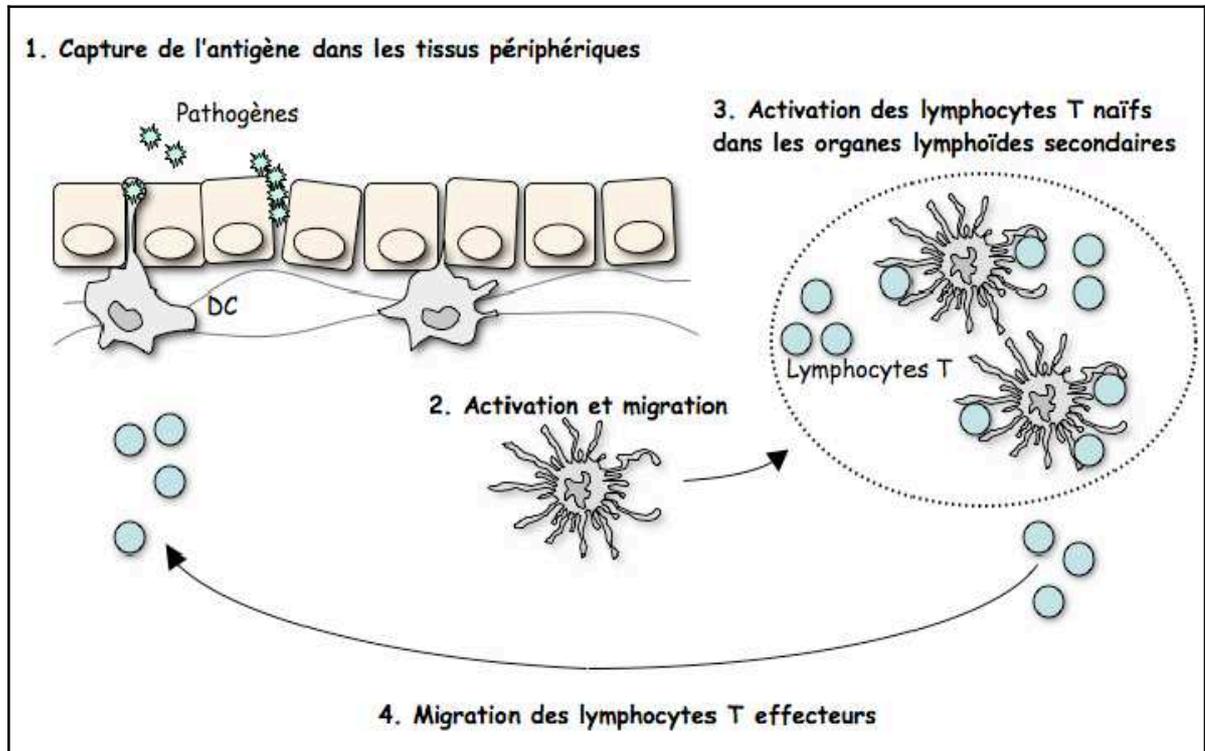


Fonction	Capture antigénique	Présentation antigénique
Localisation	Tissus	Zones T des organes lymphoïdes
CMH de classe II intracellulaire	++++	+
CMH de classe II membranaire	+	++++
Capture antigénique Macropinocytose Phagocytose Endocytose	++++	+/-
Molécules de co-stimulations (B7-1, B7-2, CD40)	+	++++
Molécules d'adhésion (CD54, CD53)	+	++++
Cytokines	IL-12 +/-	IL-12+++ , IL-10
Migration	Non	Oui
Reconnaissance de pathogène	Forte expression des TLR	Diminution de leur expression

**Figure 11 : Principaux changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels au cours de la maturation des cellules dendritiques.**

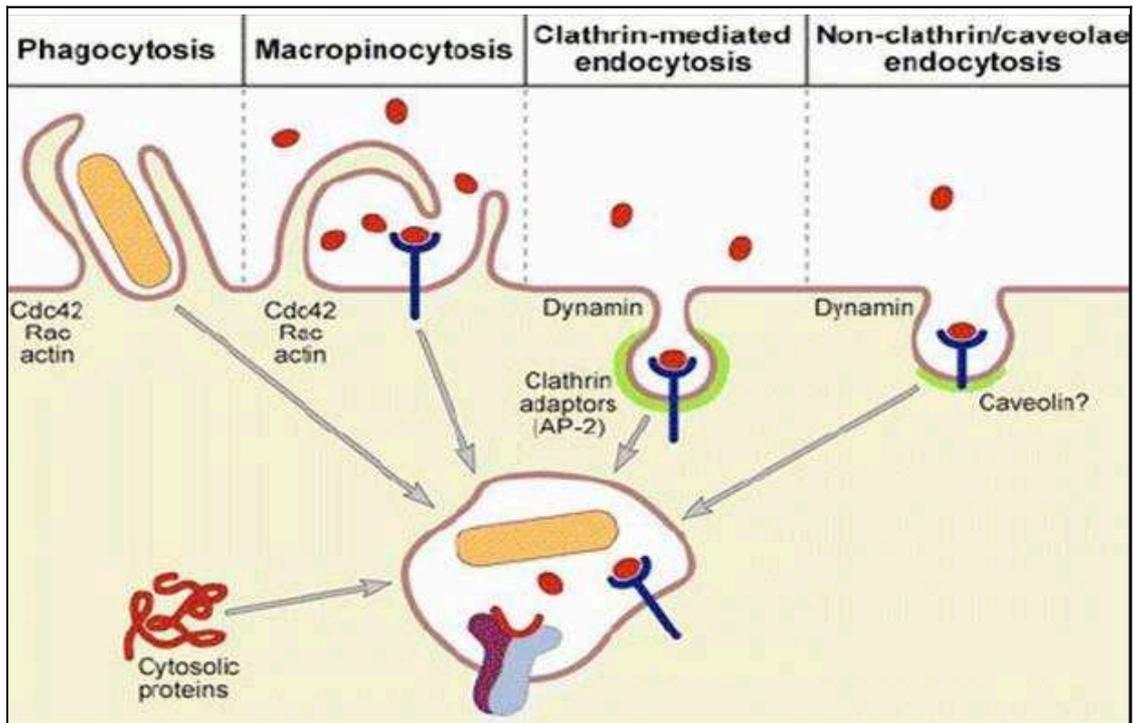
Au stade immature, les DC jouent un rôle de sentinelle dans les tissus périphériques et passent continuellement en revue l'environnement antigénique (figure 12). Les DC immatures ne sont pas capables de stimuler les lymphocytes T car elles n'expriment pas, ou faiblement, les molécules de co-stimulation (telles que CD40, CD54 et CD86), mais elles sont capables de

capturer efficacement les antigènes qui vont induire leur maturation complète. La capture de l'antigène peut s'effectuer de différentes façons. Les DC immatures sont capables de phagocytose, de macropinocytose et expriment des récepteurs reconnaissant les pathogènes (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) et pouvant conduire leur internalisation par endocytose (figure 13).



**Figure 12 : Rôle des DC dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative.** Les DC immatures échantillonnent l'environnement antigénique dans les tissus périphériques (1). Elles capturent les antigènes et les appréêtent pour présenter des complexes CMH/peptide antigénique à leur surface, ce qui induit leur maturation. Les DC migrent alors jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (2) où une fois matures, elles expriment des molécules qui permettent de lier et d'activer les lymphocytes T naïfs (3). Les lymphocytes T effecteurs migrent au site d'entrée du pathogène et entraînent son éradication (4).

Suite à l'activation par des micro-organismes ou des signaux pro-inflammatoires, les DC immatures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. La maturation des DC et la surexpression des molécules de stimulation des lymphocytes T est concomitante à leur migration.



**Figure 13 : Mécanismes de capture antigénique des cellules dendritiques. D’après (Trombetta & Mellman, 2005)**

### 3. Migration et maturation des DC

Le terme de maturation recouvre un ensemble de modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles qui confèrent aux DC la capacité d’activer efficacement les LT. La migration et la maturation des DC semblent très liées.

Les pathogènes ou des molécules associées aux pathogènes induisent la maturation des DC qui s’accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels majeurs transformant de façon coordonnée et séquentielle une cellule capturant l’antigène en une cellule présentant l’antigène. La maturation est intimement liée à la migration des DC des tissus vers les organes lymphoïdes.

Les signaux capables d’induire la maturation des DC sont :

- Des molécules associées aux pathogènes (Pathogen Association Molecular Pattern ou **PAMP**) comme le lipopolysaccharide (LPS), l’acide lipotéichoïque, l’ADN bactérien (motif CpG), ou l’ARN double brin;
- Des cytokines pro-inflammatoires comme le  $TNF\alpha$ , l’IL1, l’IL6, GM-CSF et l’ $IFN\alpha$ , libérées dans le microenvironnement ;
- La molécule CD40L (CD154) exprimée par les cellules T  $CD4^+$  activées ;

- La présence de cellules nécrotiques mais non apoptotiques ;
- Certaines molécules de choc thermique ou HSP (Heat shock proteins) exprimées par des microorganismes ou lors d'un stress cellulaire

Nous rappellerons le rôle des **récepteurs Toll-like** (TLR), au nombre de 9, chacun se liant à des ligands différents, qui permettent aux DC de décoder le microenvironnement dans lequel elles baignent, et d'y réagir en conséquence.

La **maturation** s'accompagne de:

- ✓ Une diminution considérable de la capacité des DC à capturer l'antigène
- ✓ Une augmentation de la quantité de molécules du CMH de classe II, et donc de complexe CMH-peptide, à la membrane
- ✓ Une augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe I
- ✓ L'expression en grande quantité des molécules de costimulation CD80, CD86, CD40, et des molécules d'adhérence CD54, CD58.
- ✓ La production de cytokines : l'IL12 est produite largement par les DC sous l'influence de nombreux pathogènes et de certaines cytokines comme l'IFN $\gamma$  ou l'IL4. Les cellules dendritiques peuvent également sécréter d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL1, l'IL6, l'IL15, l'IL18, et l'IL23.
- ✓ Une modification d'expression de récepteurs aux chimiokines
- ✓ Des modifications morphologiques importantes qui se traduisent par une diminution de l'adhérence, une augmentation de la mobilité et une réorganisation du cytosquelette avec apparition de longues dendrites très mobiles.

La migration des DC vers les organes lymphoïdes repose sur l'existence de récepteurs spécifiques pour des chimiokines (Luster. , 2002).

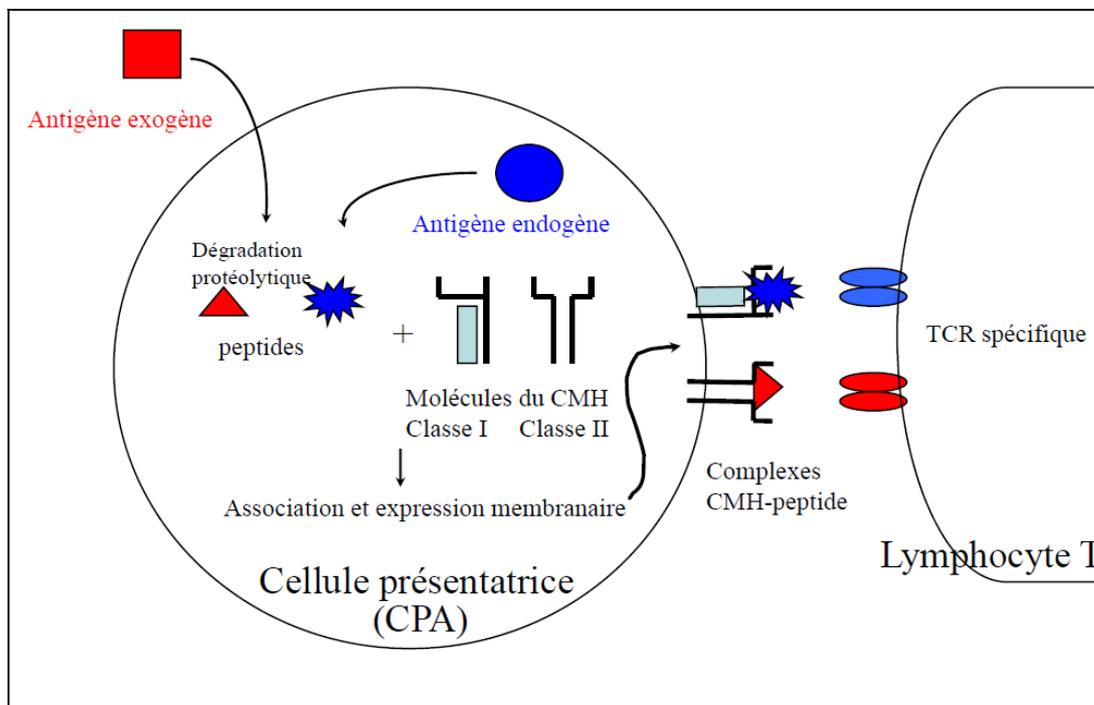
#### 4. Apprêtement des antigènes

Rappelons que les DC sont les seules CPA capables d'activer les lymphocytes T naïfs *in vivo* et *in vitro*. Bien qu'elles expriment 10 à 100 fois plus de complexes pCMH que les autres CPA, le maintien d'un contact suffisamment long entre elles et le lymphocyte T nécessite l'aide de nombreuses molécules d'adhérence qui participent à ce que l'on appelle la Synapse immunologique (Bromley *et al.* , 2001).

Selon le type de pathogène rencontré et le micro-environnement cellulaire, les DC immatures peuvent se différencier en différents sous-types de DC matures, pouvant promouvoir par exemple

l'activation de lymphocytes T auxiliaires de type 1 ou bien de type 2 (Th1 ou Th2) qui activent différentes sortes de réponses immunitaires (cellulaires ou humorales).

De manière générale, les antigènes exogènes sont généralement présentés en association avec le CMH de classe II, induisant une réponse immunitaire menée par les lymphocytes T auxiliaires CD4+. De plus, les DC sont également capables de présenter ces antigènes, en association avec le CMH de classe I, aux lymphocytes T CD8+ pour générer une réponse impliquant les cellules cytotoxiques tueuses. Cette voie de présentation est normalement restreinte aux antigènes endogènes exprimés dans le cytosol. Cependant plusieurs études montrent que ce modèle n'est pas absolu, notamment pour les cellules dendritiques. Des peptides dérivés de protéines exogènes peuvent être présentés en association avec des molécules du CMH de classe I (Wilson & Villadangos. , 2005).



**Figure 14 : Apprêtement et Présentation des antigènes par les molécules du CMH-I et les molécules du CMH-II.**

Ainsi, le rôle des DC pourraient être de décoder les signaux microenvironnementaux et de traduire ces informations pour le lymphocyte T afin d'induire une réponse immune effectrice adaptée au type de pathogène (Kapsenberg. , 2003). Il est possible que des sous populations de DC soient apparus au cours de l'évolution pour lutter contre la diversité des agents pathogènes (Voisine *et al.* , 2002). En effet, les sous populations de DC expriment des Toll-like récepteurs (TLR) différents suggérant que chaque population serait spécialisée dans la reconnaissance de certains pathogènes.

## IV. Contact Lymphocyte T/ Cellules dendritiques

### 1. Sensibilité et spécificité des TCR :

La reconnaissance du complexe pCMH antigénique par le TCR semble être l'événement essentiel dans la réponse adaptative.

Matsui et Weber se sont intéressés à cette interaction en mesurant l'affinité du TCR pour le complexe pCMH. En effet, il s'est avéré que cette affinité est faible (Kd approximativement entre  $10^{-7}$  et  $10^{-4}$  M) (Matsui *et al.* , 1991, Weber *et al.* , 1992).

Grâce au développement d'autres techniques par résonance plasmonique de surface, la demi-vie d'association du complexe TCR/pCMH a pu être calculée (2-12 secondes) (Davis *et al.* , 1998) . Ces mesures montrent que cette interaction TCR/pCMH a une constante d'association lente ( $900-3000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) et une constante de dissociation rapide ( $0.3-0.06 \text{ s}^{-1}$ ) (Matsui *et al.* , 1994).

Le nombre de peptides suffisant pour l'activation du lymphocyte T est très faible entre 60-200, ceci représente seulement 0,03% de molécules du CMH sur la CPA (Demotz *et al.* , 1990). En effet, les complexes pCMH spécifiques sont noyés dans une mer de complexes pCMH provenant de dégradations et présentations successives des protéines intra et extracellulaires de l'environnement. Donc le lymphocyte T doit scanner la surface de la CPA à la recherche de ces ligands spécifiques (Demotz *et al.* , 1990). La probabilité que les complexes pCMH spécifiques se trouvent dans la zone initiale de contact entre ces deux cellules est très faible. L'initiation de la transduction du signal en aval du TCR est due à une interaction moléculaire hautement sensible<sup>5</sup> et spécifique<sup>6</sup>. Tous ces éléments réunis soulèvent donc une nouvelle interrogation sur les mécanismes développés par la cellule T afin d'assurer une détection efficace de faibles concentrations antigéniques. Pour cela plusieurs modèles ont été proposés parmi eux on cite : la « kinetic proofreading », le « serial engagement ».

---

<sup>5</sup> Une faible quantité de ligand devant engendrer une forte réponse

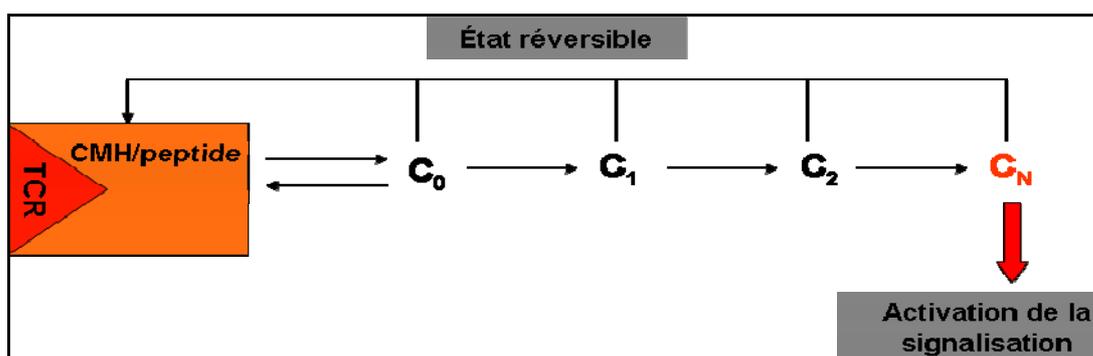
<sup>6</sup> Très peu de ligands spécifiques parmi un océan de ligands non spécifiques

## 2. Le modèle de « kinetic proofreading » (McKeithan 1995)

Ce modèle a été proposé par McKeithan en 1995 (McKeithan. , 1995), les bases de ce modèle reposent sur la notion de temps d'interaction entre le TCR et son ligand.

Il souligne tout d'abord qu'un délai de temps sépare la liaison initiale et la production d'un signal majeur d'activation, incluant plusieurs étapes enzymatiques comme de la phosphorylation des tyrosines, avant la génération des seconds messagers. Ce délai se justifie biologiquement par la nécessité d'étapes successives de phosphorylations sur des tyrosines essentielles à la mise en place de voies de signalisation productive. Ceci explique le fait qu'une interaction entre un TCR et un complexe pCMH non spécifique ayant un taux d'association très court et un taux de dissociation très rapide ne peut conduire qu'à l'obtention d'un signal abortif. Dans les mêmes conditions, l'interaction TCR/pCMH spécifique doit être plus stable pour pouvoir générer un signal d'activation (Lyons *et al.* , 1996).

Le modèle est schématisé de la manière suivante : l'interaction TCR/pCMH forme un complexe ( $C_0$ ). Ce complexe pouvant à tout moment être dissocié, est converti en une série d'intermédiaires ( $C_i$ ) avec pour but d'obtenir un complexe actif ( $C_N$ ) qui permet d'induire la réponse biologique. Chaque étape est nécessaire et consomme de l'énergie car elle implique des processus enzymatiques. Toutefois chaque étape peut être réversible, car chacun des intermédiaires peut être dissocié.



**Figure 15 : Schématisation du modèle de « Kinetic Proofreading » pour la signalisation du TCR.**

Le complexe  $C_0$  formé entre le TCR et le complexe pCMH va subir N modifications afin de produire le complexe actif ( $C_N$ ) seul capable d'induire la signalisation chaque étape est réversible. Adapté de (McKeithan. , 1995).

Ce modèle permet d'expliquer la haute sélectivité du TCR, car la transduction du signal demande une spécificité de l'interaction TCR/pCMH, pour induire la formation du complexe actif ( $C_N$ ).

Dans le cas des variantes « peptidiques altérées » ou APL<sup>7</sup> (Altered Peptide Ligand) induisant soit l'inhibition d'un signal (antagoniste) ou n'induisant que l'activation partielle du lymphocyte T (agoniste partiel) aide à comprendre les mécanismes de l'engagement du TCR. La durée courte de leurs interactions, induit l'absence de signalisation qui permet l'obtention du complexe actif (C<sub>N</sub>).

En 1996, Rabinowitz a apporté une nouvelle pierre à l'édifice du « Kinetic proofreading » en proposant le modèle de « Kinetic discrimination » (Rabinowitz *et al.*, 1996). Il a proposé que l'utilisation d'un peptide antagoniste, en plus de ne pas aboutir au travers de la cascade d'intermédiaires au complexe actif C<sub>N</sub>, a un effet inhibiteur sur l'activation de la cellule T.

Risueno et coll. ont récemment observé qu'un changement conformationnel avait lieu au niveau de la chaîne CD3ε suite à une stimulation par un agoniste et non par un antagoniste (Risueno *et al.*, 2005).

Ce modèle pourrait prendre toute sa dimension biologique au cours de la sélection thymique où l'affinité de l'interaction TCR/pCMH conditionne le devenir des thymocytes en développement (Alam *et al.*, 1996) comme pour l'activation et la sélection périphérique.

### **3. Le modèle des engagements consécutifs « Serial Triggering ou Serial engagement »**

Comme nous l'avons vu plus haut, l'interaction TCR/pCMH est caractérisée par une forte vitesse de dissociation avec une demi-vie de liaison allant de quelques secondes à quelques minutes (Matsui *et al.*, 1994). En effet, des lymphocytes T<sub>H</sub> (Helpers) ou T auxiliaires sont capables de s'activer, de proliférer et de produire des cytokines en réponse à une CPA présentant entre 50 et 100 complexes pCMH spécifiques (Demotz *et al.*, 1990). D'autres études ont montré qu'un seul complexe CMH/peptide était capable d'induire une signalisation calcique dans un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> (Irvine *et al.*, 2002) et que trois complexes étaient suffisants pour engendrer la réponse cytotoxique des CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) (Purbhoo *et al.*, 2004).

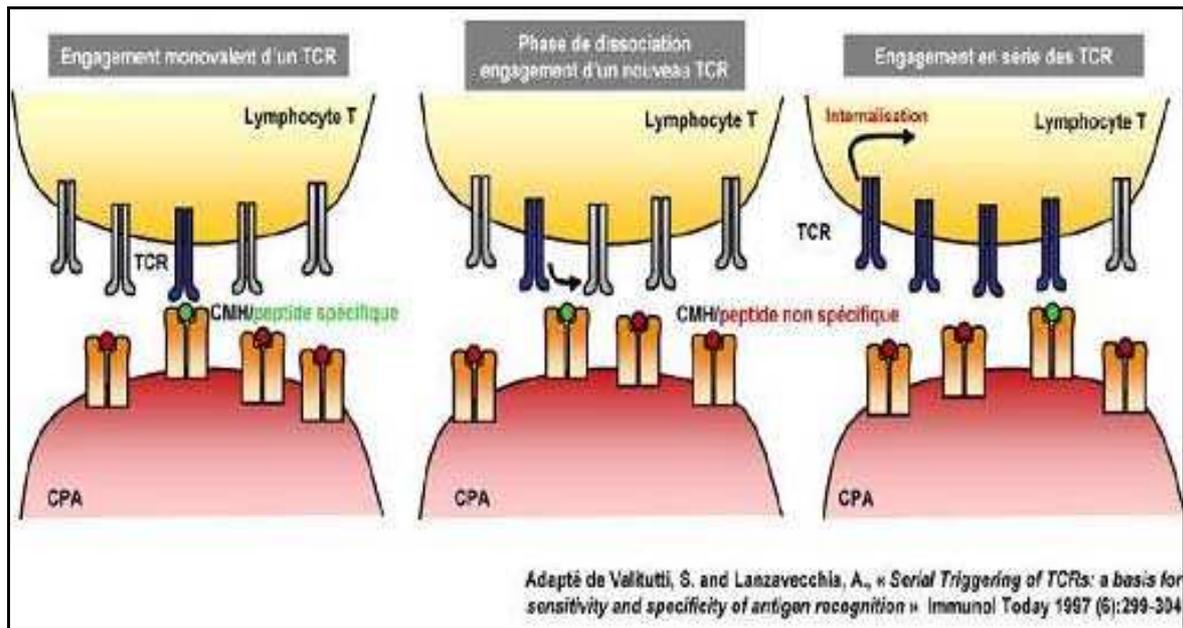
En 1995, Valitutti en s'appuyant sur le fait que l'internalisation et le recyclage du TCR est une conséquence de la liaison spécifique avec son ligand (Kragel, 1987, Padovan *et al.*, 1993), expliquait le paradoxe de l'activation d'un nombre suffisant de TCR avec un très peu de peptides disponibles à la haute sensibilité-faible affinité du TCR par le « serial engagement » (Valitutti *et al.*, 1995). Ce dernier expliquait qu'un petit nombre de complexes CMH/peptide peut engager des associations en série avec un très grand nombre de TCR emmenant à un signal soutenu et

---

<sup>7</sup> Plusieurs structures proches (variation d'un acide aminé) ont des affinités variables pour le récepteur TCR.

amplifié. La forte vitesse de dissociation du TCR permet à un simple complexe pCMH d'engager plusieurs TCR par étapes successives de liaison-engagement dissociation.

Ainsi, dans des conditions physiologiques, les lymphocytes T peuvent être activés par l'engagement monovalent et séquentiel de plusieurs TCR avec un petit nombre de ligands. En accord avec ce modèle, un temps minimum de liaison est requis pour entraîner la transduction de signal et l'internalisation après engagement du TCR. Le modèle de « serial engagement » est illustré par la figure 16.



**Figure 16 : Modèle d'engagement en série des TCR ou « Serial triggering ».** Un seul complexe pCMH spécifique peut se lier à plusieurs TCR durant l'interaction prolongée entre le lymphocyte T et la CPA.

Le modèle suppose que le processus « serial triggering » prend place dans une aire limitée du contact cellule T/CPA et est par conséquent dépendant de trois facteurs : 1) L'adhérence de la cellule T facilitant l'interaction TCR-CMH-peptide ; 2) Un approvisionnement continu de composants de la signalisation au niveau des TCRs engagés ; 3) Un approvisionnement de nouveaux TCR afin de remplacer ceux qui sont internalisés après engagement.

Dans le cas des peptides altérés, il a été établi que des complexes CMH/agonistes partiels ou encore CMH/antagonistes associés à des TCR avaient des vitesses de dissociation plus fortes comparées aux peptides agonistes (Lyons *et al.*, 1996). De ce fait, la dissociation prématurée du TCR avant une pleine activation reflète le comportement du TCR à l'égard des peptides altérés. Ainsi, il est possible que la liaison pour un temps court puisse résulter d'une activation partielle, alors qu'une liaison encore plus courte peut utiliser des TCR de façon stérile sans signal

délectable. L'importance de la demi-vie du complexe TCR/pCMH doit donc être optimale (Kalergis *et al.* , 2001).

Le modèle serial triggering explique deux caractéristiques clés de la reconnaissance antigénique : la sensibilité et la spécificité. La sensibilité est expliquée par le fait qu'un petit nombre d'agoniste avec des cinétiques de liaison optimales ; peut emmener à l'activation de la cellule T. les petites déviations dans ces cinétiques optimales peuvent dramatiquement inhiber la capacité d'engager en série les TCR. Cette reconnaissance est surtout liée à la reconnaissance du peptide. Ce qui explique le haut niveau de spécificité de la reconnaissance antigénique (Valitutti & Lanzavecchia. , 1997).

Des modèles mathématiques ont été développés afin d'estimer les rôles de chacun des deux modèles dans l'internalisation du TCR. Il en a résulté l'apparition d'un nouvel état de TCR (activé, dissocié à partir du complexe pCMH mais pas encore prêt à être internalisé) non supposé par les deux modèles précédents. De plus le modèle prédit aussi que la fenêtre de demi-vie de liaison TCR/pCMH dépend de la concentration et de la localisation de molécules de signalisation intracellulaires (Coombs *et al.* , 2002).

En résumé, nous pourrions dire que le kinetic proofreading se focalise au niveau du récepteur individuel. En effet, pour devenir activé, un TCR lié doit compléter une série de modifications biochimiques (phosphorylation des ITAMs, activation de la ZAP-70...). Par contre, le modèle du serial triggering se focalise au niveau cellulaire. Puisque, dans des conditions physiologiques où la densité de pCMH spécifique sur la CPA est faible, la demi-vie de liaison du complexe TCR/pCMH doit être assez courte pour permettre à un seul peptide d'engager en série de multiples TCR requis pour l'activation de la cellule T (Kalergis *et al.* , 2001).



## V. La synapse immunologique

### 1. Architecture de la synapse immunologique

**La synapse immunologique concentrique : « l'oeil de boeuf » :** Le concept de la synapse immunologique est né il y a plusieurs années, popularisé à partir d'observation montrant, à l'interface entre les lymphocytes T et certaines cellules présentant l'antigène (APC), une accumulation de molécules adoptant une organisation spatiale particulière à l'échelle de quelques micromètres carrés (Monks *et al.* , 1998).

Utilisant la microscopie à déconvolution, Monks et coll. étaient les premiers à décrire une réorganisation spatiale des protéines au site de contact entre un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et un lymphocyte B chargé en antigène (Monks *et al.* , 1998). Ces réarrangements structuraux aboutissent à la formation de zones distinctes au niveau de la synapse, les SMAC (*supra molecular activation cluster*). Ils ont ainsi montré que les TCR se regroupent au centre de la synapse immunologique dans une zone appelée cSMAC (*central SMAC*) tandis que les protéines accessoires LFA-1, CD45..., se localisent autour du cSMAC dans une zone appelée pSMAC (*peripheral SMAC*) (Monks *et al.* , 1998). Depuis, d'autres travaux ont confirmé et étendu ce travail en décrivant plus précisément les trois zones structurant la synapse immunologique dite concentrique : le cSMAC, le pSMAC et le dSMAC (*distal SMAC*) (Figure 17).

Le cSMAC est le cœur de la synapse, il regroupe les effecteurs principaux de la transduction du signal impliqués dans l'activation du lymphocyte T : le TCR, les corécepteurs CD4 et CD8, la molécule de costimulation CD28, la molécule CD2, la PKC $\theta$ , Lck, Fyn... (Huppa *et al.* , 2003). Le pSMAC est la zone qui entoure directement le cSMAC, elle est enrichie en molécules d'adhérence comme LFA-1 et en taline<sup>8</sup> (Grakoui *et al.* , 1999, Monks *et al.* , 1998). La troisième est la plus externe des zones composant la synapse immunologique, elle est appelée le dSMAC. Elle regroupe de grosses protéines qui vont être exclues du centre de l'aire de contact à cause de leur grande taille. C'est le cas des protéines CD43, CD45 et CD148 (Delon *et al.* , 2001, Leupin *et al.* , 2000) (Figure 17 et 18).

---

<sup>8</sup> Protéine assurant la liaison entre les microfilaments d'actine et les intégrines

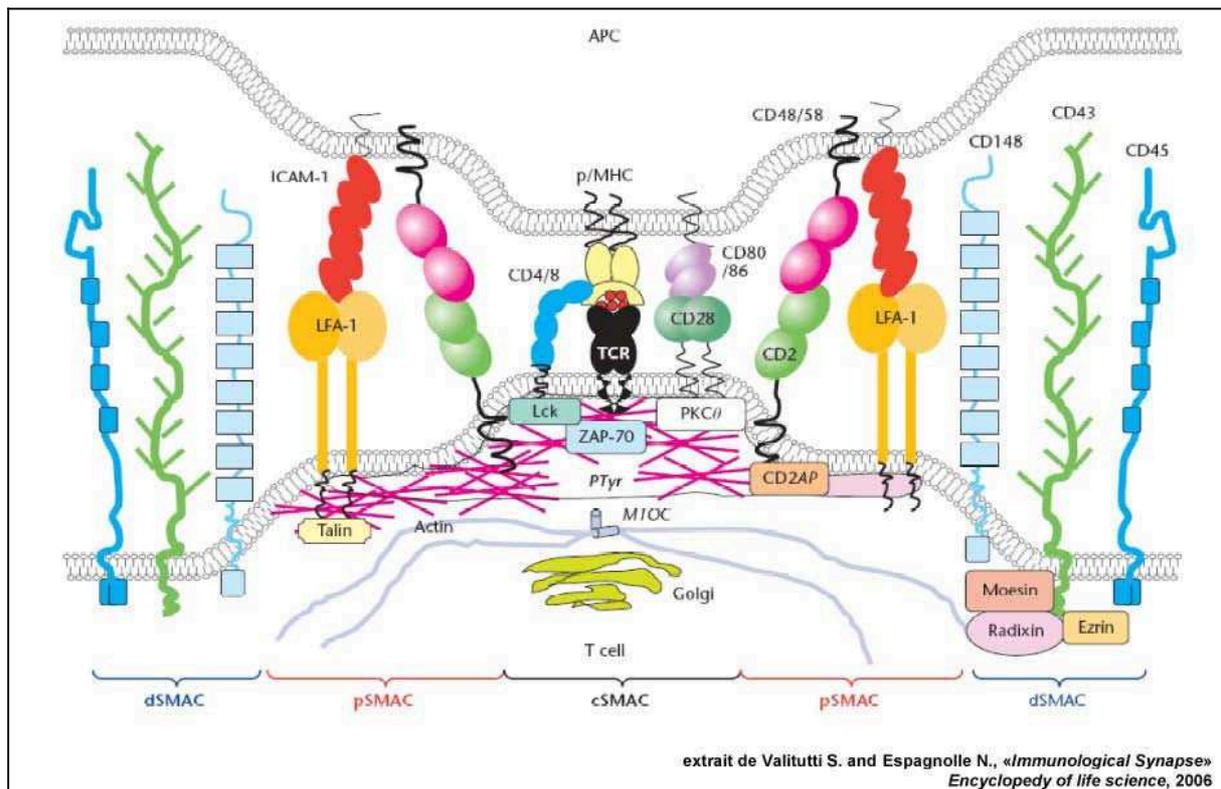


Figure 17 : Représentation schématique de la synapse immunologique mature.

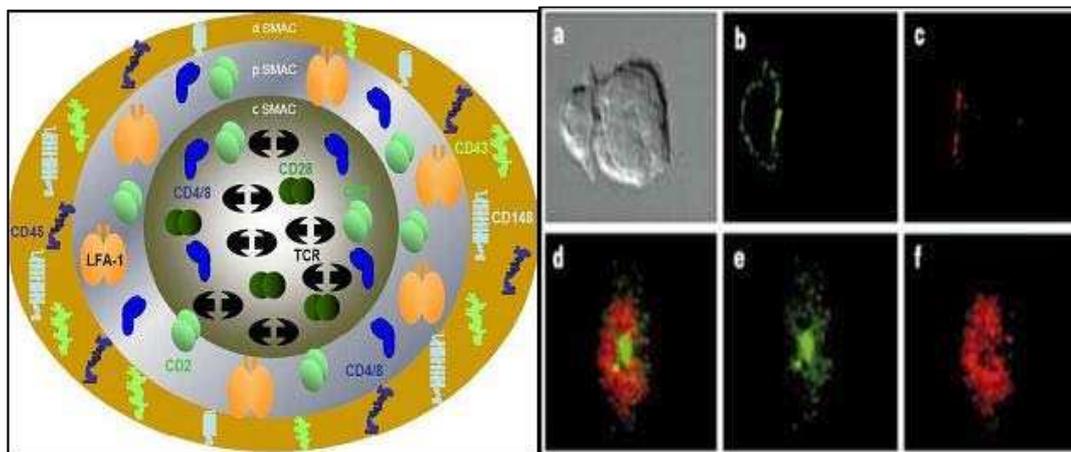


Figure 18: Vue de face (côté lymphocyte T) de la synapse immunologique mature. A droite, redistribution 3D du TCR-CD3 (vert) et LFA-1 (rouge) après 30 minutes, dans des conjugués cellule T/CPA. Le schéma a été modifié à partir de Valitutti and Espagnolle, *Encyclopedia of Life Sciences*, 2005 et les images de microscopie à fluorescence sont tirées de Monks et coll.(Monks *et al.* , 1998).

L'organisation structurée de ces SMAC favorise l'engagement simultané de nombreuses molécules de surface qui autorisent la mise en place de différentes voies de signalisation contrôlant ainsi l'activation et la mise en place des fonctions effectrices des lymphocytes T

(Anton van der Merwe *et al.* , 2000). Le centre névralgique de la signalisation intracellulaire va se situer au niveau du cSMAC en aval des TCR où des molécules comme Lck, ZAP-70 et PKC- $\theta$  colocalisent avec une aire importante de phosphorylation sur tyrosine (Lee *et al.* , 2002, Monks *et al.* , 1998, Muller *et al.* , 1999). Parallèlement à ce recrutement massif de protéines de signalisation il y a une restructuration du cytosquelette d'actine et polarisation de la machinerie sécrétoire (appareil de Golgi et MTOC) du lymphocyte T vers la CPA (Kupfer *et al.* , 1987, Kupfer & Singer. , 1989)(Kupfer *et al.* , 1987, Kupfer & Singer. , 1989). Burack *et al.* ont montré que les microdomaines lipidiques s'accumulent rapidement à la synapse immunologique au niveau du cSMAC lors du processus de reconnaissance antigénique et que de plus cette accumulation se faisait indépendamment de la costimulation induite par la molécule CD28 (Burack *et al.* , 2002).

La synapse immunologique est une structure dynamique : elle évolue à partir d'une structure rudimentaire nommée la « SI immature » vers une architecture plus organisée nommée la « SI mature » (Figure 17 et 18) désignant la structure en « œil de bœuf » avec un cluster de TCR central (Grakoui *et al.* , 1999). Il faut entre 5 et 30 minutes d'engagement productif du TCR pour que la SI mature soit assemblée (Saito & Yokosuka. , 2006).

## 2. La synapse immunologique est une structure dynamique

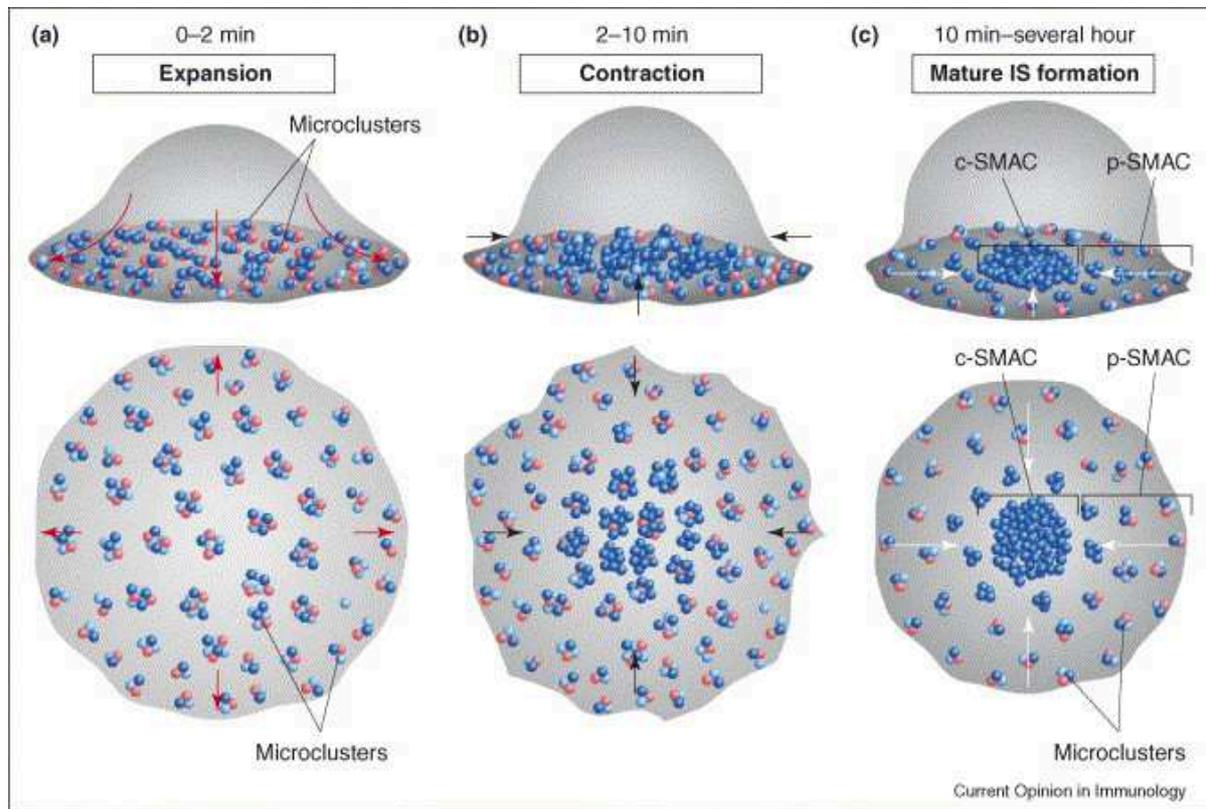
### 2.1. Dynamique à la synapse

Les lymphocytes T circulent en permanence au sein des organes lymphoïdes secondaires. De nombreuses collisions avec les CPA se produisent, et peuvent déclencher, en présence d'antigène à faible affinité, de petites réponses transitoires. En présence d'antigène cinq grandes phases ont été déterminés (Figure 19).

**La première étape :** correspond à l'initiation du contact, le lymphocyte T « scanne » la surface de la CPA à la recherche de l'antigène. La reconnaissance de l'antigène induit un arrêt transitoire dans la migration de la cellule T, c'est le « *stop signal* » (Donnadieu *et al.* , 1994) .

**La seconde étape :** concrétise cette interaction avec la formation de la SI et la mise en place de la signalisation intracellulaire. Une SI immature se forme tout d'abord avec un enrichissement central de la molécule LFA-1 entourée par un anneau de TCR (Grakoui *et al.* , 1999).

**La troisième étape :** Après cinq à trente minutes d'interaction continue entre la cellule T et la CPA, une SI mature se forme (Lee *et al.* , 2002a, Bromley *et al.* , 2001).



**Figure 19 : Formation des micro-groupes de TCR suite à la reconnaissance antigénique. D'après (Saito & Yokosuka. , 2006).**

La SI mature est formée après que les TCR accompagnés des molécules CD3 et PKC $\theta$  se soient enrichis dans la zone centrale de la SI, le cSMAC. De manière inverse, les intégrines LFA-1 migrent en périphérie pour former une structure en anneau co-localisant avec la taline, nommée le pSMAC. Les molécules qui sont recrutées, au moins temporairement dans le cSMAC, incluent CD28 (Andres *et al.* , 2004), le CD2 (Dustin *et al.* , 1998), le CD45 (Freiberg *et al.* , 2002) et CTLA-4, le récepteur régulateur de l'activation de la cellule T (Egen & Allison. , 2002). De plus, via des mécanismes dépendant de l'actine, de la contractilité médiée par la myosine et des transports vésiculaires médiées par le réseau de microtubules, les radeaux lipidiques pré-assemblés transigent à la SI (Villalba *et al.* , 2001) (Jordan & Rodgers. , 2003). Une agrégation des récepteurs de surface, de protéines de signalisation, de protéines du cytosquelette ainsi que des vésicules membranaires est alors microscopiquement détectable le long de la jonction cellule-cellule mais ceci n'est qu'un point temporaire à la dynamique de la SI.

**La quatrième étape :** est caractérisée par l'internalisation des TCR au niveau du cSMAC au sein de vésicules intra-cytoplasmiques. Cette phase permet d'initier une modulation du signal.

Cela souligne donc le rôle biologique crucial que la SI joue dans le contrôle de l'activation T (Lee *et al.*, 2003a).

Enfin **la cinquième étape** : correspond à un détachement de la SI et à un détachement de la cellule T. Il est toutefois difficile de déterminer si la résolution de la SI est la conséquence ou la cause de la rupture de l'interaction lymphocyte T/CPA. Il est intéressant de noter que dans cette phase tardive de l'interaction de nombreux événements contribuent à cette déstructuration de la SI : internalisation des TCR, diminution du niveau d'expression de LFA-1, augmentation du niveau d'expression de CTLA-4, redistribution des phosphatases (Friedl *et al.*, 2005). Cette phase est encore mal connue, notamment en ce qui concerne la nature du contrôle qui entraîne la fin du signal et le détachement des cellules T. On ignore également si les mitoses multiples ou la prolifération cellulaire qui affectent un lymphocyte T s'effectuent au contact de la première CPA stimulatrice, sinon dans son environnement proche, ou avec d'autres DC, après que les cellules aient retrouvé leur mobilité initiale (Mempel *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2004).

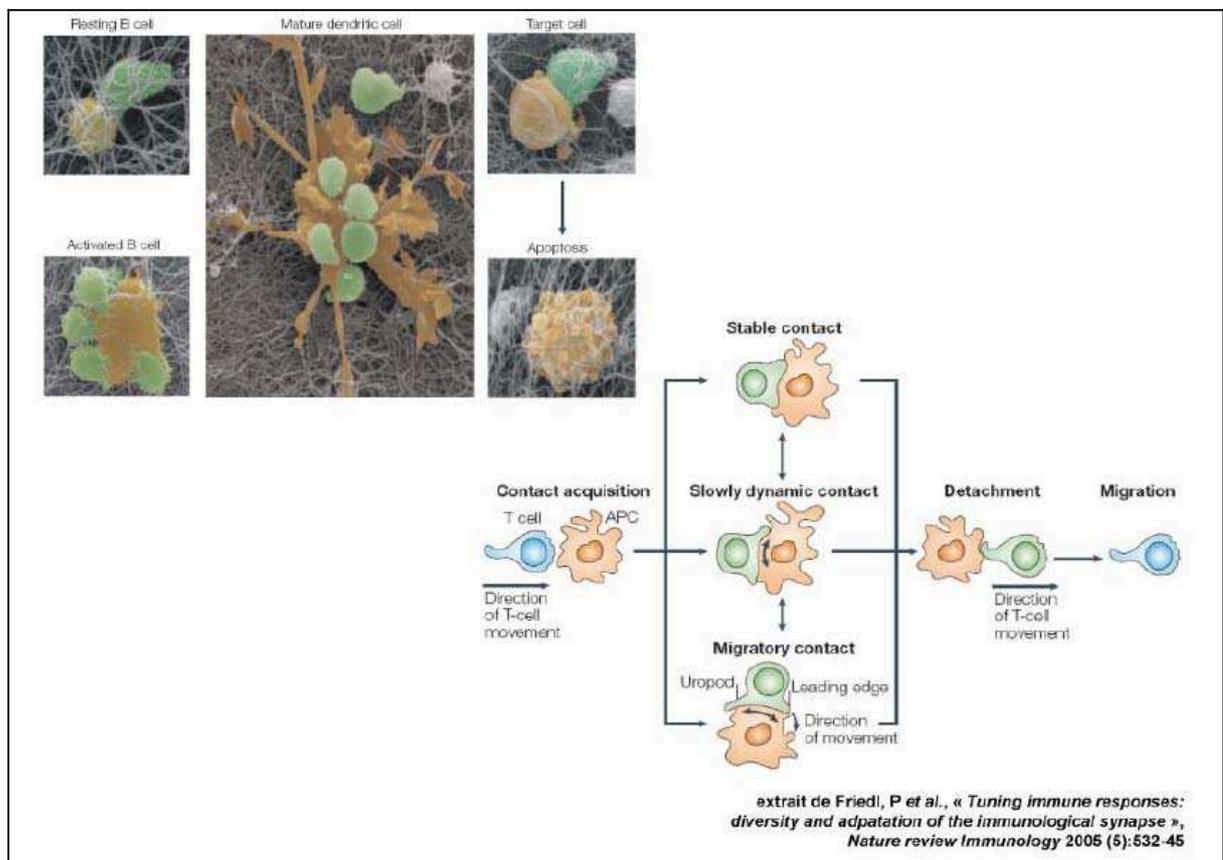


Figure 20 : Dynamique de l'interaction entre un lymphocyte T et une CPA. Extrait de Friedl et coll. (Friedl *et al.*, 2005).

## 2.2. Dynamique de l'interaction lymphocyte T/CPA pendant la formation de la synapse

L'initiation de contact ou l'acquisition de contact est initiée par le déplacement des cellules T via leur « leading edge<sup>9</sup>» lors du contact avec la CPA (Mempel *et al.* , 2004). Une fois le contact établi, il y a formation du plan d'interaction (SI) d'une durée de quelques minutes à plusieurs heures. Cette phase dépend de différents états physiques dans l'interaction lymphocyte T-CPA, un état stable et polarisé résulte de l'adhésion des deux cellules, les cellules T s'arrondissent et abandonnent leur morphologie migratoire (la mobilité latérale de la cellule T est de moins d'1  $\mu\text{m}$  par minute) (Friedl *et al.* , 2005), permettant ainsi la redistribution des récepteurs vers la jonction «stabilisée». Ce type de contact est le plus souvent observé entre des lymphocytes T activés et des cellules B (Kupfer *et al.* , 1986).

Puis, un état faiblement mobile (mobilité latérale de plus de 2  $\mu\text{m}$  par minute) est souvent observé entre des cellules T et des CPA dans des environnements tissulaires tels que les ganglions lymphatiques (Benvenuti *et al.* , 2004, Miller *et al.* , 2004). Enfin, une jonction dynamique résulte du maintien de la migration de la cellule T à la surface de la CPA (Friedl & Brocker. , 2002). Cet état migratoire indique que la cellule T est polarisée avec un lamellipode (leading edge) qui génère le mouvement en avant, un corps cellulaire arrondi et un uropode qui suit le mouvement (Friedl & Brocker. , 2002). Ces contacts sont plus rapides (1-10  $\mu\text{m}$  par minute) emmenant à de fréquents changements de position de la cellule T à la surface de la CPA et par conséquent ces interactions sont associées à des détachements rapides (Friedl *et al.* , 2005). Une fois détachée la cellule T continue sa migration.

D'après les observations de Mempel et Coll.,(Mempel *et al.* , 2004) dans le ganglion lymphatique et en présence d'antigène, trois phases distinctes ont été décrites pour le comportement des cellules T *in vivo*. Des rencontres transitoires en série durant la première phase d'activation sont suivies par une seconde phase de contacts stables culminant dans la production de cytokines faisant la transition avec une troisième phase de haute mobilité et de prolifération rapide (Mempel *et al.* , 2004).

Ces types d'interaction sont déterminés par le type de la CPA, l'état de la cellule T, la quantité d'antigène, l'affinité et l'environnement où a lieu l'interaction.

---

<sup>9</sup> Mode de migration des récepteurs au niveau de la membrane.

- **Rôle de la CPA**

Le mode d'interaction est déterminé en partie par le type et l'état d'activation de la CPA. Par exemple, les contacts stables entre cellules T CD4<sup>+</sup> et cellules B au repos, bien que durant plusieurs heures, n'emmènent pas à une activation efficace de la cellule T (Gunzer *et al.* , 2004). Au contraire, les interactions entre cellules T naïves et lymphocytes B activés ou DC sont moins stables (quelques minutes) mais ont une efficacité largement supérieure dans l'activation du lymphocyte T (Gunzer *et al.* , 2004).

- **Rôle de la cellule T**

Le type d'interaction dépend aussi du type ou du statut d'activation de la cellule T. Des cellules T partiellement activées forment, principalement, des contacts plus stables et plus longs pour compléter leur activation (Mempel *et al.* , 2004, Miller *et al.* , 2004).

- **Rôle de la qualité et quantité de l'antigène**

Le niveau de signalisation via le TCR peut être mesurée par la durée et l'intensité du signal calcique induit, comme une fonction directe de la concentration de complexes CMH/peptide agoniste (Wulfing *et al.* , 1997). Dans des études de dose réponse, en présence de doses croissantes d'antigène, la durée des interactions cellules T-CPA est augmentée (Bousso & Robey. , 2003). De plus, les interactions du TCR avec des complexes pCMH agoniste et non pas antagoniste ou nul favorisent des interactions lymphocyte T-CPA stables et prolongées (Wulfing *et al.* , 2002).

- **Rôle de l'environnement**

Des environnements structurellement complexes, tels que les tissus interstitiels périphériques ou les zones T des ganglions, supportent la migration et le positionnement coordonné des cellules T. Ainsi, les cellules T migrent à travers et dans un réseau dense de DCs maintenant des contacts constants avec ces dernières (Lindquist *et al.* , 2004). La complexité structurale et dynamique de l'environnement lymphoïde entraîne un profil migratoire et transitionnel des lymphocytes T entre les CPA. Au contraire, les interactions entre les cellules T et les CPA dans des environnements moins complexes (zone sous capsulaire des nœuds lymphatiques ou culture liquide en deux dimensions) montrent des interactions plus stables.

### **2.3. « Ségrégation cinétique » « kinetic segregation » ou l'organisation de zones privilégiées au site de contact LT/APC**

Ce modèle postule le fait que l'initiation de la signalisation est due à une réorganisation géographique des protéines membranaires au niveau de la zone de contact entre un lymphocyte T et une CPA (Davis *et al.* , 1998).

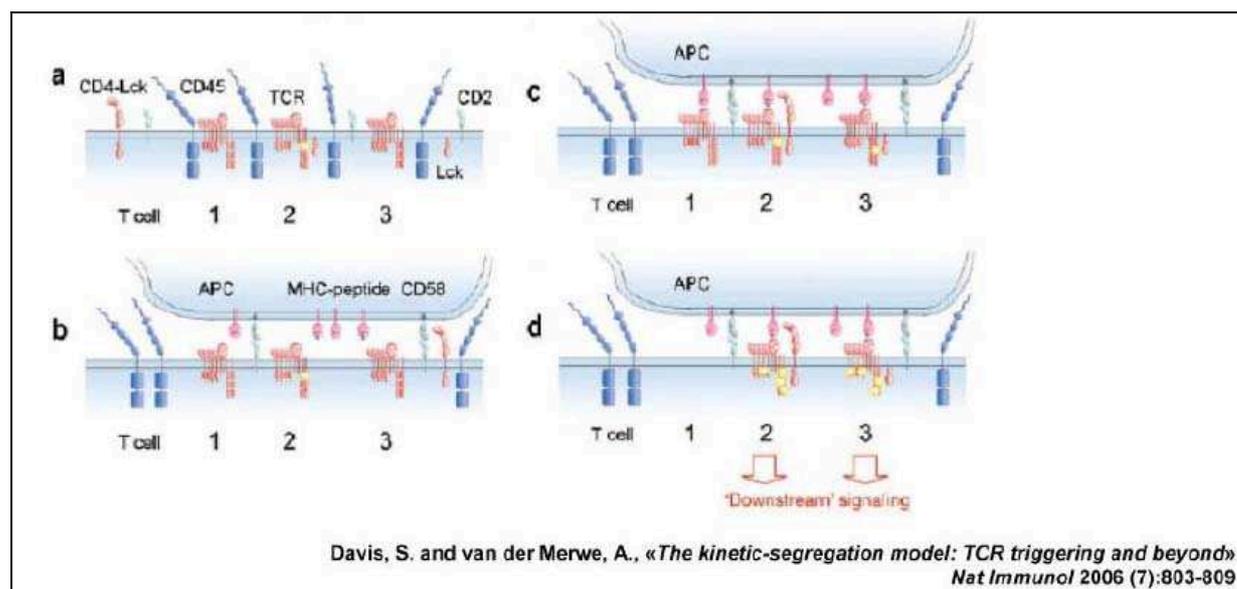
Cette réorganisation est basée sur la différence de taille entre le TCR et les molécules d'accessoires, d'une part, et les grandes molécules qui les entourent comme les phosphatases CD45, CD43 ou CD148 ayant une taille trois fois plus importante de l'autre.

Ces grandes molécules sont exclues de la zone privilégiée de contact où s'initie la transduction du signal (Cyster *et al.* , 1991, Leupin *et al.* , 2000, Lin & Weiss. , 2003) . En plus d'être exclues, ces grosses molécules (notamment la protéine CD45) vont avoir un impact fonctionnel direct sur la signalisation.

CD45 est la phosphatase la plus abondante à la surface des lymphocytes T, elle possède plusieurs fonctions : premièrement, elle assure le maintien de Lck sous sa forme active (par déphosphorylation de sa tyrosine inhibitrice), elle va avoir ensuite une fonction inhibitrice sur l'activation du TCR en déphosphorylant CD3 $\zeta$  (Furukawa *et al.* , 1994), ZAP-70 ainsi que la tyrosine activatrice de Lck (D'Oro *et al.* , 1996).

En plus de l'expulsion des grandes molécules de la zone privilégiée, se produit l'intégration de certaines molécules accessoires de plus petite taille comme le CD2 qui sont 6 à 8 fois plus petites que les molécules CD43 et CD45. Les complexes TCR/CMH et CD2/CD58 ont la même taille (15nm), CD2 pourrait alors jouer un rôle dans la reconnaissance antigénique en favorisant la proximité des membranes du lymphocyte T et de la CPA (Davis & van der Merwe. , 2006).

En reprenant toutes ces observations, Davis et van der Merwe ont donc proposé le modèle de « *kinetic segregation* » (Davis *et al.* , 1998).. A l'état de repos, c'est-à-dire en absence de stimulation antigénique, les protéines transmembranaires des lymphocytes T diffusent de manière aléatoire dans la membrane, Il y a alors équilibre entre phosphorylations et déphosphorylations. Lors de la rencontre entre un lymphocyte T et une CPA lui présentant son ligand antigénique spécifique, il y a réorganisation des molécules de surface qui vont s'agréger suivant leur taille ; cela permet de créer des zones de contact privilégiées contenant les complexes TCR/CD3 où il y aura un enrichissement en kinases (CD2, CD28) ainsi qu'une exclusion des phosphatases (CD45), facteurs favorables à l'initiation de la signalisation induite par la liaison du TCR. L'activation des complexes TCR/CD3 permet le recrutement de la tyrosine kinase ZAP-70 qui assurera la mise en place séquentielle des chaînes de transduction du signal (Figure 21).



**Figure 21 : Le modèle de kinetic segregation.** a) les Lymphocyte au repos, les interactions des protéines sont au hasard. b-d) Cd2 permet la formation de zone de contact étroite, en excluant les molécules de grandes tailles. D'après (Davis & van der Merwe. , 2006)

Ce modèle postule donc que l'activation de la cellule T ainsi que la signalisation sont maintenues tant que ces zones privilégiées existent. Lorsque le TCR ou les molécules accessoires quittent ces zones, il y a arrêt de la signalisation. La demi-vie d'interaction entre TCR/CMH/peptide apparaît donc comme le paramètre crucial pour la modulation de l'activation du lymphocyte T. Une courte durée d'interaction entre le TCR et son ligand conduirait à un signal insuffisant pour permettre l'activation de la cellule T (Davis & van der Merwe. , 2006).

### 3. Rôle de la synapse immunologique dans la maintenance d'un pool de lymphocytes T naïfs périphériques

Après être sortis du thymus, les lymphocytes T naïfs recirculants interagissent avec un grand nombre de DCs dans les régions périfolliculaires des ganglions lymphatiques (Miller *et al.* , 2004)(Miller *et al.* , 2004). *In vitro*, les SI non spécifiques formées entre un lymphocyte T naïf et une DC génèrent des signaux faibles, représentés par des phosphorylations de la tyrosine faibles ainsi que des flux calciques minimales. De telles interactions indépendantes de l'antigène entre les cellules T et les DCs pourraient contribuer au maintien d'un répertoire de cellules T en périphérie, par l'induction de signaux de survie, en absence d'activation et d'expansion clonale (Brocker. , 1997, Miller *et al.* , 2004, Revy *et al.* , 2001).

#### **4. Rôle de la synapse immunologique dans la signalisation intracellulaire**

Le cSMAC est une structure « longue vie » qui a été suspectée d'augmenter l'activation de la cellule T en concentrant les molécules du TCR et du CMH dans une aire de la membrane plasmique pour de longues durées (Dustin & Shaw. , 1999). Des expériences faites par ordinateur ont confirmé cette idée, en suggérant que le cSMAC pouvait faciliter les événements de liaison répétée ou itérative (serial triggering) grâce à la haute concentration de TCR et de son ligand (Lee *et al.* , 2003a).

Le déclenchement de la prolifération et la production de cytokine requièrent un contact de plusieurs heures entre une cellule T naïve et une CPA (Lee *et al.* , 2002). Des estimations portaient la durée entre 4 et 10 heures pour déclencher au moins un cycle de division. Bien que la phosphorylation sur tyrosine soit maximale quelques minutes après l'engagement du TCR, la signalisation persiste pendant des heures après la stimulation. Plusieurs groupes ont démontré que le PIP3 est continuellement généré, synonyme d'activité de la PI3K, tant que la cellule T reste en contact avec la CPA (Harriague & Bismuth. , 2002, Huppa *et al.* , 2003).

La signalisation paraît dépendre d'un engagement continu du TCR puisque l'addition d'anticorps bloquant l'interaction TCR-CMH/peptide provoque une interruption de la signalisation (Huppa *et al.* , 2003, Valitutti *et al.* , 1995).

Comme nous l'avons dit plus haut, la signalisation déclenchée par la liaison du TCR avec des complexes pCMH peut être maintenue pour de longues périodes, et il est maintenant clair qu'une fraction de complexes pCMH du soi soit recrutée dans le cSMAC (Krogsgaard *et al.* , 2005, Li *et al.* , 2004, Wulfing *et al.* , 2002). Il est intéressant de spéculer que les peptides du soi endogènes puissent être responsables des événements de signalisation soutenue. Les peptides antigéniques initieraient la formation du cSMAC et les peptides du soi induiraient un signal suffisant pour augmenter et soutenir l'activation de la cellule T en présence d'un faible nombre de complexes pCMH agonistes (Krogsgaard *et al.* , 2005, Wulfing *et al.* , 2002). Ainsi, dans des conditions où la présence d'antigène est limitante, la formation du cSMAC pourrait être critique dans le maintien de la signalisation pour plusieurs heures.

Il convient de préciser ici l'objet dont on parle, car il n'y a pas une, mais de nombreuses SI, par exemple celles formées entre cellules T et cellules B, cellules T et DC, entre cellules NK (natural killer) et leurs cibles... les partenaires moléculaires étant différents dans chaque cas, chacun de ces objets doit donc être analysé spécifiquement, et il est important de se garder de

généralisations anticipées. Dans ce qui suit, nous porterons un intérêt particulier à la structure et au fonctionnement des synapses formées par des cellules T naïves, avec les APC naturelles que sont les cellules dendritiques (DC). Rappelons que si d'autres cellules comme les cellules B ou les macrophages peuvent également présenter des antigènes à des cellules T activées, les DC sont les seules APC capables, *in vivo*, d'activer pleinement des cellules T naïves.



## **VI. Activation des lymphocytes T**

### **1. Activation des lymphocytes T et valence des TCR**

La nécessité de la multimérisation des TCR pour permettre l'activation des lymphocytes T est un dogme. Cette théorie a été initialement proposée suite au constat que l'utilisation d'anticorps anti-CD3, afin d'activer une cellule T, était très efficace du fait de leur potentiel à agréger ou « cross-link » plusieurs TCR (Kappler *et al.* , 1983).

Plus tard des travaux ont supporté ce prérequis de multimérisation en montrant que l'induction des réponses calciques dans les lymphocytes T nécessitait l'utilisation de multimères solubles de complexes pCMH (Boniface *et al.* , 1998).

Plusieurs évidences récentes remettent toutefois en doute cette notion de multimérisation des TCR pour l'activation des lymphocytes T. En effet, les complexes CMH/peptides spécifiques dans des conditions physiologiques sont à l'état monomérique et leur densité à la surface de la CPA est très faible, rendant la probabilité d'engagement simultané de plusieurs TCR et donc d'agrégation de ces TCR quasi-nulle. Allant dans ce sens là, il a été montré qu'un seul ligand antigénique permettait d'induire la réponse cytotoxique des CTL (Sykulev *et al.* , 1996). D'autres données morphologiques (Irvine *et al.* , 2002) indiquent qu'un seul complexe TCR/pCMH est capable d'induire la mobilisation de calcium intra-cellulaire et donc la signalisation soutenue au sein d'un lymphocyte T CD4+. Ces travaux ont permis de souligner l'importance du co-récepteur CD4 dans l'engagement du TCR avec son ligand. Ces résultats ont été confirmés en 1998 par Delon et coll. (Delon *et al.* , 1998), démontrant le rôle important du corécepteur CD8 monomérique. L'induction de la signalisation observée est similaire à celle obtenue en stimulant les lymphocytes par anticorps anti-CD3.

Ainsi, trois modèles ont été présentés s'appuyant sur le rôle des co-récepteurs et sur la valence des TCR :

#### **1.1. Le modèle d'hétérodimérisation du TCR :**

Ce modèle a été initialement proposé pour les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ postulant l'hétérodimérisation du TCR avec le corécepteur CD4 ou CD8 lors de l'activation par des monomères de complexe CMH/peptide. Ces corécepteurs étant associés à la protéine tyrosine

kinase Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) cela permet la phosphorylation des chaînes CD3 associées au TCR et donc d'initier la transduction du signal (van der Merwe. , 2002).

### **1.2. Le modèle de pseudodimérisation du TCR :**

Ce second modèle a été proposé suite à plusieurs constatations. En premier lieu, le rapport entre le nombre de complexes pCMH spécifiques et le nombre de complexes pCMH du soi ou « endogène », est situé entre  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ . De plus, ces complexes CMH/peptide du soi ont une affinité pour le TCR seulement dix fois plus faible sans pour autant engendrer un signal au sein du lymphocyte T (Boniface *et al.* , 1998). En 2005, Krogsgaard et coll. ont montré que le recrutement ou l'absence de complexe CMH/peptide du soi au niveau de l'aire de contact entre lymphocyte T et CPA avait un impact positif ou négatif sur la réponse induite par le complexe pCMH spécifique (Krogsgaard *et al.* , 2005).

Le postulat de ce modèle repose sur le fait que lors de l'interaction entre un TCR ( $TCR_1$ ) et un complexe CMH/peptide agoniste, un autre TCR ( $TCR_2$ ) interagissant avec un complexe CMH/peptide du soi peut lier via son corécepteur CD4 ce premier  $TCR_1$ . Il en résulte alors la formation d'un pseudodimère ( $TCR_1$ / ligand agoniste/  $TCR_2$ / ligand endogène) qui, notamment grâce aux molécules CD4 associées aux deux TCR, va pouvoir efficacement initier la transduction du signal (Irvine *et al.* , 2002).

Il est tentant de considérer ce modèle comme un mécanisme moléculaire participant au « serial engagement ». La durée d'interaction importante entre le TCR et ses ligands est alors compensée par la capacité à lier un  $TCR_2$ .

### **1.3. Le modèle des TCR multivalents :**

Ce troisième modèle proposé par Alarcon et coll.(Alarcon *et al.* , 2006) complète en quelque sorte les deux précédents modèles en étudiant plus finement la sensibilité des lymphocytes T et donc leurs capacités à discriminer et intégrer différentes concentrations antigéniques.

Des études utilisant de nouvelles techniques comme le FRET (fluorescence Resonance Energie Transfert) ont permis, d'observer deux hétérodimères TCR  $\alpha\beta$  au sein d'un même complexe TCR/CD3 (Fernandez-Miguel *et al.* , 1999). Des études récentes utilisant des techniques de

microscopie électronique ont pu montrer la co-existence à la surface de lymphocytes T murins et humains des complexes TCR/CD3 monovalents et multivalents (Schamel *et al.* , 2005).

Alarcon et coll. ont proposé qu'à des faibles concentrations antigéniques, la détection de l'antigène se ferait grâce aux complexes multivalents, l'augmentation de l'avidité compensant la faible concentration en ligands agonistes. A l'inverse, à des fortes concentrations en antigènes, les complexes multivalents étant saturés, ce serait les complexes monovalents qui assureraient la réponse (Alarcon *et al.* , 2006).

Cela permettrait au lymphocyte T d'être le plus résolutif possible face à la stimulation antigénique, aussi bien pour des faibles que pour des fortes concentrations en antigène, afin de pouvoir au mieux adapter et traduire sa réponse par un ajustement de l'intensité de la signalisation intracellulaire.

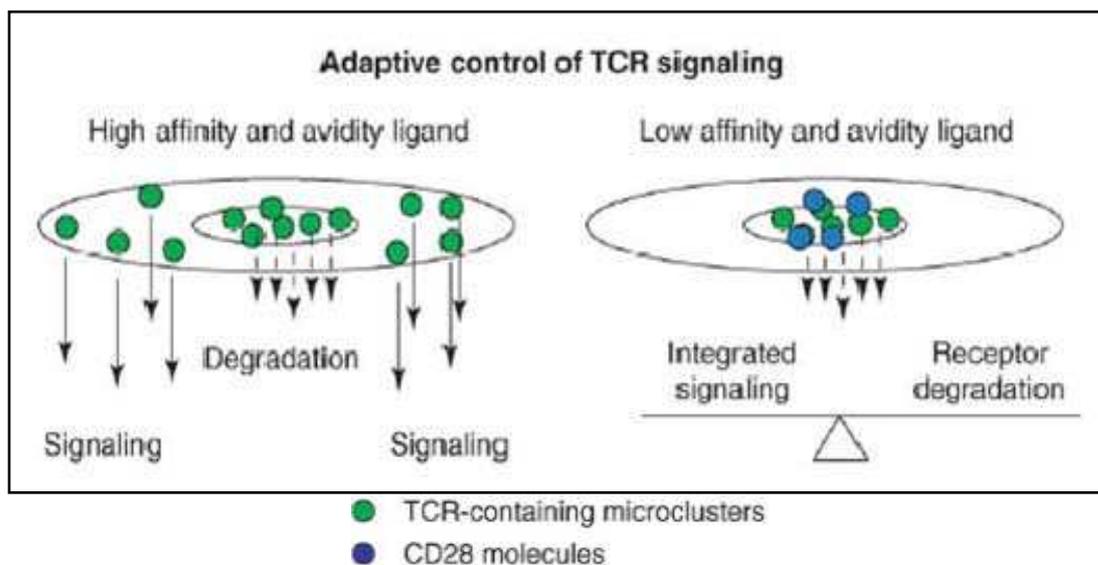
## **2. Changement conformationnel du TCR**

Plusieurs mécanismes peuvent être proposés pour comprendre comment l'information est transmise depuis le site de liaison du TCR pour l'antigène jusqu'aux motifs ITAMs du complexe CD3, à partir desquels la signalisation va être déclenchée. En 1989, Rojo et coll. ont remarqué des changements de conformation au niveau du TCR $\alpha\beta$  (Rojo *et al.* , 1989). Plus exactement, lorsque le TCR se lie à son ligand, seules les boucles CDR sont modifiées (Reiser *et al.* , 2002). Cependant, des travaux récents par Gil et coll. ont montré qu'après la liaison du TCR, un changement conformationnel avait lieu dans le complexe CD3 en révélant une région riche en proline (PR : proline rich region) dans le domaine intracytoplasmique du CD3 $\epsilon$  (Gil *et al.* , 2002). De plus, ce changement conformationnel est spécifique de la nature du ligand car seul un agoniste le permet (Risueno *et al.* , 2005).

## **3. Baisse d'expression membranaire du TCR engagés « downregulation »**

Lorsque les complexes se dissocient du pCMH, les TCR sont ôtés de la surface cellulaire par internalisation et de nouveaux TCR prennent leur place. Ce phénomène permet une transduction du signal efficace et aboutit à une baisse d'expression du TCR, mesurable dès 20 minutes après activation. L'intériorisation des TCR participe de ce fait à un rétrocontrôle négatif de la réponse. La cinétique de cette baisse d'expression du TCR reflète l'intensité de l'engagement des TCR sur le ligand (Hemmer *et al.* , 1998).

La formation de la synapse immunologique initie l'internalisation et la dégradation des TCR engagés. Dans les conditions de repos, le TCR se recycle constitutivement entre la surface et un compartiment intracellulaire (Liu *et al.* , 2002). Après engagement du TCR, les récepteurs aux résidus tyrosines phosphorylés sont ubiquitinés et redirigés vers les lysosomes (Alcover & Alarcon. , 2000). Les cellules T ayant un défaut dans la formation du cSMAC (cellules T déficientes en CD2AP) connaissent des altérations dans la baisse d'expression du TCR (Lee *et al.* , 2003b)(Lee *et al.* , 2003a). L'incapacité à internaliser les récepteurs activés provoque une signalisation soutenue en absence de rétro-contrôle. Une simulation informatique de la formation du cSMAC suggère que la phosphorylation est plus efficace dans le cSMAC du fait des hautes concentrations de TCR et CMH (Lee *et al.* , 2003b). Le modèle suggère aussi que les hauts niveaux de phosphorylation médiés par le cSMAC facilitent le recrutement d'ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation du TCR (Naramura *et al.* , 2002).



**Figure 22 : Rôle de la synapse immunologique dans la dégradation, l'internalisation des TCR et l'induction de la signalisation. D'après (Saito & Yokosuka. , 2006).**

Malgré tout, il est important de noter que l'internalisation du TCR peut être détectée très tôt (environ 30 secondes) après la formation de conjugués lymphocyte T/CPA et s'intensifie durant les premières minutes (Utzny *et al.* , 2006). Ce processus s'établit, donc, bien avant que la SI mature ne soit formée. Pour une question de temps, la formation de la SI ne coïncide pas avec les fonctions qu'on lui attribue.

#### 4. Les molécules de co-stimulation

Lors de l'activation d'un lymphocyte T naïf, un second signal est indispensable à la mise en place d'une réponse efficace. L'absence de ce deuxième signal peut aboutir à l'anergie ou la mort de la cellule T qui a engagé son TCR (Bretscher. , 1992). Ce second signal est régi par l'interaction de couples ligands-récepteurs accessoires présents à la surface des LT et des cellules dendritiques.

Au cours de leur maturation, les cellules dendritiques augmentent considérablement leur expression de CD86 (B7-1) et commencent à exprimer CD80 (B7-2), deux ligands de CD28 et de CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocytes Antigen 4) (Reiser & Schneeberger. , 1996, Symington *et al.* , 1993) .

L'IL2 est une cytokine autocrine essentielle à la prolifération et l'activation des cellules T. L'un des effets de l'engagement de CD28 est d'augmenter la production d'IL-2 d'un facteur 20 à 30 (Fraser *et al.* , 1991).

La molécule CTLA-4 joue un rôle d'inhibiteur dans l'activation T et se lie également avec B7-1 et B7-2, mais avec une avidité 40 à 100 fois plus forte que CD28. La molécule CTLA-4 n'est pas exprimée constitutivement à la surface des LT naïfs; cependant l'engagement du TCR et de CD28 conduit à une translocation rapide, de la molécule séquestrée dans les lysosomes, vers la membrane plasmique (Saito & Yamasaki. , 2003). L'interaction CTLA-4/B7 inhibe la synthèse d'IL-2 et protège les cellules T d'une activation incontrôlée (Krummel & Allison. , 1996). Ainsi, le blocage de l'interaction CD28/B7, par injection de CTLA-4 soluble à des souris, conduit à une suppression de l'HSRC (Hypersensibilité retardée de contact) (Tang *et al.* , 1996). Par ailleurs, l'injection d'anticorps anti-CTLA-4 au moment de la phase de sensibilisation entraîne une exacerbation de l'HSRC avec à une augmentation du nombre de LT spécifiques de l'allergène (Nuriya *et al.* , 2001).

La molécule LFA-1 est une autre molécule d'adhésion, exprimée par les LT, qui se lie au ligand ICAM-1 et -3 sur les DC. La stimulation de LFA-1 permet d'abaisser la quantité de peptides nécessaires à l'activation mais contrairement à CD28, sa liaison ne peut empêcher l'induction d'un état de non réponse « anergie » (Bachmann *et al.* , 1997).

Le Tableau 1 montre les différentes molécules de co-stimulations localisées sur les CPA et leurs actions sur l'activation des lymphocytes T.

Molécules de co-stimulations Ligand sur l'APC Action sur l'activation			
<b>Famille CD28</b>			
	CD28	B7-1 et B7-2	+
	ICOS	B7H	+
	PD-1	PD-L1 et PDL-2	-
	CTLA-4	B7-1 et B7-2	-
	?	B7H3	+
<b>Famille des Intégrines</b>			
	LFA1	ICAM1	+
	ICAM1	LFA1	+
<b>Famille CD2</b>			
	CD2	CD48 (souris)	+
	CD48	CD2	+
	SLAM	SLAM	+
	2B4	CD48	+
<b>Famille TNF-R</b>			
	4-1BB	4-1BBL	+
	OX-40	OX40-L	+
	CD4OL	CD40	+
	CD27	CD70	+
	FasL	Fas	+
<b>Famille NK-R</b>			
	NKG2D	MIC A/B (homme)	+

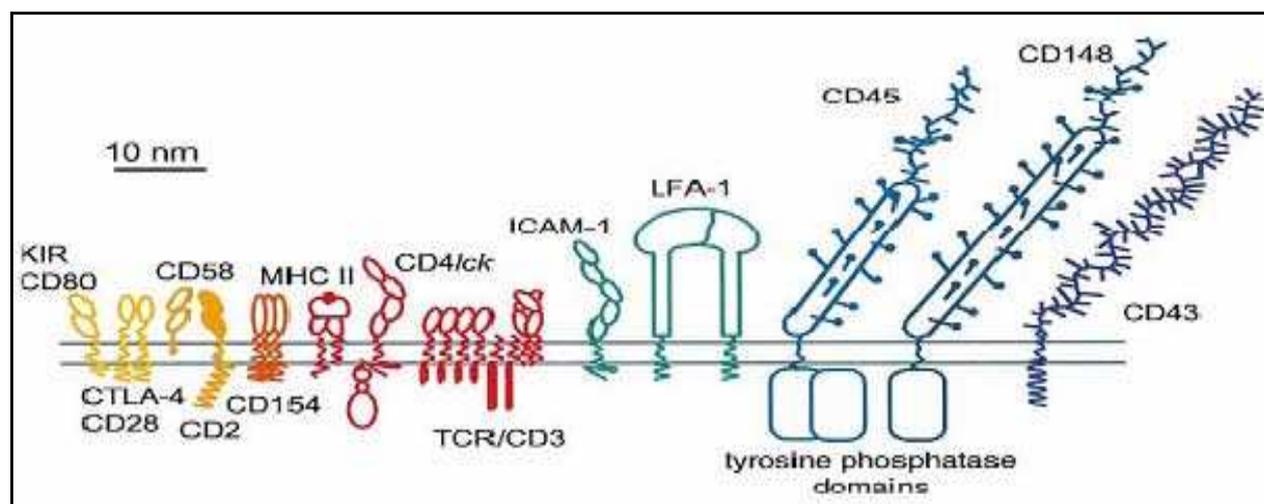
**Tableau 1: Différentes familles de molécules co-stimulatrices identifiées. D'après (Montoya *et al.* , 2002).**

## 5. Dynamique d'un lymphocyte avant et après rencontre de DC

Le répertoire des LT est composé d'au moins  $10^9$  spécificités différentes de récepteurs, chacun possède une spécificité différente pour l'antigène (Arstila *et al.* , 1999). Confronté à la faible fréquence de chacun des 2 partenaires (cellules dendritiques et lymphocyte T), le système immunitaire a différentes stratégies pour augmenter la fréquence de ces rencontres. Plusieurs hypothèses faisant intervenir l'action du microenvironnement et notamment de gradients de chimiokines ont été proposées pour expliquer la rencontre de ces 2 types cellulaires.

Récemment, de nombreuses études utilisant la microscopie confocale biphotonique appliquée à l'observation de cellules vivantes au sein de ganglions lymphatiques explantés (Bouso & Robey. , 2003, Miller *et al.* , 2002, Miller *et al.* , 2004, Stoll *et al.* , 2002) ou encore en connexion avec la

circulation. Millet et coll. ont éclairé d'un jour nouveau ces premières étapes de l'activation (Mempel *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2003). Toutes ces études montrent en effet que les LT ont un comportement très différent selon qu'ils rencontrent ou non des DC présentant l'antigène spécifique.



**Figure 23 : Dimensions des molécules impliquées dans la formation de la zone privilégiée. D'après (Anton van der Merwe *et al.*, 2000)**

En l'absence d'antigène spécifique, les LT sont en effet extrêmement mobiles (10-12  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), leurs trajectoires sont aléatoires et indépendantes d'un LT à un autre (Figure 23). Les DC sont présentes à la sortie des veinules post-capillaires, porte d'entrée des LT naïfs dans le ganglion, leur vitesse est plus faible ( $<6\mu\text{m}/\text{min}$ ) et elles émettent de longues dendrites. La durée des interactions LT/DC est très courte, de l'ordre de la minute (Miller *et al.*, 2004). Tous ces paramètres permettent un maximum de contacts LT/DC. Ainsi, les estimations du nombre de LT contacté par une DC en une heure sont comprises entre 500 (Bousso & Robey., 2003) et 5000 (Miller *et al.*, 2004). Si l'on se base sur une fréquence de LT spécifique d'un antigène donné de l'ordre de  $1/10^5$  dans la population naïve (Blattman *et al.*, 2002), on peut estimer que 200 DC présentant un pCMH de spécificité donnée suffisent pour détecter et activer une cellule naïve spécifique de ce pCMH par heure.

Lorsque l'antigène est présent la situation est tout à fait différente (Figure 24). Mempel et Coll. suggèrent de subdiviser le temps passé par le LT dans le ganglion en 3 phases distinctes qui correspondent globalement au schéma observé dans les autres études (Mempel *et al.*, 2004).

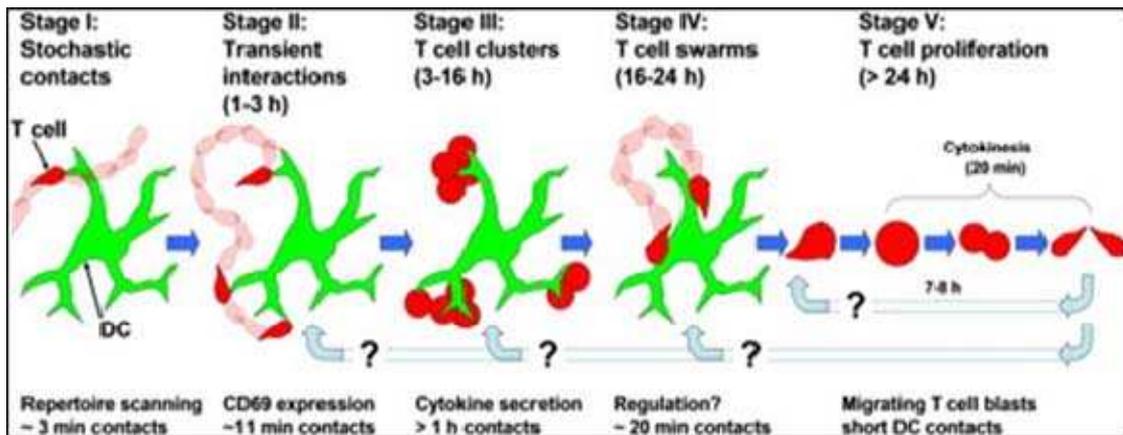


Figure 24 : Les différentes phases de l'activation des lymphocytes T in vivo. D'après (Miller *et al.* , 2004).

- La première phase dure entre 3 (Miller *et al.* , 2004) et 8 heures (Mempel *et al.* , 2004) et suit l'entrée dans le ganglion. Au cours de cette phase, la vitesse des LT diminue progressivement de 10 à 4 $\mu$ m/min. Les LT établissent de brefs contacts (de l'ordre de la minute) avec de nombreuses DC, cependant contrairement à ce que l'on observe *in vitro*, il n'y a pas d'arrêt et donc probablement pas de synapse mature. On peut quand même observer l'augmentation d'expression membranaire de certains marqueurs d'activation comme CD69 ou CD44 (Mempel *et al.* , 2004, Stoll *et al.* , 2002), par contre la production de cytokine comme l'IL-2 ou l'IFN- $\gamma$  reste faible (Mempel *et al.* , 2004).

- Au cours de la 2<sup>ème</sup> phase, les LT établissent des contacts prolongés avec les DC (de l'ordre de plusieurs heures) (Mempel *et al.* , 2004, Stoll *et al.* , 2002). L'activation semble être complétée à cette étape avec l'acquisition de la capacité à sécréter des cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ ). C'est à cette étape qu'une synapse immunitaire stable semble pouvoir se former. En effet, certains auteurs ont montré que l'interaction LT/APC s'organisait en synapse immunologique, avec polarisation de molécules membranaires (TCR, LFA-1) ainsi que de la sécrétion de cytokines (IL-2, Perforine) et exclusion de certaines molécules (CD43) de manière similaire à ce qui avait été décrit *in vitro* (McGavern *et al.* , 2002, Reichert *et al.* , 2001, Stoll *et al.* , 2002).

- Enfin au cours de la troisième phase (une vingtaine d'heures après l'entrée dans le ganglion), les LT se détachent des DC et les premières divisions cellulaires ont lieu (Mempel *et al.* , 2004, Miller *et al.* , 2002, Miller *et al.* , 2004). Les LT retrouvent en partie leur mobilité (6-9 $\mu$ m/min) avant de quitter le ganglion et de rejoindre la circulation (Mempel *et al.* , 2004). Le détachement est progressif et certains auteurs décrivent des « essais » de LT restant à proximité de la DC activatrice (Miller *et al.* , 2002, Miller *et al.* , 2004).

D'autres paramètres, non pris en compte lors de ces études utilisant des populations homogènes de LT transgéniques pour le TCR, vont probablement contribuer à nuancer ces premières études. La compétition entre clones de plus ou moins forte affinité pour un pCMH donné peut ainsi réduire la disponibilité de ce pCMH (Kedl *et al.* , 2002) et raccourcir certaines des phases décrites ci-dessus. L'intervention d'autres types cellulaires capables de moduler l'activation des LT, tels que les lymphocytes T régulateurs ou les LT CD4 helper ou auxiliaires, pourrait aussi intervenir pour moduler les interactions LT/DC (Castellino *et al.* , 2006, Tadokoro *et al.* , 2006, Tang & Krummel. , 2006).

## **6. Marqueurs membranaires d'activation**

Outre l'expression des molécules de co-stimulation, l'activation du LT se traduit par l'expression d'autres molécules qui sont également utilisées comme marqueurs d'activation : CD69, et CD25.

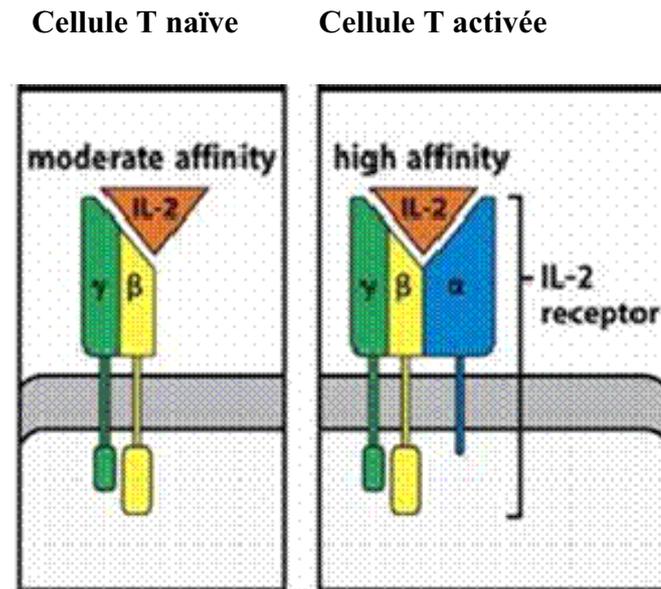
### **6.1. CD69 marqueur précoce d'activation**

CD69, est la molécule la plus précocement induite. Elle n'est exprimée que lorsque l'activation est faite par le TCR, la PHA ou un anti-CD3-et sa liaison à un ligand contribuerait à l'amplification de l'activation du LT via l'afflux de calcium, la synthèse de différentes cytokines et de leurs récepteurs (Testi *et al.* , 1989). Son ligand n'est pas clairement identifié mais le CD69 est une lectine. Il pourrait se lier à une glycoprotéine exprimée sur la CPA.

### **6.2. CD25 marqueur tardif d'activation**

CD25 (récepteur de l'IL2) est composé de trois chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Figure 25). Les lymphocytes T au repos expriment un récepteur composé des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  qui fixe l'IL-2 avec une faible affinité, il permet aux lymphocytes T au repos de répondre aux fortes concentrations d'IL2.

L'association de la chaîne  $\alpha$  avec les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  forme un récepteur de plus haute affinité pour l'IL2 ce qui permet à la cellule de répondre à de très faibles concentrations d'IL2 (Taniguchi & Minami. , 1993).



**Figure 25 : Schéma représentant le récepteur de l'interleukine-2 avant et après activation. Immunobiology, 7ed. (© Gerland Science 2008).**

Le CD25 est très peu exprimé par les LT CD8<sup>+</sup> sur des courtes activations contrairement aux LT CD4. En revanche, *in vitro* après stimulation non spécifique, les LT CD8<sup>+</sup> augmentent l'expression de CD25 (Shahabuddin. , 1991).

### **6.3. Rôle de l'interleukine-2 dans l'activation des lymphocytes T**

Les LT CD4<sup>+</sup> ont longtemps été considérés comme les acteurs clés pour l'obtention d'activation efficace. Or, une étude récente a montré que les LT CD4<sup>+</sup> n'étaient pas indispensables pour l'expansion des LT CD8<sup>+</sup>. En revanche, il a été montré qu'ils jouaient un rôle clé dans le maintien de la mémoire (Shedlock & Shen. , 2003, Sun *et al.* , 2004, Zajac *et al.* , 1998). L'IL2 constitue une cytokine importante pour l'expansion des LT CD8<sup>+</sup>. La synthèse de l'IL2 est majoritairement le fait des LT CD4<sup>+</sup> constituant ainsi la fonction «auxiliaire » CD4<sup>+</sup>. Cependant, les LT CD8<sup>+</sup> sont également capables de sécréter de l'IL2 en quantité beaucoup moins importante (Kaech & Ahmed. , 2001), générant ainsi une boucle autocrine pour amplifier leur expansion (Figure 26).

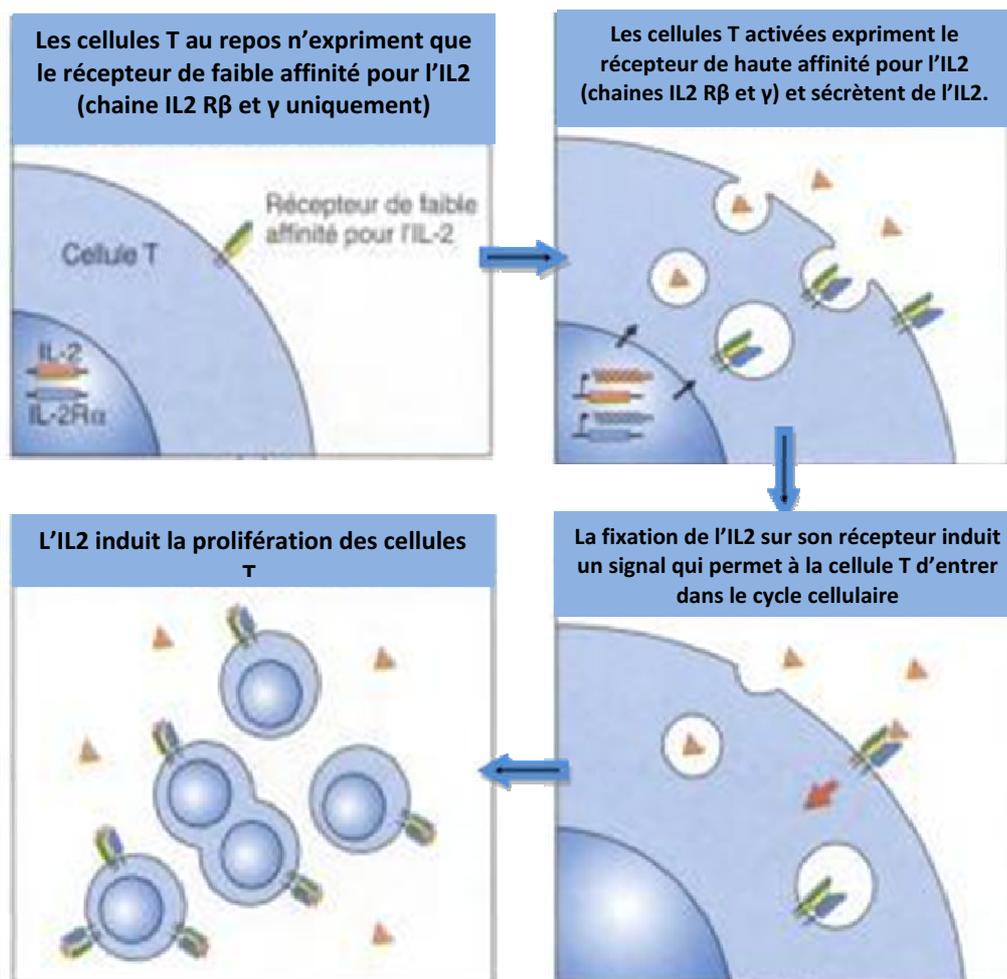


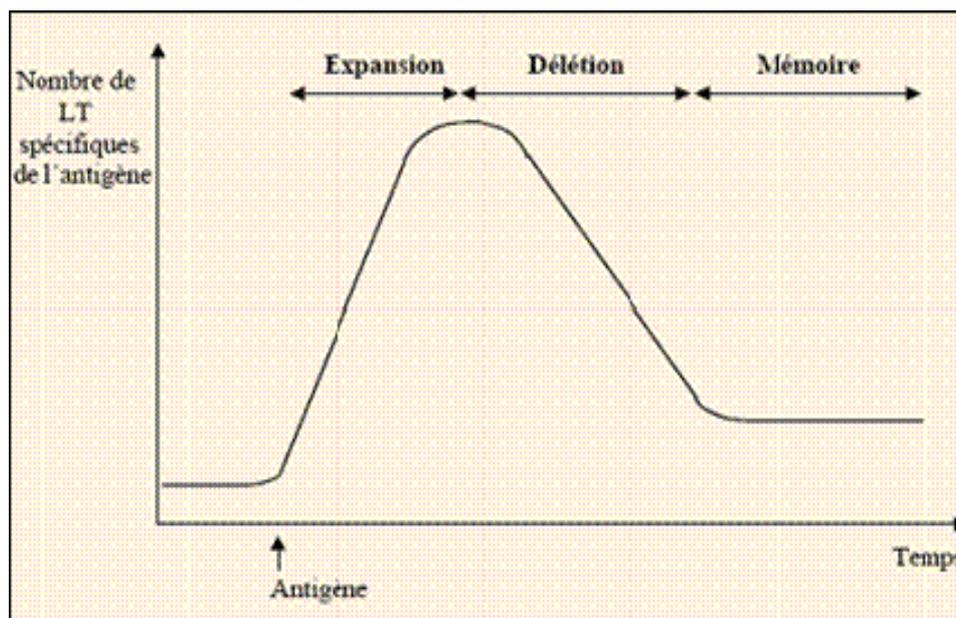
Figure 26 : Rôle autocrine de l'interleukine-2 dans l'activation des lymphocytes T. D'après Immunobiology, 7ed. (© Gerland Science 2008).

## 7. Les conséquences de l'activation : l'expansion clonale

L'une des conséquences majeure de l'activation des LT spécifiques de l'Ag est l'induction d'une forte expansion. Vingt-quatre heures suivant l'activation par la DC, le LT enclenche une série de divisions rapides (toutes les 6 à 8 heures) au cours desquelles l'interphase est réduite à son minimum. Cette étape conduit à augmenter dans des proportions considérables le nombre de LT spécifiques de l'Ag. L'exemple le mieux caractérisé est celui de l'expansion induite par le virus LCMV qui conduit les LT CD8 naïfs spécifiques (Blattman *et al.*, 2002) à se diviser une vingtaine de fois pour à partir d'une centaine de cellule générer 20 millions de LT CD8 effecteurs dans les 8 jours qui suivent l'infection (Murali-Krishna *et al.*, 1998) (figure 27).

Plusieurs études ont suggérées que cette phase de différenciation s'effectuerait de façon programmée. Après une courte stimulation, les LT entrent en prolifération et effectuent 7 à 8 divisions au minimum quelque soit le niveau d'activation initial, sur plusieurs jours peut se dérouler en l'absence de nouveaux contacts avec l'Ag (Kaech & Ahmed, 2001, Mercado *et al.*, 2000, van Stipdonk *et al.*, 2001, Wong *et al.*, 2001). Le nombre de divisions effectuées ne

semble proportionnel ni à la quantité d'Ag ni à la durée du signal antigénique initial. Kaech et coll. ont montré ainsi qu'un faible nombre de DC présentant l'Ag ne va pas induire un nombre de divisions plus faible des LT mais va induire la prolifération d'un plus faible nombre de cellules spécifiques (Kaech & Ahmed. , 2001). D'autre part, van Stipdonk et coll. ont montré que 2 heures de contact entre le LT CD8 et l'APC suffisaient à induire une forte prolifération (van Stipdonk *et al.* , 2001). Ces études ont conduit à proposer l'hypothèse d'une différenciation en « autopilote<sup>10</sup> ».



**Figure 27 : Les trois phases de la réponse immune.** Dans le cas des réponses T CD8 contre un virus tel que LCMV chez la souris, le pic de l'expansion a lieu au jour 7-8. Le pourcentage de cellules spécifiques du virus parmi les LT CD8 est alors d'environ 50%. La phase de délétion est progressive et dure environ 3 semaines. Au cours de celle-ci environ 95% des LT CD8 spécifiques seront délévés tandis que les autres seront maintenus toute la durée de vie de la souris sous forme de LT Cd8 mémoire. (Blattman *et al.* , 2002).

Il faut cependant nuancer cette vision. Ainsi, *in vivo*, l'étude de la réponse dirigée contre la bactérie *Listeria monocytogenes* montre que l'expansion des LT CD8 n'est optimale qu'après un temps minimum de présence de la bactérie de 24 heures, un temps d'infection de 12 heures produisant une réponse réduite de moitié (Mercado *et al.* , 2000). Ces données sont en accord avec les données de microscopie intravivante montrant une interaction ferme du LT à l'APC au cours des 20 premières heures puis la dislocation de ces complexes au moment des premières divisions du LT. D'autre part, les études précédentes utilisent des systèmes de stimulations pour lesquels la costimulation et la quantité de pCMH sont optimales. Au contraire lorsque la stimulation ne l'est pas, des LT entrés en division peuvent arrêter leur cycle de prolifération après 1 à 5 divisions (Hernandez *et al.* , 2001).

<sup>10</sup> Développement d'une réponse programmée, et identique d'une cellule à une autre, suite à une rencontre unique et brève avec l'antigène

## 8. Rôle des cytokines dans l'expansion clonale :

Après l'activation, plusieurs cytokines pourraient aussi contribuer à réguler la survie des cellules produites. L'IL2 semblait être un candidat idéal, en effet, son expression ainsi que celle de la chaîne  $\alpha$  de son récepteur (IL2R $_{\alpha}$  ou CD25) sont induites lors de l'activation et augmentées par l'engagement de la molécule de costimulation CD28 (Chen *et al.* , 1998, Maxwell *et al.* , 2004), ce qui permettrait une régulation de l'expansion des LT de façon autocrine. De plus, on sait que l'IL-2 peut inhiber l'apoptose de LT activés (Vella *et al.* , 1998) en induisant l'expression de gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl2 comme cela a été montré *in vitro* et *in vivo* (Adachi *et al.* , 1996). Cependant, si l'IL2 est clairement nécessaire à l'activation des LT *in vitro*, son rôle *in vivo* est beaucoup plus controversé.

L'IL-15, dont le récepteur est constitué d'une chaîne  $\alpha$  propre et des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  en commun avec le récepteur de l'IL2, pourrait aussi intervenir dans la régulation du nombre de cellules au pic de la réponse en diminuant le seuil d'activation des LT (Schluns *et al.* , 2002). Plus récemment la régulation de l'expansion des LT par d'autres cytokines a été proposée. Une étude du groupe de Harty montre notamment que des signaux liés à l'inflammation et présents au moment de l'activation contribuent à augmenter le nombre de LT effecteurs au pic de la réponse (Badovinac *et al.* , 2004). L'effet positif de l'inflammation sur la prolifération des LT est connu, cependant, on pensait jusqu'à présent qu'il passait essentiellement par la DC en induisant l'expression de molécules de costimulation. Or Kolumam et Coll. ont montré que les IFN de type I (IFN- $\alpha$  et  $\beta$ ), qui sont massivement produits au cours de l'inflammation, agissaient directement sur les LT CD8 pour potentialiser leur expansion et ceci dans divers systèmes d'immunisation *in vivo* (Kolumam *et al.* , 2005). D'autres études suggèrent que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  pourrait elle aussi agir directement sur les LT CD8 et augmenter leur nombre lors d'une infection par le virus LCMV (Badovinac & Harty. , 2000, Whitmire *et al.* , 2005). Cependant, d'autres études suggèrent un rôle inhibiteur de l'IFN- $\gamma$  comme par exemple lors de la réponse contre *Listeria* (Badovinac & Harty. , 2000, Whitmire *et al.* , 2005).



## VII. Modélisation de la réponse immunitaire

A l'heure actuelle, de nombreuses parties des mécanismes biologiques ont été (partiellement) élucidées, y compris dans le domaine de l'immunologie et de la virologie. Cependant ces connaissances restent parcellaires et souffrent du fait que selon les modèles d'études, on retrouve parfois une grande hétérogénéité dans les résultats. De plus, même si nous avons une connaissance qualitative de systèmes biologiques, nous disposons encore trop rarement des données quantitatives qui seraient pourtant d'une aide précieuse dans l'élaboration des thérapies mieux adaptées. D'une manière générale, nous avons accès à une connaissance figée. Or, la biologie est par essence une science du mouvement, l'évolution se construit au fil des interactions avec l'environnement. Il manque à l'heure actuelle une vision plus intégrée et dynamique des systèmes biologiques en général. La tendance actuelle, pour contourner la complexité du système, est l'approche réductionniste, par dissection très détaillée et précise des très petites parties du système.

Depuis de nombreuses années déjà, la modélisation mathématique est employée pour formaliser la dynamique de système biologique, comme elle le fait pour comprendre et anticiper des systèmes mécaniques ou chimiques complexes, et de plus en plus, l'interdisciplinarité apporte de nouvelles pistes.

Dans la littérature, nous constatons un intérêt à la modélisation mathématique de la dynamique des épidémies (Matthews & Woolhouse. , 2005). De plus en plus d'études permettent aux virologues d'avoir une vision plus intégrée de leurs modèles infectieux. Les virus les plus modélisés sont le HIV, le HBV (Hépatite B virus), le HCV (Hépatite C virus) et dans une moindre mesure, les virus influenza et le HTLV (Human T-lymphotropic virus). La plupart des études sont menées sur des virus qui persistent au sein de l'organisme et l'intérêt premier de la modélisation est de mieux quantifier voir d'anticiper l'effet de certaines molécules thérapeutiques.

La plupart des modèles utilisent des systèmes d'équations différentielles ordinaires (EDO). Chaque étape se traduit par une équation différentielle qui décrit la variation temporelle de chaque quantité ou concentration.

La résolution est très compliquée par l'interaction entre les différents systèmes et le jeu des différents variables cinétiques et valeurs initiales. Les résultats ne peuvent pas être devinés intuitivement mais une résolution informatique permet de simuler les cinétiques des différentes variables et les effets de modification des variables.

Ce système d'équations différentielles et ceux qui en découlent (en ajoutant d'autres variables...) peuvent parfois être résolus de manière analytique et on obtient alors des solutions littérales : sommes produits, composées de diverses fonctions mathématiques. La plupart du temps, les systèmes d'EDO n'acceptent pas de solutions littérales évidentes, et le seul recours est alors une résolution numérique. Le résultat se traduit alors par des fichiers de données et des courbes.

Nous nous sommes intéressés à la cinétique (en fonction du temps) de chacune des variables qui nous intéressent selon la valeur au temps initial. Les équations permettent de définir la valeur à un temps donné en fonction de l'état précédant immédiatement. De proche en proche, on trace les différentes courbes représentant l'évolution de ces variables. Les paramètres sont des inconnues auxquelles, on va donner différentes valeurs jusqu'à obtenir des courbes en accord avec les résultats expérimentaux. Cette étape d'ajustement ou d'identification peut être automatisée et différents algorithmes permettent de faire une recherche de paramètres relativement efficace.

Dans notre étude, nous avons modélisé (sous plusieurs variantes) le processus d'activation du lymphocyte T. Pour écrire ce modèle, nous nous sommes basés sur la cinétique chimique, et avons utilisé des schémas réactionnels chimiques pour décrire les relations entre les différents états des protéines lymphocytaires T. Ces schémas ont été traduits en systèmes d'équations différentielles ordinaires (EDO), et le logiciel Matlab utilisé pour la résolution numérique.

## **1. Modélisation de l'activation lymphocytaire T**

Le niveau de la réponse immunitaire est le résultat de l'interaction entre le complexe TCR-pCMH et les molécules accessoires. Le model « Proofreading » (Coombs *et al.* , 2002, Hlavacek *et al.* , 2002, McKeithan. , 1995, Rosette *et al.* , 2001) propose que plusieurs étapes de la transduction du signal doivent être accomplies de façon séquentielle afin de parvenir à un point de non retour.

La durée de la liaison pourrait également être limitante (« Kinetic determination ») (Davis & van der Merwe. , 2006, Lord *et al.* , 1999, Rabinowitz *et al.* , 1996), et l'activation doit atteindre le seuil de déclenchement dans une période de temps limitée pour être efficace (Bitmansour *et al.* , 2002, Kalergis *et al.* , 2001, Tanchot *et al.* , 2001, Waldrop *et al.* , 1998). Ces hypothèses sont probablement complémentaires mais pas suffisantes.

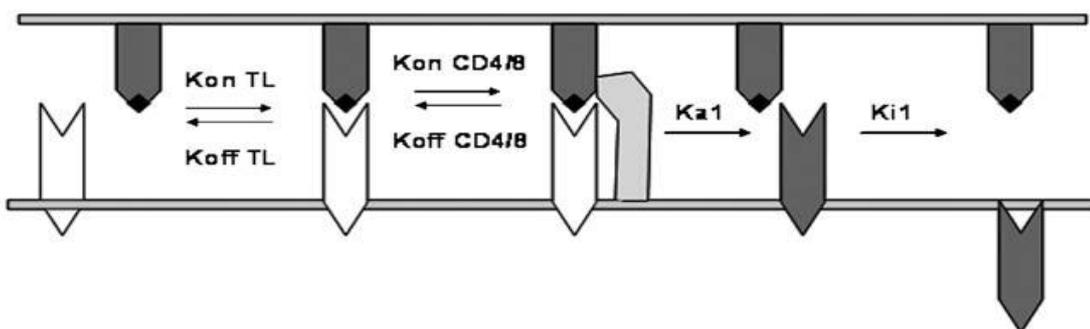
La cinétique d'activation des lymphocytes T résulte de la combinaison de plusieurs interactions biochimiques dont le comportement complexe est difficile à prédire sans l'aide d'un ordinateur (McNeil & Evavold. , 2003, Savage *et al.* , 1999).

Quelques chercheurs ont utilisé une assistance mathématique pour tester les hypothèses physiologiques de l'activation lymphocytaire T (Kim *et al.* , 2005, Krummel *et al.* , 2000, Lord *et al.* , 1999, Sousa & Carneiro. , 2000) ou pour l'étude de la dynamique de la population globale sous une activation non spécifique (Borisova & Kuznetsov. , 1997, Borisova *et al.* , 1998, Sidorov & Romanyukha. , 1993) . Des systèmes d'équations différentielles ont été aussi utilisés pour étudier la cinétique des interactions avec une approche mathématique (Carneiro *et al.* , 1996, Leon *et al.* , 2001).

Notre modèle a été réalisé afin d'approcher la cinétique d'activation spécifique à un seul (monoclonal) lymphocyte T, de la reconnaissance des peptides jusqu'à la décision de division cellulaire *in vivo* chez l'homme (Wigginton & Kirschner. , 2001). Chaque étape implique des interactions entre protéines, d'où le choix des lois de la thermodynamique et de la cinétique. Le modèle a été testé en utilisant des paramètres (cinétiques ou thermodynamiques) estimés à partir de données rapportées de la littérature. Nous le rappelons dans les paragraphes suivants.

## 2. Schémas réactionnels

Les différentes étapes physiologiques d'activation des lymphocytes T ont été transformées en système d'équations cinétiques, en se basant sur l'interaction ligand/récepteur (Figure 28), en considérant un lymphocyte T spécifique et un seul complexe peptide-CMH. La définition et les noms des variables et paramètres cinétiques utilisés sont listés dans les tableaux 2 et 3.



**Figure 28 : Présentation de l'antigène.** Dans la synapse immunologique, les cellules présentatrices d'antigène (APC) présentent le complexe p-CMH aux lymphocytes T. D'autres TCR viennent en face du complexe p-CMH. D'autres protéines comme le CD28 et le CD69 se lie à d'autres ligands sur les APC (CD80 et CD69L), par la phosphorylation le signal va au noyau des lymphocytes T. les LT produisent les cytokines (IL-2), et les récepteurs de ses cytokines. Ces événements mènent à l'activation et à l'expansion clonale des LT (Bidot *et al.* , 2008).

Qui	Quoi	Où	Unité
T	Récepteur du lymphocyte T	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
S	TCR à l'extérieur de la synapse	Hors synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
TL	Complexes TCR/p-CMH	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
TL*	Complexes TCR/p-CMH activés	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
T*	TCR activés	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
T <sup>*i</sup>	TCR activés internalisés	Synapse	Mol.m <sup>-3</sup>
CD28	Protéine CD28 dans la synapse	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
CD28 <sub>hs</sub>	Protéine CD28 hors synapse	Hors synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
CD28-CD80	Complexe CD28/CD80	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
CD28*	CD28 activés	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
CD28 <sup>*i</sup>	CD28 activés internalisés	A l'intérieur du lymphocyte T	Mol.m <sup>-3</sup>
CD69	Protéine CD69	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
CD69/CD69L	Complexe CD69/CD69L	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
CD69*	CD69 activés	Synapse	Mol.m <sup>-2</sup>
CD69 <sup>*i</sup>	CD69 activés internalisés	Synapse	Mol.m <sup>-3</sup>
IL2R <sub>M</sub>	Récepteur membranaire de l'IL2	Lymphocyte T	Mol.m <sup>-2</sup>
IL2R <sub>S</sub>	Récepteur soluble de l'IL2	A l'extérieur du lymphocyte T	Mol.m <sup>-3</sup>
IL2	Interleukine 2	A l'extérieur du lymphocyte T	Mol.m <sup>-3</sup>
IL2-IL2R <sub>S</sub>	Complexe IL2-IL2R <sub>S</sub>	A l'extérieur du lymphocyte T	Mol.m <sup>-3</sup>
IL2-IL2R <sub>M</sub>	Complexe IL2-IL2R <sub>M</sub>	A l'extérieur du lymphocyte T	Mol.m <sup>-2</sup>
IL2-IL2R <sub>M</sub> *	Complexe IL2-IL2R <sub>M</sub> activé	Lymphocyte T	Mol.m <sup>-2</sup>
IL2-IL2R <sub>M</sub> <sup>*i</sup>	Complexe IL2-IL2R <sub>M</sub> activé internalisé	Lymphocyte T	Mol.m <sup>-3</sup>

**Tableau 2 : Définition des variables utilisées dans notre modèle. Ce qu'elles représentent, où se localisent-elles, et qu'elles sont leurs unités. D'après (Bidot *et al.*, 2008).**

Paramètres	Description	unité
$k_{onTL}$	constante d'association du TCR avec le p-CMH	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{offTL}$	constante de dissociation du TCR avec le p-CMH	$s^{-1}$
$s$	renouvellement des TCR en surface	$s^{-1}$
$\varphi$	échange entre les populations de TCR hors synapse, et dans la synapse	$s^{-1}$
$k_1$	constante de production des TCR en présence de IL2-IL2R* <sup>i</sup>	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$\lambda$	rapport entre les surfaces de la synapse et hors de la synapse	
$k_2$	constante de production des TCR en présence de IL2-IL2R* <sup>i</sup> <sub>M</sub>	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{onCD4/8}$	constante d'association du CD4 (ou CD8) avec le CMH	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{offCD4/8}$	constante de dissociation du CD4 (ou CD8) avec le CMH	$s^{-1}$
$k_{a1}$	constante d'activation (en fait dissociation du TCR activé avec le p-CMH)	$s^{-1}$
$k_{i1}$	constante d'intériorisation du TCR activé	$s^{-1}$
$k_{i1}^v$	constante d'intériorisation du TCR activé	$m^{-1} \cdot s^{-1}$
$K_{m1}$	Constante de production de CD69	$s^{-1}$
$K_{m2}$	Constante de production de l'IL2R <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$K_{m3}$	Constante de production de l'IL2	$s^{-1}$
$K_{p1}$	Constante de production de CD69 en présence de CD28	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$K_{p2}$	Constante de production de l'IL2R <sub>M</sub> en présence de CD28	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$K_{d1}$	Constante de dégradation de T* <sup>i</sup>	$s^{-1}$
$s'$	renouvellement des CD28 en surface	$s^{-1}$
$\varphi$	échange entre les populations de CD28 hors synapse, et dans la synapse	$s^{-1}$
$k_{onCD28}$	constante d'association du CD28 avec le CD80	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{offCD28}$	constante de dissociation du CD28 avec le CD80	$s^{-1}$
$k_{f2}$	constante de formation de CD28*,	$s^{-1}$
$k_{i2}^v$	constante d'intériorisation de CD28*	$m^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{d2}$	constante de dégradation de CD28* <sup>i</sup>	$s^{-1}$
$k_{m1}^s$	constante de production de CD69	$m \cdot s^{-1}$
$k_{p1}^s$	constante de production de CD69 en présence de CD28	$m^4 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{p'1}$	constante de production de CD69 en présence de IL2-IL2R* <sup>i</sup> <sub>M</sub>	$m \cdot s^{-1}$
$k_{onCD69}$	constante d'association du CD69 avec le CD69L	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{offCD69}$	constante de dissociation du CD69 avec le CD69L	$s^{-1}$
$k_{e1}$	constante d'élimination du CD69	$s^{-1}$
$k_{f3}$	constante de formation de CD69*	$s^{-1}$
$k_{i3}$	constante d'intériorisation de CD69*	$s^{-1}$
$k_{i3}^v$	constante d'intériorisation de CD69*	$m^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{p3}$	constante de production de l'IL-2	$s^{-1}$
$k_{d3}$	constante de dégradation de CD69* <sub>i</sub>	$s^{-1}$
$k_{m2}^s$	constante de production de IL2R <sub>M</sub>	$m \cdot s^{-1}$

$k_{p2}^s$	constante de production de IL2R <sub>M</sub> en présence de CD28	$m^4 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{p2}$	constante de production de IL2R <sub>M</sub> en présence de IL2-IL2R <sup>*i</sup> <sub>M</sub>	$m \cdot s^{-1}$
$k_{onIL2m}$	constante d'association du IL2R <sub>M</sub> avec l'IL-2	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{offIL2m}$	constante de dissociation du IL2R <sub>M</sub> avec l'IL-2	$s^{-1}$
$k_{f5}$	constante de formation de IL2R <sub>S</sub>	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{e2}$	constante de disparition de IL2R <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$k_{f5}^e$	constante de formation de IL2R <sub>S</sub>	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{onIL2s}$	constante d'association du IL2R <sub>S</sub> avec l'IL-2	$m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{offIL2s}$	constante de dissociation du IL2R <sub>S</sub> avec l'IL-2	$s^{-1}$
$k_{e3}$	constante de disparition de IL2R <sub>S</sub> ,	$s^{-1}$
$k_{m3}^e$	constante de production de l'IL-2 par consommation de T <sup>i</sup>	$s^{-1}$
$k_{p3}^e$	constante de production de l'IL-2 par consommation de CD69 <sup>i</sup>	$s^{-1}$
$k_{p3}$	constante de production de l'IL-2 en présence de IL2-IL2R <sup>i</sup> <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$k_{onIL2m}^e$	constante d'association du IL2R <sub>M</sub> avec l'IL-2	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{offIL2m}^e$	constante de dissociation du IL2R <sub>M</sub> avec l'IL-2	$m^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{e4}$	constante d'élimination de l'IL-2	$s^{-1}$
$k_{e5}$	constante d'élimination de IL2-IL2R <sub>S</sub>	$s^{-1}$
$k_{f4}$	constante de formation de IL2-IL2R <sup>*</sup> <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$k_{i4}$	constante d'intériorisation de IL2-IL2R <sup>*</sup> <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$k_{i4}^v$	constante d'intériorisation de IL2-IL2R <sup>*</sup> <sub>M</sub>	$m^{-1} \cdot s^{-1}$
$k_{f5}^v$	constante de formation de IL2R <sub>S</sub>	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$K^v_1$	constante de production des TCR en présence de IL2-IL2R <sup>*i</sup> <sub>M</sub>	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k^v_2$	constante de production des TCR en présence de IL2-IL2R <sup>*i</sup> <sub>M</sub>	$m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$
$k^v_{p1}$	constante de production de CD69 en présence de IL2-IL2R <sup>*i</sup> <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$k^v_{p2}$	constante de production de IL2R <sub>M</sub> en présence de IL2-IL2R <sup>*i</sup> <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$k^v_{p3}$	constante de production de l'IL-2 en présence de IL2-IL2R <sup>*i</sup> <sub>M</sub>	$s^{-1}$
$k_{d4}$	constante de dégradation de IL2-IL2R <sup>*i</sup> <sub>M</sub>	$s^{-1}$

**Tableau 3 : Paramètres cinétiques du modèle d'activation du lymphocyte T. D'après (Bidot *et al.* , 2008).**

Pour une même protéine, chacun des états définis précédemment découle d'un autre. Le passage d'un état à l'autre pour les protéines est schématisé (figure 29)

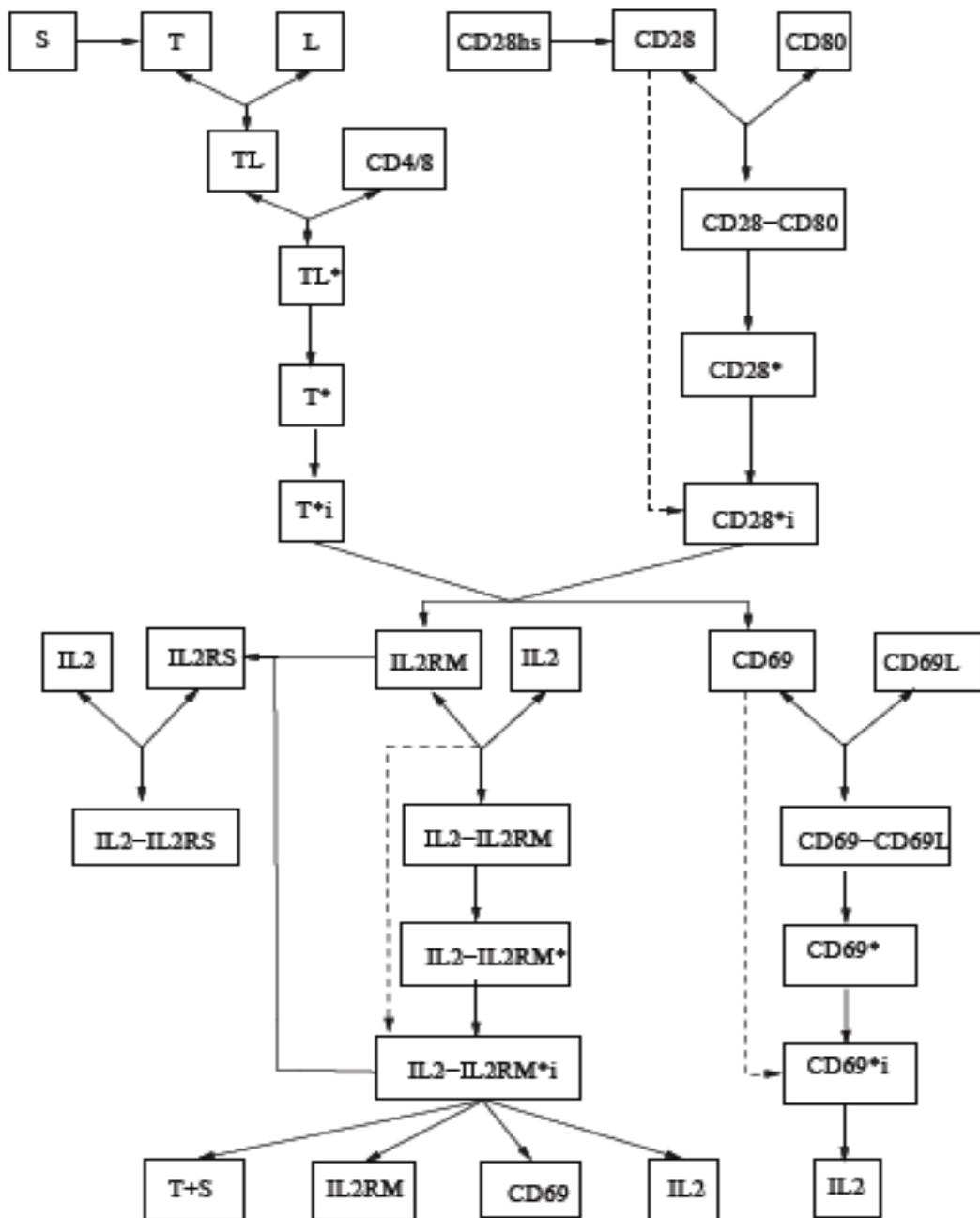


Figure 29 : Processus d'activation du lymphocyte T : relation entre les différents états des protéines. D'après (Bidot *et al.*, 2008).

### 3. Ecriture des équations

Le schéma réactionnel (figure 29), est transformé en système d'équations différentielles ordinaires (EDO), chacune décrivant la variation au cours du temps des concentrations en protéines (en se basant sur le formalisme de la cinétique chimique).

Ainsi, la variation de la concentration d'une protéine, au cours du temps correspond à la somme de ce qui a été créé moins ce qui a été utilisé. L'étape de diffusion (certaines protéines peuvent se déplacer sur la membrane) est traitée, après linéarisation et partage en zones comme une loi cinétique. Pour le détail de l'écriture des équations le lecteur pourra se reporter à l'article de Bidot (Bidot *et al.*, 2008).

#### 4. Variantes du modèle d'activation

Le système d'EDO obtenu, en considérant toutes les protéines et leurs associations définies précédemment (tableau 2), est composé de 22 équations. Ce système sera désigné sous le terme de « modèle complet ». Nous pouvons soit réduire les étapes considérées lors du processus d'activation, et obtenir un modèle « simplifié », soit en ajouter.

Modèle	Taille	Description
<b>Complet</b>	<b>22EDO</b>	Processus d'activation du lymphocyte T, avec pour variables les protéines TCR, CD28, CD69, IL-2, IL-2R, dans les états libres, liées avec le ligand, activées et intériorisées
<b>Simplifié</b>	<b>15EDO</b>	Processus d'activation du lymphocyte T, avec pour variables les protéines TCR, CD28, CD69, IL-2 et IL-2R, dans les états libres, intériorisées (sauf pour le TCR pour lequel sont considérés plus d'états). Utilisation de moins d'étapes que dans le modèle « complet »
<b>Avec 1 protéine supplémentaire</b>	<b>27EDO</b>	Processus d'activation du lymphocyte T, avec pour variables les protéines TCR, CD28, CD69, IL2, IL-2R et CDx, dans les états libres, liées avec le ligand, activées et intériorisées. Utilisation d'une protéine co-activatrice supplémentaire (CDx) par rapport au modèle « complet »
<b>Avec [L] et [CD4/8] variables</b>	<b>24EDO</b>	Processus d'activation du lymphocyte T, avec pour variables les protéines TCR, L(p-CMH), CD4(ou CD8), CD28, CD69, IL-2 et il-2R, dans les états libres, liées avec le ligand, activées et intériorisées. Utilisation de [L] et [CD4/8] comme variables, alors qu'elles sont constantes dans le modèle « complet »

Tableau 4 : variantes du modèle d'activation du lymphocyte T

Le tableau 4 récapitule les différentes variantes du modèle d'activation du lymphocyte T décrites dans le travail de (Bidot *et al.* , 2008).

Le modèle complet sera considéré comme le modèle de référence pour les futures modélisations.

## **5. « Modaly\_T », un programme pour la résolution numérique des modèles d'activation T**

La thèse de C.Bidot a conduit à l'élaboration d'une interface homme/machine (figure 30), accessible sous Matlab par la commande Modaly\_T, afin de faciliter la résolution numérique du modèle d'activation lymphocytaire T.

Cette interface permet à l'utilisateur de choisir quelle variante d'activation T il souhaite étudier, et de renseigner les différents paramètres du modèle, comme :

- l'état initial des deux cellules en jeu (lymphocyte T et CPA),
- les constantes d'association ( $k_{on}$ ) ou de dissociation ( $k_{off}$ ) entre les protéines,
- les vitesses d'intériorisation des protéines activées ( $k_i$ )...

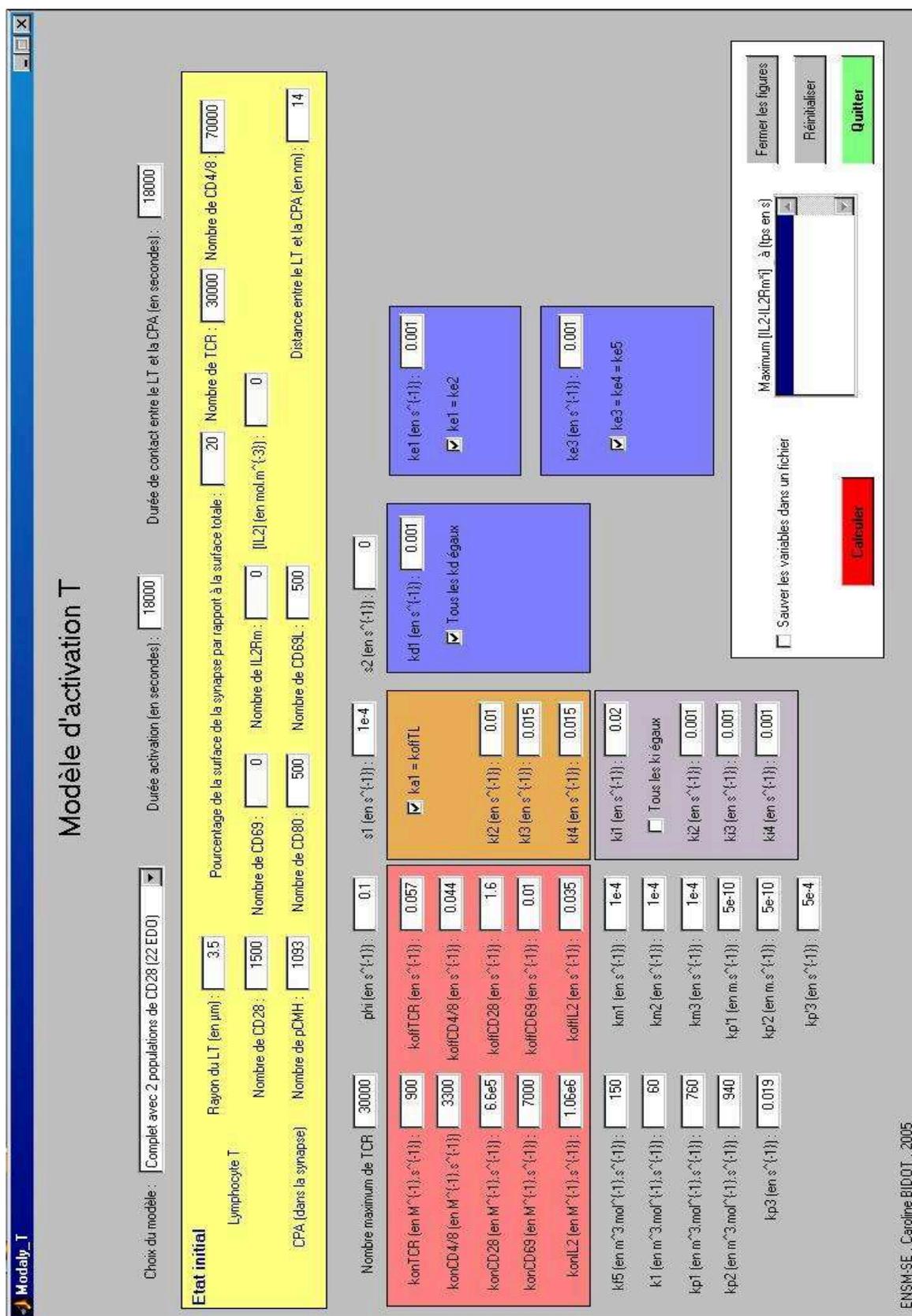


Figure 30 : Interface du programme Modaly\_T.

## 6. Point de vue sur la bibliographie

L'approche mathématique de la réponse immunitaire a été tentée par des voies différentes que nous avons détaillées :

Nous avons abordé ici les travaux de 5 écoles:

- le groupe de Coombs (Los Alamos)
- le groupe de Chakraborty (Berkeley)
- le groupe de Dushek (university of british columbia)
- Le groupe d'Arhipov (university of Pittsburgh)
- Le groupe d'Arnacha Casal (Stanford university)

### 6.1. Groupe de Coombs

Ces auteurs ont considéré deux mécanismes compétitifs : le « kinetic proofreading » et le « serial engagement ». L'article de référence est l'article de Coombs et coll. (Coombs *et al.* , 2002), ils modélisent uniquement l'étape très précoce du processus de formation du complexe TCR-pCMH jusqu'à l'intériorisation du TCR.

Leur modèle se présente sous forme d'équations différentielles qui décrivent la variation en fonction du temps des concentrations du TCR, et pCMH sous leurs différents états, en négligeant les autres récepteurs (CD4/8, CD28.....) qui participent à la formation de la synapse immunologique et ainsi à l'activation.

Ils ont pris en considération l'existence de 3 zones :

- Zone centrale : formation du TCR-pCMH, avec la possibilité d'intériorisation. Elle est modélisée sous forme d'un disque de rayon  $a$ .
- Zone de transition : il n'y a pas de liaison du TCR-pCMH, mais l'intériorisation est possible. Elle est modélisée sous forme d'un disque de rayon  $2a$ .
- Zone de périphérique : pas de formation de TCR-pCMH, pas de formation de TCR activé ( $T^*$ ), mais seulement l'existence du TCR avec une concentration uniforme.

Ils ont considéré que toutes les espèces étaient susceptibles de diffuser, que tous les complexes TCR-pCMH dans la synapse étaient mobiles, qu'il y a possibilité de former un complexe de dimère, ainsi que la possibilité d'une intériorisation du complexe (TCR seul ou avec son ligand ( $LT^*$  ou  $T^*$ )).

Leur modèle est basé sur des résultats expérimentaux qui donnent une formation rapide et efficace de la synapse immunologique, en considérant la présence du TCR et pCMH exclusive à la zone centrale, entouré d'un cercle de molécules d'adhésion.

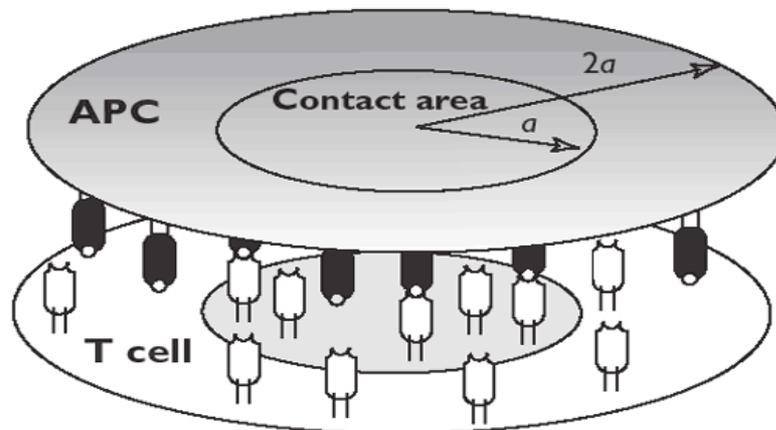
De façon générale, Coombs. ne décrivent que les phénomènes qui se passent au niveau de la synapse et qui sont en relation qu'avec le TCR et pCMH (Coombs *et al.* , 2002) . Notre modèle opère une description plus large ; de l'intérieur à l'extérieur de la cellule, ainsi que le déclenchement de la prolifération.

En conséquence, nous ne pouvons comparer que les mécanismes dans la synapse :

- **La variable d'espace (définition des zones modélisées):**

Elle est explicitement présente dans le modèle de Coombs. Cela a les conséquences suivantes :

- géométrie différente (3 espaces zones pour Coombs, 2 pour notre modèle) (figure 31)
- le déplacement des protéines au niveau de la synapse se fait par diffusion et fait appel à un coefficient de diffusion pour Coombs alors que dans notre modèle il est modélisé par un transfert entre deux zones. En considérant l'apport de molécules de l'extérieur de la synapse.



**Figure 31 : Modèle géométrique lors du contact entre LT et CPA. D'après (Coombs *et al.* , 2002).**

Le fait de définir 3 zones semble assez admis (Cemerski & Shaw. , 2006), les complexes TCR-pCMH se concentrent dans la zone centrale c-SMAC, alors que la zone p-SMAC (composée principalement de taline et LFA) est responsable des phénomènes d'activation (Grakoui *et al.* , 1999, Monks *et al.* , 1998).

Dans notre modèle, nous nous sommes intéressés plutôt à la zone c-SMAC en négligeant le rôle de la p-SMAC dans l'induction de l'activation et par la suite dans la prolifération. la notion des 3 zones est en fait implicite, mais continue par gradient qui se forme progressivement du fait du

mouvement des récepteurs vers le centre d'intérêt (pCMH). Il nous est possible de modéliser ce regroupement en modifiant la loi de transfert utilisé :

$$\frac{d[T]}{dt} = \varphi([S] - [T])$$

$$\text{En } \frac{d[T]}{dt} = \varphi([S])$$

Le coefficient de transfert  $\varphi$  et le coefficient de diffusion  $D$  sont approximativement liés par la relation :

$$\varphi = D / L^2$$

Où  $L$  est la longueur de diffusion (en gros, le diamètre de la synapse).

Dans notre modèle nous avons pris comme valeur de diffusion de surface  $10^{-4} \text{s}^{-1}$  (Wei et al 1999), alors que Coombs a pris  $D=3 \cdot 10^{-14} \text{m}^2/\text{s}$ . Comme  $L \sim 3 \mu\text{m}$ , alors  $\varphi=3 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$ . L'ordre de grandeur est respecté.

- **La concentration en ligand.**

Dans le modèle de Coombs  $[L]$  est variable (de la même façon que  $[T]$ ). Le « serial engagement » fait que la quantité de  $L$  engagée peut être beaucoup plus grande que prévue. Le nombre total de  $L$  et  $T$  (sommés sur les 3 zones) est supposé constant chez Coombs. La valeur pour  $L$  n'est pas précisée. Nous nous sommes pour l'instant limité à une quantité constante, faible de pCMH d'intérêt en considérant que leur mobilité était négligeable pendant l'interaction et leur disparition compensée par l'apport d'autres pCMH d'intérêt. Mais ces choix sont discutables et nous n'avons pas pour l'instant d'arguments expérimentaux pour les évaluer.

- **Le « kinetic proofreading »**

Coombs a modélisé le « kinetic proofreading ». Celui-ci met en œuvre une suite de transformations irréversibles en série de mêmes constantes cinétiques (figure 32):

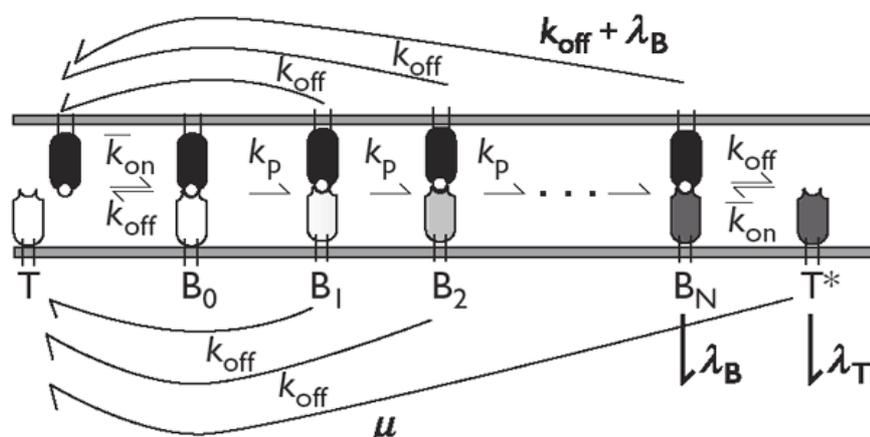


Figure 32 : Schéma réactionnel de l'internalisation du TCR. D'après (Coombs *et al.*, 2002).

Dans notre modèle cette étape est modélisée de la façon suivante (figure 33):

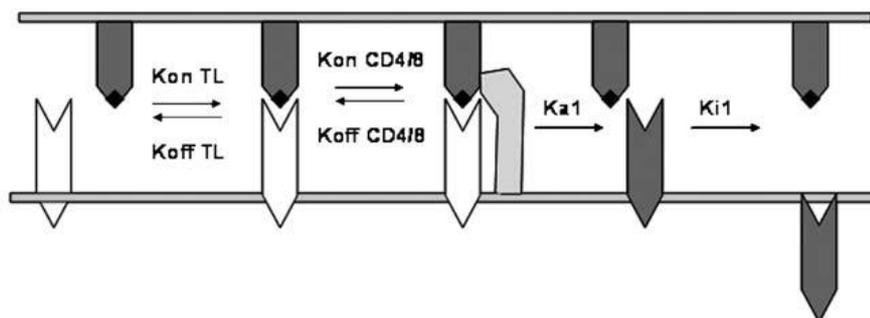


Figure 33 : Schéma réactionnel de l'internalisation du TCR. D'après (Bidot *et al.*, 2008).

Notre modèle a également plusieurs étapes d'activation et implication des co-activateurs comme les CD4/CD8 qui peuvent représenter le proofreading. Mais nous avons considéré qu'après un engagement efficace, le processus n'était plus réversible et il ne pouvait pas y avoir de retour d'une forme activé du TCR à une forme initiale ( $T^* \rightarrow T$ ) puisque les TCR sont rapidement internalisés et les formes activées dégradées. Le fait d'avoir une succession d'étapes pour le TCR ne semble pas primordial pour nous, parce que nous ne prenons pas en compte le kinetic proofreading. Mais nous tenons en compte le rôle joué par CD4/8 dans l'activation. Nous avons aussi prévu implicitement le serial engagement puisque le nombre de TCR engagé ne dépend pas dans notre modèle du nombre de pMHC.

Notre schéma réactionnel est très voisin de celui de Coombs, sauf le remplacement de son étape  $T^* \rightarrow T$  par la notre qui est moins direct  $TL^* \rightarrow TL \rightarrow T + L$ .

Les paramètres cinétiques sont sensiblement les mêmes valeurs :  $k_p$ ,  $\tau$ ,  $\lambda_T$ .

Le travail de Coombs est complété expérimentalement par celui de (Gonzalez *et al.* , 2005) qui se sont intéressés au rôle de la densité du pCMH dans l'activation des LT, chose qui était négligée par Coombs. En effet ils mettent la lumière le fait qu'un petit nombre de pCMH pouvait être suffisant pour déclencher le processus d'activation, et sur le rôle important du  $t_{1/2}$  optimal dans l'activation des LT.

Leurs observations suggèrent que la kinetic proofreading demeure une condition pour l'activation des LT lors de la présence d'une quantité importante d'agoniste, alors que dans le cas contraire le serial engagement était le mieux adapté.

## 6.2. Groupe de Chakraborty

Ce groupe a écrit une modélisation originale (Chakraborty *et al.* , 2003), qui repose sur le travail de Qi (Qi *et al.* , 2001). Ils ont étudié en détail la liaison TCR-pCMH (mais sans activation ni intériorisation) dans un contexte de biophysique.

Il met en évidence le couplage fort entre les couples récepteurs-ligand (R-L) de différentes tailles (longueurs) (42nm pour le complexe ICAM-1/LFA-1 et 15nm pour le complexe TCR/CMH) (Dustin & Shaw. , 1999, Garboczi *et al.* , 1996), qui peuvent être différentes, et les propriétés mécaniques et géométriques de la membrane. La conséquence en serait la formation d'îlots bien distincts de R-L suivant leurs longueurs : ainsi, les molécules d'adhésion au centre de la synapse et TCR-pCMH à la périphérie. Ceci est à rapprocher de résultats expérimentaux (Grakoui *et al.* , 1999), où il est montré qu'une « jeune synapse » avait cette configuration et qu'une synapse mature à une configuration stable et opposée (molécules d'adhésion à la périphérie et TCR-pMHC au centre). La partie centrale (c-SMAC) joue le rôle d'un concentrateur de TCR et de p-MHC.

Chakraborty pose la question de la relation entre les paramètres cinétiques de la liaison TCR-pCMH et l'activation. Pour lui l'activation est corrélée à la maturité (et donc la stabilité) de la synapse.

La modélisation a pour but de retrouver les propriétés topologiques de la synapse et de voir comment sont distribuées les différentes espèces.

Le couplage mécanique de la membrane, topologie et transfert de matière se fait au travers de  $k_{on}(z)$ , ( $z$  est la coordonnée perpendiculaire à la surface de contact). Chakraborty introduit une vitesse de convection (pour T, mais pas pour L), dont l'origine est le mouvement du cytosquelette. Il introduit aussi la constante des phénomènes membranaires liés à l'échange d'énergie libre ( $M$ ). En résumé ce modèle présente deux faiblesses : l'obtention de  $K_{on}(z)$  et de  $M$ .

### 6.3. Groupe de Dushek

Dushek et Coll. (Dushek & Coombs. , 2008) ont utilisé une nouvelle approche mathématique, permettant d'analyser la cinétique de déplacement du pCMH à l'intérieur de la synapse et au serial engagement pour la formation du complexe TCR-pCMH au niveau de la synapse.

En utilisant ce modèle mathématique, ils ont pu montrer que l'interaction TCR/pCMH seule ne soutient pas un rôle majeur du serial engagement des TCR ou du transport des pCMH par les clusters. Les paramètres déterminant sembleraient être la force de la liaison TCR/pCMH qui peut être stabilisée (par exemple, par les corécepteurs comme CD4/8 ou par les pCMH dimerisés..), rendant possible le transport vers cSMAC et le serial engagement dans les clusters en serait les conséquences logiques. C'est un peu notre position dans le concept de notre modèle.

Ils ont aussi pu déterminer mathématiquement la durée passée du pCMH au niveau des microclusters de TCR. Celle-ci permet de déduire le nombre de groupement de TCR qui se sont engagés.

Leur modèle ne tient pas en compte des phénomènes de signalisation, ni de la prolifération, et ne traite pas la liaison d'un seul TCR avec le pCMH, mais un groupe de TCR.

### 6.4. Groupe Arkhipov

Arkhipov et Coll. ont élaboré un modèle numérique du processus d'activation des lymphocytes T (Arkhipov & Maly. , 2006), en prenant en compte la polarité de la cellule, qui est déterminée par la polarité des microtubules au centre de la synapse immunologique et plus précisément la polarité des récepteurs.

Ce modèle explique la dynamique de l'accumulation des récepteurs membranaires au niveau de la synapse immunologique, ainsi que la dynamique de la maintenance de la densité des récepteurs à son niveau.

Ils montrent mathématiquement que dans le cas d'une absence ou une mauvaise polarisation du centre des microtubules, le trafic des récepteurs est altéré.

Dans leur modèle ils supposent que:

- Le recyclage des récepteurs est le mécanisme par lequel la cellule détecte les erreurs de polarité.
- Le transport des récepteurs de la membrane plasmique vers le compartiment de recyclage est instantané.
- La ségrégation des TCR au niveau de la synapse immunologique est négligée
- La synthèse et la dégradation des récepteurs sont négligées (Geisler. , 2004).

Pour simplifier le modèle ils ont considéré que :

- la synapse immunologique est un domaine uniforme, c.-à-d. que tous les récepteurs dans cette zone sont intériorisés à la même vitesse, alors qu'en réalité c'est un mélange de récepteurs activés et non activés, et que seules les stimulés peuvent être intériorisés à une grande vitesse.
- En plus du rôle de la polarité des microtubules cytoplasmique dans le recyclage, ils ont ajouté 2 processus qui jouent un rôle dans la redistribution des TCR après contact des LT avec les APC, ces 2 phénomènes sont la convection et la diffusion au niveau de la surface cellulaire. En fait, lors du contact LT avec APC, le TCR au niveau de la membrane est transporté par un flux sub-membranaire du cortex actomyosine (couche fine du réseau d'actine sous-jacent à la membrane plasmique). Ce flux est le résultat de la contraction du cortex vers la synapse, il joue un rôle très important dans la distribution des TCR.
- La redistribution des TCR est prise en compte dans le modèle, cette dernière se fait entre quatre compartiments : un intracellulaire (compartiment de recyclage), et les trois autres ce sont des compartiments de la région membranaire.
- Le modèle cinétique fait la distinction entre deux régions polaires et une région équatoriale. Ce qui va permettre de faire la distinction entre les récepteurs engagés et ceux qui vont être recyclés.

### **6.5. Groupe Arnacha Casal**

Casal et Coll. ont exploré la notion d'activation des lymphocytes T avec différents mélanges de peptides du soi et leurs sensibilités (Casal *et al.* , 2005).

Le but principal de cette étude était de simuler l'effet des peptides de « soi » dans l'activation des lymphocytes T et plus précisément dans l'augmentation de la sensibilité des TCR pour les ligands (agoniste).

Originalité du modèle : Plusieurs modèles mathématiques ont traité l'activation des lymphocytes T, ils se sont focalisés sur la formation de la synapse (événement qui se déroule entre 3 et 5 minutes après le contact initial LT-APC) en apportant de nouvelles idées sur les aspects biophysiques de la formation de la synapse (Coombs *et al.* , 2002, Lee *et al.* , 2002a, Qi *et al.* , 2001, Sousa & Carneiro. , 2000, Wulfing *et al.* , 2002).

Arnacha et Coll. se sont focalisés plus spécialement sur l'importance de la complexité des peptides dans la reconnaissance lymphocytaire. Ils se sont intéressés aux premières 60 secondes du contact LT-APC. Leurs simulations a pour but de monitorer la composition en peptide du soi

par un ensemencement des APC par différents peptides avec une approche mathématique. Puis ils ont utilisé le modèle pour déterminer le mélange de peptides qui donne une non activation (qui n'est activé qu'en présence d'un nombre important de peptides étrangers), ou un sous-seuil (qui sont plus sensible à une petite quantité de peptide étranger).

Ils ont utilisé la méthode de Monte Carlo (récemment décrite par (Lee *et al.* , 2002b)). Leur modèle accepte 2 hypothèses : la kinetic proofreading et le serial engagement.

En revanche leur modèle présente quelques faiblesses :

- Il ne reflète pas la dynamique de l'interaction LT-APC dans le détail. Ils ne tiennent pas en considération l'effet d'autres signaux cytoplasmique, ni de corécepteurs et co-stimulateurs, Ils se focalisent juste sur la formation des microgroupes (microclusters) de TCR et la complexité du peptide dans la reconnaissance lymphocytaire T.
- Parallèlement à la formation des microgroupes, ils ont introduit plusieurs paramètres (tels que la probabilité CDP (cluster dissociation probabilities) et la CAP (cluster association probabilities)) n'ayant aucun équivalent biologique.
- L'effet des autres signaux cytoplasmiques, des co-récepteurs et co-stimulateurs était négligé.

## 6.6. Groupe sousa et Carneiro

Sousa et Carneiro (Sousa & Carneiro. , 2000) ont testé différents modèles cinétiques à partir des travaux de Valitutti (Valitutti *et al.* , 1995) concernant l'activation et la régulation des récepteurs T du lymphocyte T

Ils ont abouti ainsi à un modèle distinguant 3 populations de TCR à la surface du lymphocyte : les TCR dans la synapse libre (T) ou les TCR activés (A), et les TCR se trouvant hors synapse (S). Les équations suivantes décrivent la variation au cours du temps des densités relatives de ces trois populations de TCR :

$$\begin{aligned}\frac{d[S]}{dt} &= -\lambda\varphi([S]-[T]) + s(1-[S]) \\ \frac{d[T]}{dt} &= \varphi([S]-[T]) - \kappa_{eff} [T]^h [L]^h \\ \frac{d[A]}{dt} &= \kappa_{eff} [T]^h [L]^h - \kappa_i [A]\end{aligned}$$

Où 'S' est le taux de renouvellement des TCR,  $\varphi$  le taux d'échange entre les 2 populations de TCR,  $\lambda$  le rapport entre les surfaces des 2 zones considérées (synapse et hors synapse),  $\kappa_{eff}$  un taux d'agrégation,  $h$  l'ordre de la réaction,  $[L]$  la densité relative des complexes pCMH,  $\kappa_i$  la

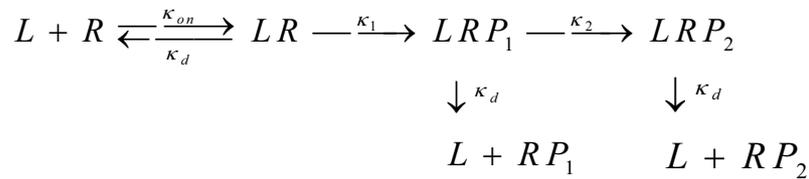
vitesse d'intériorisation des TCR activés. [S] et [T] sont ici des taux de recouvrement, dont les valeurs sont donc comprises entre 0 et 1.

La comparaison avec les données de Valitutti et al a été faite en postulant que le pourcentage de

CD3 est équivalent à  $\frac{1}{\lambda+1}[S] + \frac{\lambda}{\lambda+1}([T] + [A])$ , c'est-à-dire la quantité totale de TCR à la surface du lymphocyte.

Rabinowitz et ses collaborateurs se sont intéressés aux paramètres de l'association et la dissociation du TCR avec le complexe pCMH, en écrivant un modèle cinétique décrivant ces liaisons et séparations (Rabinowitz *et al.*, 1996), sur le même modèle que Sousa et Carneiro (Sousa & Carneiro, 2000), et conduisant à la prolifération des lymphocytes T.

Ce schéma cinétique est retranscrit ci-dessous.



Le TCR se lie au complexe pCMH (L) pour former le complexe (LR). Ce complexe subit une première modification intracellulaire (état LRP<sub>1</sub>). Il y a alors deux possibilités : soit le TCR se sépare de son ligand et reste dans l'état RP<sub>1</sub>, ce qui donne un signal négatif à la cellule, soit le processus d'activation se poursuit (passage d'un état LRP<sub>1</sub> à un état LRP<sub>2</sub>) et le TCR se sépare de son ligand en restant en état activé (RP<sub>2</sub>), ce qui donne un signal positif à la cellule. C'est l'accumulation de signaux positifs et négatifs qui détermine la décision de prolifération des lymphocytes.



**Deuxième partie :**  
**Matériels et Méthodes**



## **I. Echantillons :**

### **1. Les lignées de souris transgéniques**

#### **1.1. La lignée CL4-TCR**

Ces animaux ont été générées en utilisant le cDNA de la lignée clone-4 CTL, qui est inséré par microinjection aux vecteurs TCR $\alpha$  et TCR $\beta$  au niveau d'ovocytes de souris fertilisées H-2<sup>bx<sup>d</sup></sup> (C57BL/C x Balb/c)F<sub>1</sub>. Les souris transgénique sont croisées 5 fois avec des Balb/c pour obtenir des homozygotes H-2<sup>d</sup>.

Les souris transgéniques expriment en grande majorité un TCR spécifique du peptide HA<sub>512-520</sub> (YSTVASSL) restreint par la molécule du CMH de classe I, exprimé à la surface de plus de 95% de leurs LT CD8<sup>+</sup>. La chaîne  $\beta$  du transgène résulte du réarrangement V $\beta$ 8.2-D $\beta$ 1-J $\beta$ 1.4 et la chaîne  $\alpha$  du réarrangement V $\alpha$ 10.3-J $\alpha$ 34. Chez ces souris, le rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> est inversé ce qui suggère une sélection intrathymique biaisée vers la voie CD8<sup>+</sup>, conséquence de l'expression précoce du TCR restreint par une molécule du CMH de classe I. On retrouve en effet 2 à 5 fois plus de LT CD8<sup>+</sup> en périphérie que de LT CD4<sup>+</sup>.

Cette lignée a été étudiée et les LT CD8<sup>+</sup> isolés à partir de ces souris présentent une très grande avidité vis-à-vis du peptide HA<sub>512-520</sub> (Pardigon *et al.* , 1998). En effet, des LT CD8<sup>+</sup> issus de souris CL4-TCR mis en présence d'astrocytes pré-incubés avec le peptide HA<sub>512-520</sub> développent une forte réponse proliférative (Cornet *et al.* , 2000). Cette réponse est indépendante de la voie de co-stimulation B7/CD28 et semble due à la très grande affinité du TCR pour son ligand, le complexe K<sub>d</sub>:HA<sub>512-520</sub>.

La lignée CL4-TCR est un don du Pr. Roland LIBLAU de l'unité INSERM U563, CHU Purpan, Toulouse (France).

#### **1.2. Production et conditions d'élevage de ces lignées**

La lignée de souris transgéniques est produite sur un fond génétique homogène, Balb/c, d'haplotype H-2<sup>d</sup> (Morgan *et al.* , 1996).

Cette lignée est en élevage sous conditions EOPS (exemptes d'organismes pathogènes spécifiques) dans l'Animalerie Centrale du CHU Saint-Etienne. Numéro d'agrément 42-218-0801.

Pour le maintien de la lignée, des mâles transgéniques sont accouplés avec une ou deux femelles BALB/c, qui ont été acquise chez Charles River (France) et sont maintenues au moins 1 semaine dans notre animalerie avant qu'elles ne soient utilisées entre l'âge de 4 à 6 mois.

### **1.3. Identification des animaux transgéniques**

Le phénotypage par CMF des animaux a été effectué par cytométrie en flux à partir du sang prélevé de par ponction de veine caudale de souris au sevrage des CL4-TCR x Balb/c.

Le marquage a été effectué en utilisant des anticorps dirigés contre TCRV $\beta$ 8.3 et CD8. La méthode utilisée pour le marquage cellulaire est décrite dans la section (IV.1.1) (Morgan *et al.* , 1996). Plus de 95% des CD8+ de cette lignée exprime le TCRV $\beta$ 8.3+.

## **2. Les cellules mononuclées**

### **2.1. Cellules mononuclées du sang**

Les cellules mononuclées (PBMC) ont été préparées à partir de buffy coat résidus de traitement du sang de donneurs de l'établissement français du sang (EFS), ou des patients de la néphrologie (transplantation rénale) dans le cadre de soins courants ou d'études cliniques, en conformité avec la législation actuelle (Loi d'Aout 2006).

Le sang a été récolté dans des tubes de 10ml contenant de l'héparine, comme anticoagulant (Vacutainer®; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Le sang a été dilué au 1/2 dans du HBSS (GIBCO® Invitrogen), puis centrifugé à 300g, sur un coussin de Ficoll (Lymphoprep ®, AbCys) (2/3 de sang dilué sur 1/3 de Ficoll) pendant 30 min à température ambiante. Le gradient de densité a permis de séparer les PBMC des autres composants du sang tels le plasma, les plaquettes, les globules rouges et les neutrophiles et de récupérer les cellules mononuclées à l'interface des deux phases.

Les cellules ont par la suite été lavées deux fois avec HBSS (GIBCO® Invitrogen, Carlsbad, Calif). Toutes les cellules ont été regroupées dans un tube de 15 ml de HBSS et un aliquot de 10 $\mu$ L a été prélevé pour faire un compte par coloration au bleu de trypan (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) (dilué au 1/10 dans une solution de trypan à 0,4% (P/V)). Le comptage a été fait sur une cellule de Thomas.

## **2.2. Cellules mononuclées de la rate et ganglions de souris**

La rate des souris CL4-TCR a été prélevée et dilacérée sur un tamis métallique (30µm) en utilisant la Medimachine™ (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). La suspension a été ensuite lavée, puis filtrée (30µm) (DAKO, Hamburg, Germany).

Les cellules obtenues à partir de la rate ont été isolées par gradient de Ficoll (Lymphoprep®, AbCys) (La suspension cellulaire a été déposée sur le gradient avec un rapport de 1/1). Après centrifugation à 300g pendant 30 minutes à température ambiante, les cellules ont été lavées deux fois dans du HBSS. La suspension a été énumérée avec du bleu de trypan (voir paragraphe I.2.1)

## **3. Les cellules dendritiques**

### **3.1. Préparation des cellules dendritiques à partir de la moelle osseuse de souris**

La moelle osseuse a été prélevée à partir de moelle osseuse du fémur et du tibia des souris par expulsion avec du milieu de culture (RPMI 1640 (GIBCO® Invitrogen, Carlsbad, Calif), 10% SVF et 1% Antibiotique (GIBCO® Invitrogen, Carlsbad, Calif), et 1% L-glutamine (Seromed-Biochrom, Berlin, D), les cellules ont été lavées et suspendues puis mises en culture pendant 2 heures à 37°C. Les cellules non adhérentes ont été récupérées puis lavées 2 fois avec du milieu de culture.

### **3.2. Culture des cellules dendritiques**

Le culot récupéré a été mis en culture à une concentration de  $0,5 \cdot 10^6$  cellules/ml dans du milieu de culture en présence de granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; 50 ng/mL final) et IL-4 (10 ng/mL final) cytokines Clinisciences (Montrouge, France). Le milieu a été changé toutes les 48 heures avec ajout d'IL-4 et GM-CSF. Après 7 jours, les cellules dendritiques peuvent être utilisées.

### **3.3. Pureté des cellules dendritiques**

Après 7 jours de culture les cellules dendritiques ont été récupérées, comptées puis marquées avec un cocktail d'anticorps anti-CD11C PE (N418) Miltenyi Biotec (Auburn, California), anti-CD45 FITC (I3/2.3) Beckman Coulter (Villepinte, France), anti-CD19 APC

(6D5) Beckman Coulter (Villepinte, France). L'état de différenciation de cellules a été suivi par cytométrie de flux en utilisant les marqueurs CD11c, CD19, CD45. (Voir tableau 5). (>80% de pureté).

## II. Mesure d'absorption du peptide hémagglutinine par les cellules dendritiques

### 1. Description de la HPLC-MS

La spectrométrie de masse (mass spectrometry ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique. De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant.

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

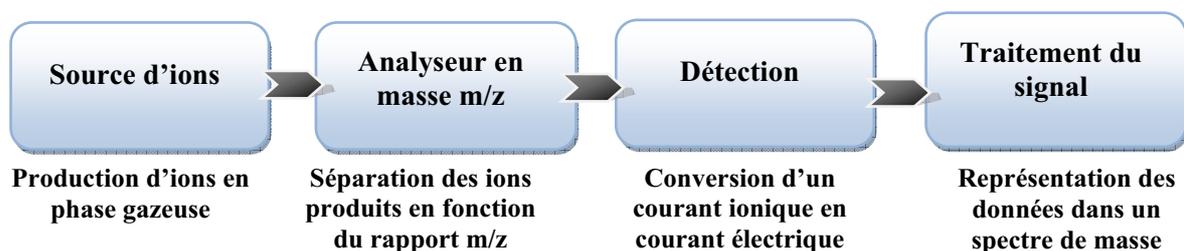


Figure 34 : Structure d'un spectromètre de masse.

### 2. Incubation des cellules dendritiques avec le peptide Hémagglutinine

#### 2.1. Peptides

Le peptide HA<sub>512-520</sub> (IYSTVASSL) a été synthétisé par Neosystem Laboratory (Strasbourg, France). Les deux peptides ont été purifiés par HPLC (>95% de pureté).

#### 2.2. Chargement des cellules dendritiques par le peptide HA

Les cellules dendritiques issues de la rate ou la moelle osseuse des souris BALB/c ont été mises en culture ( $5.10^5$  cellules/puits) avec le peptide hémagglutinine à différents temps (0, 10,

30, 40, 60, 120, 180, 320 min...), et concentrations (30, 20, 10, 5, 2.5µg/ml), dans des plaques 24 puits (Nunc™) dans un volume final de 500µl de milieu de culture 10% SVF à 37°C sous atmosphère 5% CO<sub>2</sub>.

### **3. Dosage du peptide Hémagglutinine par HPLS-MS**

#### **3.1. Précipitation des protéines :**

Afin d'éliminer les protéines contenues dans le milieu, le contenu du puits a été centrifugé, le surnageant a été récupéré, les protéines ont été précipitées, puis analysées par HPLC-MS.

Les étapes de précipitation :

- 1ml d'acetonitrile (Fisher Scientific, Strasbourg, France) et 50µl de HCL 1X (Sigma-Aldrich, Germany) ont été ajoutées au surnageant de culture (V=500µl)
- Le mélange a été centrifugé 15 minutes à 3000g à 4°C afin de précipiter les protéines dans le fond du tube.
- Le surnageant a été concentré par évaporation sur SpeedVac®AES 2000 (Savant Instruments of Holbrook, N.Y).

#### **3.2. Quantification du peptide hémagglutinine par HPLC-MS**

Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées dans le laboratoire de Jérôme Lemoine UMR 5180 Sciences Analytiques, Université de Lyon. L'échantillon a été introduit dans le spectromètre de «HP 1100» (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) couplé à un hybride triple quadrupole trappe ionique 5500 QTRAP en mode MRM (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) à 20µl/min.

Les composés sont ionisés dans la source du spectromètre par électrospray. Le spectre de masse a été obtenu par balayage des masses m/z. les ions positifs ont été détectés.

Les transitions suivies étaient 470.8/306.2, 470.8/564.2, 470.8/635.0. La quantification a été réalisée sur la transition 470.8/306.2. La séparation a été effectuée sur une colonne C18 symmetry Waters 2.1mm de diamètre interne et 10cm de long avec des particules de 3.5µm. Le gradient réalisé était de 5% ACN 0.1% acide formique (AF) à 30% ACN AF en 5 minutes puis 100% ACN AF de 6 à 10 minutes et un reconditionnement de 5 minutes. Le temps total d'analyse est de 15 minutes.

Les concentrations ont été calculées à partir de la droite étalon réalisée dans le milieu de culture entre 0.1 et 1000ng/ml. La courbe de régression linéaire a été établie avec une pondération de 1/X<sup>2</sup> afin de favoriser les faibles concentrations plus proches de la valeur des échantillons.

### **III. Cinétique d'activation des lymphocytes**

#### **1. Activation des lymphocytes par cellules dendritiques chargées**

Les cellules dendritiques ont été mises en incubation avec différentes concentrations de peptide HA128-136 ou HA<sub>512-520</sub> (0, 10, 15, 20, 30, 80µg/ml), pendant 2h d'incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A la fin de l'incubation les cellules ont été lavées 2 fois avec du milieu HBSS (GIBCO® Invitrogen).

Les lymphocytes issus de la lignée CL4-TCR (à l'ordre de 0,4.10<sup>6</sup> cellules/puits) ont été mis en contact avec les cellules dendritiques (0,8.10<sup>6</sup> cellules/puits) chargées avec différentes concentrations de peptide HA<sub>512-520</sub> à différents temps (0, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 24h, 48h) dans Plaques 96 puits *Nunc* MicroWell™ à un volume total de 200µl par puits.

A la fin de chaque incubation le contenu des puits est centrifugé (300g pendant 5 min), le surnageant a été récupéré pour le dosage des cytokines. Le culot cellulaire a été mis en suspension dans du FACS (PBS 1X (Bio Mérieux, France), 1% BSA (Biomedicals Inc.), 0.01% EDTA (Sigma-Aldrich)) afin de procéder au marquage direct des récepteurs lymphocytaires.

#### **2. Activation des lymphocytes T par stimulation non spécifiques**

Pour le test d'activation les PBMC ont été mis en culture avec soit des billes CD3/CD28 (DynaL Biotech A.S.A, Oslo, Norway), soit de la PHA (Murex Diagnostics, Dartford, UK). Après 20 heures d'incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, les cellules ont été lavées puis marquées directement avec les anticorps adéquats.

### **IV. Caractérisation des populations de LT par cytométrie en flux :**

#### **1. Marquage direct des cellules**

##### **1.1. Marquage direct sur sang total chez l'homme et la souris**

Le marquage est réalisé sur 100µl de sang périphérique, incubé avec 10 à 20 µl d'anticorps pendant 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La lyse et la fixation des cellules sont réalisées avec l'ajout de 500µl de FACSLysing solution (BD Biosciences). Les échantillons sont analysés durant la première heure avec FACScanto II (BD Biosciences).

Pour le marquage des V<sub>β</sub>, la lyse des érythrocytes est réalisée avec Versalyse® solution (Beckman-Coulter) et les échantillons sont lavés avec 3ml de PBS avant l'analyse.

Le clonotype des chaînes  $V_{\beta}$  du TCR est identifié en utilisant une paire d'anticorps monoclonal conjugué avec les fluorochromes FITC et PE :  $V_{\beta 1}/V_{\beta 2}$  FITC,  $V_{\beta 3}$  FITC/ $V_{\beta 4}$  PE,  $V_{\beta 5.1}$  FITC/ $V_{\beta 5.3}$  PE,  $V_{\beta 5.2}$  FITC/ $V_{\beta 8}$  PE,  $V_{\beta 7}$  FITC/ $V_{\beta 9}$  PE,  $V_{\beta 11}$  PE/ $V_{\beta 12}$  FITC,  $V_{\beta 13.1}$  PE/ $V_{\beta 13.6}$  FITC,  $V_{\beta 14}$  PE/ $V_{\beta 16}$  FITC,  $V_{\beta 17}$  FITC/ $V_{\beta 18}$  PE,  $V_{\beta 20}$  FITC/ $V_{\beta 22}$  PE,  $V_{\beta 21.3}$  FITC/ $V_{\beta 23}$  PE (tout les réactifs sont obtenus de chez Beckman-Coulter). Tous les marquages sont associés avec CD3-APC-Cy7, CD8 $\alpha$ -APC, CD4-PE-Cy7, CD8 $\beta$  PE-Cy5. (Voir Tableau 8).

## 1.2. Marquage direct sur PBMC

Cette technique est utilisée pour déterminer le phénotype des LT (CD3+/CD4+, CD3+/CD8+) et leur état d'activation en fonction de leur niveau d'expression de marqueurs d'activation des LT (CD25, CD69). Le culot lymphocytaire est incubé dans du tampon (PBS (BioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, France), 1% BSA (Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA), 0.01% EDTA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 30 minutes à 4°C en présence d'anticorps marqués, puis lavées avec 3ml de PBS 300g, 5 minutes) et resuspendues 2% PFA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) pour les fixer.

Les réactifs suivants ont été utilisés (voir tableau 5 et 6)

	Anticorps	Clone	Fluorochrome	Expression dans les leucocytes	Fournisseur
Genotypage des souris	Anti-CD4	RM2504	PE	LT	TEBU Bio Caltag
	Anti-CD8	RM2204	PE	CLT	TEBU Bio Caltag
	Anti- $V_{\beta 8.3}$	F23.1	FITC	LT	BD Pharmingen
Pureté des CD	Anti-CD11c	130-091-891	PE	CD myéloïdes	Macs : Miltenyi Biotec (Allemagne)
	Anti-CD19	6D5	APC	LB et CD folliculaires	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD45	12/2.3	FITC	Leucocytes	Beckman coulter
Suivi de la cinétique des récepteurs membranaire des LT	Anti-CD3	145-2C11	APC-Cy7	LT	BD Bioscences (La Jolla CA)
	Anti-CD8	536.7	APC	CTL	eBiosciences (CA)
	Anti-CD25	PC61.5	PE-Cy7	LT et B activés, et LT régulateurs	eBiosciences
	Anti-CD69	H12F3	PE-Cy5	LT et B activés, et cellules NK	BD Bioscences

**Tableau 5 : Différents anticorps utilisés pour le marquage des cellules chez la souris.**

	Anticorps	Clone	Fluorochrome	Expression dans les leucocytes	Fournisseur
<b>Marquage des lymphocytes T</b>	Anti-CD3	Sk7	APC-Cy7	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD16	B7 3.1	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD56	NCAM 16.2	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD45	2D1	PerCP	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD4	SK3	PE-Cy7	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD19	SJ25C1	APC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD8 $\alpha$	SFC121thyD3	APC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD8 $\beta$	2ST8.5H7	PE-Cy5	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-TCR $\gamma/\delta$	Immu 510	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	Anti-CD25	MA251	PE-Cy5	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
<b>Marquage des chaînes V<math>\beta</math> du TCR</b>	V $\beta$ 1	BL37.2	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 2	MPB2D5	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 3	CH92	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 4	WJF24	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 5.1	IMMU157	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 5.2	36213	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 5.3	3D11	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 7	ZOE	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 8.1/ V $\beta$ 8.2	56C5	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 9	FIN9	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 11	C21	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 12	VER2.32.1	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 13.1	IMMU222	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 13.6	JU-74	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 14	CAS1.1.3	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 16	TAMAYA 1.2	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 17	E17.5F3	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 18	BA62	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 20	ELL 1.4	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 21.3	IG125	FITC	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 22	IMMU 546	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)
	V $\beta$ 23	AF23	PE	LT	Beckman coulter (Fulerton Tx)

Tableau 6 : Différents anticorps utilisés pour le marquage des cellules chez l'homme.

## **2. Marquage indirect des cellules « QIFIKIT® »**

### **2.1. Principe du QIFIKIT®**

L'approche, développée par Philippe Poncelet (*Poncelet & Carayon. , 1985*) et commercialisée par Dako et Biocytex, est une technique en immunofluorescence indirecte. Des billes sont recouvertes avec un nombre croissant et connu de molécules d'immunoglobulines G non couplées, spécifiques de l'antigène à quantifier. Ces billes sont ensuite colorées avec un anticorps de couche secondaire, anti-immunoglobulines de souris marqué avec le fluorochrome FITC. La Moyenne d'Intensité de Fluorescence (MFI) des billes permet d'établir une courbe standard qui traduit directement la MFI de la cellule en nombre de récepteurs par cellule/bille. Parallèlement, dans cette approche, la fixation entre l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire est rigoureusement identique entre les billes et les cellules. Cette technique permet de prendre en compte la part des réactions non-spécifiques, en utilisant comme anticorps de première couche, un anticorps contrôle isotypique, ainsi que l'évaluation de la densité membranaire des récepteurs.

### **2.2. Marquage des billes de fenêtrage et de calibration**

Une suspension de billes (100µL) est mise dans un tube, à laquelle est ajouté 100µl du conjugué FITC dilué au 1/20, suivie d'une incubation de 45 min, à température ambiante, à l'obscurité. Les billes par la suite ont été lavées deux fois avec 2 ml de PBS à 300g pendant 5min. le culot est resuspendu dans 500µl de PBS 1X. Les billes sont analysées en même temps que les échantillons.

### **2.3. Marquage des Lymphocytes T**

Il s'agit d'un procédé de marquage de type immuno-fluorescence indirecte, en conditions saturantes : la suspension cellulaire (100µl) contenant  $1.10^6$  cellules/ml dans chaque tube, un tube servant à la détection d'une molécule, le contrôle négatif (cellules et tampon) et le contrôle isotypique. Les anticorps monoclonaux primaires de souris non conjugués (TCR, CD3, CD4, CD8, CD25, CD69) sont incubés pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont lavées deux fois avec 2 ml de PBS à 300g, pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans 100µl du conjugué FITC dilué au 1/20, suivie d'une incubation de 45 min, à température ambiante, à l'obscurité. Les billes par la suite ont été lavées deux fois avec 2 ml de PBS à 300g pendant 5min. le culot est resuspendu dans 500µl de PBS.

### 3. Paramètres de l'analyse

Toutes les analyses ont été effectuées en quadruple coloration sur une population de 50000 événements. Les débris cellulaires et les cellules mortes ont été exclus de l'analyse par l'utilisation des paramètres de taille et de granularité. Les fenêtres de lecture ont été établies avec les contrôles : isotypiques, les marquages seuls, les marquages mixtes et les cellules non marquées, en utilisant les facilités de calcul de FACS Diva™ (BD Biosciences) (Lambert *et al.* , 2006).

L'instrument est réglé quotidiennement en utilisant des billes de calibration (Quantum 1000 ). Les analyses sont quotidiennement validées par un contrôle de qualité externe (Multi-check control ; BD Biosciences).

Parce que l'intensité de fluorescence n'a pas toujours été une distribution normale, nous avons choisi de considérer la médiane (MdFI) au lieu de la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI). La MdFI et le CV de chaque échantillon ont été calculés automatiquement par le logiciel FacsDiva.

Le principe de la cytométrie est détaillé en annexe III.

### 4. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant, test t de Student apparié pour la comparaison de deux sous-populations de cellules à partir de l'échantillon, des régressions linéaires sont exprimées en moyenne  $\pm$  1SD. Le coefficient de variation (CV) a été calculé comme 1SD/mean.

## V. Microscopie électronique à balayage :

La taille des billes a été analysée par microscopie électronique à balayage. Brièvement les billes ont été lavées pendant 10 minutes à 300g, puis fixées avec de l'alcool à 100%. Après un séchage complet, l'échantillon a été couvert par une couche de gold-palladium, puis analysé par microscopie électronique (JEOL 840). Plus de 25 billes ont été mesurées manuellement. L'index de réflexion a été évalué à 1,592 pour les billes en polystyrène et 1,456 pour le noyau et 1,355 pour le cytoplasme des LT. La taille du noyau a été estimée à 80% de la taille de la cellule (Sloot *et al.* , 1988). Le volume des billes et des cellules a été calculé à partir de la mesure du pic de FSC en accord avec la théorie de mie appliqué aux particules sphériques multicouches optiques.

## VI. Dosage IL2 par ELISA

L'interleukine-2 est dosé par méthode immuno-enzymatique à l'aide d'un kit commercial BD Opt EIA™ fourni par BD Biosciences.

La quantification de l'IL2 sécrétés dans le milieu par les LT activés est réalisée sur des plaques 96 puits (Nunc MaxiSorp™ MicroWell™). Les puits de la plaque ELISA sont couverts (100 µL) avec du « coating buffer : 0.1M sodium carbonate, PH 9.5 » et l'anticorps IL-2 de capture (au 1/200), pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les puits sont lavés 3 fois avec une solution de lavage («washing buffer : PBS 1X, 0.05% Tween20 (SIGMA-ALDRICH)»). Les sites de fixation éventuellement libres sont saturés avec la solution de blocage (200 µL « assay diluent : PBS 1X, 10% SVF ») pendant 1h, à température ambiante afin d'empêcher la fixation non spécifique. Le standard de la gamme étalon est préparé avec des concentrations connues d'IL-2 diluées dans le tampon du test « assay diluent ». Les concentrations finales sont : 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,3 ; 3,4 et 0 pg/mL.

Les échantillons (les surnageants de culture) sont ensuite déposés dans les puits appropriés (100 µL), la réaction entre les anticorps et IL2 se fait pendant 2h à température ambiante, puis la plaque est lavée 5 fois, et l'anticorps conjugué de détection dans la solution de « working detector » est ajoutée (100 µL : anticorps couplés à l'enzyme + substrat de l'enzyme), la plaque est laissée incubée 1h à température ambiante et dans l'obscurité.

Après 1h, la plaque est lavée 7 fois, et les anticorps couplés fixés sont révélés avec le substrat (100 µL). Après 30 min, la réaction est stoppée avec la « stop solution » (50 µL). Enfin, l'absorbance est lue à 450 nm dans les 30 min qui suivent l'arrêt de la réaction.

Les concentrations sont ainsi mesurées par l'intermédiaire de la densité optique. Les gammes étalons sont réalisées à chaque expérience.



# **Troisième partie :**

## **Résultats**



# **I. Niveau d'expression des récepteurs membranaires chez l'homme**

## **1. Introduction**

La modélisation mathématique de l'activation des lymphocytes T repose tout d'abord sur le niveau d'expression des molécules de surface qui joue un rôle important sur le niveau d'activation des lymphocytes T.

Certaines données ont pu être obtenues de la littérature. Nous avons vérifié ces valeurs sur des donneurs sains.

## **2. But**

Quantification des récepteurs membranaires des lymphocytes T par un kit commercial Qifikit® (Dako Denmark), et comparaison entre valeurs trouvées expérimentalement et valeurs utilisées pour notre modèle.

## **3. Patients et Méthodes**

Les récepteurs membranaires ont été quantifiés sur des lymphocytes T issus de 39 donneurs sains de l'EFS (établissement français du sang) par la méthode « Qifikit » qui permet à l'aide d'une courbe standard de convertir la médiane de fluorescence en densité membranaire.

Pour des raisons réglementaires le sang des donneurs n'était utilisé qu'un jour après le prélèvement.

Les lymphocytes T ont été marqués individuellement avec les anticorps suivants : anti-CD3 (UCHT1), anti-TCR (2H2D9), anti-CD4 (13B8-2), anti-CD8 (KT15), anti-CD25 (B1.49.9), anti-CD69 (TP1.55.3) et anti-CD28 (CD28.2). Tous les anticorps ont été achetés chez Beckman-Coulter; Fullerton, CA.

La quantification a été réalisée selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes» (paragraphe IV.2.).

## 4. Résultats

La densité absolue des différents récepteurs membranaires chez 39 donneurs sains a été évalué à :

- 63 000 +/- 11 500 molécules/cellule (CV=18,3%) pour le CD3 (n=39)
- 22 100 +/- 4 900 molécules/cellule (CV=21,9%) pour le TCR (n=39)
- 40 450 +/- 9 200 molécules/cellule (CV=22,8%) pour le CD4 (n=39)
- 55 000 +/- 16 400 molécules/cellule (CV=29,3%) pour le CD8 (n=39)
- 8 000 +/- 2 400 molécules/cellule (CV=34,6%) pour le CD28 (n=39)
- 892 +/- 1 098 molécules/cellule (CV=123,1%) pour le CD69 (n=7)
- 12 000 +/-18 600 molécules/cellule (CV=147,1%) pour le CD25 (n=10)

Ces résultats préliminaires montrent que l'expression des récepteurs CD25 et CD69 n'est pas homogène, car on a observé un très important CV (>100%), vu cette grande variété d'expression, nous n'allons pas prendre en considération ces 2 valeurs dans la correction de notre modèle.

La correction du modèle a été effectuée en remplaçant les valeurs initiales par les valeurs quantifiées expérimentalement :

- 22 000 de TCR au lieu de 30 000 dans le modèle
- 55 000 de CD8 au lieu de 70 000 dans le modèle
- pour le CD25 et CD69 nous allons maintenir les valeurs initiales en attendant de réaliser la quantification sur un nombre plus important de donneurs sains.
- 5 $\mu$ m pour le rayon de lymphocyte T chez l'homme au lieu de 3,5 $\mu$ m dans le modèle. Cette valeur a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant la théorie de mie. Cette partie sera amplement décrite dans les chapitres suivants.

Nous avons comparé les courbes simulées par notre modèle avant et après application des corrections précédemment décrites :

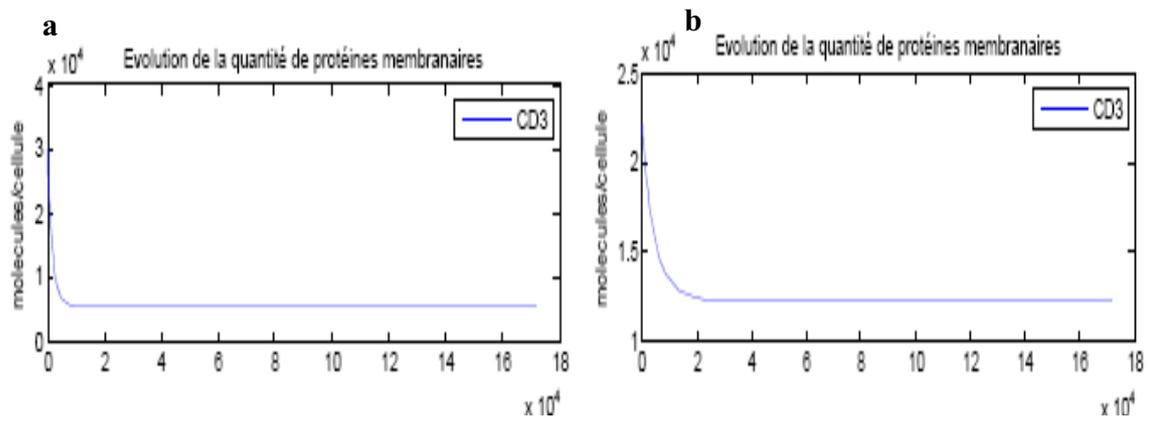


Figure 35 : Courbes simulées de l'évolution de la quantité membranaire de CD3 pour la concentration de 1093 pCMH. a) avant correction du modèle (TCR=30 000, CD8/4=70 000, CD28=500 et  $r=3,5\mu\text{m}$ ), b) après correction du modèle (TCR=22 000, CD8/4=55 000, CD28=8 000 et  $r=5\mu\text{m}$ ). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

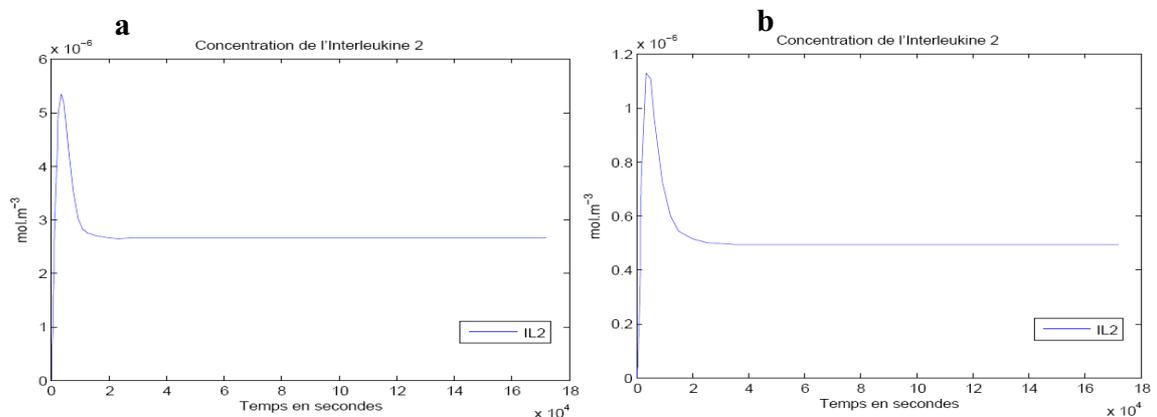


Figure 36 : Courbes simulées de l'évolution de la concentration de l'interleukine 2 pour la concentration de 1093 pCMH. a) avant correction du modèle (TCR=30 000, CD8/4=70 000, CD28=8 000 et  $r=3,5\mu\text{m}$ ), b) après correction du modèle (TCR=22 000, CD8/4=55 000, CD28=8 000 et  $r=5\mu\text{m}$ ). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

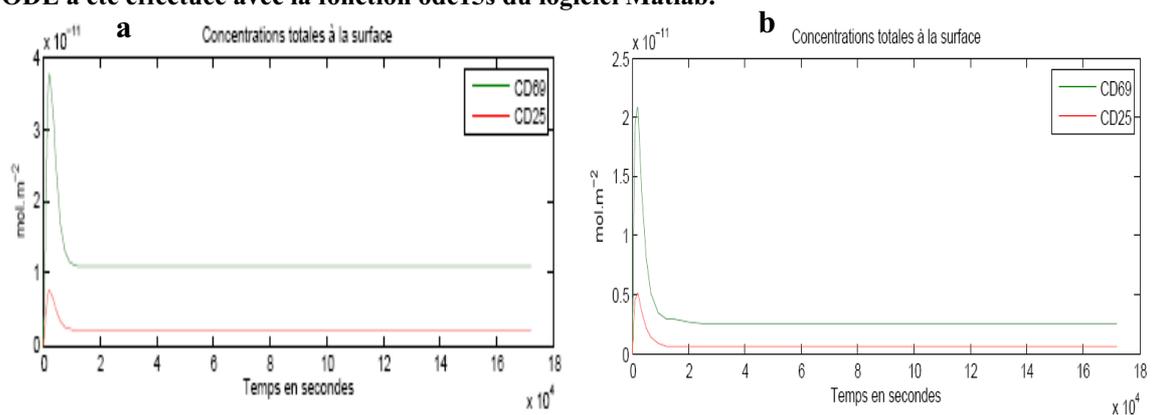


Figure 37 : Courbes simulées de l'évolution de la concentration membranaire de CD69 et CD25 pour la concentration de 1093 pCMH. a) avant correction du modèle (TCR=30 000, CD8/4=70 000 et  $r=3,5\mu\text{m}$ ), b) après correction du modèle (TCR=22 000, CD8/4=55 000, CD28=8 000 et  $r=5\mu\text{m}$ ). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

En réalisant ces corrections, nous avons constaté des différences au niveau de l'activation des lymphocytes (Figures 35, 36 et 37). Ces différences ont été résumées à une intériorisation plus lente du CD3 suite à la diminution du nombre initial de CD3/TCR et l'augmentation de la taille de la cellule, une activation plus faible et moins importante se manifestant par une sécrétion plus basse et une expression plus faible des récepteurs d'activation (CD69 et CD25).

Cette comparaison nous a permis de conclure que nous avons surestimé les paramètres initiaux d'activation.

## **5. Conclusion**

Nous avons utilisé des valeurs moyennes, assumant une forte homogénéité des cellules. Mais les données expérimentales nous montrent que cette hypothèse n'est pas justifiée.

Par exemple en comparant la densité absolue du CD3, CD4 et CD8, on a observé un CV important, donc une grande disparité de niveau d'expression des récepteurs entre les cellules.

De ce fait, nous nous sommes intéressés à étudier la variabilité des récepteurs membranaires sur les lymphocytes T et plus précisément le CD3.

## **II. Etude de la variabilité de l'expression des CD3 membranaires et la capacité d'activation des lymphocytes T chez l'homme**

### **1. Introduction**

Durant l'immunisation, le TCR se lie spécifiquement au complexe pCMH. Cette reconnaissance est liée à l'avidité du TCR pour le complexe pCMH (Bachmann *et al.* , 1996, Carreno *et al.* , 2006, Corr *et al.* , 1994, Grakoui *et al.* , 1999, Madrenas. , 1999, Margulies. , 1997), et elle est renforcée par le CD4 ou le CD8 (Denkberg *et al.* , 2001, Feito *et al.* , 1997, Garcia *et al.* , 1996a). Le signal est transmis à la mécanique cellulaire par le CD3 qui est associé au TCR (Lanzavecchia *et al.* , 1999). Le complexe CD3/TCR est ensuite internalisé induisant une baisse significative de l'expression de CD3/TCR et une activation qui, si elle n'atteint pas un seuil de déclenchement peut mener à un statut de non réponse jusqu'à que le niveau membranaire en CD3 soit restauré (Gouaillard *et al.* , 2001, Valitutti *et al.* , 1997). Pour atteindre le seuil de déclenchement, un nombre suffisant de CD3/TCR doit être engagé et internalisé. La cinétique d'internalisation est liée au niveau de la réponse du lymphocyte T.

L'engagement d'un petit nombre de TCR/CD3 est suffisant pour l'activation des LT (Demotz *et al.* , 1990, Labrecque *et al.* , 2001, Rabinowitz *et al.* , 1996), si le nombre de peptide est restreint, le « serial engagement » est possible (Hudrisier *et al.* , 1998, Itoh *et al.* , 1999, Valitutti *et al.* , 1995).

Le complexe TCR/CD3 peut être recruté à l'extérieur de la synapse à l'aide du transfert membranaire, pendant une courte durée (Kalergis *et al.* , 2001, Rabinowitz *et al.* , 1996, Rosette *et al.* , 2001, Williams *et al.* , 1999) pour qu'il soit efficace. L'activation induit la production de l'IL-2 et l'expression membranaire des chaînes  $\gamma$  de son récepteur (CD25 ;(Bettens *et al.* , 1984)). L'IL-2 se lie à son récepteur, en induisant un signal d'activation des LT, ainsi l'expression de CD25 est corrélée avec l'activation des LT (Caruso *et al.* , 1997).

L'observation des lymphocytes T normaux montre une grande disparité du niveau d'expression du CD3/TCR, suggérant des différences importantes de densité de surface.

## 2. But

Les données expérimentales ont montré que le nombre de CD3-TCR est important pour la réactivité du lymphocyte T. Nous nous sommes intéressés à la différence de l'expression des CD3 membranaires sur les lymphocytes T  $\alpha\beta$ , chez les donneurs sains et les patients immuno-déprimés ayant subi une transplantation rénale.

## 3. Patients et Méthodes

Les lymphocytes analysés sont issus de 97 donneurs sains et de 56 patients ayant subi une transplantation rénale, avec une ancienneté de greffe de 1 à 15 ans

Pour des raisons réglementaires le sang des donneurs n'a pas été testé que 24h après le prélèvement. Les tests fonctionnels ont été réalisés sur 10 patients de cardiologie sans déficit immunitaire hospitalisés pour des problèmes cardiaques (département de cardiologie du CHU Saint-Etienne).

Les lymphocytes ont été marquées en utilisant une combinaison de : CD3- FITC, CD16-PE, CD56-PE, CD45 PerCP, CD4 PE-Cy7, CD19 APC, et CD8 APC-Cy7.

Une autre combinaison de marquage a été utilisée pour l'analyse des LT  $\gamma\delta$  en utilisant : CD3-APC-Cy7, CD8 $\alpha$ -APC, CD4-PE-Cy7, CD8 $\beta$  PE-Cy5 de chez BD Biosciences, San Jose, CA et les TCR $\gamma/\delta$  FITC, TCR $\gamma$ 9 de chez Beckman-Coulter; Fullerton, CA.

Les clonotypes des chaînes V $\beta$  des TCR ont été identifiés en utilisant un marquage en paire avec des anticorps monoclonal : V $\beta$ 1 PE et V $\beta$ 2 FITC, V $\beta$ 3 FITC et V $\beta$ 4 PE, V $\beta$ 5.1 FITC et V $\beta$ 5.3 PE, V $\beta$ 5.2 FITC et V $\beta$ 8 (8.1 et 8.2) PE, V $\beta$ 7 FITC et V $\beta$ 9 PE, V $\beta$ 11 PE et V $\beta$ 12 FITC, V $\beta$ 13.1 PE et V $\beta$ 13.6 FITC, V $\beta$ 14 PE et V $\beta$ 16 FITC, V $\beta$ 17 FITC et V $\beta$ 18 PE, V $\beta$ 20 FITC et V $\beta$ 22 PE, V $\beta$ 21.3 FITC et V $\beta$ 23 PE (tous achetés chez Beckman-Coulter). Tous associés avec CD3-APC-Cy7, CD8 $\alpha$ -APC, CD4-PE-Cy7 et CD8 $\beta$  PE-Cy5.

Pour le test d'activation, les PBMC fraîchement isolées ont été incubées pendant 30 heures avec des billes CD3/CD28 (Dyna; Norway) à un nombre approximativement égal. Après l'incubation les cellules issues du même puits ont été lavées et marquées avec 3 combinaisons de clonotypes représentatifs : V $\beta$ 1 PE/V $\beta$ 20 FITC; V $\beta$ 2 FITC/V $\beta$ 8 PE et V $\beta$ 3 FITC/V $\beta$ 9 PE, en association avec CD3-APC-Cy 7, CD8 $\alpha$ -APC, CD4-PE-Cy7, CD25 PE-Cy5 (Clone MA251; BD Biosciences).

La taille des cellules a été estimée à partir de FSC en relation avec Sloat et Symianov (Semyanov *et al.* , 2007, Sloat *et al.* , 1988). En absence des billes standardisées pour la taille, nous avons utilisé des billes commercialisées avec différentes tailles données par les fournisseurs : Flowcount® beads (10µm; Beckman-Coulter), QIFIKIT® beads (10µm, Dako); 7 color setup® beads ( 4 et 6µm, BD Bioscience), Trucount® beads ( 4 µm, BD Bioscience), Rainbow® beads (3 à 3.4µm, BD Bioscience). La taille des cellules a été analysée par microscopie électronique à balayage (JEOL 840). La taille d'au moins 25 billes a été mesurée manuellement. Le volume des billes et des cellules a été calculé à l'aide de la théorie de Mie appliquée aux particules sphériques multicouches.

## 4. Résultats

### 4.1. Présentation des résultats de cytométrie

Pour l'étude des lymphocytes T nous avons utilisé le cytomètre en flux, l'appareil permettant d'étudier avec précision les cellules isolées entrainées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

La définition des populations d'intérêt se réalise par un fenêtrage ciblé de ces derniers, ainsi que de leurs récepteurs membranaires.

La sélection des populations a été réalisée de la manière suivante :

- Une représentation graphique de la taille et de la granulosité des cellules, permettant ainsi de différencier les différentes populations cellulaires (Figure 38).

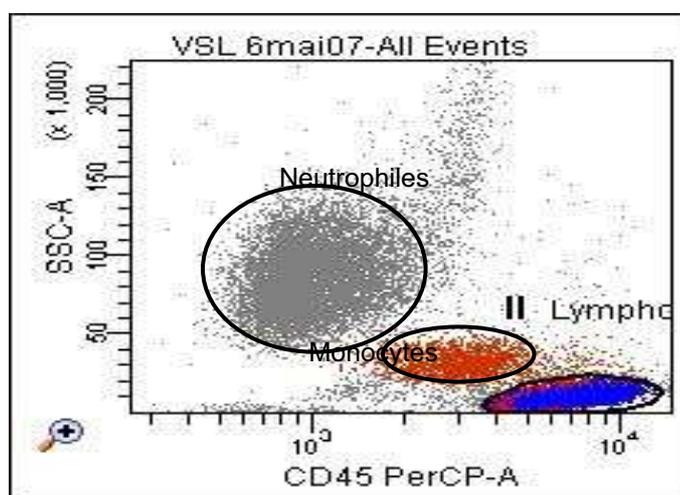
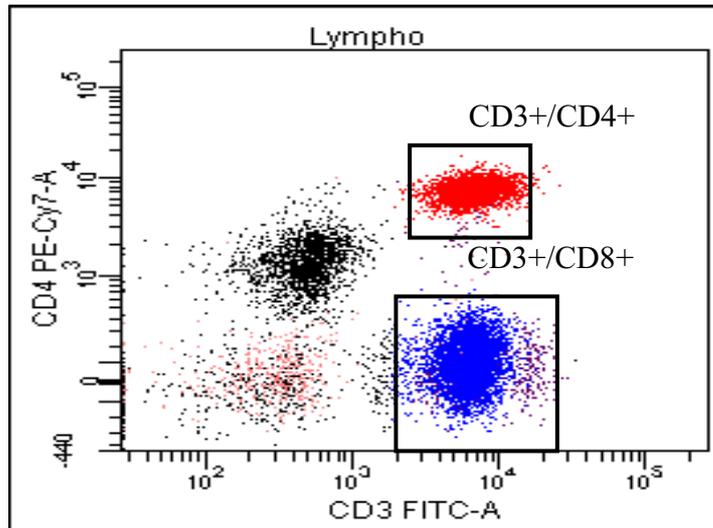


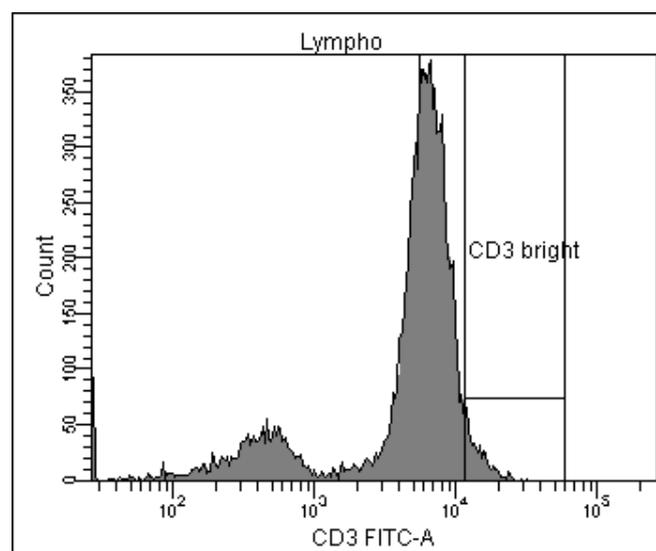
Figure 38 : Représentation graphique de la taille et de la granulosité des cellules.

- Sur la population lymphocytaire « Lympho » (Figure 38) nous avons pu différencier 2 populations bien distinctes: la population LT CD4+ (en rouge) exprimant les récepteurs CD4+ et le CD3+, et la population LT CD8+ n'exprimant pas le récepteur CD4+ mais exprimant le CD3+ (en bleu) (Figure 39).



**Figure 39 :** Représentation graphique représentant la fluorescence relative du CD4 par rapport à celle du CD3. Cette représentation permet une meilleure séparation des deux populations LTCD4+ et LTCD8+.

- Aussi sur la population lymphocytaire « Lympho » (Figure 38) nous avons pu suivre la fluorescence relative de certains récepteurs membranaires tels que le CD3 (Figure 40) par rapport au nombre d'événements, permettant ainsi une meilleure appréciation de l'évolution de ces récepteurs.



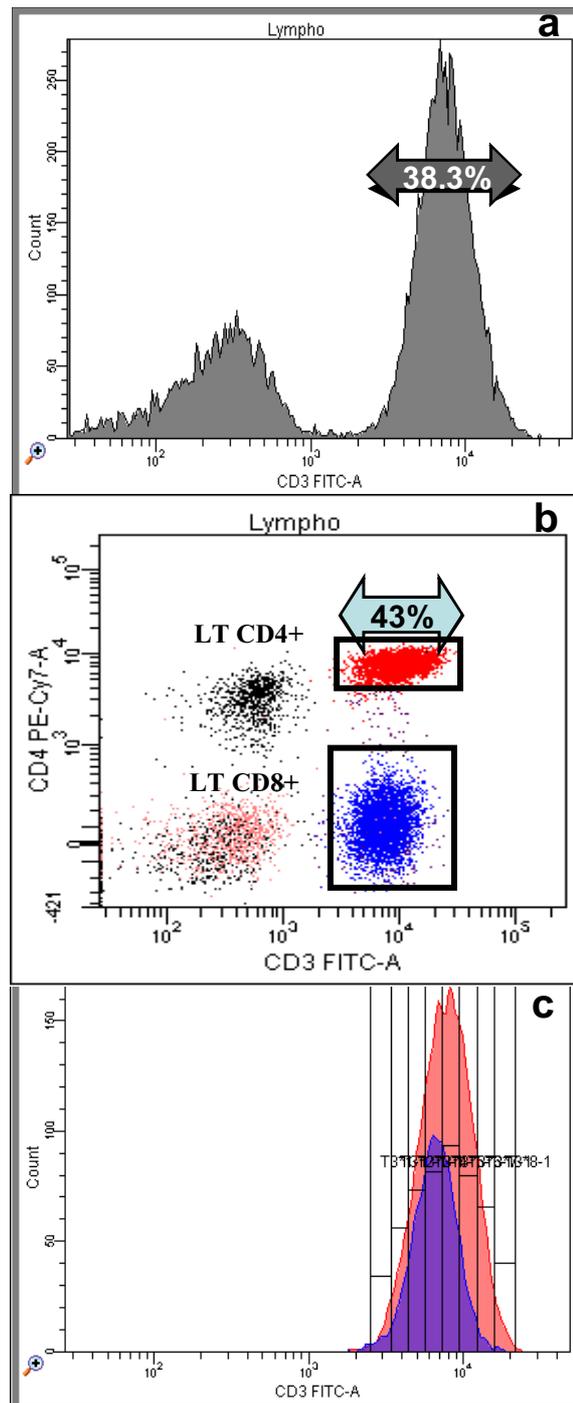
**Figure 40 :** Représentation graphique d'un histogramme illustrant la fluorescence relative du CD3 par rapport au nombre d'événements sur la population lymphocytaire.

## **4.2. La large distribution des CD3 membranaires au niveau des lymphocytes T**

Lors de l'analyse en routine des lymphocytes T, nous avons remarqué que l'expression des CD3 a été largement distribuée sur les lymphocytes T (Figure 41a). Cette diversité entre les individus a été confirmée chez 97 donneurs sains.

L'expression du CD3 en médiane de fluorescence (MdFI) sur les LT CD8+ a été de 1 100+/- 180 avec un coefficient de variance (CV) de 16% entre les donneurs, alors que sur les LT CD4+, elle a été significativement plus élevée ( $p < 0.0001$ ) avec une MdFI de 1 400+/- 250 et CV similaire (17.7%, Figure 41 b et c).

Ce qui nous a le plus intrigué c'était l'énorme variation entre les cellules de chaque échantillon (intra-individus) de donneurs sains, avec un CV de 38+/-3% pour les LT CD8+ et 43+/-2.3% pour les LT CD4+ (Figure 41b). Cette disparité a été aussi observée chez 56 patients immuno-déprimés (CV : 32.7+/-3% sur les LT CD8+ et 37+/-2% sur les LT CD4+).



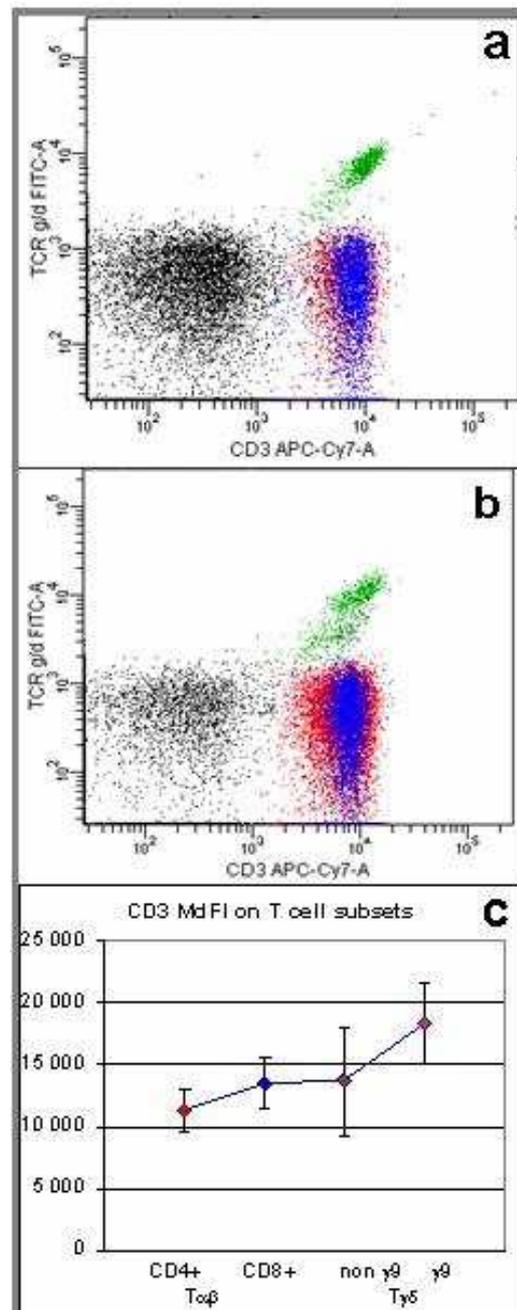
**Figure 41: La grande variabilité de l'intensité de fluorescence du CD3 FITC sur les LT périphériques.** Cette grande variabilité est observée lors des analyses de routine (graphe a) avec CD3FITC/CD56 PE/CD4PE-Cy7/CD19APC/CD8APC-PE-Cy7/CD45PerCP. L'expression du CD3 était plus élevée chez LT CD4+ en comparaison avec les LT CD8+ (graphe b et c)

### **4.3. La variabilité de la distribution des CD3 a été observée sur tous les isotypes des lymphocytes T**

L'expression du CD3 a été différente selon l'isotype de lymphocyte T : TCR  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ . Nous avons confirmé que ce niveau d'expression était significativement élevé sur les  $\gamma\delta$  T (MdFI : 17933 +/- 3214 sur 40 patients immuno-déprimés) en comparaison avec les LT conventionnels ( $p=0,0001$ , test t).

Dans les mêmes conditions, nous avons comparé le niveau d'expression du CD3 sur les LT CD4+ et CD8+ après exclusion des LT  $\gamma\delta$ . Nous avons constaté que l'expression du CD3 APC-Cy7+ était plus élevée sur les LT CD4-PE-Cy7+ (MdFI : 13 535 +/- 2 020) que sur les LT CD8-APC+ (MdFI : 11 435 +/- 1 717 ;  $p < 0,0001$ , Figure 42).

Comme ces valeurs pouvaient être faussés par les compensations d'intensité de fluorescence qui ont été appliquées entre le CD8 APC et le CD3 APC-Cy7. Cependant, nous avons pu confirmer la différence d'expression du CD3 entre le CD4+ et CD4-  $\alpha\beta$ T sur 5 patients immuno-déprimés, en utilisant la même combinaison de marquage sans le CD8 APC (résultats non montré).



**Figure 42 : La distribution de l'expression de CD3 sur les lymphocytes T  $\gamma\delta$  périphériques.** L'expression de CD3 a été largement distribuée sur les lymphocytes  $\gamma\delta$  périphériques classique  $\gamma 9$  et plus fortement en comparaison aux LT  $\alpha\beta$  (figure a). Quelques patients ont montré une double population de lymphocytes  $\gamma\delta$  (figure b) avec une différence d'intensité de CD3. Les deux populations de LT  $\gamma\delta$  ont une augmentation significative de l'expression des CD3 en comparaison avec les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (figure c). CD3 APC-Cy7, CD8 APC, CD4 PE-Cy7 et  $\gamma\delta$  FITC ont été testés chez 40 patients immunodéprimés.

#### 4.4. La distribution des CD3 est fonction des clonotypes TCR V $\beta$ des lymphocytes T

Comme nous l'avons montré précédemment, le niveau d'expression des CD3 a été très variable entre les patients (Figure 43), les 2 isotypes de LT ( $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$ ) (Figure 42), et les 2 sous-populations de LT (CD4 et CD8) (Figure 42).

En plus, comme il y avait une grosse différence entre les LT  $\gamma\delta$  ( $\gamma 9$  et autres  $\gamma$ ), nous avons cherché s'il existait des différences entre les clonotypes de V $\beta$  des LT  $\alpha\beta$ , en utilisant une combinaison de marquage composée de CD3 APC-Cy7, CD8 APC, CD4 PE-Cy7, et deux clonotypes d'anti V $\beta$  conjugués avec de la FITC ou la PE sur du sang de 28 donneurs sains (22 V $\beta$  ont été testés sur 11 tubes). Nous avons remarqué une différence consistante d'expression de CD3 en fonction des clonotypes (Figure 45).

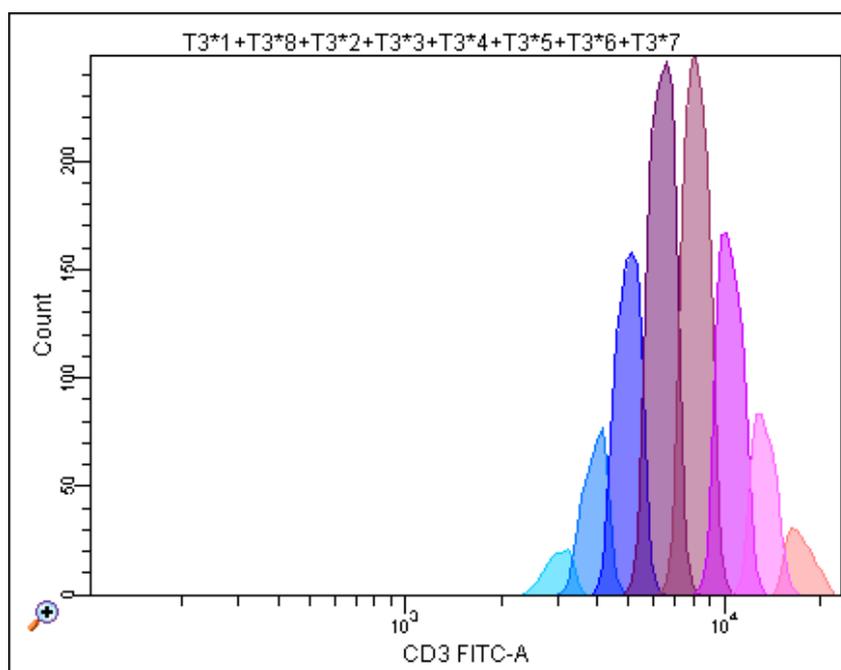


Figure 43 : La grande variabilité d'expression du récepteur CD3 sur les lymphocytes  $\alpha\beta$ .

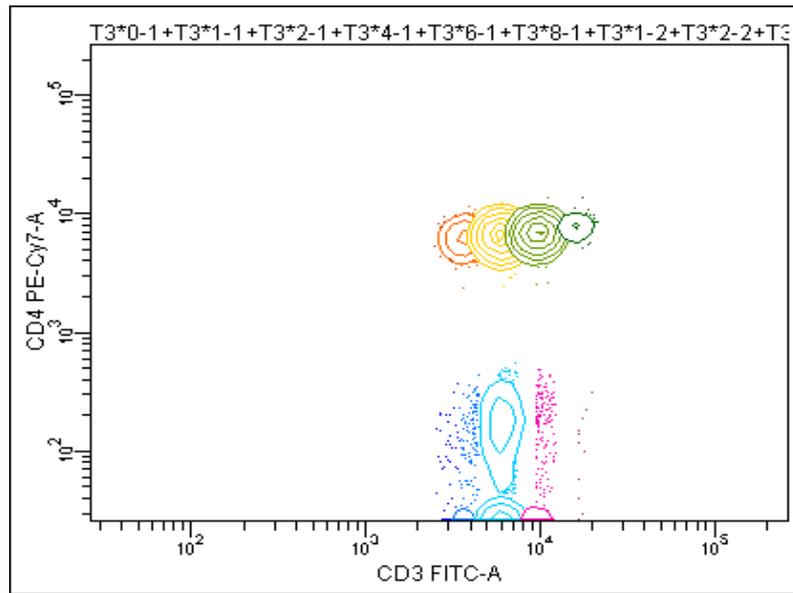


Figure 44 : La grande variabilité d'expression du CD3 sur les LT CD4 et CD8 (CD4-) sur les lymphocytes  $\alpha\beta$ .

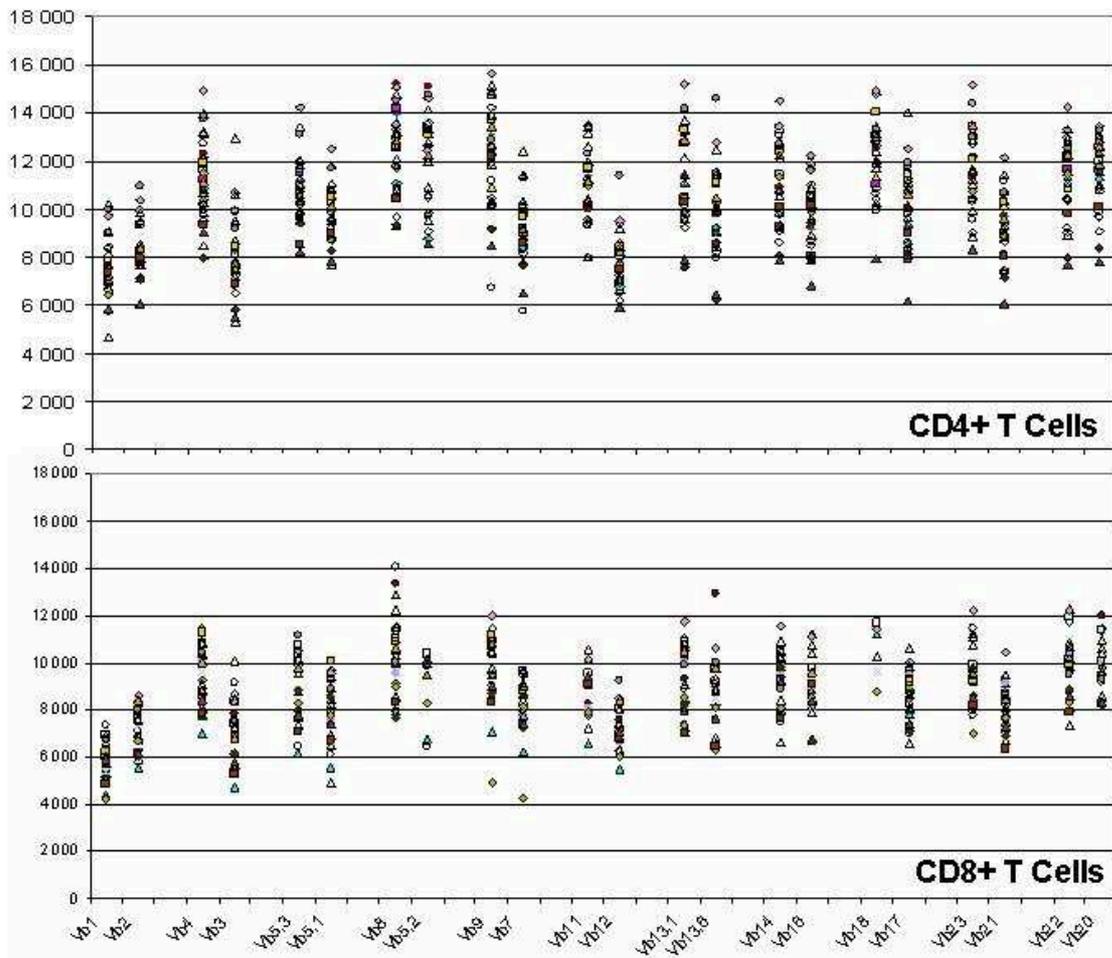


Figure 45 : La médiane d'intensité de fluorescence du CD3 varie en fonction des clonotypes des LT. Les valeurs ont été toujours élevées sur les LT CD4+ que sur les LT CD8+. APC-Cy7, CD8 APC, CD4 PE-Cy7 et V $\beta$  clonotype FITC/PE ont été testés chez 28 donneurs sains.

Nous avons constaté que le niveau d'expression du CD3 reflété par la MdFI était très bas sur certains clonotypes (e.g. : CD4+ LT : V $\beta$ 1 PE : 7 366 +/-1 236; V $\beta$ 2 FITC 8 023 +/-1 140, V $\beta$ 3 FITC 7 980 +/-1 628) et très élevée ( $p < 0.0001$ ) sur d'autres clonotypes (e.g. : V $\beta$ 8 PE : 12 845 +/-1 695; V $\beta$ 9 PE 12 435 +/-2 093; V $\beta$ 20-FITC 11 768 +/-1 510). En accord avec les premières expériences, nous avons observé que l'expression était plus élevée sur les CD4+ que sur les CD8, mais dans chaque sous-types (CD4+ ou CD8+) la différence entre les clonotypes était la même sur les CD4+ (Figure 45 en haut) que sur les CD8+ (Figure 45 en bas). Ces différences observées étaient similaires chez tous les patients et elles n'étaient pas reliées aux fluorochromes (PE ou FITC) utilisés pour le marquage des anti-clonotypes : dans les clonotypes où ils ont été marqués avec le FITC ou le PE, l'expression du CD3 était basse (e.g. anti V $\beta$ 1-PE ou anti V $\beta$ 2-FITC) ou élevée (e.g. anti V $\beta$ 3-FITC or V $\beta$ 20-PE) (Figure 45).

#### 4.5. La variabilité d'expression d'autres récepteurs membranaires

Nous nous sommes posés la question si la variabilité d'expression des récepteurs était restreinte au récepteur CD3. En effet, nous avons observé une variabilité élevée de l'expression membranaire d'autres récepteurs chez 56 patients immuno-déprimés, tel que :

- CD45 : 6269 +/-893 (CV = 14.2%) sur les LT CD4+ et 7976 +/-1186 (CV = 14.9%) sur les LT CD8+
- CD4 : 7159 +/-755 (CV = 10.5%) sur LT CD4+
- CD8: 12054 +/-1518 (CV = 12.6%) sur LT CD8+
- A noter que l'expression du CD45 était plus élevée sur les LT CD4 comparé aux LT CD8+.

Dans le but de comparer le niveau d'expression entre 2 niveaux différents d'expression de récepteur, nous avons divisé arbitrairement la population des LT en 8 sections équidistantes sur une échelle logarithmique par rapport à l'intensité de fluorescence du CD3 (Figure 44 et 46). En suite, nous avons comparé le niveau d'expression de CD4 ou CD8 et CD45 entre les différentes sections de CD3.

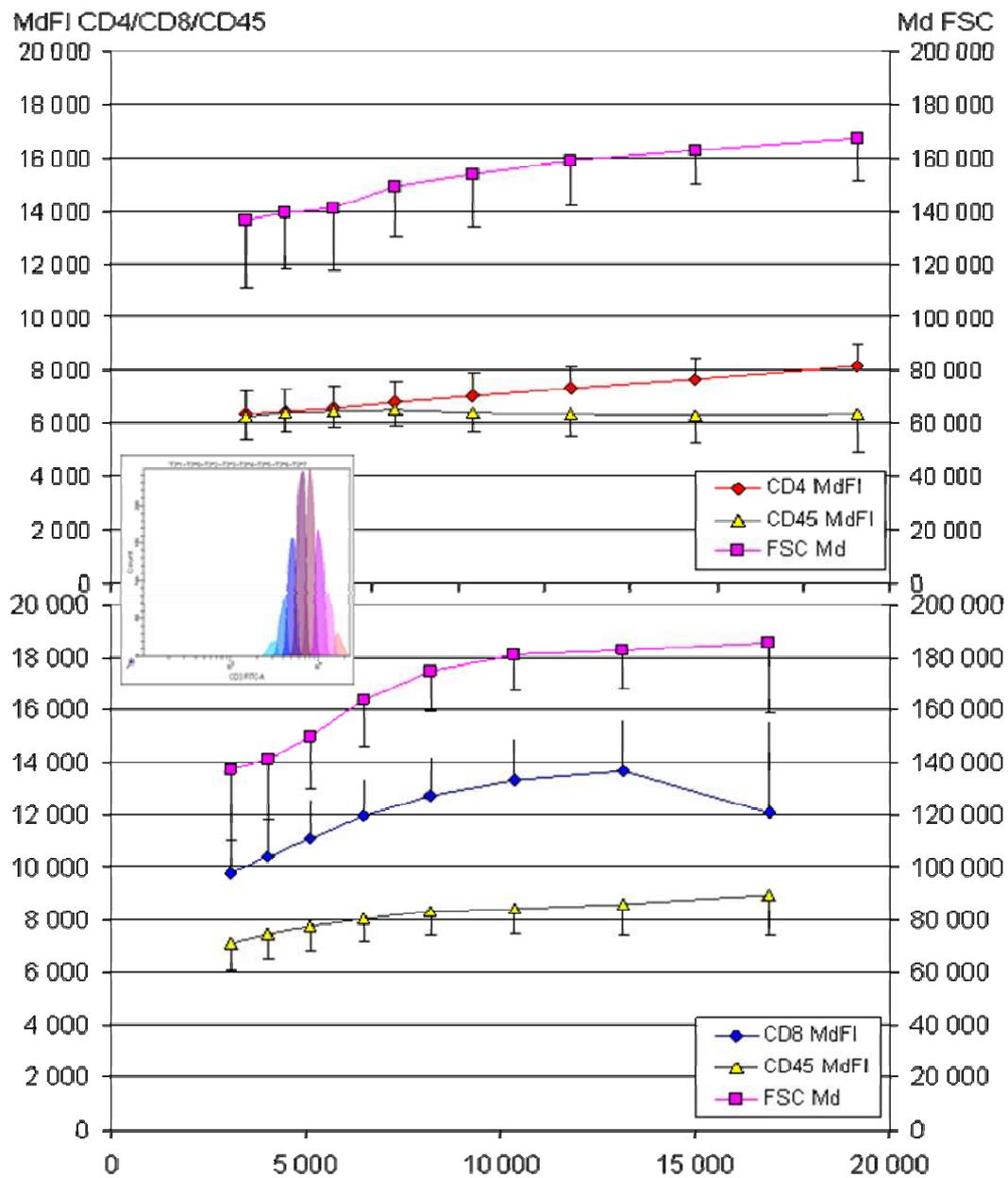


Figure 46 : L'analyse des CD4 ou CD8; CD45 et le FSC selon l'intensité de fluorescence du CD3.

Le CD4 augmente graduellement avec le niveau de CD3 ( $p < 0,001$ , test t entre 2 niveaux de sections consécutives de CD3).

Le CD8 augmente graduellement sur toutes les sections ( $p < 0,001$ ) sauf dans les dernières sections qui expriment des niveaux élevés de CD3. Similairement, le CD45 augmente graduellement sur les LT CD8+ ( $p = 0,001$ ) mais seulement pour les 5 premières sections de niveaux d'expression dans le cas de LT CD4+ ( $p < 0,026$ ) (Figure 46).

#### **4.6. Le niveau d'expression de CD3 ne dépend que partiellement de la taille des cellules**

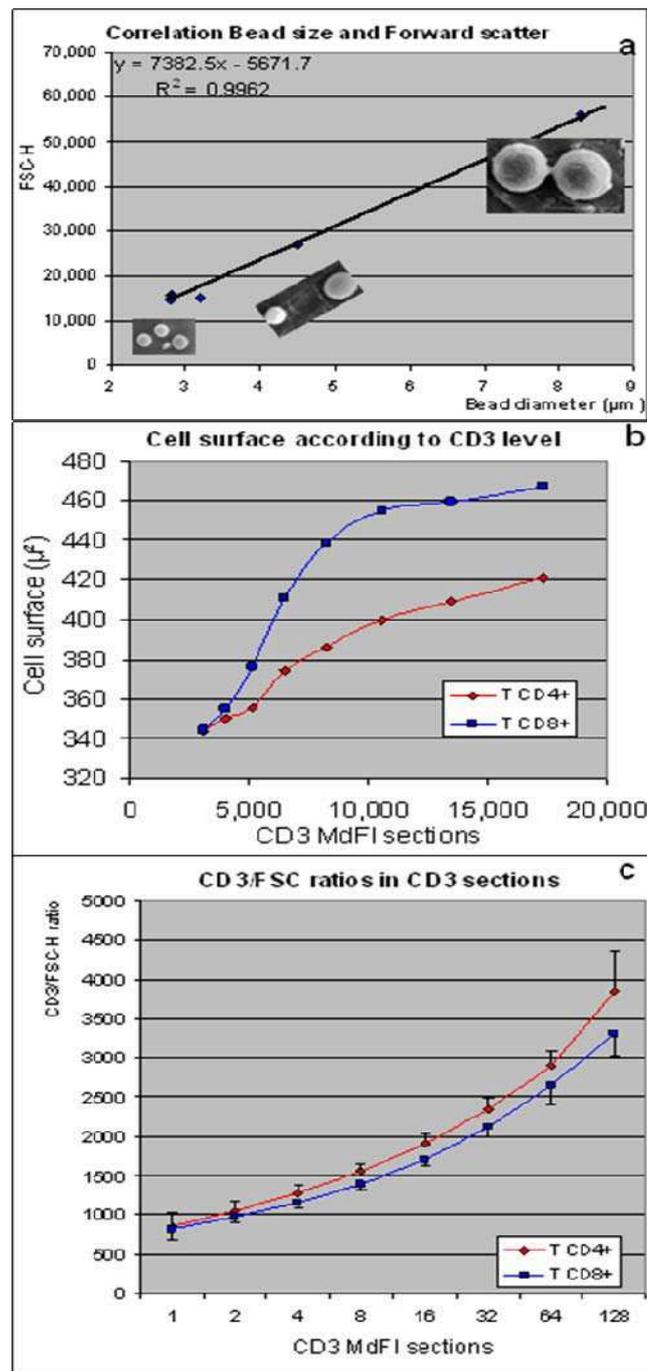
Ainsi, l'expression de plusieurs récepteurs variait dans le même sens sur les lymphocytes T. Ces variations pourraient être liées à des différences de tailles. Les plus petits lymphocytes pouvant exprimer moins de molécules que les gros. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué la variation de la médiane d'intensité du Forward Scattering (MdfSC-H).

La diffraction à faible angle de signal reflète la taille de la particule et de son indice de réflexion. Nous avons cherché à évaluer la taille des cellules en fonction du signal FSC.

L'indice de réfraction a été évalué à 1,592 pour les billes en polystyrènes, 1,355 pour le cytoplasme des lymphocytes T et 1,456 pour le noyau. La taille du noyau a été estimée à 80% de la taille de la cellule en accord avec la littérature (Semyanov *et al.* , 2007, Slood *et al.* , 1988)39-40).

L'analyse repose sur la théorie de Mie (van de hulst) appliquée à des particules sphériques comportant plusieurs couches (coated particule). Les différentes étapes de l'analyse sont les suivantes :

- Passage dans le cytomètre de particules de polystyrène d'indice de réfraction connu (1,592) et de taille connue (2,6 ; 3 ; 4,3 ; 8µm)
- Utilisation de la théorie de Mie pour les particules sphériques pour en déduire l'intervalle d'angle 3-10° de diffusion caractéristique du signal FSC du cytomètre et expliquer la relation entre la relation entre FSC et la taille
- Utilisation de la théorie de Mie pour les coated particules (avec des indices de réfraction donnés par semyanov) et utilisation des résultats précédents pour calculer la taille du lymphocyte



**Figure 47 : Relation entre le FSC et la taille des particules de polystyrène.** a) des billes avec différentes tailles mesurées par MEB ; b) la surface des cellules calculée à partir du FSC en accord avec le niveau de CD3 de 56 patients ; c) rapport des intensités de CD3/FSC en fonction des sections de CD3 chez 14 patients consécutifs.

Nous avons constaté que la MdfSC-H augmente graduellement avec le niveau de CD3 sur les LT CD4+ (Figure 46 en haut) et LT CD8+ (Figure 46 en bas,  $p < 0,0001$  test t pour chacune des sections par rapport à la précédente avec un niveau bas de CD3).

Afin d'estimer la taille de cellules par rapport à la MdfSC, nous avons d'abord déterminé la taille de certaines billes par microscopie électronique qui vont être utilisées comme standard (Figure 47a). Les diamètres des billes utilisées ont été mesurés par MEB :

8.35 +/- 0.32µm pour les billes du Qifikit® (n=34); 3.22 +/- 0.089 (n=25) et 4.48 +/- 0.16µm pour les billes 7-color setup® (n=48); 2.49 +/- 0.89 µm pour les billes de Trucount® (n=37); 8.60 +/- 0.22µm pour les billes de Flowcount® (n=31) et 27.8 +/- 2.8 µm pour les billes de Rainbow® (n=75). Nous avons ensuite analysé leurs FSC-H (répété 5 fois), en utilisant les mêmes réglages que pour l'analyse des lymphocytes T. Nous avons pu confirmer que les MdfSC-H des billes ont été directement corrélés à la taille des billes (avec la relation linéaire,  $y=7382.5x - 5671.7$ ;  $r^2 = 0.996$ ) (Figure 47a).

Grâce à la théorie de Mie et à l'indice de réfraction des cellules, nous avons pu estimer la taille des cellules (diamètre, d) au moyen de la fonction suivante :

$$[\text{FSC-H} = 1250 d^2]$$

Cette fonction montre que le FSC-H a été proportionnel à la surface des cellules plutôt qu'à diamètre.

La moyenne du diamètre des cellules a été de 11,1 µm pour les LT CD4+ et 11,5 µm pour les LT CD8+ chez 56 échantillons testés. Nous avons remarqué que, la taille des cellules augmente progressivement avec le niveau des CD3 de 10,5 à 11,6 pour les LT CD4+ et 10,5 à 12,2 pour les LT CD8+ (Figure 47b).

Les logiciels de traitement de données cytométriques permettent de calculer en direct (mais pas a posteriori) le ratio entre deux signaux. Sur un autre échantillon de 14 patients consécutifs, nous avons mesuré le rapport CD3/FSC-H de chaque. Le rapport augmente progressivement avec le niveau de CD3, de 853 +/- 163 à 3843 +/- 523 pour les LT CD4+ et de 829 +/- 144 à 3314 +/- 303 pour les LT CD8+ (Figure 47c), confirmant la relation entre le niveau d'expression de CD3 et la taille des cellules.

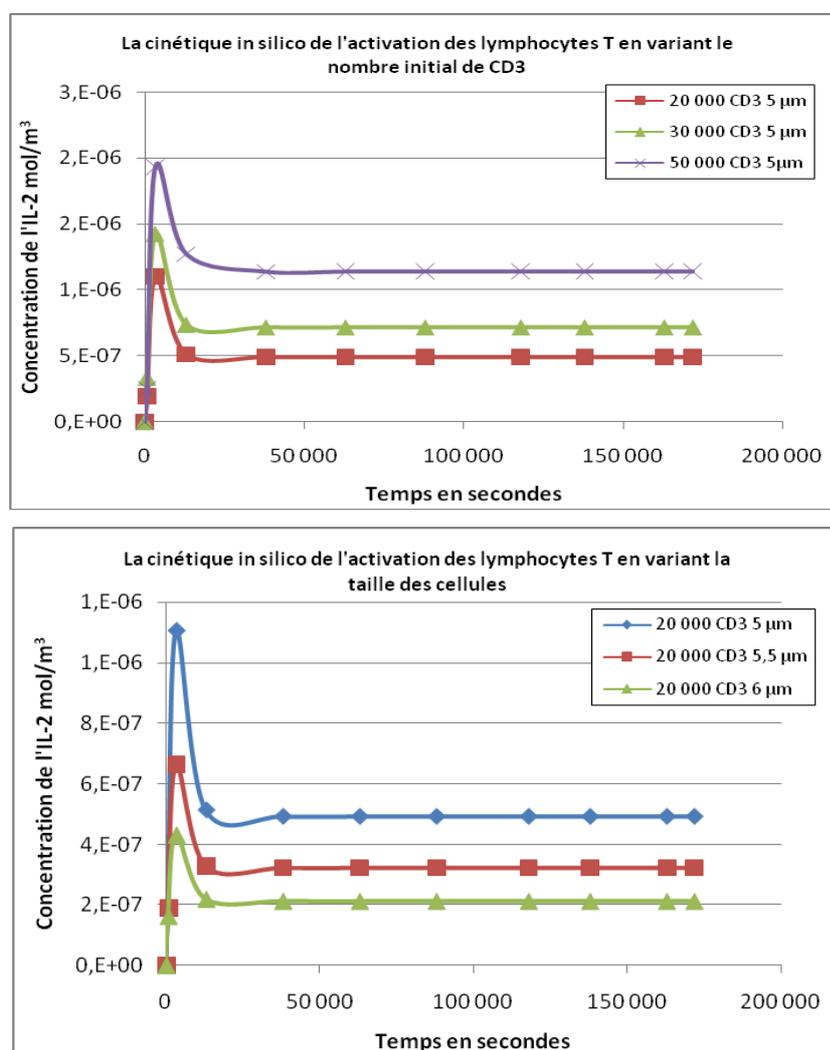
Toutefois, l'intensité de fluorescence des CD3 augmente plus que la taille des cellules (Figure 47c). Ceci suggère que la différence de taille n'était pas suffisante pour expliquer la grande variabilité de l'expression des CD3 et le fait que les cellules de grande taille expriment une densité de CD3 plus élevée, surtout pour les LT CD8+.

Nous avons donc observé que les lymphocytes T exprimaient une grande variation de CD3, quel que soit leur sous-type et de façon non aléatoire, selon le clonotype.

#### 4.7. Les conséquences fonctionnelles de la différence d'expression de CD3 à la surface des LT

Le nombre de CD3 est très important dans la formation des complexes avec les TCR, et dans l'activation des LT après la reconnaissance du peptide. Nous nous sommes alors demandé si cette variabilité avait une signification fonctionnelle comme le suggèrent les données de la littérature.

Dans ce but nous avons évalué si la différence d'expression de CD3 peut influencer la réactivité des LT, en réalisant des simulations numériques de l'effet de la taille ou de la densité sur l'activation des LT avec notre modèle.

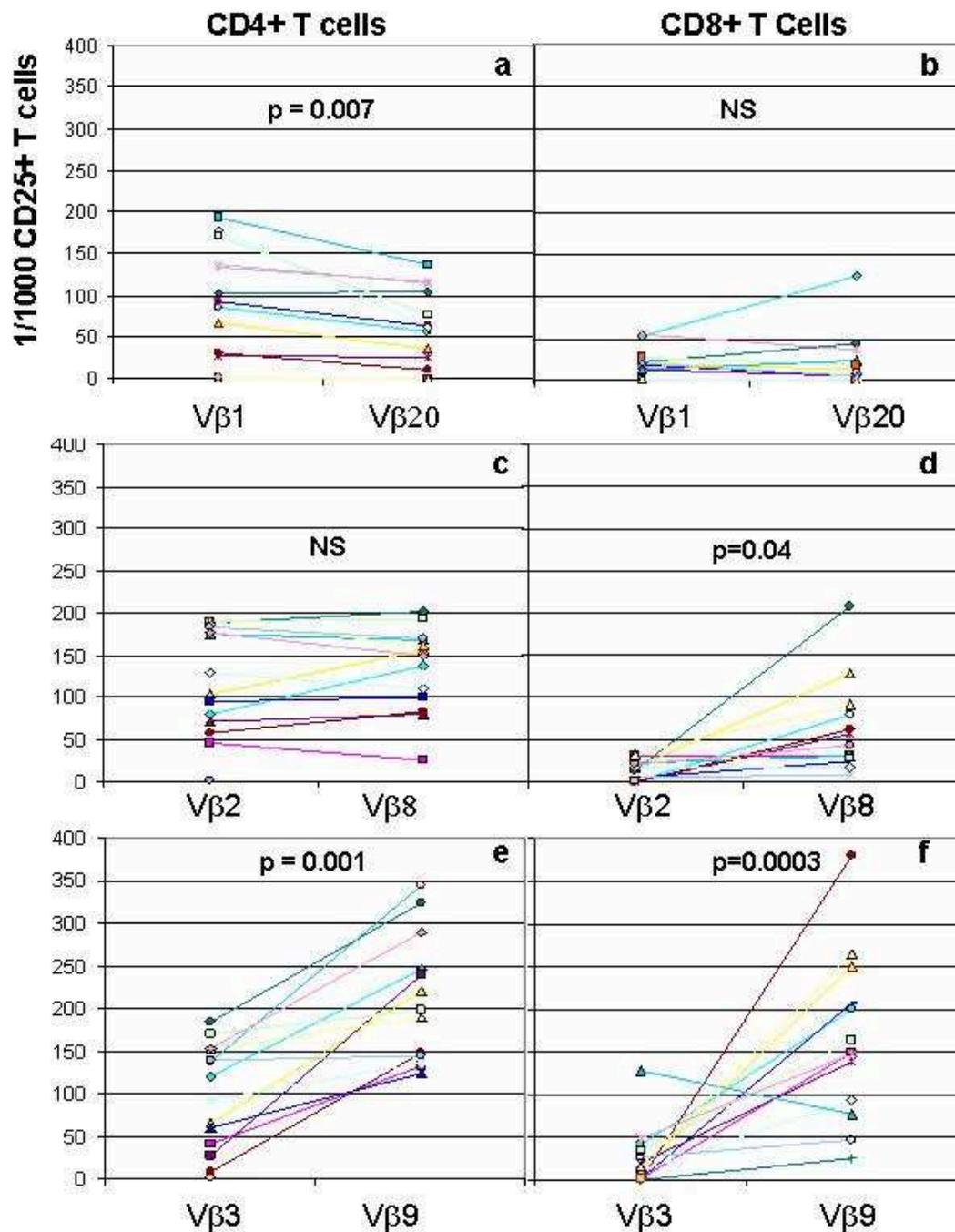


**Figure 48 :** La simulation numérique de la cinétique d'activation des lymphocytes T pour différentes densités initiales de CD3/TCR (20 000-50 000 CD3/TCR complexes par cellule) et différentes taille de cellules (rayon de 5 à 6 μm). L'activation induit la sécrétion de l'IL-2 et la production de son récepteur. La liaison et l'internalisation du complexe étaient considérées comme un paramètre de décision dans l'entrée dans le cycle cellulaire.

Pour une taille donnée, les simulations ont montré que les LT avec un niveau élevé de CD3 sur leur membrane atteignaient un niveau plus élevé d'activation (pic maximal, 48a). D'autre part, pour chaque niveau de CD3, la taille des cellules avait un grand effet sur la hauteur du pic (capacité de la réponse), aussi les cellules de petite taille s'activent plus rapidement (réduction de temps de réaction) et atteignent rapidement le pic maximal de réactivité en comparaison avec celles de grande taille (Figure 48b). Globalement, le niveau d'expression de CD3 et la taille des cellules ont une influence prédominante sur le déclenchement de l'activation des LT.

Nous avons ensuite évalué cette hypothèse expérimentalement, en activant in vitro les lymphocytes T de 13 donneurs de sang. Les stimulations ont été effectuées avec des billes anti-CD3-CD28 qui garantissent une activation égale pour toutes les cellules, quelle que soit leur avidité pour leur ligand respectifs (pCMH). L'activation a été mesurée via l'induction du CD25 (récepteur de l'IL-2) après 30 heures, sur quelques clonotypes V $\beta$  qui exprimaient des niveaux extrêmes d'expression de CD3.

Nous avons constaté que les LT CD4<sup>+</sup> (Figure 49 colonne de gauche) ont été significativement plus activés que les LT CD8<sup>+</sup> (Figure 49 colonne de droite). De plus, l'activation a été plus efficace sur les clonotypes associés avec un niveau élevé de CD3 (V $\beta$ 8 et V $\beta$ 9) en comparaison avec les clonotypes exprimant un niveau bas de CD3 (V $\beta$ 2 et V $\beta$ 3 ;  $p=0,004$  à  $p=0,0003$ ). Cependant, La différence n'était pas statiquement significative sur les LT CD8<sup>+</sup> V $\beta$ 1/ V $\beta$ 20 et les LT CD4<sup>+</sup> V $\beta$ 2/ V $\beta$ 8 et même dans le cas inverse (CD4<sup>+</sup> : les V $\beta$ 1 ont été plus réactives que les V $\beta$ 20 :  $p=0,007$ ).



**Figure 49 :** Les cellules mononuclées du sang périphérique frais de 13 donneurs sains ont été activées pendant 30h avec des billes anti-CD3/CD28. Le niveau d'activation a été mesuré en utilisant un marquage CD25 PE-Cy5 sur les lymphocytes T CD3-APCCy7, CD4 PE-Cy7 et CD8 APC pour différents clonotypes : Vβ1PE/Vβ20FITC; Vβ2FITC/Vβ8PE et Vβ3FITC/Vβ9PE. Ces clonotypes ont été choisis pour le niveau externe d'expression de CD3 : Vβ1 (7 366+1 236 / 5 857+841); Vβ2 (8 023 +1 140 / 7 368 + 886); Vβ3 (7 980 +1 628 / 6 947 +1 315); Vβ8 (12 845 +1 695 / 10 457 +1 732); Vβ9 (12 435 +2 093 / 10 430 +1 568); et Vβ20 (11 768 +1 510 / 9 870 +1 174) sur les CD4/CD8 respectivement.

## 5. Conclusions :

Les lymphocytes T sont toujours considérés comme un groupe de cellules homogènes avec des propriétés similaires et généralement caractérisées par la moyenne et la médiane de l'ensemble des populations, en négligeant leurs variabilités.

Les lymphocytes T sont séparés en deux populations principales ; les CD4/CD8 et des populations minoritaires (comme :  $\gamma\delta$ T, Th1/Th2, et Th17....) mais qui n'ont été prises en considération que pour la qualité de leurs fonctions.

La dynamique de l'activation des lymphocytes T est généralement considérée comme similaire pour tous les sous-types de lymphocytes T. Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur la large diversité des lymphocytes T existant dans le même échantillon, en termes d'expression des récepteurs à leur membrane. Nous avons remarqué que la variabilité était constante chez les donneurs sains comme chez les patients ayant des troubles immunologiques. Cette variabilité d'expression ne semble pas être liée, ni à des biais techniques car le signal obtenu par le cytomètre semble être étroit avec un CV <2%, après passage régulier dans nos expériences de billes faisant office de contrôle d'assurance qualité (Lambert *et al.* , 2006), ni à des facteurs technique. En effet, les cellules ont été préparées de la même façon, dans le même tube, avec des réactifs en excès, et elles ont été individuellement comparées dans le même échantillon, avec le même marquage. En outre, les variabilités ont été très reproductibles entre les différents échantillons.

La diversité observée des lymphocytes T a été suffisamment large pour avoir une signification fonctionnelle. En effet ;

1-Il a été largement démontré (Carreno *et al.* , 2006, Demotz *et al.* , 1990, Labrecque *et al.* , 2001, Madrenas. , 1999, Margulies. , 1997, Valitutti *et al.* , 1995) que la spécificité de l'activation des LT dépend directement de la quantité de peptide, du nombre de récepteurs TCR et de leur mutuelle affinité. Au fur et à mesure que les LT reconnaissent leur peptide spécifiquement, le complexe TCR-CD3 impliqué dans la liaison était activé et internalisé. Un nombre minimal de TCR semble être nécessaire pour atteindre un niveau d'activation suffisant pour prendre la décision sur le destin des cellules (soit la prolifération, ou anergie ou l'apoptose induit par l'activation).

Le nombre de complexes pCMH présentés par les DC a été moins critique, parce que la liaison des TCR est très rapide et plusieurs TCR peuvent se lier successivement à un seul complexe pCMH (serial engagement).

Comme le nombre de CD3/TCR à l'intérieur de la synapse n'est pas suffisant, d'autres complexes peuvent être recrutés de l'extérieur de la synapse, par transfert surfacique des récepteurs ; ainsi, la distance du transfert peut augmenter avec la taille des cellules. En conséquence, le nombre initial

dans la synapse, et la densité membranaire de CD3 influencent certainement la vitesse d'activation des LT.

2-On peut argumenter cette hypothèse avec l'aide du modèle mathématique qui a été développé par notre équipe récemment (Bidot *et al.* , 2008). Ce modèle n'est malheureusement pas encore achevé car plusieurs paramètres impliqués dans le processus d'activation doivent encore être déterminés avec précision. Toutefois, les premières confrontations des données calculées avec les données expérimentales obtenues à partir de la littérature (Grakoui *et al.* , 1999, Itoh *et al.* , 1999, Rosette *et al.* , 2001, Williams *et al.* , 1999) ont montré que ce modèle est réaliste.

Dans cette présente étude, nous avons utilisé la simulation par ordinateur et choisi un ensemble de paramètres initiaux (peptide agoniste, la taille des cellules CD3 et les niveaux d'expression) qui sont proches des conditions de la pratique clinique. Ces simulations montrent que le nombre initial de CD3 disponibles influence l'activation dans le même ordre de grandeur que les différences observées avec les peptides agonistes et antagonistes.

3-Nous avons confirmé expérimentalement l'importance fonctionnelle du niveau initial de l'expression du CD3. Ceci a été réalisé en activant les LT avec des CPA artificielles, qui sont des billes anti-CD3 et anti-CD28 induisant l'activation de tous les LT indépendamment de leur structure ou de l'avidité de leur TCR pour le pCMH. Nous avons analysé les effets de l'activation précoce (expression membranaire de CD3, CD25 et CD69) pendant les 30 premières heures avant la première division cellulaire afin d'éviter la confusion entre le niveau d'expression des cellules mères avec les cellules filles.

4- Nous avons comparé les différents clonotypes dans les mêmes échantillons de sorte que la préparation des cellules soit réalisée dans les mêmes conditions, dans le même puits, afin de réduire les erreurs techniques. Les risques d'artefact expérimentaux étaient minimes car les LT ont été exposés aléatoirement, avec la même probabilité, et dans les mêmes conditions environnementales (même puits, même environnement) à la plus efficace activation polyclonale physiologique (anti-CD3/anti-CD28 sur billes). L'activation de chaque clonotype a été comparée 2 par 2 et à son homologue non activé.

5-L'expression de CD3 a été reliée à la taille des cellules mais la relation n'était pas linéaire, et les cellules ayant un fort FSC avaient beaucoup plus de CD3 que ne le voudrait la simple différence de taille. Cela a été confirmé en comparant les valeurs de FSC entre les différentes sections de CD3 et par la mesure du rapport individuel de CD3/FSC.

L'étude physique a montré que le FSC était directement lié au diamètre au carré des particules, c-à-d la surface cellulaire. Cela nous a permis de relier l'expression de CD3 à la densité surfacique ; la taille réelle des LT peut être calculée, mais nous n'avons pas trouvé de technique qui permette de compter le nombre absolu de CD3 à la surface de différentes cellules. Le Qifikit semble être la meilleure méthode pour le quantifier, mais celui-ci utilise le marquage indirect qui n'est pas compatible avec nos multiples marquages cellulaires. Cela pourrait être résolu avec le tri des

différentes sous-populations des LT, mais il nécessite un marquage qui rende par la suite la quantification des CD3 impossible.

6-Il existe des arguments physiques pour expliquer la relation entre le niveau d'expression de CD3 et la réactivité des cellules. Un recrutement suffisant de complexe CD3/TCR est nécessaire dans la synapse en vue de parvenir à un niveau suffisant pour la transduction du signal (Demotz *et al.*, 1990, Denkberg *et al.*, 2001, Hudrisier *et al.*, 1998, Itoh *et al.*, 1999, McKeithan, 1995, Valitutti *et al.*, 1997). Le nombre de pCMH n'a pas de rôle limitant parce que lors du « serial engagement » un seul complexe pCMH peut lier successivement plusieurs TCR (Demotz *et al.*, 1990, Hudrisier *et al.*, 1998, Itoh *et al.*, 1999, Valitutti *et al.*, 1995).

Le nombre de récepteurs dans la synapse peut être insuffisant pour atteindre le seuil d'activation, ce qui nécessite le recrutement d'autres récepteurs présent sur la membrane. Le recrutement de ces molécules se fait grâce à un transfert membranaire, qui se fait à une vitesse linéaire (Favier *et al.*, 2001). Il est raisonnable de considérer que cette vitesse est constante pour les différentes cellules, parce qu'elle dépend des composantes de la membrane et de la motricité du cytosquelette qui est considéré commune pour toutes les cellules.

Sur les grands LT, le pool des molécules est grand (forte intensité de fluorescence), ce qui induit une grande distance de transfert pour arriver à la synapse. Dans le modèle, nous avons utilisé une taille de cellules moyenne (rayon entre 5 et 6  $\mu\text{m}$ ), une densité initiale de CD3/TCR entre 25 000 et 50 000 complexes par cellule et une vitesse surfacique constante tirée des données expérimentales publiées dans la littérature (Favier *et al.*, 2001). En général, nos données théoriques et expérimentales ont prouvé que la variabilité de l'expression de CD3 avait une signification fonctionnelle. L'activation *in vitro* des LT a été maintes fois plus efficace sur les clonotypes ayant un niveau d'expression de CD3 plus élevé par rapport à ceux ayant un niveau d'expression de CD3 plus bas.

7-Est-ce que le niveau de variabilité de CD3 est relié au devenir des LT ? L'expression du CD3 était significativement différente suivant les sous-populations des LT. En accord, les LT CD4 (exprimant un niveau élevé de CD3) étaient plus souvent activés dans les tests de stimulation. La relation avec les clonotypes est plus surprenante.

8-Comment l'expression du CD3 et le potentiel d'activation sont-ils reliés aux clonotypes ? Le choix du clonotype pour un pCMH donné est aléatoire et déterminé selon l'avidité de la reconnaissance. Le clonotype n'a donc *a priori* aucune relation avec le type d'antigène et la taille/densité de surface ne peut être adapté à la nature de l'antigène ou du risque pour l'hôte. Parce que le segment V $\beta$  est impliqué dans la liaison du complexe pCMH au TCR, il est possible que le LT adapte son niveau d'expression de CD3 et sa taille avec l'avidité au pCMH. Mais les différences seraient plus larges pour chaque clonotype et il ne serait pas possible d'observer des expressions aussi homogènes. Le lymphocyte T pourrait utiliser des moyens matériels pour une meilleure adaptation de sa réactivité à la fréquence ou à l'intensité du challenge.

D'autre part, considérant que la détermination des clonotypes est relativement hasardeuse pour un complexe de peptide donné/MHC, nos résultats suggèrent une variabilité individuelle dans la réponse à un antigène donné selon le clonotype de TCR choisi. Un même antigène peut avoir une forte ou faible réponse en fonction du clonotype qui le reconnaît. Cependant, la différence n'est pas aussi aléatoire puisque pour un antigène, le choix du clonotype dépend en grande partie de l'haplotype qui présente l'antigène, avec une certaine reproductibilité entre individus de même groupe HLA. Les autres molécules de co-stimulation (CD4 ou CD8, CD28, ..) ne devraient pas intervenir vigoureusement, car elles sont communes à toutes les cellules.

En conclusion, les cellules expriment des récepteurs avec une grande variabilité qui ne dépend pas de l'antigène reconnu mais plus du terrain génétique du sujet. Cette variabilité génotypique pourrait créer des variabilités de risque de réponse (adaptée ou sous-évaluée ou exagérée) pour un antigène.

## **II. Etude de la cinétique d'activation des récepteurs membranaires chez la souris et confrontation avec la modélisation mathématique**

### **1. Introduction**

Comme nous l'avons cité précédemment, notre modèle mathématique (Bidot *et al.* , 2008), n'est malheureusement pas encore achevé car plusieurs paramètres impliqués dans le processus d'activation doivent encore être déterminés avec précision. Toutefois, les premières confrontations des données calculées avec les données expérimentales obtenues à partir de la littérature (Grakoui *et al.* , 1999, Itoh *et al.* , 1999, Rosette *et al.* , 2001, Williams *et al.* , 1999) ont montré que ce modèle est réaliste.

Pour une meilleure correction et validation du modèle nous avons cherché à déterminer certains paramètres cinétiques manquants, en réalisant des cinétiques d'activation des récepteurs membranaires des lymphocytes T sur des souris transgéniques pour un récepteur T spécifique du peptide hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza (spécificité de 97% de leurs TCR pour le peptide HA).

Notre choix s'était porté sur ce modèle expérimental, parce qu'il présente une grande spécificité pour le peptide HA et une réactivité plus forte des LT, qui n'est pas réalisable chez l'homme (<1% des LT sont spécifiques pour un peptide donné).

Nous présentons dans ce chapitre les cinétiques obtenues expérimentalement, qui ont été par la suite confrontées aux simulations numériques obtenues avec le modèle de Caroline Bidot. Les méthodes classiques d'analyse des données avec les logiciels disponibles ont paru bien insuffisantes et pour une meilleure interprétation, nous avons entrepris de réaliser un modèle mathématique permettant d'interpréter les résultats expérimentaux relatifs à l'évolution des récepteurs membranaires des lymphocytes T en fonction du temps.

### **2. Cinétique d'absorption du peptide HA par les cellules dendritiques**

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'activation des lymphocytes est déclenchée par une présentation du peptide par les cellules présentatrices d'antigène.

Afin de réaliser la cinétique d'activation des LT, nous avons choisi un modèle *in vitro* d'activation où il était possible de maîtriser et modifier au mieux les paramètres locaux. Ce

modèle consiste à mettre en contact des cellules dendritiques chargées avec différentes concentrations de peptides HA en présence de lymphocytes et de suivre leurs activations (expression des récepteurs membranaires).

## **2.1. But**

Dans notre étude nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux cellules dendritiques, dans le but d'étudier leurs capacités à présenter l'antigène et le temps d'incubation nécessaire pour un maximum d'absorption.

## **2.2. Méthodes**

Les cellules dendritiques ont été différenciées à partir de cellules de la moelle osseuse issues du fémur et tibias de souris BalbC (âge entre 1 et 3 mois), en présence de GM-CSF et IL-4 (Bajenoff *et al.*, 2006); après 15 jours de culture, la pureté des DC a été déterminée par marquage CD45+/CD19+/CD11c+ (pureté >85%).

Les cellules au nombre de  $0,5 \cdot 10^6$ , ont été mises en culture dans un volume de 500µl de milieu de culture (10% SVF) en présence de peptide HA à 37°C.

Le surnageant récupéré a subi une étape de précipitation de protéine en présence de 50µl de HCl (1M) et 1ml d'acétonitrile, puis analysé par HPLC-MS. Le spectre de masse a été obtenu par balayage des masses m/z. les ions positifs ont été détectés. Les transitions suivies étaient 470.8/306.2, 470.8/564.2, 470.8/635.0. La quantification a été réalisée sur la transition 470.8/306.2. La séparation a été effectuée sur une colonne C18 symmetry Waters 2.1mm de diamètre interne et 10cm de long avec des particules de 3.5µm. Le gradient réalisé était de 5% ACN 0.1% acide formique (AF) à 30% ACN AF en 5 minutes puis 100% ACN AF de 6 à 10 minutes et un reconditionnement de 5 minutes. Les concentrations ont été calculées à partir de la droite étalon réalisée dans le milieu de culture entre 0.1 et 1000ng/ml. La courbe de régression linéaire a été établit avec une pondération de 1/X<sup>2</sup> afin de favoriser les faibles concentrations plus proches de la valeur des échantillons.

## **2.3. Résultats**

### **2.3.1. Sensibilité de la HPLC-MS**

Le peptide HA a été clairement identifié par HPLC-MS (*high-performance liquid chromatography/mass spectroscopy*). Une gamme étalon a été réalisée par dilution en cascade, et les différentes concentrations testées sont : 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.1

ng/ml (Figure 50). La dernière concentration détectée par HPLC-MS était 0,1 ng/ml, ce qui nous a permis d'en déduire la sensibilité de détection de l'appareil.

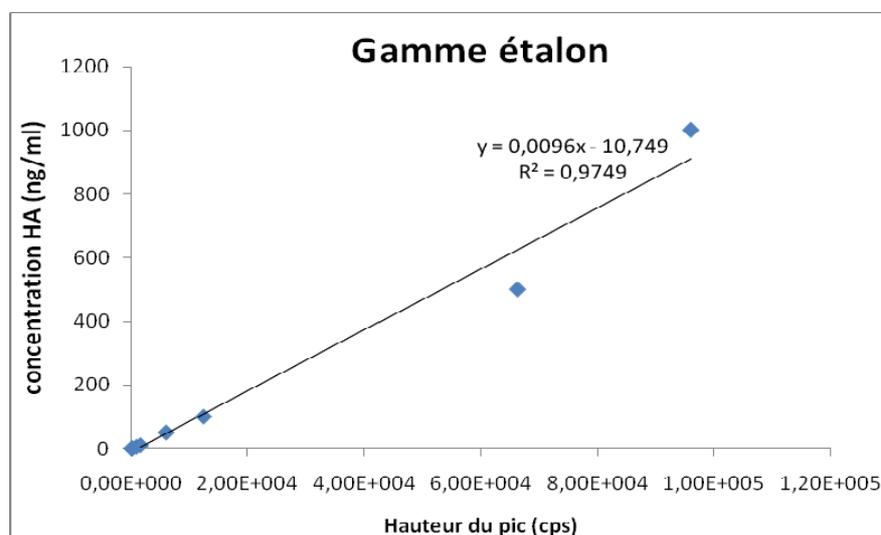


Figure 50 : Gamme étalon du peptide HA

### 2.3.2. Cinétique d'absorption du peptide HA

Afin de déterminer la capacité d'absorption d'une DC, les cellules ( $0,5 \cdot 10^6$  cellules/puits dans un volume de 500 $\mu$ l de milieu de culture) ont été incubées à 37°C en présence de peptide HA<sub>512-520</sub> (10 $\mu$ g/ml soit 10  $\mu$ M) à différents durées de temps (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 et 180 min), les échantillons ont été centrifugés à 300g pendant 5 minutes. Le surnageant de culture a été récupéré puis a subi une précipitation en présence de HCl et ACN afin d'éliminer toutes les protéines présentes (la performance de la précipitation a été évaluée à >80% par comparaison de la concentration de protéines dosées dans des échantillons ayant subit ou pas une précipitation) (La technique est détaillée dans la partie « matériels et méthodes »). Le peptide restant dans le surnageant après centrifugation a été dosé par spectromètre «HP 1100» (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) couplé à un hybride triple quadropole trappe ionique 5500 QTRAP en mode MRM (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) à 20 $\mu$ l/min.

La séparation a été effectuée sur une colonne C18 symmetry Waters 2.1mm de diamètre interne et 10cm de long avec des particules de 3.5 $\mu$ m. Le gradient réalisé était de 5% ACN 0.1% acide formique (AF) à 30% ACN AF en 5 minutes puis 100% ACN AF de 6 à 10 minutes avec un reconditionnement de 5 minutes. L'expérience a été répétée 3 fois.

Le surnageant de culture récupéré à différents temps a été dosé, sachant que la concentration initiale de peptide à temps 0 était de 10  $\mu$ g/ml (soit 10nM), cette concentration subit une baisse

importante dès les premières minutes d'incubation. En faisant une soustraction de la concentration à l'instant initial par la concentration à l'instant t, nous avons pu réaliser la cinétique d'absorption du peptide HA par les DC (Figure 51).

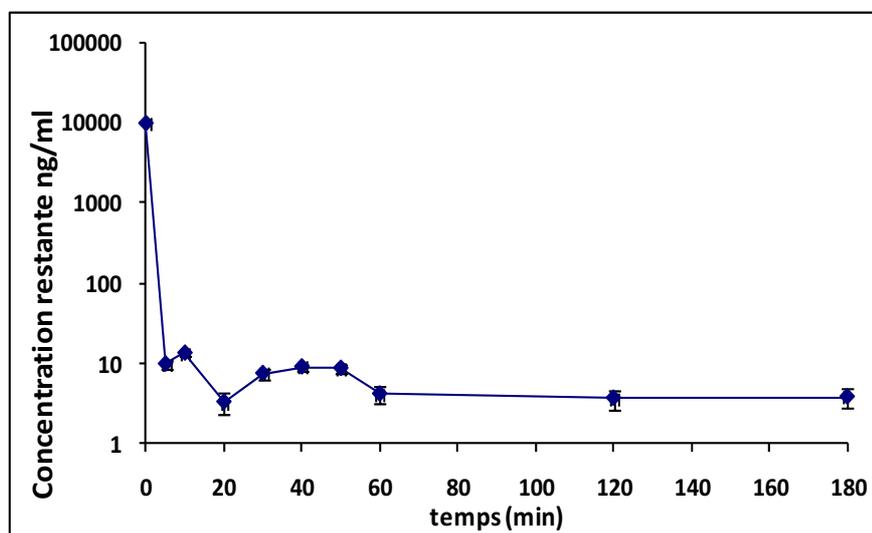


Figure 51 : Dosage par HPLC de la cinétique d'absorption du peptide HA restant dans le milieu après contact avec les cellules dendritiques en échelle log.

Les résultats montrent que le peptide a été absorbé à 99.9% +/- 1% dès les 5 premières minutes, ce qui correspond à une capacité de  $1,062 \cdot 10^{-17}$  moles/cellule (en divisant le nombre de moles de peptide absorbé à  $t=5$ min par le nombre de cellules dans le puits), ou une concentration de  $6,39 \cdot 10^6$  peptides/cellule (en multipliant la capacité en moles/cellules par le nombre d'Avogadro). Cette absorption a atteint son seuil de saturation de 99,96% +/-0.1% après 2 heures d'incubation avec une capacité de  $1,063 \cdot 10^{-17}$  moles/cellule ou une concentration de  $6,4 \cdot 10^6$  peptides/cellule (Tableau 7).

Nous avons réalisé des contrôles pour éviter la présence d'artefact;

- Une saturation des plaques de culture avant de réaliser la cinétique, afin d'éviter une éventuelle adsorption du peptide sur le plastique. La saturation a été effectuée pendant 3 heures avec du SVF 10% à 37°C.
- Une gamme étalon de peptide purifié, à différentes dilutions dans les mêmes conditions expérimentales d'incubation mais sans les cellules.
- Des cinétiques d'absorption dans du milieu sans SVF, qui a été remplacé par du RPMI seul, afin d'évaluer la possibilité d'absorption du peptide avec les molécules de SVF présentes dans le milieu ; les résultats obtenus ont été similaires.

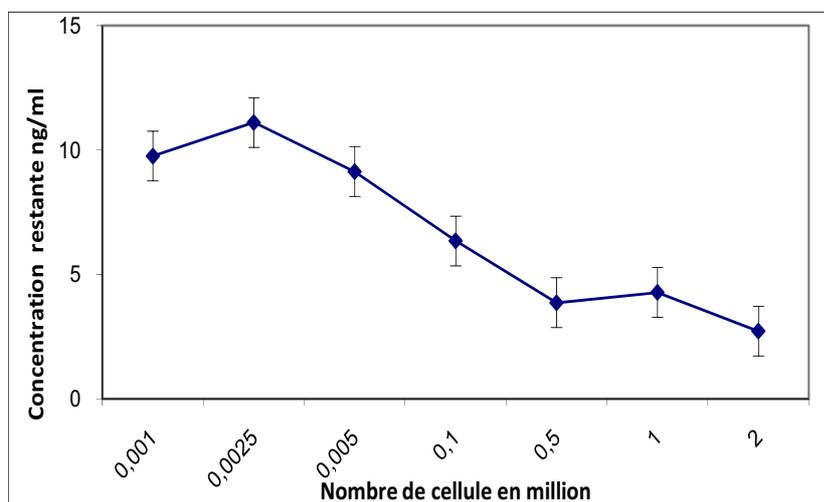
Temps (minutes)	0	5	10	20	30	40	50	60	120	180
Concentration restante ng/ml	10000	9,82	13,45	6,59	7,475	9,05	8,68	4,15	3,68	3,825
Concentration absorbée ng/ml	0	9990	9986	9993	9992	9990	9991	9995	9996	9996
capacité moles/cell ( $10^{-17}$ )	0	1,062	1,062	1,063	1,063	1,062	1,062	1,063	1,063	1,063
nombre de peptide /cell ( $10^6$ )	0	6,39	6,39	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40
% absorption	0	99,90	99,86	99,93	99,92	99,90	99,91	99,95	99,96	99,96

**Tableau 7 : Evaluation de la cinétique d'absorption du peptide HA par les DC. Expérience répétée 3 fois.**

A partir de ces résultats préliminaires nous avons pu déterminer la quantité absorbée par une DC, qui atteignait les  $6,4 \cdot 10^6$  peptides/cellule ( $1,063 \cdot 10^{-17}$  moles/cellule) après 2 heures d'incubation (Tableau7).

### 2.3.3. Evaluation de la capacité d'absorption du peptide HA en variant le nombre de DC

Afin de déterminer la capacité maximale d'absorption des DC pour le peptide HA, nous avons incubé la plus forte concentration de peptide avec les dilutions de DC. Les quantités décroissantes de DC (2; 1; 0,5; 0,1; 0,005; 0,0025 et 0,001 millions) ont été incubées avec une concentration de 10 µg/ml (soit 10µM) de peptide HA pendant 2h à 37°C dans un volume de 500 µL de milieu de culture. L'expérience a été répétée 3 fois.



**Figure 52 : Courbe représentant la capacité d'absorption des cellules dendritiques.** Différentes concentrations de cellules dendritiques (2 ; 1 ; 0,5 ; 0,1 ; 0,005 ; 0,0025 ; 0,001.10<sup>6</sup>) ont été incubées dans un volume de 500µl avec 10µg/ml de peptide HA 512-520 pendant 2h à 37°C. Expérience répétée 3 fois.

L'absorption du peptide par les cellules dendritiques a été très massive, même en présence d'une quantité faible de DC (1000 cellules) (Figure 52), atteignant les 99.9%± 0,1% de la quantité mise au départ (10 µM) (tableau 8). Nous avons observé que la saturation des cellules était atteinte. Au dessus de  $5,31 \cdot 10^{-15}$  moles par cellule, une très faible quantité de peptide était présente dans le surnageant.

Nombre de cellules	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$
Concentration absorbée ng/ml	9997,29	9995,73	9996,15	9993,66	9990,875	9988,9	9990,25
capacité moles/cell ( $10^{-15}$ )	0,0025	0,005	0,01	0,05	1,06	2,13	5,31
nombre de peptide /cell ( $10^7$ )	0,16	0,23	0,64	3,2	64	128	320
0% absorbé	99,97	99,95	99,96	99,93	99,9	99,88	99,90

**Tableau 8 : Evaluation de la capacité d'absorption du peptide HA par les cellules dendritiques en faisant varier leur nombre. Expérience répétée 3 fois.**

La capacité d'absorption du peptide par les cellules dendritiques pour la même concentration de départ (10µg/ml), dépend faiblement de la concentration de cellules présentes dans le milieu. Ceci est physiquement impossible.

#### 2.3.4. Evaluation de la capacité d'absorption du peptide HA par variation de la concentration initiale de peptide :

Les cellules dendritiques ont été mises en incubation pendant 2 heures avec différentes concentrations de peptide HA (0, 0.3, 3, 10, 30 µg/ml) dans un volume final de 500µl de milieu de culture, le nombre de DC a été fixé à  $0.5 \cdot 10^6$ . L'expérience a été répétée 3 fois.

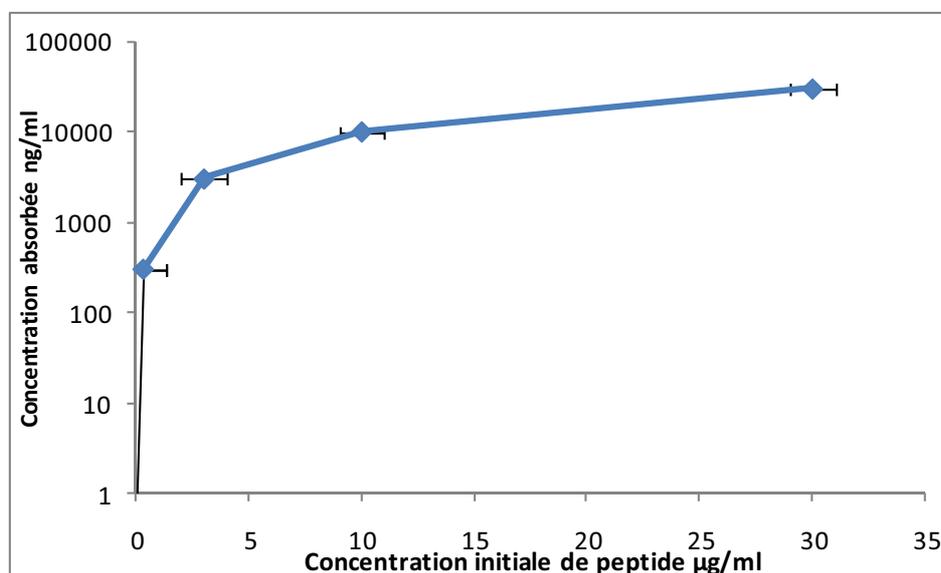
A la fin du temps d'incubation, les échantillons ont été centrifugés, et le surnageant a été précipité afin d'éliminer les protéines présentes dans le milieu de culture, puis analysé par HPLC-MS. La capacité d'absorption des cellules a été déterminée à partir des quantités de peptide restant dans le milieu.

Concentration µM	30	10	3	0,3	0
Concentration restante ng/ml	145,5	3,68	2,87	0,731	0
Concentration absorbée ng/ml	29854,5	9996,32	2997,13	299,269	0
capacité moles/cellule $10^{-16}$	3,17	1,06	0,31	0,03	0
nombre de peptide /cell ( $10^6$ )	191	64	19,2	1.92	0
% absorbé	99,51	99,96	99,90	99,75	0

**Tableau 9 : Evaluation de la capacité d'absorption du peptide HA par les CD en faisant varier sa concentration. Expérience répétée 3 fois.**

Nous avons constaté que l'absorption du peptide HA était importante, en présence de concentration croissante de peptide allant de  $0.3\mu\text{M}$  jusqu'à  $30\mu\text{M}$  (figure 53).

Nous avons aussi constaté que la quantité absorbée décroissait bien avec la quantité de peptide initiale mais pas de façon linéaire aux concentrations testées révélant qu'elles étaient encore largement excédentaires.



**Figure 53 : Courbe représentant la capacité d'absorption des cellules dendritiques en fonction de la concentration du peptide HA en échelle log.** Les cellules dendritiques ( $0,5 \cdot 10^6$ ) ont été incubées avec différentes concentrations de peptide HA 512-520 (0,3 ; 3 ; 10 ;  $30\mu\text{g/ml}$ ) pendant 2h à  $37^\circ\text{C}$ . Expérience répétée 3 fois.

Les cellules dendritiques ont une grande capacité d'absorption de peptide allant jusqu'à 99.5% de peptide absorbé pour une concentration de départ de  $30\text{nM}$  (Tableau 9).

## 2.4. Conclusions

Les cellules dendritiques sont les cellules « professionnelles » de la présentation antigénique, elles ont un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire grâce à leur capacité à capter l'antigène, le transporter aux « nœuds lymphatiques », et à activer spécifiquement les lymphocytes T (Banchereau & Steinman. , 1998, Banchereau *et al.* , 2000, Liu. , 2001), en accord avec leurs différents phénotypes, fonction et la localisation de leurs microenvironnements (ganglions, sang périphériques..) (Banchereau & Steinman. , 1998, Shortman & Liu. , 2002)

Les DC doivent subir une maturation afin de pouvoir présenter efficacement l'antigène, d'orienter sa migration et préparer sa capacité de stimuler les lymphocytes T ((Vermaelen & Pauwels. , 2005)

Après absorption, une fraction du peptide est attachée dans le sillon du CMH dans les vésicules, formant ainsi des complexes p-CMH qui se déplacent vers la surface de la cellule. L'activité endocytose des DC isolées ex-vivo a été largement étudiée (Steinman & Swanson. , 1995).

Les cellules dendritiques acquièrent d'autres propriétés pour la présentation de l'antigène et la stimulation des lymphocytes T : elles synthétisent un grand nombre de molécules CMHI/II (Kleijmeer *et al.* , 1995, Sallusto *et al.* , 1995), et expriment un niveau élevé de molécules d'adhésion et de co-stimulation. Ceci leur permet de devenir les APC les plus efficaces pour les antigènes solubles, car elles peuvent lier 30 à 200 fois plus d'antigène que les lymphocytes B et les monocytes (Bhardwaj *et al.* , 1993).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la capacité d'absorption des DC. Nous avons remarqué que cette absorption était maximale dès les 5 premières minutes atteignant les 99.9% ce qui correspond à  $6,4 \cdot 10^6$  peptides/cellule pour  $10 \mu\text{M}$ .

Les résultats que nous avons eus ne sont pas toujours cohérents. Le peptide dans les conditions expérimentales était présent en excès ; même pour de faibles concentrations en peptide, la quantité par cellule est très forte, ce qui nous mène à nous poser plusieurs questions :

- Est ce que les peptides sont vraiment tous absorbés par les APC ? Sachant qu'on n'a pas observé d'absorption non spécifique avec la matrice de l'environnement
- Est ce que tout les peptides absorbés sont présentés à la surface ?
- Est ce qu'une grande partie du peptide peut être dégradée ?
- Est-ce qu'il y a possibilité d'échange de peptide à la surface sans nécessité d'internalisation ?

De plus la courbe d'absorption du peptide était non linéaire, donc la quantité mise au départ était en excès et non proportionnelle à la quantité chargée ce qui risque de rendre les stimulations peu différentes.

- L'équipe de Bhardwaj en utilisant le peptide staphylococcal enterotoxin A (SEA) à des concentrations entre 0.005-50 nM en présence de  $2 \cdot 10^6$  cellules, a pu déterminer que le peptide d'intérêt occupait moins de 0,1% des CMH (mais suffisant pour activer des lymphocytes).

Leurs conditions expérimentales ont permis d'obtenir une capacité de  $\sim 2 \cdot 10^6$  peptide/cellule. Cette valeur s'approche de la notre, dans le cas d'incubation de  $2 \cdot 10^6$  cellules avec  $10 \mu\text{M}$  de peptide HA ( $\sim 1,6 \cdot 10^6$  peptides/cellule). Alors que dans d'autres conditions de nombre de cellules ou de concentration initiale de peptide, cette capacité peut dépasser 1000 fois la capacité calculée par l'équipe de Bhardwaj. Ce qui peut être expliqué par le fait de l'utilisation d'une préparation plus purifiée de DC (qui n'était que de >85%), l'utilisation des concentrations de peptide plus élevées ( $100-30 \cdot 10^3$  nM), et l'utilisation du peptide HA<sub>512-520</sub> qui est apprêté que par la molécule de CMHI.

En se basant sur les données de Bhardwaj et en comparant la quantité de peptide absorbée et mesurée expérimentalement, on peut déduire que tout le peptide absorbé ( $\sim 1,6 \cdot 10^6$ ) n'a pas été forcément présenté en totalité à la surface des DC. Ceci peut être expliqué par :

- L'utilisation d'une partie du peptide dans le maintien de la charge antigénique sur des cellules dendritiques, lors de la dissociation du peptide du complexe CMH. Sachant que la dissociation d'un peptide de la molécule de CMH est très rapide (Bajenoff *et al.* , 2006) (Cerundolo *et al.* , 1991).
- Possibilité de dégradation dans les lysosomes et le cytosol, qui sont 2 compartiments subcellulaires dotés d'une capacité protéolytique importante (Ciechanover. , 2005). En effet dans le cytosol, les protéines ayant par exemple perdu leur fonction suite à un mal repliement sont dégradées par les protéasomes (grand complexe protéolytique) et catabolisées (Baumeister *et al.* , 1998, Meusser *et al.* , 2005).

Il faut noter, cependant, qu'une analyse physique des résultats démontre le non réalisme de nos résultats ; ces résultats préliminaires nécessitent leur confirmation.



### **3. Cinétique d'Activation des lymphocytes T**

#### **3.1. Introduction**

L'activation des lymphocytes T reste l'événement principal de la réponse immunitaire, elle dépend de l'affinité du TCR avec le pCMH.

Les phénomènes d'activation du TCR sont dus à une interaction moléculaire hautement sensible (une faible quantité de ligand devant engendrer une forte réponse) et spécifique (très peu de ligands spécifiques parmi un océan de ligands non spécifiques). En effet, Le nombre de peptides présents à la surface du lymphocyte T suffisant pour son activation est très faible entre 60- 200, ceci représente seulement 0.03% de molécules du CMH sur la CPA (Demotz *et al.* , 1990).

L'interaction entre le TCR et son complexe pCMH déclenche plusieurs événements : une intériorisation du TCR, une expression des récepteurs membranaires d'activation, et le déclenchement de la cascade de signalisation, qui mènent à la division cellulaire, la production des interleukines, et par la suite à la mort cellulaire.

#### **3.2. But**

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la dynamique de l'expression des récepteurs membranaires des lymphocytes T CD3, CD8, CD69 et CD25 et à la production de l'IL-2 par les lymphocytes T activés en présence de cellules dendritiques chargées avec le peptide hémagglutinine du virus d'influenza.

Les questions que nous nous sommes posées sont les suivantes : quelle est la relation entre la dose de peptide testée et le niveau d'activation des lymphocytes T ?, et quelle est la vitesse d'intériorisation du CD3 dans ces conditions ?

#### **3.3. Méthodes**

Le modèle *in vitro* a été réalisé en incubant à différents temps des lymphocytes T issues de souris transgéniques CL4-TCR spécifique du peptide HA<sub>512-520</sub> (>96% TCR V<sub>β</sub>8) avec des cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup> (>80% de pureté) dans un rapport de 1 lymphocyte pour 2 DC. Les DC ont été issues de souris BalbC et chargées avec différentes concentrations de peptide HA<sub>512-520</sub> (2.5, 5, 10µg/ml). Les lymphocytes T ont été marqués par des anticorps anti-CD3/CD8/CD25/CD69, afin de suivre la cinétique de ces récepteurs par Cytométrie en flux. Le surnageant de culture a été récupéré afin de doser la sécrétion d'IL-2.

### 3.4. Résultats

#### 3.4.1. Evaluation de l'activation des lymphocytes T

##### a) La réactivité des souris CL4

Toutes les souris CL4 testées étaient transgéniques pour le gène TCR V $\beta$ 8 qui était exprimé par plus de 97% des LT CD8+ comparées aux LT CD4+ (<30%). Ceci nous a permis de considérer que toutes les T CD8+ étaient capable de reconnaître le peptide HA<sub>512-520</sub>.

##### b) Activation des lymphocytes suite au contact avec le peptide HA<sub>512-520</sub>

1. Nous avons constaté une bonne stimulation à 24h sur 5 expériences réalisées. Elle se manifeste par une forte expression de deux récepteurs membranaires : CD69 et CD25 à 24h.

- 18% des lymphocytes T exprimaient le CD69 avec un haut niveau de MdFI de la fraction positive, qui était de : 19100  $\pm$  720 MdFI pour 10 $\mu$ g/ml, 19000 $\pm$ 1100 MdFI pour 5 $\mu$ g/ml et 18900 $\pm$ 1500 MdFI pour 2,5 $\mu$ g/ml. (Figure 54), alors que les non stimulés la valeur de la MdFI était de 194  $\pm$  74 pour la concentration 5 $\mu$ g/ml par exemple.

- 20% des lymphocytes exprimaient le CD25 avec un haut niveau de MdFI de la fraction positive, qui était de : 17000  $\pm$  1400 MdFI pour 10 $\mu$ g/ml, 13000 $\pm$ 700 MdFI pour 5 $\mu$ g/ml et 12600 $\pm$ 330 MdFI pour 2,5 $\mu$ g/ml. (Figure 55), alors que les non stimulés la valeur de la MdFI était de 106  $\pm$  36 pour la concentration 5 $\mu$ g/ml par exemple.

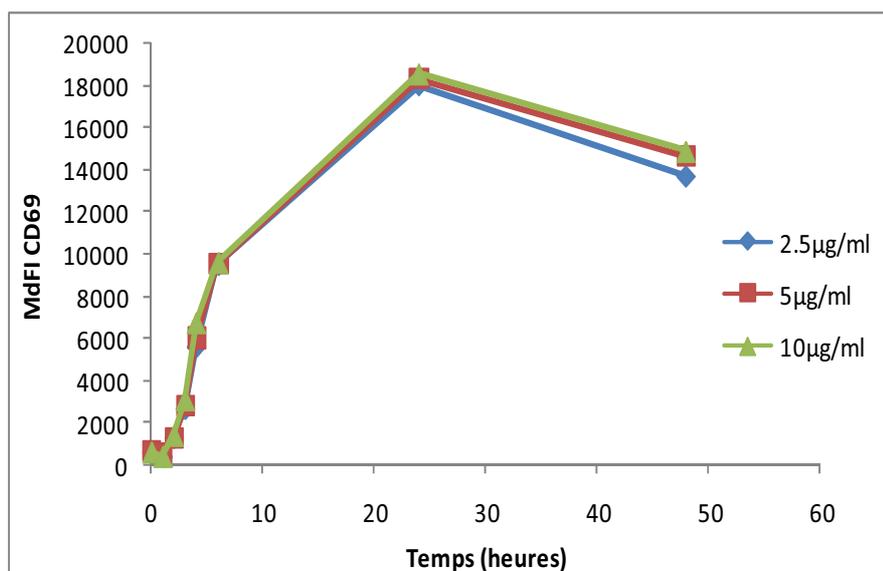
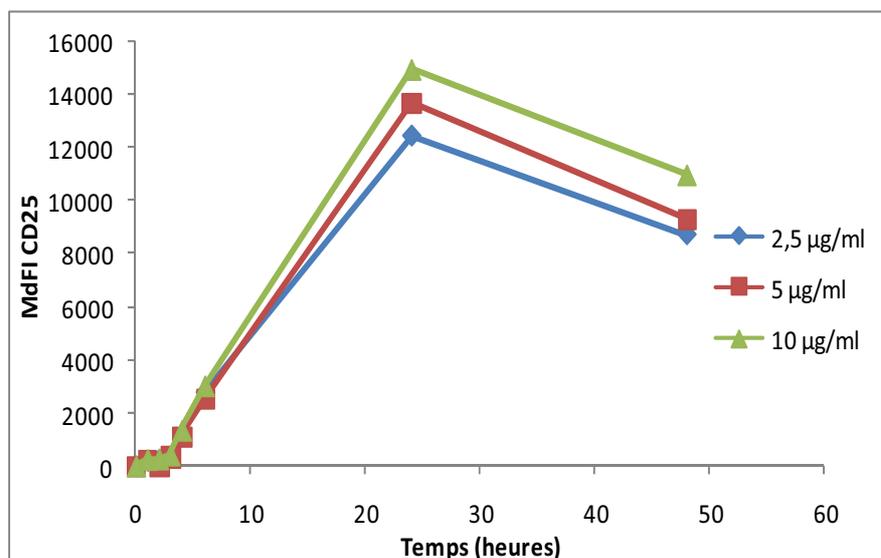


Figure 54 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression du CD69 en médiane de fluorescence, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10 $\mu$ g/ml). Les résultats montrés sont représentatifs d'une expérience sur 5 expériences indépendantes.



**Figure 55 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression du CD25 en médiane de fluorescence, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml). Les résultats montrés sont représentatifs d'une expérience sur 5 expériences indépendantes.**

2. Nous avons constaté que la stimulation des LT issus des souris CL4 semble être bien spécifique au peptide HA (en comparaison au stimulation effectué avec le peptide HA sur les BalbC (Figure 60)) : ceci a été vérifié en observant le comportement des récepteurs CD69 et CD25 sur la population CD3/CD8 soit sur :

- Des lymphocytes T incubés en présence de DC non chargées. L'expression à 24h de CD69 était de  $153 \pm 26$  MdFI et celle de CD25 était de  $6,7 \pm 11$  MdFI.
- Des lymphocytes T issus de souris BalbC incubés en présence de DC chargé avec le peptide HA. l'expression à 24h de CD69 est de  $122 \pm 25$ , et celle de CD25 est de  $55 \pm 36$ .

3. la sensibilité des lymphocytes T ne semble pas être affectée par la dose de peptide. Nous avons testé une large gamme de concentration allant de 2.5µg/ml à 50µg/ml (Figure 56 et 57).

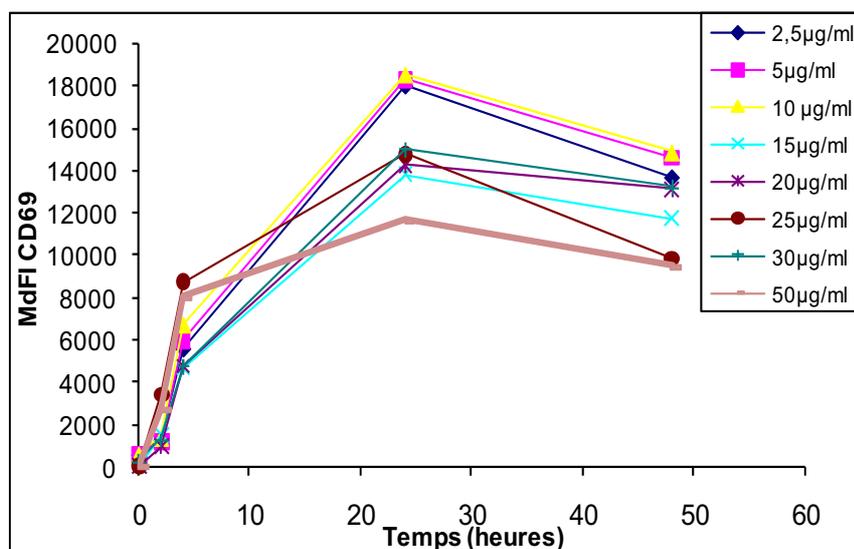


Figure 56 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du récepteur CD69 sur des lymphocytes T CD8+ en médiane de fluorescence pour huit concentrations de peptide (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 µg/ml). Les résultats montrés sont représentatifs d'une expérience sur 5 expériences indépendantes.

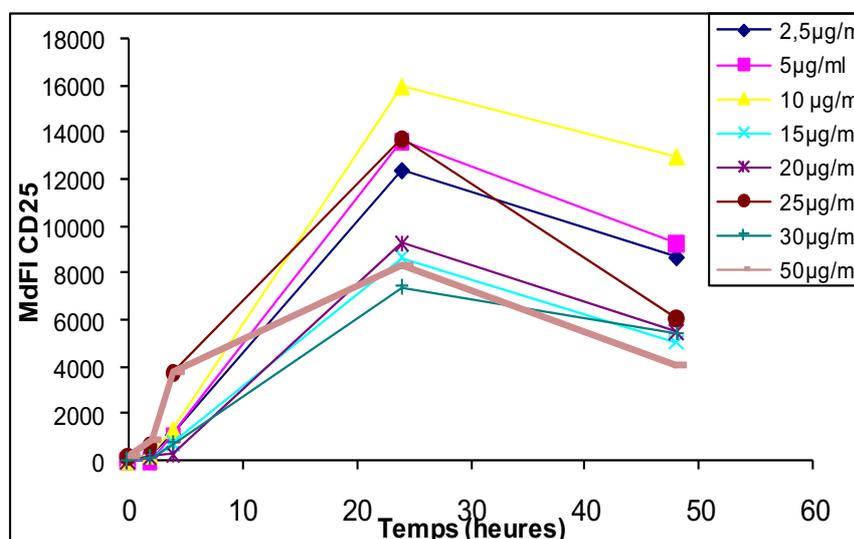


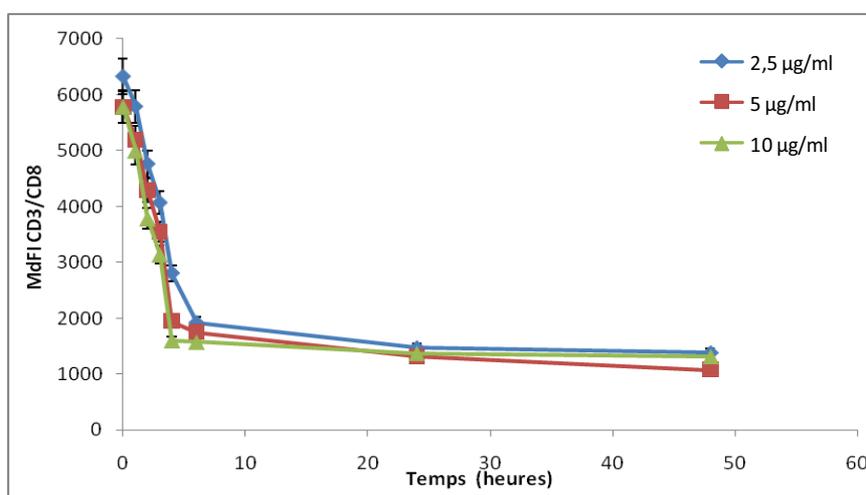
Figure 57 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du récepteur CD25 sur des lymphocytes T CD8+ en médiane de fluorescence pour huit concentrations de peptides du virus d'influenza (HA 512-520) (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 µg/ml). Les résultats montrés sont représentatifs d'une expérience sur 5 expériences indépendantes.

Nous constatons que la dose du peptide ne semble pas influencer l'activation des lymphocytes T. Ce comportement peut être expliqué par la présence d'un excès de peptide sur la cellule dendritique même à faible concentration (2,5µg/ml).

### 3.4.2. Cinétique d'activation des lymphocytes T après une stimulation antigénique au HA

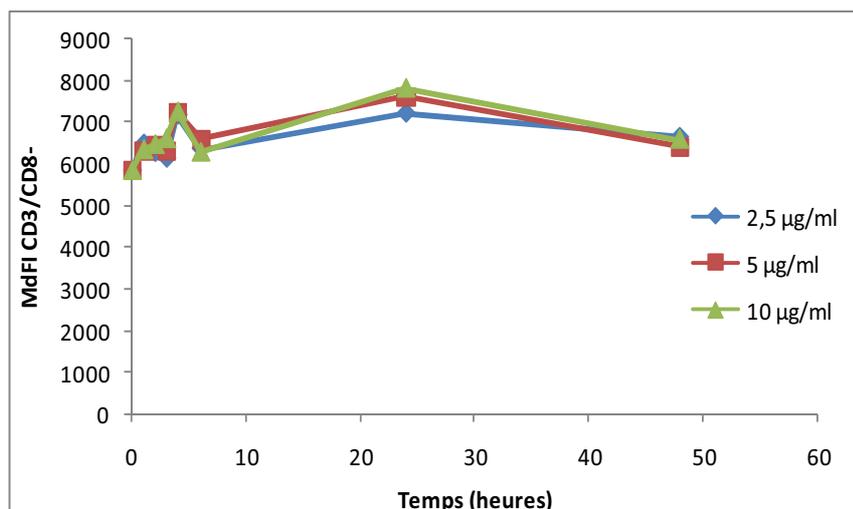
#### a) Comportement du récepteur membranaire CD3

- Après stimulation des lymphocytes T par des DC chargées, l'expression du CD3 sur les LT CD8+ subit une diminution atteignant son maximum après 24h de stimulation, qui était de  $1380 \pm 200$  MdfI pour  $2.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $1300 \pm 100$  MdfI pour  $5 \mu\text{g/ml}$  et  $1370 \pm 200$  MdfI pour  $10 \mu\text{g/ml}$  par rapport à  $6777 \pm 150$  au temps 0 (Figure 58).



**Figure 58 : Mesure par analyse en cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression de récepteur CD3 en médiane de fluorescence sur des lymphocytes T CD8+ pour 3 concentrations de peptide.** Les concentrations testées sont 2,5; 5 et  $10 \mu\text{g/ml}$ . Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

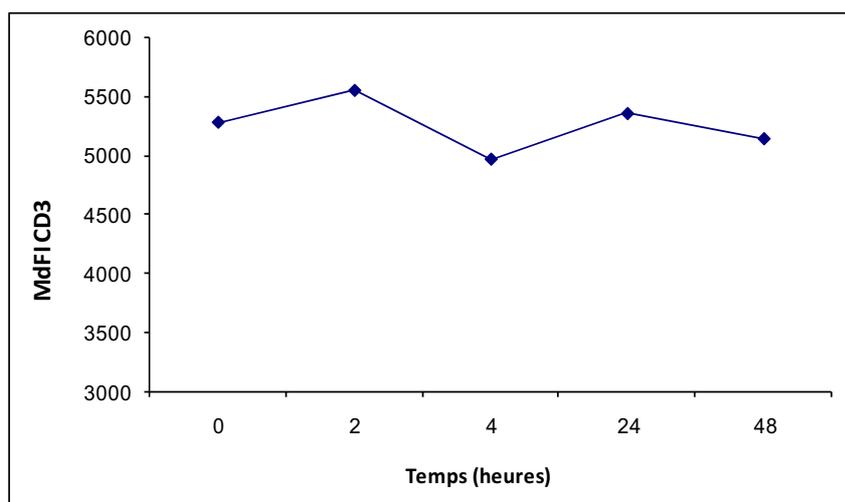
- Sur la population T CD3+/CD8-, nous n'avons pas remarqué une diminution de la médiane de fluorescence du CD3 au cours de l'activation (Figure 59). Après 24h de stimulation la médiane de fluorescence était de  $7000 \pm 300$  pour  $2.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $6000 \pm 1000$  pour  $5 \mu\text{g/ml}$  et  $7300 \pm 700$  pour  $10 \mu\text{g/ml}$ . Ceci montre que le CD3 sur la population CD3+/CD8- ne subit pas de décroissance et donc que la stimulation avec le peptide HA des lymphocytes T issus des souris CL4 était bien spécifique des lymphocytes TCD8+.



**Figure 59 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD3 sur des lymphocytes T CD3/CD8-.** Les cellules sont issues de souris CL4 pour trois concentrations de peptides du virus d'influenza (HA 512-520) (2,5 ; 5 et 10µg/ml). Les résultats montrés sont représentatifs d'une expérience sur 5 expériences indépendantes.

- Nous avons constaté aussi que les lymphocytes T stimulés avec des DC non chargées ne montraient pas de décroissance de la médiane de fluorescence du CD3, car après 24h de stimulation elle reste voisine de (7000±1300 MdFI).

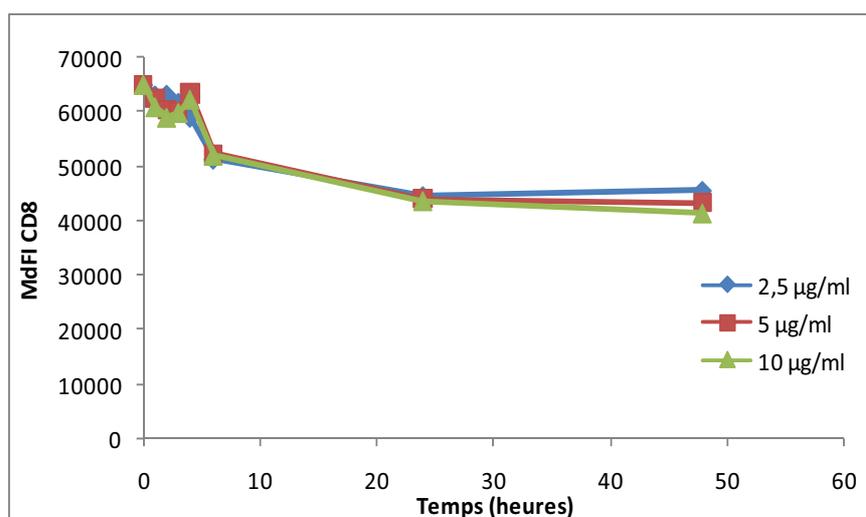
- Lors de la stimulation des lymphocytes T issus de BalbC avec des DC chargées en peptide HA, nous avons constaté que le CD3 ne subissait pas de décroissance, car le peptide n'a pas été reconnu par les LT. La médiane de fluorescence après 24h de stimulation était de 5600± 81 MdFI par rapport à 5200± 500au temps 0 (Figure 60).



**Figure 60 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD3 sur des lymphocytes T CD3/CD8.** Les cellules sont issues de BalbC pour une concentration de peptides du virus d'influenza (HA 512-520) (2,5 µg/ml). Les résultats montrés sont représentatifs d'une expérience sur 3 expériences indépendantes.

### b) Comportement du récepteur membranaire CD8

Lors de l'activation des lymphocytes T, nous avons constaté que la médiane de fluorescence du récepteur CD8 subissait aussi une décroissance, qui était moins rapide que celle observée pour le CD3. Cette décroissance ne s'accroît qu'après 6h de stimulation, atteignant son maximum après 48h de stimulation, qui était de  $52\,000 \pm 9\,000$  MdFI pour  $2,5\mu\text{g/ml}$ ,  $50\,000 \pm 8\,000$  MdFI pour  $5\mu\text{g/ml}$  et  $45\,000 \pm 2\,000$  MdFI pour  $10\mu\text{g/ml}$  (Figure 61), pour une valeur au temps 0 avoisinant  $66\,700 \pm 2\,200$ .



**Figure 61 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD8 sur des lymphocytes T issues de CL4 pour trois concentrations de peptide du virus d'influenza (HA 512-520) (2.5, 5, 10µg/ml). Les résultats montrés sont représentatifs d'une expérience sur 5 expériences indépendantes.**

### c) Analyse fine de la population T activée

L'analyse de la population T activées montre une hétérogénéité. Bien que 97% des TCD8+ soient spécifiques et que le peptide soit en excès, nous avons observé 2 pics sur un diagramme représentant la distribution d'intensité de fluorescence de CD3. Une partie seulement des lymphocytes T s'active (baisse du CD3) (figure 62 et 63a) alors qu'un groupe de cellule ne change pas.

- Le pic 1 représente la population de T activés exprimant de faibles médianes de fluorescence de CD3 (CD3 bas) (entre 1 000 et 2 000 MdFI)
- Le pic 2 représente la population de CD3 n'ayant pas encore subi d'activation (CD3 haut) (entre 4000 et 7000 MdFI).

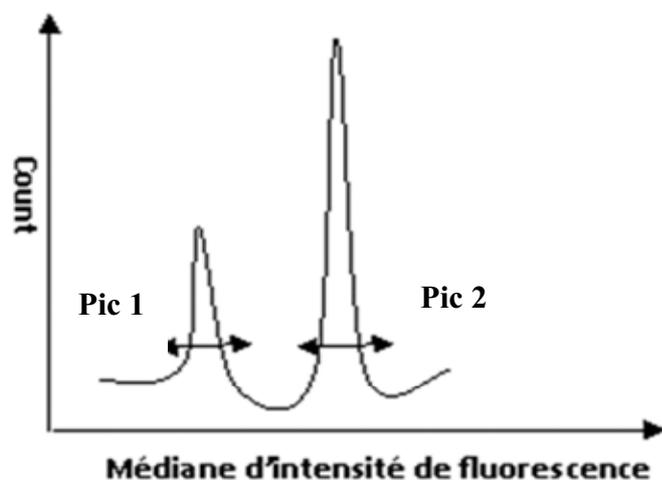
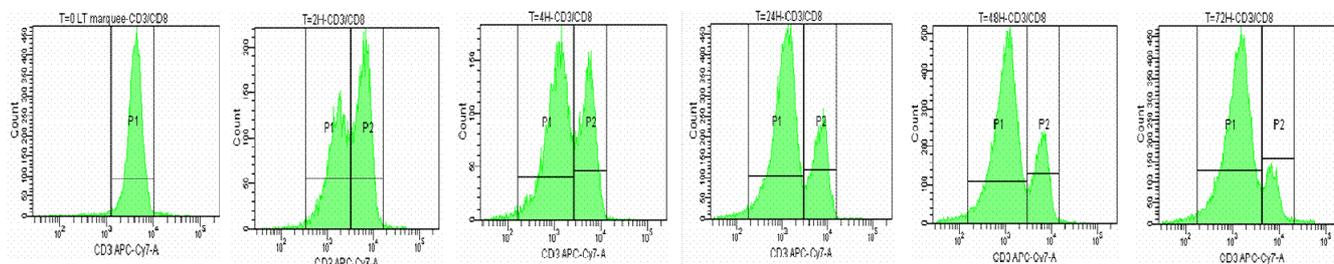
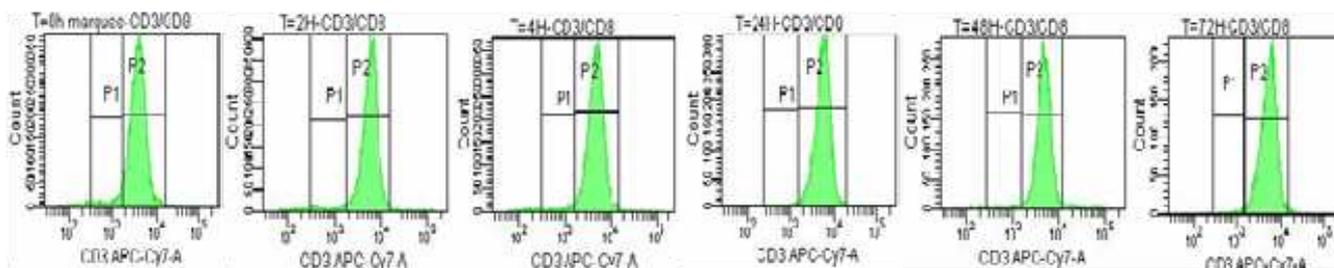


Figure 62 : Schéma représentatif de la distribution bimodale de l'expression de CD3

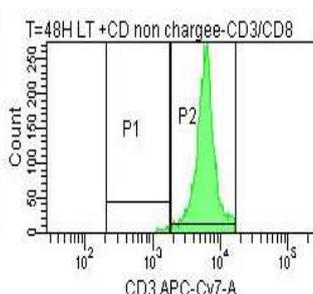
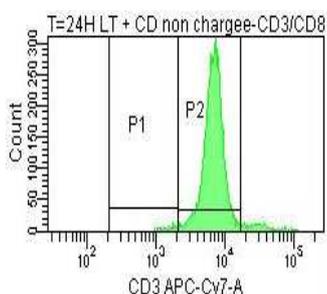
a.



b.



c.



d.

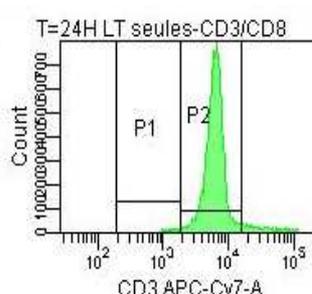


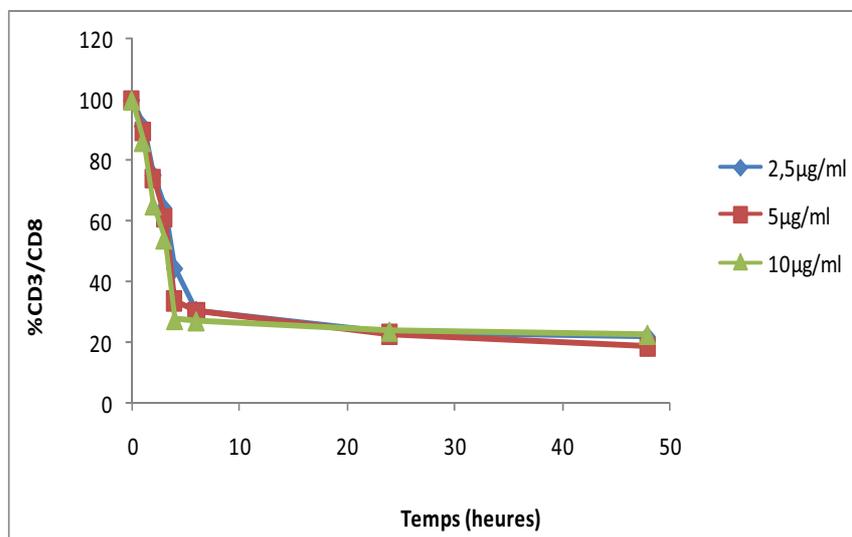
Figure 63 : Mesure par analyse en cytométrie en flux de l'activation spécifique des lymphocytes T CD3. a) Activation des lymphocytes T CD3 issus de souris CL4 (97%) avec des cellules dendritiques (rapport 1/2) chargées avec le peptide HA 512-520 à différents temps de contact 0, 2, 4, 24, 48 et 72h. b) Activation suite au contact des lymphocytes T CD3 issus de souris BalbC avec des cellules dendritiques chargées avec le peptide HA a différents temps de contact 0, 2, 4, 24, 48 et 72h. c) activation des lymphocytes T CD3 issus de souris CL4 avec des cellules dendritiques non chargées (rapport 1/2) à différents temps de contact 24 et 48h. d) Lymphocytes T CD3 seules en culture pendant 24h. Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

Afin d'évaluer la spécificité de cette reconnaissance du peptide pour les LT, nous avons mis les mêmes cellules dendritiques chargées en contact avec des lymphocytes T CD3 issus de souris BalbC, nous avons constaté qu'il n'y avait pas d'apparition du pic 1, montrant que les LT n'ont pas été activés (Figure 63b). La même observation a été faite lors de la mise en contact des lymphocytes T CD3 spécifique au HA en présence des cellules dendritiques non chargées (Figure 63c et d).

Ce constat nous a mené à établir une stratégie de fenêtrage. Puisque nous nous sommes intéressés au comportement des lymphocytes T activés, nous avons fait la sélection sur le pic P1.

#### d) Cinétique de décroissance du CD3

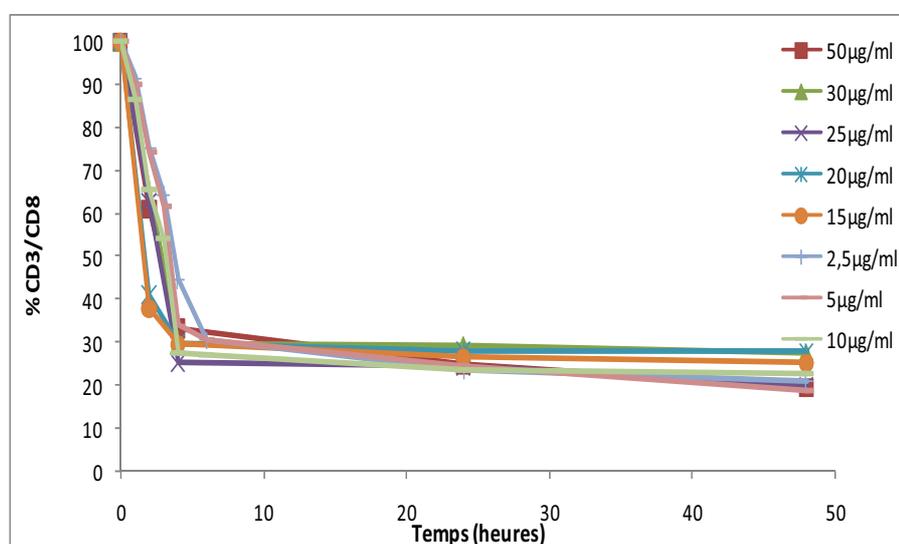
Dans le cas des lymphocytes T activés, nous avons suivi l'évolution de la médiane de fluorescence du CD3, en réalisant un fenêtrage sur le pic 1 (CD3 bas). Nous avons raisonné en pourcentage de CD3/CD8, qui a été calculé en réalisant le rapport  $([CD3]/[CD3]_{t=0})$  entre la médiane de fluorescence de CD3 au temps t (pic 2) sur la médiane de fluorescence de CD3 au temps 0 (pic1=pic2) au niveau de la population LT CD8+. Nous avons constaté que la fraction de lymphocytes à bas niveau de CD3 croissait au cours du temps, 0% au temps 0 jusqu'à 78% pour 2,5µg/ml, 81.4% pour 5µg/ml et 77,3% pour 10µg/ml au temps 48h (Figure 64).



**Figure 64: Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de la médiane de fluorescence du récepteur CD3 (sur pic 2) en pourcentage pour trois concentrations.** Pourcentage, par rapport à la densité au repos, sur des lymphocytes T CD8+ mis en contact avec des cellules dendritiques (rapport 1/2) préalablement traités avec des concentrations de peptides de 10, 5, 2.5 µg/ml à différents temps 0, 1, 2, 3, 4, 6, 24 et 48h. Le peptide utilisé est un peptide du virus d'influenza (HA 512-520), les lymphocytes utilisés issus de souris transgéniques CL4 sont spécifiques de ce peptide. Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

En considérant que l'intensité de fluorescence moyenne sur le pic 1 reflétait la concentration surfacique en CD3 des lymphocytes T, nous avons observé sur la fraction de cellules activées, une décroissance progressive des médianes de fluorescence (MdFI) au cours du temps. Si on prend, par exemple, la concentration 10 $\mu$ g/ml (concentration testée la plus élevée), l'intensité de fluorescence moyenne varie de 5800  $\pm$  900 au temps 0 à 1300  $\pm$  61 au temps 48h (Figure 60) : ceci correspondait à une réduction de la densité initiale jusqu'à ~20% en considérant la valeur de départ à 100%.

La cinétique était peu différente pour les différentes doses testées (2,5 à 10 $\mu$ g/ml), même pour les plus élevées (15 à 50 $\mu$ g/ml). (Figure 65).



**Figure 65 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du récepteur CD3 (sur pic 2) en pourcentage pour huit concentrations.** Pourcentage, par rapport à la densité au repos, de CD3 sur des lymphocytes T CD8+ mis en contact avec des cellules dendritiques (rapport 1/2) préalablement traités avec des concentrations de peptides de 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50  $\mu$ g/ml. Le peptide utilisé est un peptide du virus d'influenza (HA 512-520), les lymphocytes utilisés issus de souris transgéniques CL4 sont spécifiques de ce peptide. Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

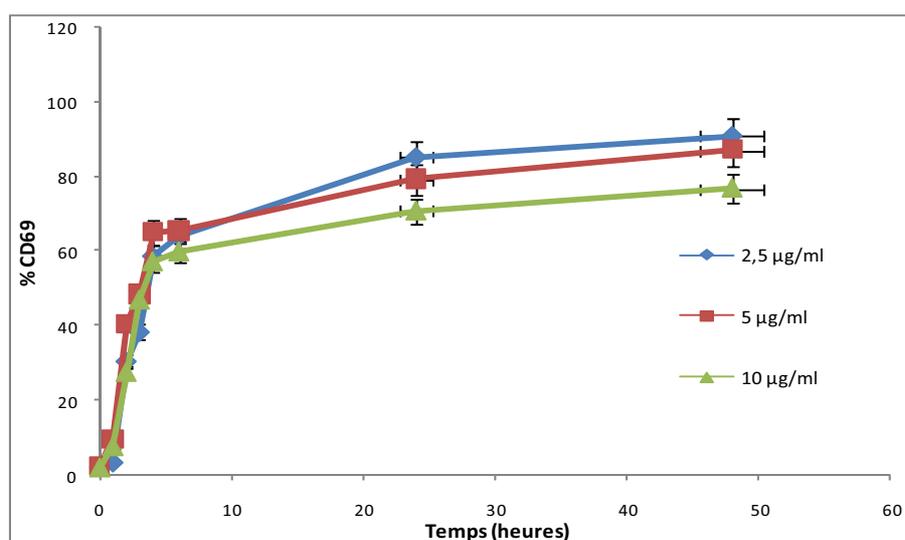
Nous avons remarqué que 20% de CD3 sur les lymphocytes T activés n'étaient jamais internalisés bien qu'ils aient eu probablement un contact avec les DC, puisqu'on était sur le pic 2 qui correspond aux lymphocytes T activés. Ceci peut être expliqué par le fait que:

- L'activation atteint le seuil avant que tous les CD3 ne soient internalisés
- Possibilité de renouvellement de CD3 à la surface du LT
- Certains CD3 ne peuvent pas être consommés car loin de la synapse
- Les lymphocytes T peuvent exprimer des TCR non V $\beta$ 8, qui ne vont pas être activés.

### e) Cinétique de croissance de CD69

Dans le cas des lymphocytes T CD3+/CD8+, nous avons suivi l'évolution du pourcentage de cellules exprimant le récepteur CD69. Nous avons observé l'apparition de la molécule à la surface d'une fraction de cellules qui atteint son maximum 91 %±4% pour 2,5µg/ml, 87%±6,5% pour 5µg/ml et 77%±10% pour 10µg/ml après 48h d'activation.

La cinétique était peu différente pour les différentes doses testées (2.5 à 10µg/ml) (Figure 66), ce qui confirme qu'on était en excès de peptide.

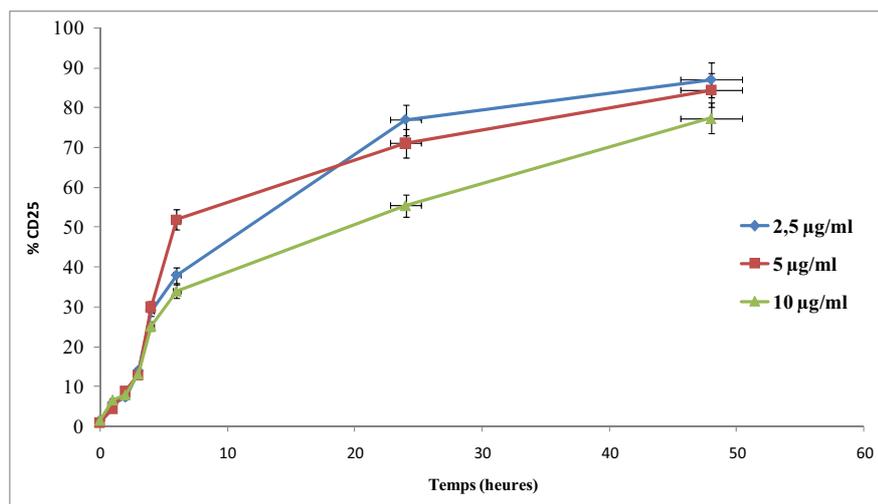


**Figure 66 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression du CD69 en % de cellules, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml).** % de cellules exprimant le CD69 sur des lymphocytes T CD8+ mis en contact avec des cellules dendritiques (rapport 1/2) préalablement traités avec des concentrations de peptides de 2.5, 5, 10µg/ml. Le peptide utilisé est un peptide du virus d'influenza (HA 512-520), les lymphocytes utilisés issus de souris transgéniques CL4 sont spécifiques de ce peptide. Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes

### f) Cinétique de croissance de CD25

Dans le cas des lymphocytes T CD3+/CD8+ on observe parallèlement à la croissance du pourcentage de cellules exprimant le CD69, une croissance de pourcentage de cellules exprimant le CD25 qui atteint son maximum 87%±5,5 pour 2,5µg/ml, 84%±13% pour 5µg/ml et 77%±14% pour 10µg/ml après 48h d'activation.

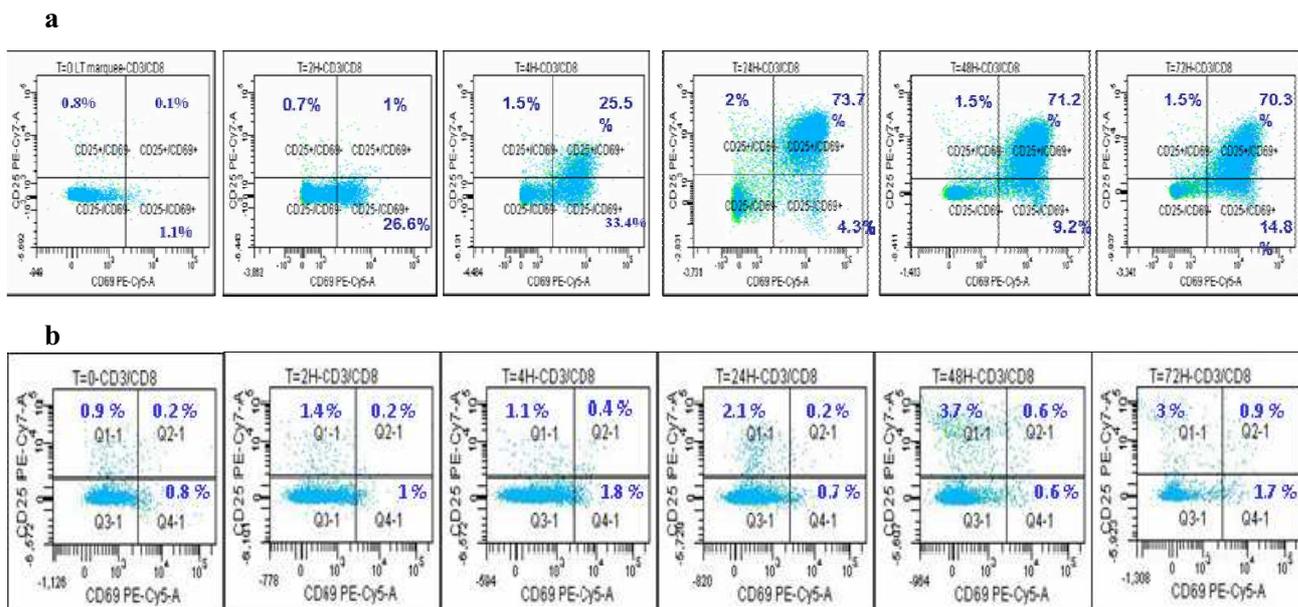
La cinétique est peu différente pour les différentes doses testées (2.5 à 10µg/ml) (Figure 67), ce qui est en accord avec le fait qu'on fût en excès de peptide.



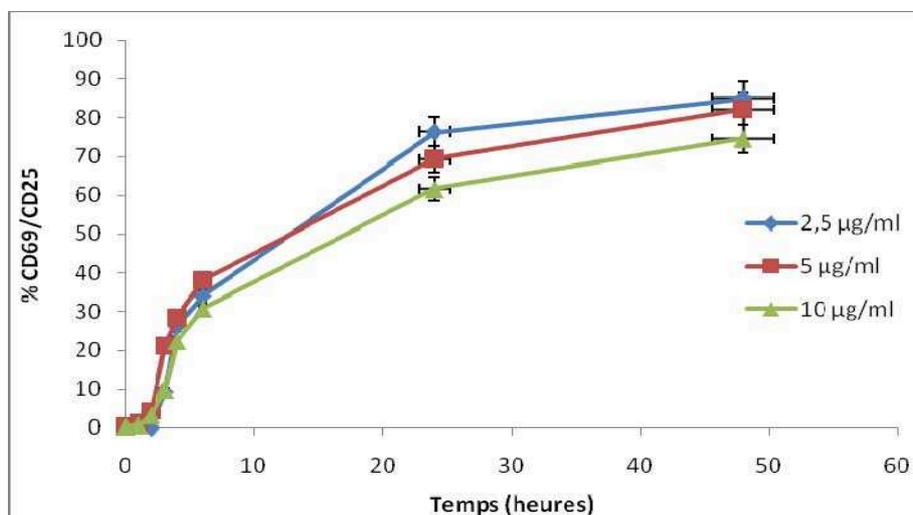
**Figure 67 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du % de cellules exprimant le CD25, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10µg/ml).** % de cellules exprimant le CD25 sur des lymphocytes T CD8+ mis en contact avec des cellules dendritiques (rapport 1/2) préalablement traités avec des concentrations de peptides de 2.5, 5, 10µg/ml. Le peptide utilisé est un peptide du virus d'influenza (HA 512-520), les lymphocytes utilisés issus de souris transgéniques CL4 sont spécifiques de ce peptide. Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

#### g) Cinétique de recouplement des deux expressions CD69 et CD25

La cinétique des deux molécules se superpose partiellement, avec l'apparition d'une fraction de cellules exprimant à la fois du CD25+ et du CD69+ sur la population TCD3+/CD8+ (Figure 68). L'expression de cette population croit au cours du temps atteignant après 48h de stimulation: 85±5% pour 2,5µg/ml, 82±13% pour 5µg/ml et 74% ±14% pour 10µg/ml (Figure 69). Cette croissance était bien spécifique à la présence du peptide HA (Figure 68b), mais ne dépend pas de la dose de peptide testée, car nous retrouvons une réponse presque similaire pour les différentes doses (2,5 à 10µg/ml) (Figure 69).



**Figure 68 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de pourcentage de cellules exprimant les 2 récepteurs CD69 et CD25, suite à l'activation des lymphocytes CD3/CD8 avec le peptide HA 512-520.** Pourcentage de CD69/CD25 sur des lymphocytes T CD3/CD8 mis en contact avec des cellules dendritiques (rapport 1/2) préalablement traités avec un peptide du virus d'influenza (HA 512-520). a) les lymphocytes utilisés issus de souris transgéniques CL4 sont spécifiques de ce peptide. b) les lymphocytes utilisés issus de souris Balbc non spécifique pour ce peptide. Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

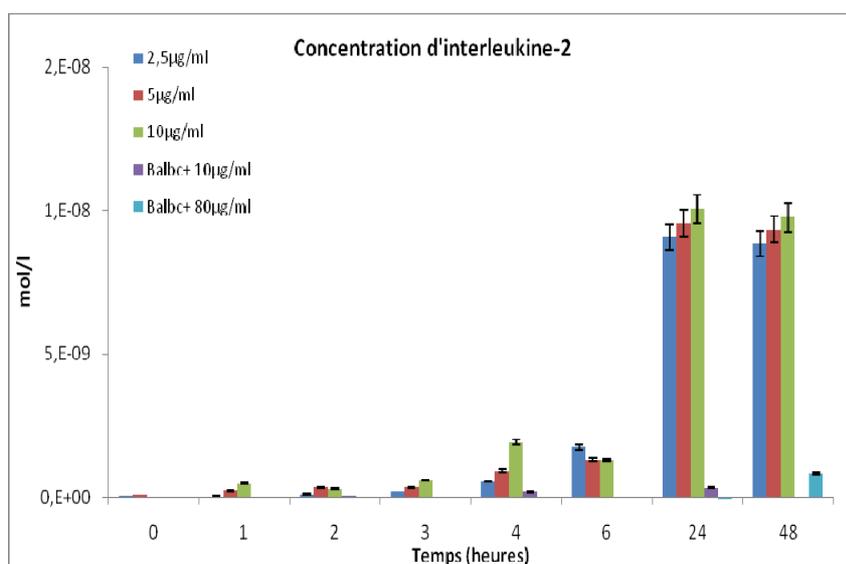


**Figure 69 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps du pourcentage de cellules exprimant les 2 récepteurs CD69 et CD25, suite à l'activation des lymphocytes T CD3/CD8 avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10 µg/ml).** % de CD25+CD69+ sur des lymphocytes T CD8+ mis en contact avec des cellules dendritiques (rapport 1/2) préalablement traités avec des concentrations de peptides de 2.5, 5, 10 µg/ml. Le peptide utilisé est un peptide du virus d'influenza (HA 512-520), les lymphocytes utilisés issus de souris transgéniques CL4 sont spécifiques de ce peptide. Les résultats montrés sont représentatifs de 5 expériences indépendantes

### h) Cinétique de sécrétion d'IL2

La sécrétion de l'IL-2 par les lymphocytes T induit par une stimulation avec le peptide, est mesurée dans le surnageant de culture récupéré à différents temps dans un volume de 200 $\mu$ l.

Sous une activation efficace, les lymphocytes produisent de l'IL2. Une partie de cette production était immédiatement réutilisée par les cellules elles-mêmes pour une boucle d'auto-amplification. Cela veut dire que la quantité dosée est sous estimée et ne représente que la quantité excédentaire sécrétée par les lymphocytes T.



**Figure 70 : Dosage de la sécrétion de l'interleukine-2 en pg/ml par les lymphocytes T suite à la stimulation avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10 $\mu$ g/ml). Le nombre de cellules utilisées est de  $4 \cdot 10^5$  dans un volume de 200 $\mu$ l, à différents temps (0, 1, 2, 3, 4, 6, 24, 48 h).**

Dans notre cas la stimulation a été réalisée dans des puits différents. La quantité mesurée correspond à la quantité cumulée de protéine. Nous en concluons que la sécrétion maximale d'IL-2 était de  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l après 24 h de stimulation.

La stimulation avec différentes doses de peptide conduit à la même sécrétion d'IL2 (Figure 70).

### 3.5. Conclusions

1- Nous avons constaté que l'activation des lymphocytes se manifeste par l'apparition progressive des molécules CD25 et CD69 à la surface. Une croissance de la médiane de fluorescence de CD69 et CD25. Cette croissance semble être un peu décalée, puisque le CD69 apparaît dès 2 à 3h de stimulation, alors que le CD25 n'est sécrété qu'à partir de 4h. Ces résultats ont été comparables à ceux obtenus par d'autres équipes (Hutchinson *et al.*, 1999, Maino *et al.*, 1995, Reddy *et al.*, 2004, Testi *et al.*, 1989).

2- L'activation des lymphocytes T se manifeste par l'expression du CD25 et CD69 consécutifs à l'intériorisation du récepteur CD3. Cette intériorisation était visible par la réduction de la médiane de fluorescence. La cinétique observée était spécifique, et comparable aux données de la littérature (Valitutti et al 1995).

Grâce aux cinétiques obtenues (Figure 50) nous avons pu calculer la vitesse d'intériorisation du CD3 de la manière suivante :  $[(\%CD3 \text{ à temps } t - \%CD3 \text{ à temps } 0) / (t - \text{temps } 0)]$ .

Cette vitesse d'intériorisation est de 0,2%/min pour 2,5µM, 0,22%/min pour 5µM et 0,25%/min pour 10µM pendant les 3 premières heures de stimulation. Valitutti et ces collaborateurs (Valitutti *et al.*, 1995), qui ont trouvé une vitesse d'intériorisation de 0,26%/min pour 25nM et 0.48%/min pour 20µM durant les 3 premières heures de stimulation.

Nous avons supposé que le décalage dans l'activation *in vitro* pourrait être lié au délai de rencontre entre le LT et la DC. En analysant le protocole expérimental de l'équipe de Valitutti, nous avons pu confirmer que la différence de vitesse constatée était dû au fait qu'ils ont procédé à une centrifugation juste après la mise en suspension des LT avec les DC. Cette étape semble primordiale dans l'augmentation des probabilités de contact et de collision entre ces deux populations, et par conséquent dans l'augmentation de la vitesse d'intériorisation.

Dans nos conditions expérimentales, la vitesse de contact entre les deux populations était lente car elle dépend de la vitesse de sédimentation des cellules au fond des puits. Sachant que la vitesse de sédimentation des lymphocytes est de 6.3mm/h (Sitar *et al.*, 1997), le diamètre du puits est de 6.5mm et la hauteur du liquide dans le puits est de 6mm, nous en déduisons que le temps de sédimentation nécessaire est jusqu'à 2 heures.

Si on suppose que la majorité des contacts entre les 2 populations se font après la sédimentation, cela explique la lenteur de l'intériorisation du CD3 par rapport à la littérature (Liu *et al.*, 2000). En plus, la sédimentation ne permet pas des mouvements latéraux en dehors des mouvements browniens et des minimes vibrations de l'incubateur.

*In vivo*, cette vitesse d'intériorisation va être plus lente, car le volume est plus grand et les DC sont très étalées ce qui augmente considérablement la probabilité de rencontre.

3- Nous n'avons pas constaté l'effet de la dose, malgré l'utilisation d'une concentration basse du peptide (2,5µg/ml) (Figure 58). En relation avec la sursaturation de peptide, ce n'est pas une condition naturelle, car il a été estimé qu'un peptide n'était représenté que sur <0,1% des CMH d'une DC, mais nous avons cherché à saturer pour maîtriser la composante pCMH et mieux mesurer la cinétique des cellules T. par contre, nous avons mal maîtrisé la distribution spatiale et la probabilité de rencontre.

4- Quand on regarde la courbe d'intériorisation du CD3 (Figure 62), on constate que 20% des lymphocytes T CD3+ ne connaissent pas l'intériorisation. Ce qui peut être expliqué par:

- L'activation a atteint son seuil avant que tous les CD3 ne soit consommés
- Les cellules renouvellent régulièrement leur charge surfacique de CD3
- Certains CD3 ne peuvent pas être consommés car ils sont loin de la synapse immunologique
- Certains LT peuvent exprimer des TCR non transgéniques pour le peptide HA, et qui ne sont donc pas activables, sachant que des LT normaux peuvent exprimer rarement 2 types de TCR à la fois (Padovan *et al.* , 1993).

5- L'activation des lymphocytes T s'exprime par la sécrétion d'IL-2 ; une partie de cette production peut être réutilisée par les cellules elles-mêmes pour une boucle d'auto-amplification. On note aussi l'existence de récepteur CD25 soluble (Nelson *et al.* , 1986, Rubin *et al.* , 1985), qui va capter une partie de l'IL2 secrété dans le milieu. Donc, La concentration d'IL-2 que nous avons dosée expérimentalement, ne correspond pas à ce qui a été réellement secrété. Cependant, nous avons une idée qualitative sur l'intensité de l'activation, qui pourra nous aider par la suite dans la confirmation ou la correction de notre modèle mathématique.

## **4. Confrontation des résultats expérimentaux avec les simulations numériques**

### **4.1. Introduction**

La réponse lymphocytaire T, est spécifique et très complexe car elle fait intervenir de nombreux éléments reliés les uns aux autres. Elle est, par conséquent, difficile à appréhender, et à analyser dans les situations médicales (vaccins, désordres immunitaires,..).

Les approches mathématiques permettent de simuler les phénomènes complexes en prenant en compte les nombreux paramètres qui interfèrent. Dans la littérature, on trouve encore peu de modèles adaptés à la réponse immunitaire spécifique.

Un support mathématique pourrait être utile, notamment pour valider certains mécanismes et en expliquer d'autres, soulever des hypothèses, aider à interpréter, anticiper les réponses que les techniques d'analyse biologique ne permettant pas à l'heure actuelle.

### **4.2. But**

Le modèle élaboré par notre équipe avait pour but de mimer la cinétique de réponse lymphocytaire pour des paramètres expérimentaux : qualité, quantité du peptide, avidité pour le récepteur....

Ce modèle repose sur les données de la littérature. Suite au manque de certains paramètres cinétiques dans la littérature, nous avons réalisé des cinétiques in vitro dans l'optique de corriger et valider le modèle.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à confronter nos résultats expérimentaux avec les simulations données par le modèle mathématique dans son état actuel, en tenant en compte des corrections de données obtenues dans les premiers chapitres.

### **4.3. Modèles et méthodes**

#### **4.3.1. Les valeurs numériques utilisées pour les paramètres du modèle d'activation**

Les valeurs des paramètres utilisées pour tracer les courbes se trouvent ci-dessous.

- Diamètre du lymphocyte T : 7  $\mu\text{m}$  (calculé à partir de la relation avec FSC-H)
- Pourcentage de la surface de la synapse par rapport à la surface totale : 20%;
- Distance entre le lymphocyte et la CPA : 14 nm;

- Nombre de CD8 sur le lymphocyte : 70 000 corrigé à 55 000 ;
- Nombre de CD3/TCR sur le lymphocyte : 30 000 corrigé à 22 000 ;
- Nombre de complexes p-CMH sur la CPA (dans la synapse) : 1 093 corrigé à 1 106 ;
- Nombre de CD80 sur la CPA (dans la synapse) : 500 corrigé à 100 000 ;
- Nombre de CD69L sur la CPA (dans la synapse) : 500 pas de nouvelles données;
- Nombre maximum de récepteurs T dans la synapse (Tmax) : 6 000 corrigé à 4 400 ;
- Nombre maximum de récepteurs T à l'extérieur de la synapse (Smax) : 24 000 corrigé à 17 600.

Nous avons considéré comme temps 0 l'instant où le lymphocyte T (naïf), qui était au repos, rencontrait une cellule présentatrice d'antigène.

Il a donc à sa surface uniquement ses récepteurs T et des CD28 au temps 0 :

- nombre de récepteurs T dans la synapse ( $T(t=0)$ ) : 6 000 corrigé à 4 400 ;
- nombre de récepteurs T à l'extérieur de la synapse ( $S(t=0)$ ) : 24 000 à 17 600 ;
- nombre de CD28 sur toute la surface : 1 500 corrigé à 8 000.

Pour les récepteurs T, cela correspond à 22 000 récepteurs répartis uniformément sur toute la surface (20% dans la synapse, d'où 4 400).

De même, les CD28 sont répartis uniformément sur le lymphocyte.

Le volume extérieur est l'espace d'influence de diffusion des facteurs soluble à l'extérieur du lymphocyte. Nous avons défini, arbitrairement, le point le plus éloigné comme se trouvant à une distance d'un quart du rayon du lymphocyte (lymphocyte dans un ganglion humain). Ce qui est plausible pour le ganglion mais pas pour les puits de culture.

Soit  $R_T$ , le rayon de notre lymphocyte (assimilé à une sphère), la sphère englobant le lymphocyte

a un rayon égal à  $R_T + \frac{R_T}{4}$ .

Le volume extérieur est alors calculé en faisant la différence entre le volume de la sphère de rayon

$R_T + \frac{R_T}{4}$  et le volume du lymphocyte.

$$\text{Soit } V_{ext} = \frac{4}{3} \pi \left( \left( R_T + \frac{R_T}{4} \right)^3 - R_T^3 \right).$$

Les valeurs numériques des autres paramètres se trouvent dans le tableau 10.

Paramètre	Valeur	Paramètre	Valeur
S	$10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$\Phi$	$0,1 \text{ s}^{-1}$
$K_{onTL}$ (Grakoui <i>et al.</i> , 1999) chez la souris	$900 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{offTL}$ (Grakoui <i>et al.</i> , 1999) chez la souris	$0,057 \text{ s}^{-1}$
$K_1$	$60 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_2$	$60 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$K_{onCD4/8}$ (Garcia <i>et al.</i> , 1997) chez l'homme	$3300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{offCD4/8}$ (Garcia <i>et al.</i> , 1997) chez l'homme	$0,044 \text{ s}^{-1}$
$K_{\alpha 1}$	$0,057 \text{ s}^{-1}$	$K_{i1}$	$0,02 \text{ s}^{-1}$
$K_{p1}$	$760 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{p2}$	$940 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$K_{onCD28}$ (van der Merwe <i>et al.</i> , 1997)(chez l'homme)	$6,6.10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{offCD28}$ (van der Merwe <i>et al.</i> , 1997)chez l'homme	$1,6 \text{ s}^{-1}$
$K_{f2}$	$0,01 \text{ s}^{-1}$	$K_{f5}$	$150 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$K_{onCD69}$	$7000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{offCD69}$	$0,01 \text{ s}^{-1}$
$K_{f3}$	$0,015 \text{ s}^{-1}$	$K_{p3}$	$0,019 \text{ s}^{-1}$
$K_{onIL2m}$ (Wu <i>et al.</i> , 1995) chez les insectes	$1,06.10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{offIL2m}$ (Wu <i>et al.</i> , 1995) chez les insectes	$0,035 \text{ s}^{-1}$
$K_{onIL2s}$	$1,06.10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{offIL2s}$	$0,035 \text{ s}^{-1}$
$K_{p'3}$	$5.10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$K_{f4}$	$0,015 \text{ s}^{-1}$

**Tableau 10 : Valeurs numériques des paramètres du modèle de C.Bidot**

Nous avons supposé que  $K_{\alpha 1} = K_{offTL}$ , i.e. la vitesse de dissociation entre le TCR et le complexe p-CMH était la même que le TCR soit à l'état activé ou non (Rabinowitz *et al.* , 1996). De même, nous avons choisi de prendre des mêmes valeurs numériques pour certains groupes de paramètres :

- pour les constantes de production de CD69, IL2RM et IL-2 ( $K_{m1}$ ,  $K_{m2}$  et  $K_{m3}$ ) :  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;
- pour les constantes de production de CD69, et IL2R<sub>M</sub> ( $K_{p1}$  et  $K_{p2}$ ) :  $5.10^{-10} \text{ s}^{-1}$  ;
- pour les constantes de dégradation des protéines intériorisées ( $K_d$ ) :  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ;
- pour les constantes de dégradation des protéines CD69 et IL2RM ( $K_{e1}$  et  $K_{e2}$ ) :  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ;
- pour les constantes de dégradation des protéines solubles ( $K_{e3}$ ,  $K_{e4}$  et  $K_{e5}$ ) :  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ;
- pour les constantes d'intériorisation des CD28, CD69, et IL-2 ( $K_{i2}$ ,  $K_{i3}$  et  $K_{i4}$ ) :  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .
- Nous avons également considéré que la production de CD28 par la cellule pendant l'activation était négligeable par rapport à la vitesse d'utilisation  $s' = 0$ .
- Vitesse de déplacement des protéines sur la membrane :  $0,12 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$  (Favier *et al.* , 2001, Figge & Meyer-Hermann. , 2006)

- Constante de diffusion d'un TCR :  $0,01 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  d'après (Wei *et al.* , 1999).
- Constante d'intériorisation du TCR :  $0,012 \text{mn}^{-1}$  d'après (Dietrich *et al.* , 2002).

#### 4.3.2. Conversion des unités des données expérimentales aux unités utiles pour le modèle

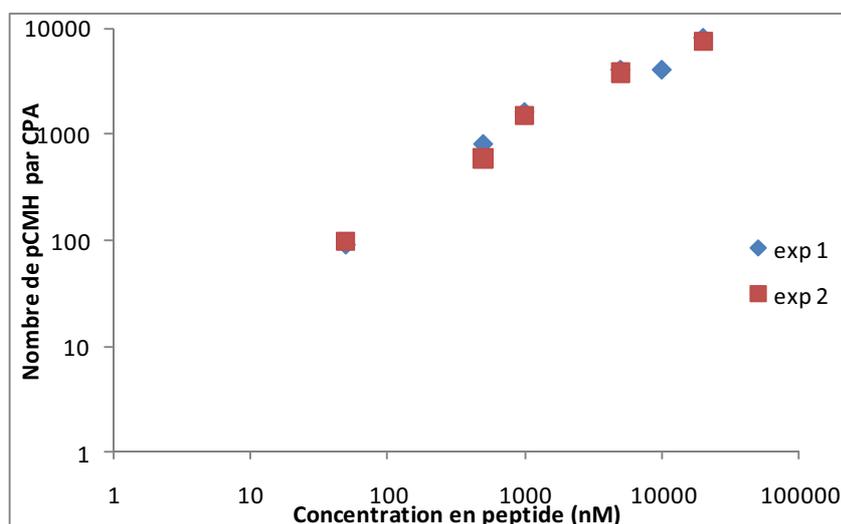
Le dosage d'IL-2 nous fournit une concentration massique (pg/ml). Pour obtenir une concentration molaire (mol /l), nous devons diviser par la masse molaire de l'IL2 qui est de 17,5 KDa.

Pour la concentration massique ( $\mu\text{g/ml}$ ) en concentration molaire (mol/l), nous devons diviser par la masse molaire du peptide HA<sub>512-520</sub> qui est de 998 g/mol.

#### 4.3.3. Relation entre concentration de peptide et nombre de peptide sur la CPA

Afin de déterminer la relation entre la concentration de peptide dans la suspension et le nombre de peptide sur la CPA, nous avons utilisé les résultats de l'équipe de Valitutti (Valitutti *et al.* , 1995). En effet, ils ont pu déterminer cette relation en réalisant des incubations de différentes concentrations de peptide marqué radioactivement en présence de CPA qui était des LB (EBV-B). Les LB ainsi chargées avec le peptide vont être lavées et lysées, afin de quantifier le nombre de complexe pCMH formé.

La figure 71 montre le nombre de complexes pCMH par cellule présentatrice en fonction de la concentration de peptide incubée avec ces cellules, pour deux expériences, en échelle log.



**Figure 71 : Nombre de complexes pCMH sur le lymphocyte B en fonction de la concentration de peptide (nM).** Le peptide utilisé est un peptide de la toxine (TT830-843) pour deux expériences. D'après (Valitutti *et al.* , 1995).

**Régression linéaire :** en utilisant une régression linéaire sur la courbe (Figure 71) nombre de peptide par CPA en fonction de la concentration de peptide en nM, nous avons obtenu une droite d'équation :  $y = 0,7085x + 0,9087$  avec un excellent coefficient  $R^2 = 0,9699$ .

Le nombre de peptide par CPA peut donc être calculé en fonction de la concentration de peptide mélangée aux cellules :  $8,1X^{0,7085}$ . Ceci n'est valable que pour cet exemple et dans cet intervalle de concentration.

Pour pouvoir utiliser ces résultats, nous devons faire l'hypothèse pour notre modèle que la cellule présentant l'antigène était un lymphocyte T de  $7\mu\text{m}$  de diamètre et dont la zone de contact avec la CPA (synapse) occupe 20% de surface totale.

En fixant ainsi le diamètre du lymphocyte T et le pourcentage de la surface utilisée pour le contact, on connaît la surface de la zone de contact ( $0,2 \times \pi (7 \cdot 10^{-6})^2 \approx 3,08 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2$ ). La surface utilisée pour la synapse est identique sur le lymphocyte B. En fonction du diamètre  $d_B$  du lymphocyte B (entre  $6-8\mu\text{m}$ ), nous pouvons en déduire le rapport de surface de LB consacrée au contact avec le lymphocyte T ( $r_B = \frac{3,08 \cdot 10^{-11}}{\pi d_B^2}$ ).

Les complexes peptide/CMH étant répartis de façon homogène sur la CPA, nous pouvons calculer le nombre de complexes peptide/CMH dans la synapse à partir du rapport précédent et du nombre de complexes peptide/CMH sur la cellule ( $r_B \times$  nombre de complexes peptide/CMH par CPA) (Tableau 11).

Concentration en peptide (nM)	25	50	100	200	500	1000	5000	10000	20000
peptide/CMH par CPA	79	130	212	364	662	1082	3384	5530	9036
Diamètre du lymphocyte B ( $\mu\text{m}$ )	Nombre de peptide/CMH dans la synapse								
7	16	26	42	69	132	216	677	1106	1807
8	12	20	32	53	101	166	518	847	1384
9	10	16	26	42	80	131	409	669	1093
10	8	13	21	34	65	106	332	542	886

**Tableau 11 : Calculs issus de la régression linéaire effectuée sur les données de Valitutti et coll. 1999.**

Dans le but de convertir les différentes concentrations de peptide utilisées dans nos expériences en nombre de pCMH dans la synapse afin de les intégrer dans le modèle, nous avons utilisé la régression linéaire des valeurs de Valitutti (en supposant que le diamètre du lymphocyte T était de  $7\mu\text{m}$  (donc zone de contact avec APC 20%)), pour en déduire le nombre p-CMH dans la synapse, sur la CPA:

- 1106 pCMH pour la concentration de  $10\mu\text{M}$
- 587 pCMH pour la concentration  $5\mu\text{M}$
- 293 pCMH pour la concentration  $2.5\mu\text{M}$

N.B : Je tiens à signaler que la CPA de Valitutti était un LB, alors dans nos conditions expérimentales, nous avons utilisés des mDC issues de monocytes périphériques.

#### **4.4. Résultats**

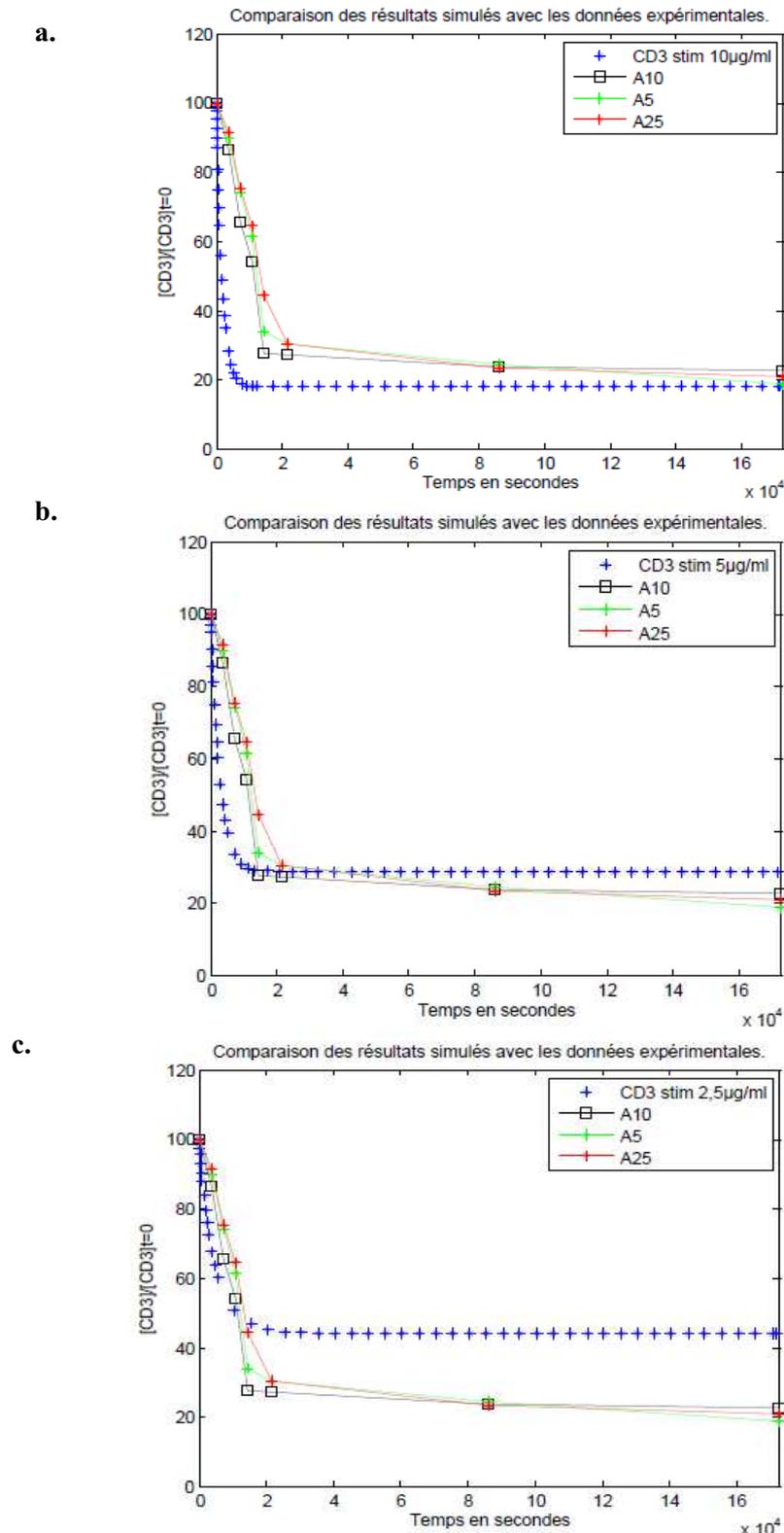
##### **4.4.1. L'expression membranaire du récepteur TCR-CD3 $\xi$ après une stimulation antigénique au HA :**

###### **a) Confrontation des données expérimentales avec le modèle mathématique :**

Pour la cinétique d'évolution du récepteur CD3, la comparaison des simulations numériques issues de notre modèle avec les résultats expérimentaux (Figure 64) montre que, la simulation était proche des données que nous avons observées pour la concentration en peptide de  $5\mu\text{g/ml}$  (Figure 72), hormis quelques différences.

Nos résultats permettent de constater que :

- Les paramètres de vitesse simulée d'intériorisation ont été sous-estimés. La vitesse observée étant plus rapide que l'expérimentale
- Nous n'avons pas trouvé de différence de concentration au plateau comme attendus par la simulation numérique, probablement du fait de nos conditions expérimentales en sursaturation de peptide.



**Figure 72 : Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet de l'évolution au cours du temps de  $[CD3]/[CD3]_{t=0}$ .** La courbe simulée de CD3 ( + ) pour 3 concentrations en peptide ( a : 10µg/ml. b : 5 µg/ml et c : 2.5µg/ml) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation pendant 48h des lymphocytes T issus de souris CL4 avec trois concentrations de peptide : 10µg/ml ( —□—), 5µg/ml ( —+—), et 2.5µg/ml ( —+—). Application numérique du modèle d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

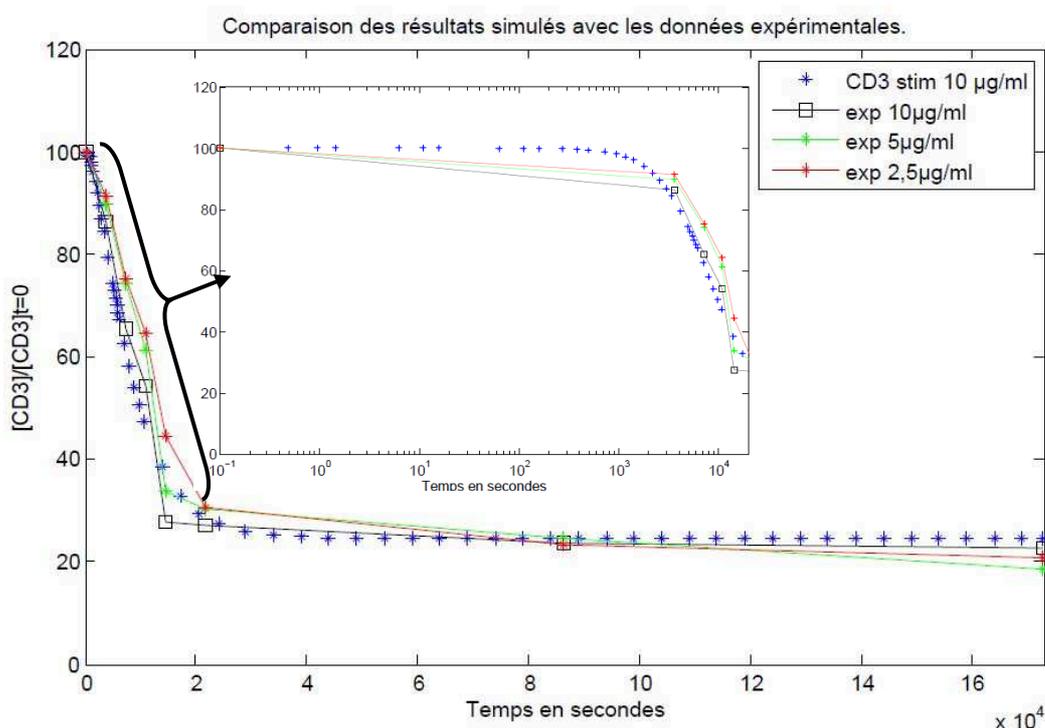
Il existe encore des différences de cinétiques, dans les premiers temps, qui même s'ils paraissent minimes peuvent avoir des conséquences importantes sur la réaction compétée. Le modèle nécessite donc des réajustements de paramètre qui devront être estimés par traitement mathématique que nous n'avons pas eu le temps d'aborder dans cette thèse.

### b) Correction du modèle complet

Pour la correction du modèle, nous avons choisi de faire des ajustements manuels de la courbe d'intériorisation de CD3 obtenue du modèle. Nous avons testé plusieurs valeurs afin de trouver les ajustements les plus adaptés, surtout au niveau des constantes cinétiques du TCR, et plus précisément la constante de renouvellement du TCR à la surface ( $S_1$ ), et la constante d'intériorisation du TCR ( $K_{i1}$ ). Ces paramètres ont été fixés au départ à :  $S_1=0,0011 \text{ min}^{-1} \sim 2.10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Sousa & Carneiro. , 2000) et  $K_{i1}=0,094 \text{ min}^{-1} \sim 0,0015 \text{ s}^{-1}$  (Dietrich *et al.* , 2002, Sousa & Carneiro. , 2000).

#### - Concentration 10 $\mu\text{g/ml}$ :

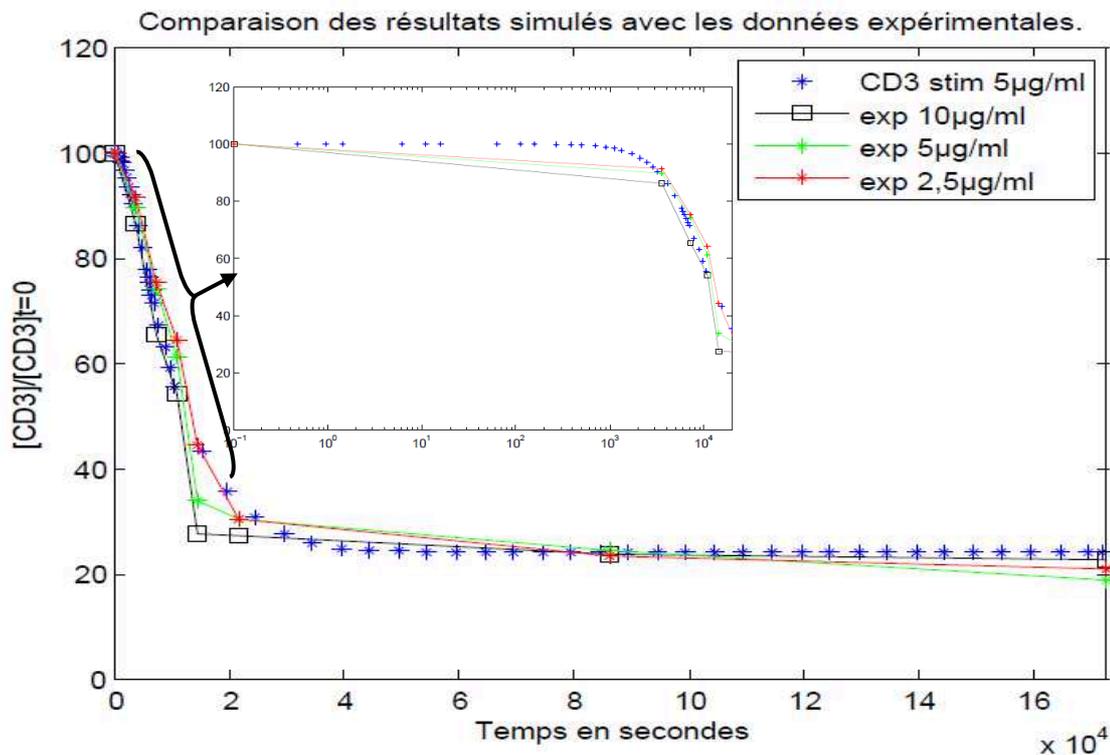
Les meilleures valeurs étaient de  $S_1=2,9.10^{-5} \text{ s}^{-1}$  et de  $K_{i1}=0,00015 \text{ s}^{-1}$ , le choix de ces valeurs permet d'obtenir une courbe de simulation qui se rapproche des résultats expérimentaux.



**Figure 73 : Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet après correction.  $S_1=2,9.10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , et  $k_{i1}=0,00015 \text{ s}^{-1}$ .** La courbe simulée de CD3 à 10 $\mu\text{g/ml}$  (1106 pCMH) (+) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10 $\mu\text{g/ml}$  (—□—), 5 $\mu\text{g/ml}$  (—+—), et 2.5 $\mu\text{g/ml}$  (—+—). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

- Concentration 5µg/ml :

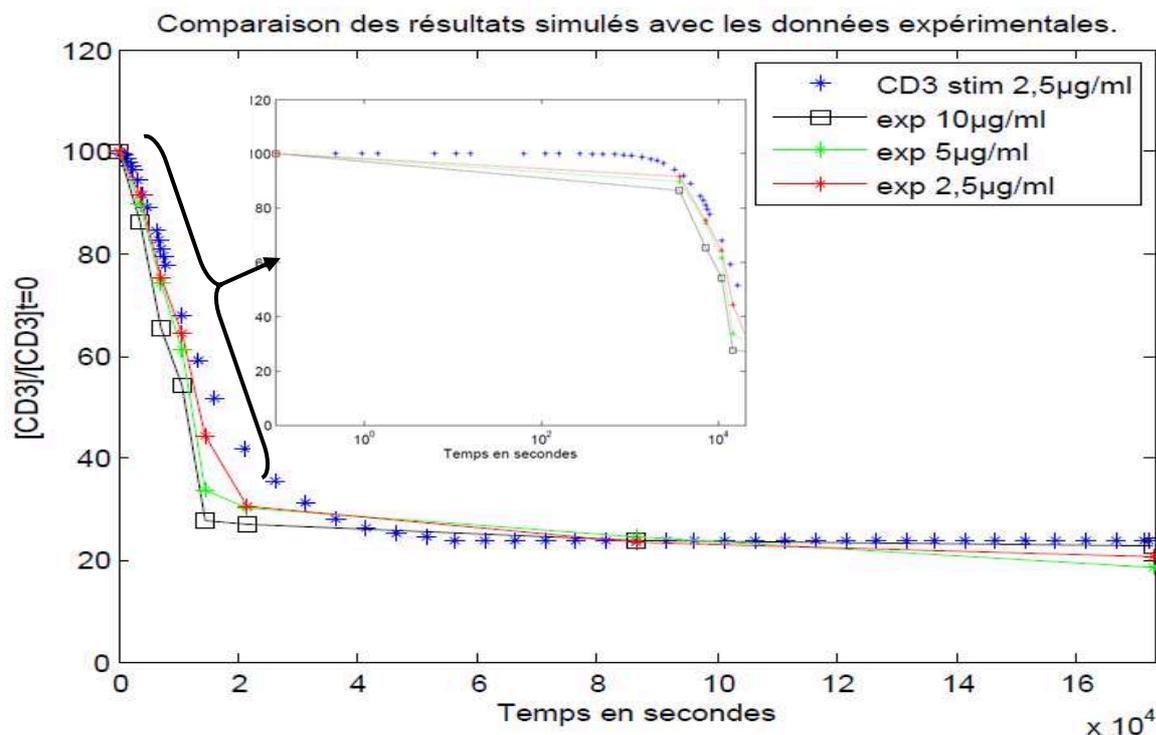
Nous avons pris la valeur de  $S_1=2,4.10^{-5}s^{-1}$  et de  $k_{i1}=0,00015 s^{-1}$ , le choix de ces valeurs permet d'obtenir une courbe de simulation qui se rapproche des résultats expérimentaux.



**Figure 74 : Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet après correction.**  $S_1=2,4.10^{-5}s^{-1}$  et  $k_{i1}=0,00015 s^{-1}$ . La courbe simulée de CD3 à 5 µg/ml (587 pCMH) (+) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml (—□—), 5µg/ml (—■—), et 2,5µg/ml (—■—). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

- Concentration 2,5µg/ml

Nous avons pris la valeur de  $S_1=1.8.10^{-5}s^{-1}$  et de  $k_{i1}=0,00015 s^{-1}$ , le choix de ces valeurs permet d'obtenir une courbe de simulation qui se rapproche des résultats expérimentaux.



**Figure 75 : Comparaison des courbes expérimentales avec les courbes simulées du modèle complet après correction.**  $S_1=1,8.10^{-5}s^{-1}$  et de  $k_{i1}=0,00015 s^{-1}$ . La courbe simulée de CD3 à 2.5 µg/ml (293 pCMH) (+) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml (—□—), 5µg/ml (—+—), et 2.5µg/ml (—\*—). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

Nous observons sur les figures 73, 74 et 75, que les courbes simulées et les courbes expérimentales sont superposables. Ce résultat a été obtenu, en faisant baisser la constante de renouvellement de TCR en surface de  $2.10^{-4}$  à  $\sim 3.10^{-5} s^{-1}$  et la constante d'intériorisation du TCR de 0,0015 à 0,00015  $s^{-1}$ .

#### 4.4.2. Sécrétion d'IL2 après stimulation antigénique

##### a) Confrontation avec le modèle:

La comparaison des simulations numériques obtenues avec notre modèle et les résultats expérimentaux (Figure 76), montre que les simulations et les expériences sont différentes pour les concentrations en peptide testées (Figure 77).

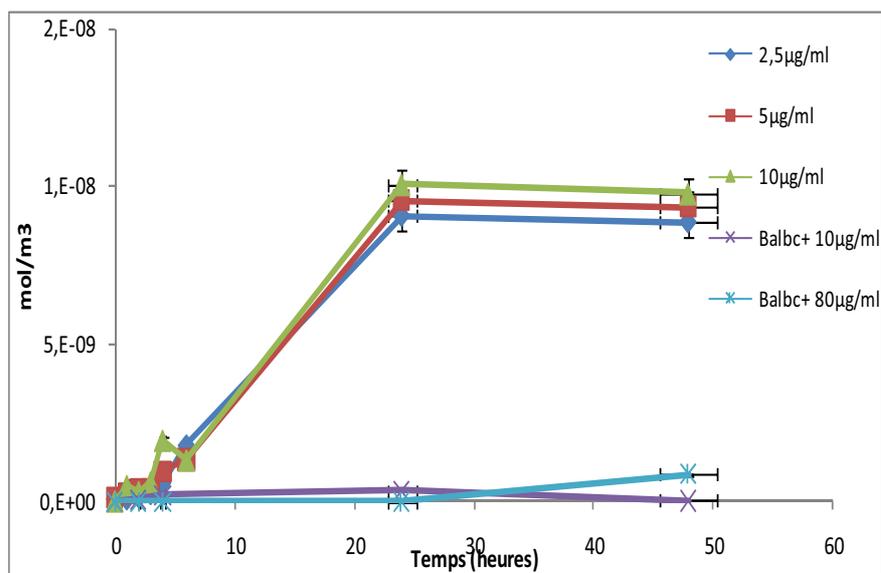
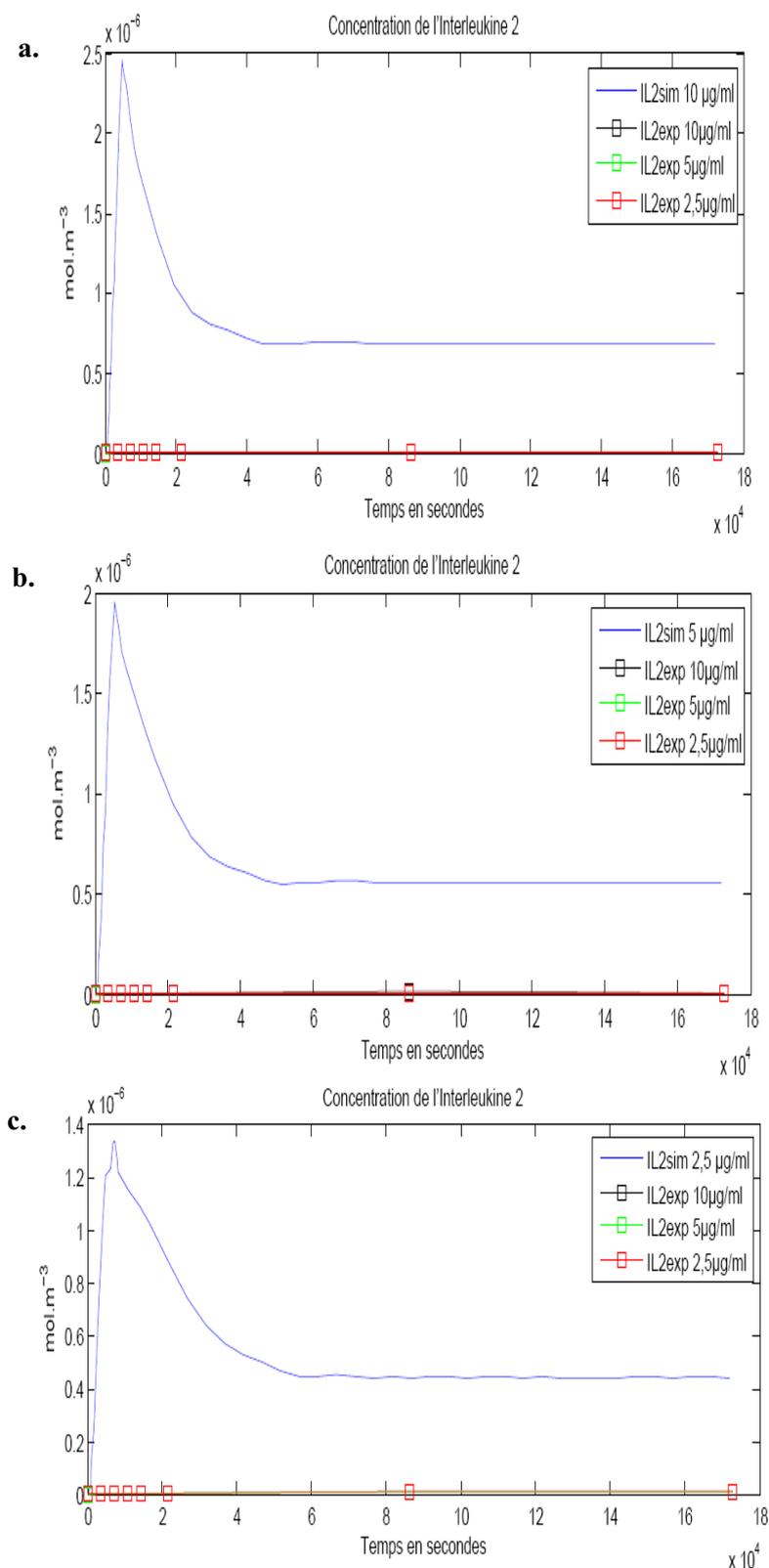


Figure 76 : Dosage de la sécrétion de l'interleukine-2 en mol/m<sup>3</sup> par les lymphocytes T suite à la stimulation avec trois concentrations de peptide (2.5, 5, 10 µg/ml). Le nombre de cellules utilisées est de 0.4.10<sup>6</sup> dans un volume de 200 µl, à différents temps (0, 1, 2, 3, 4, 6, 24, 48 h).



**Figure 77 : Comparaison des résultats simulés avec les données expérimentales.** La courbe simulée de IL2 (—) pour 3 concentrations (a : 10µg/ml. b : 5 µg/ml et c : 2,5µg/ml) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml (—□—), 5µg/ml (—+—), et 2,5µg/ml (—\*—). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

En effet, le modèle présente une forte sécrétion de l'IL2 (beaucoup plus importante), pendant les premières minutes d'activation.

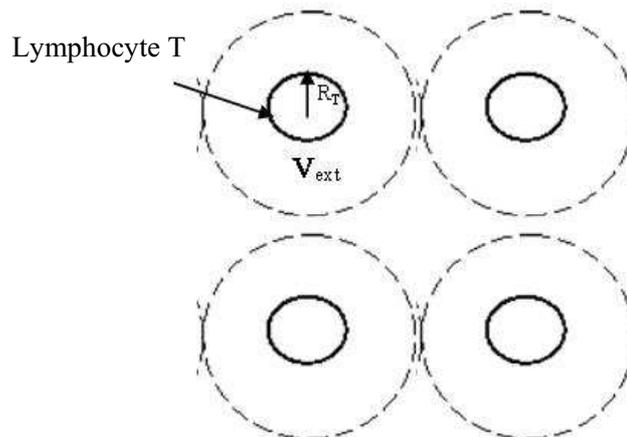
Nous ne sommes donc pas dans le même ordre de grandeur ni en quantité de protéine, ni en échelle de temps. Ceci souligne la nécessité d'ajuster les paramètres de notre modèle d'activation lymphocytaire T.

**b) Correction du modèle :**

Pour réduire la différence entre la simulation et l'expérience, nous avons opéré au niveau de certains paramètres primordiaux dans la sécrétion de l'IL-2. En effet, nous avons constaté une différence au niveau du choix du volume extérieur  $V_{ext}$  d'IL2 (volume moyen de solution dans lequel un lymphocyte T secrète de l'IL2).

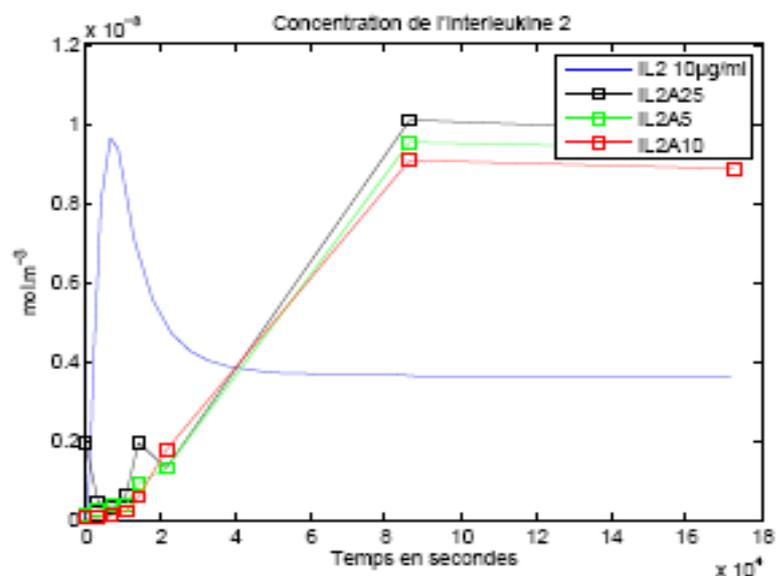
Dans le modèle de C.Bidot, les lymphocytes T sont supposés être dans les ganglions, où la sphère d'influence est faible suite à la grande densité des LT :  $V_{ext} = \frac{4}{3} \pi (R_T + R_T / 4)^3$ , alors que dans nos conditions expérimentales, ce volume est beaucoup plus grand.

Le volume extérieur est le volume de suspension dans le puits divisé par le nombre de lymphocytes T. La sphère d'influence a ainsi un rayon de 50 $\mu$ m, d'où  $V_{ext} = \frac{4}{3} \pi (R_T + nR_T)^3$  avec  $n \sim 10$ .



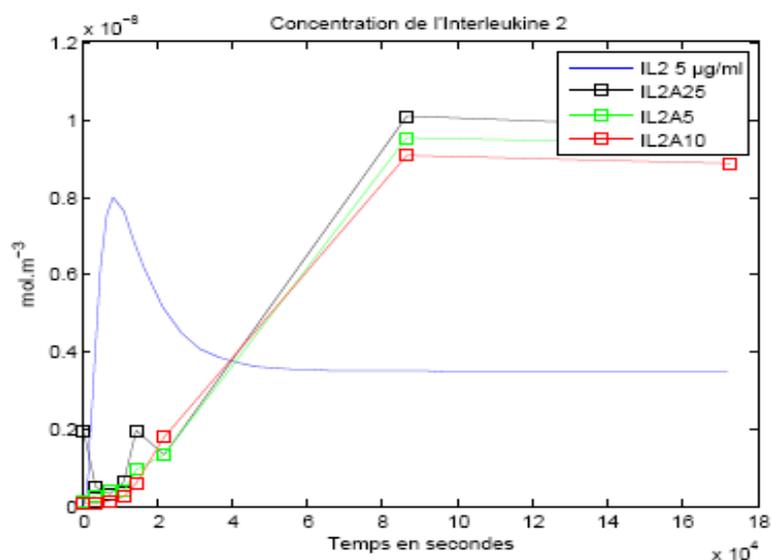
**Figure 78 : Schéma représentatif du volume extérieur d'IL2 d'un lymphocyte T.**

-Concentration 10µg/ml :



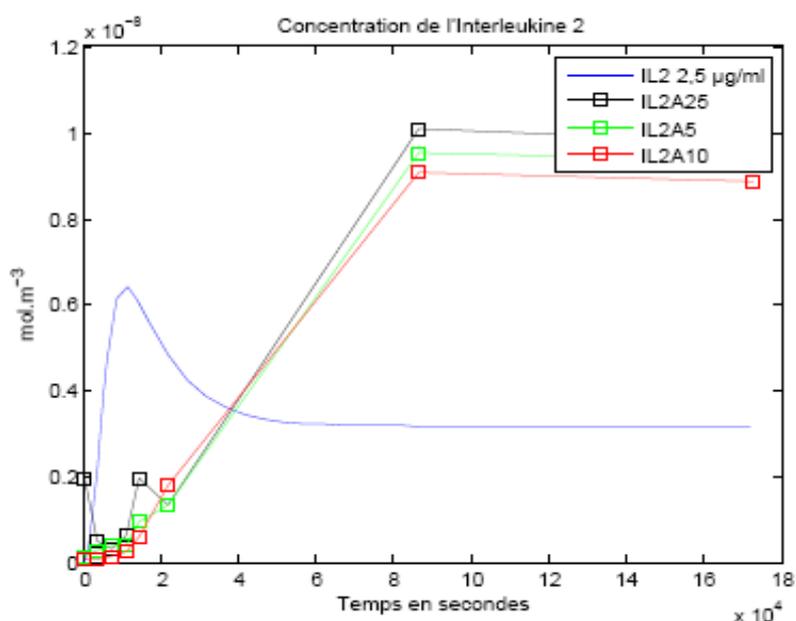
**Figure 79 :** Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 pour la concentration de 10µg/ml avec les courbes simulées du modèle après correction de  $V_{ext}$ . La courbe simulée de IL2 à 10µg/ml (1106 pCMH) (—) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml (—□—), 5µg/ml (—+—), et 2.5µg/ml (—■—). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

- Concentration 5µg/ml :



**Figure 80 :** Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 pour la concentration de 5µg/ml avec les courbes simulées du modèle après correction de  $V_{ext}$ . La courbe simulée de IL2 à 5µg/ml (587 pCMH) (—) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml (—□—), 5µg/ml (—+—), et 2.5µg/ml (—■—). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

- Concentration 2.5µg/ml :



**Figure 81 : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 pour la concentration de 2,5µg/ml avec les courbes simulées du modèle après correction de  $V_{ext}$ .** La courbe simulée de IL2 à 2,5µg/ml (293 pCMH) (—) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml (—□—), 5µg/ml (—+—), et 2,5µg/ml (—■—). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.

Après l'ajustement, nous avons pu avoir des valeurs de sécrétion maximales d'IL-2 se rapprochant des valeurs expérimentales ( $\sim 1,2 \cdot 10^{-8}$  mol/m<sup>3</sup>) pour les différentes concentrations en peptide (figure 79, 80 et 81), mais le problème du décalage de sécrétion par rapport aux résultats expérimentaux persiste. Nous ne reproduisons pas la même échelle temporelle d'événement, ce qui souligne la nécessité de modifier certains paramètres de notre modèle d'activation lymphocytaire T.

Afin de mimer au mieux les courbes expérimentales, nous avons effectué d'autres modifications au niveau de certains paramètres du modèle, on note :

$$K_{onIL2} \text{ (constante d'association de L'IL2)} = 7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{offIL2} \text{ (constante de dissociation de L'IL2)} = 8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{m2} \text{ (constante de production de l'IL2R}_M) = 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{m3} \text{ (constante de production de l'IL2)} = 1,4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{p2} \text{ (constante de production de l'IL2R}_M \text{ en présence de CD28)} = 4000 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

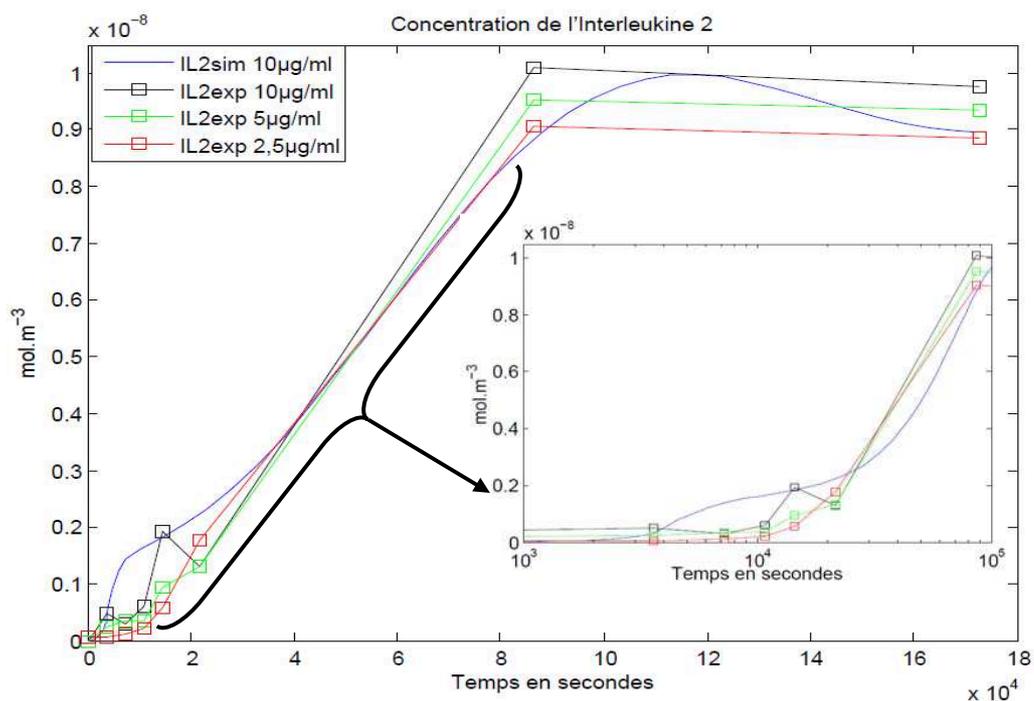
$$K_{p3} \text{ (constante de production de l'IL2 par consommation de CD69}_i^*) = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

$$K_{p3}' \text{ (constante de production de l'IL2 en présence de IL2-IL2R}_{Mi}^*) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

Alors que  $K_{e2}$  (constante de disparition de l'IL2R<sub>M</sub>) et  $K_{e4}$  (constante de disparition de l'IL2) varient en fonction de la quantité de peptide choisi.

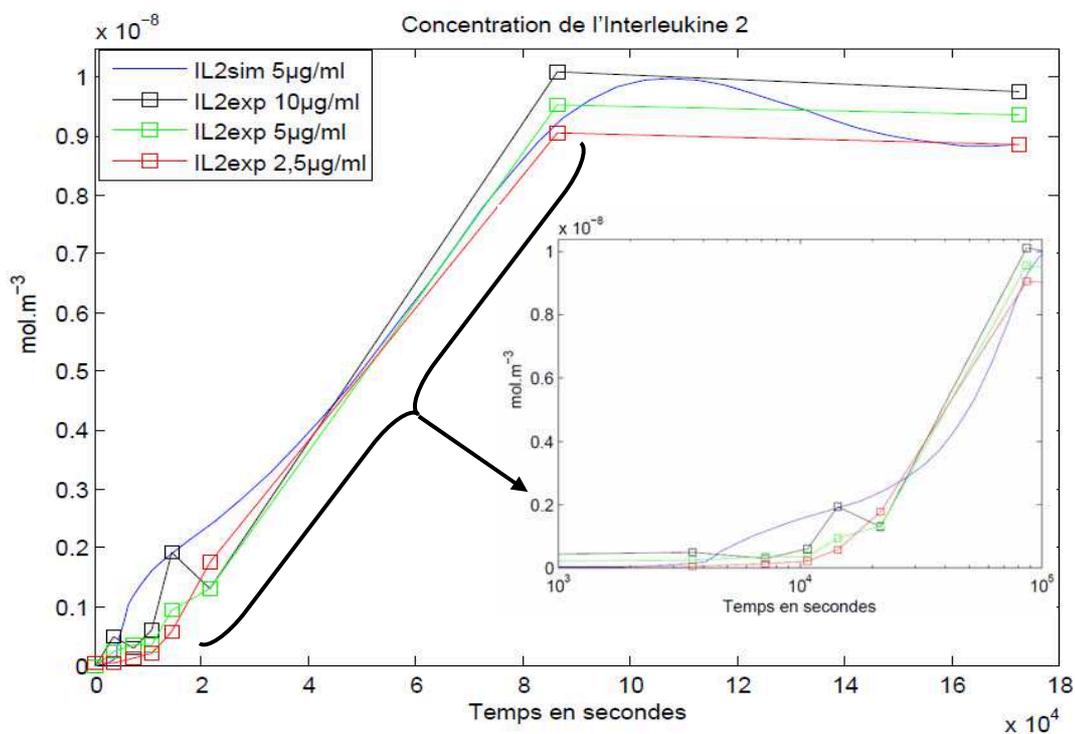
Nous avons gardé les mêmes paramètres choisis pour les ajustements des courbes de CD3 et le même volume extérieur d'IL2.

- Concentration 10µg/ml :



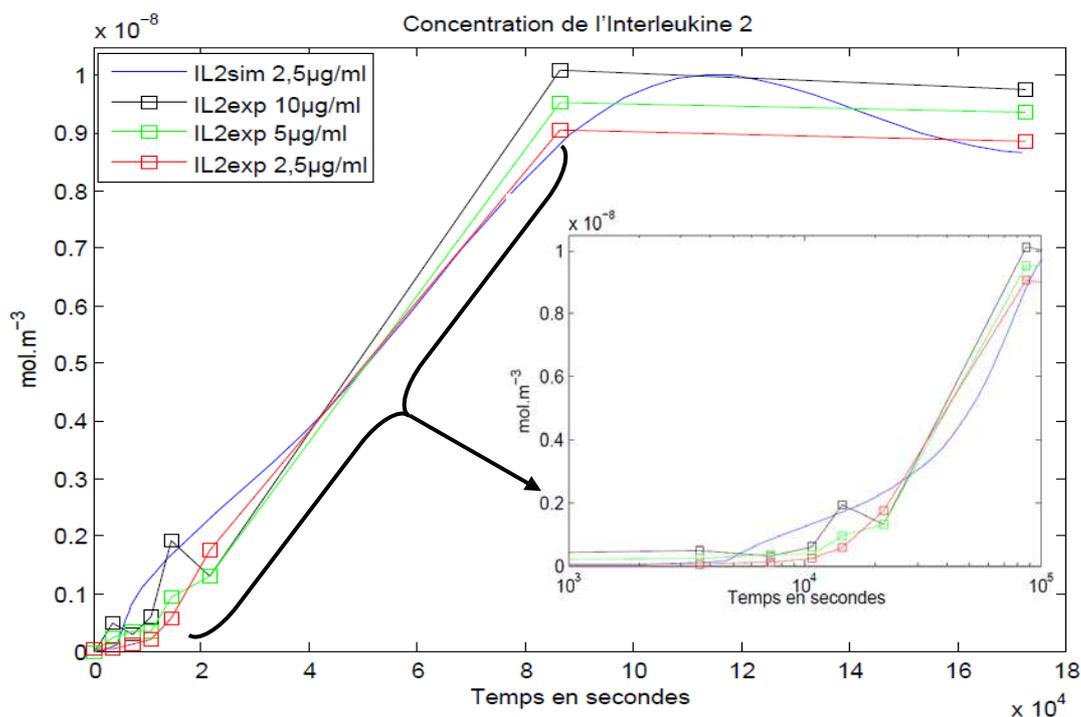
**Figure 82 : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 avec les courbes simulées du modèle après correction de  $K_{e2}= 3,4.10^{-5}s^{-1}$  et  $K_{e4}= 8,2.10^{-5} s^{-1}$ . La courbe simulée de IL2 à 10µg/ml (1106 pCMH) ( — ) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml ( —□— ), 5µg/ml ( —+— ), et 2.5µg/ml ( —□— ). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.**

- Concentration 5µg/ml :



**Figure 83 : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d'IL-2 avec les courbes simulées du modèle après correction de  $K_{e2}= 3,8.10^{-5}s^{-1}$  et  $K_{e4}= 7,6.10^{-5} s^{-1}$ . La courbe simulée de IL2 à 5µg/ml (587 pCMH) ( — ) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml ( —□— ), 5µg/ml ( —+— ), et 2.5µg/ml ( —□— ). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.**

- Concentration 2.5µg/ml :



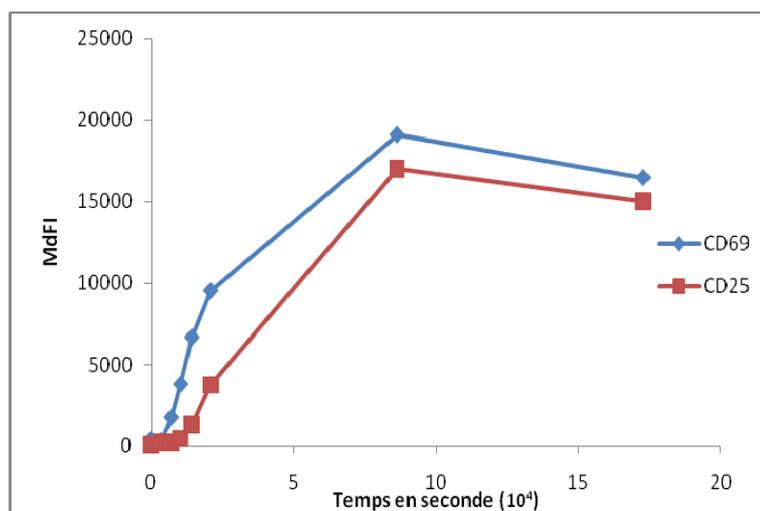
**Figure 84 : Comparaison des courbes expérimentales du dosage de la sécrétion d’IL-2 avec les courbes simulées du modèle après correction de  $K_{e2}=3,8.10^{-5}s^{-1}$  et  $K_{e4}=5,9.10^5 s^{-1}$ . La courbe simulée de IL2 à 2,5µg/ml (293 pCMH) (—) est comparée avec les courbes obtenues suite à la stimulation des lymphocytes T avec trois concentrations de peptides : 10µg/ml (—□—), 5µg/ml (—+—), et 2.5µg/ml (—■—). Application numérique du modèle complet d’activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.**

En réalisant ces corrections, nous avons pu obtenir des courbes simulées similaires aux courbes expérimentales.

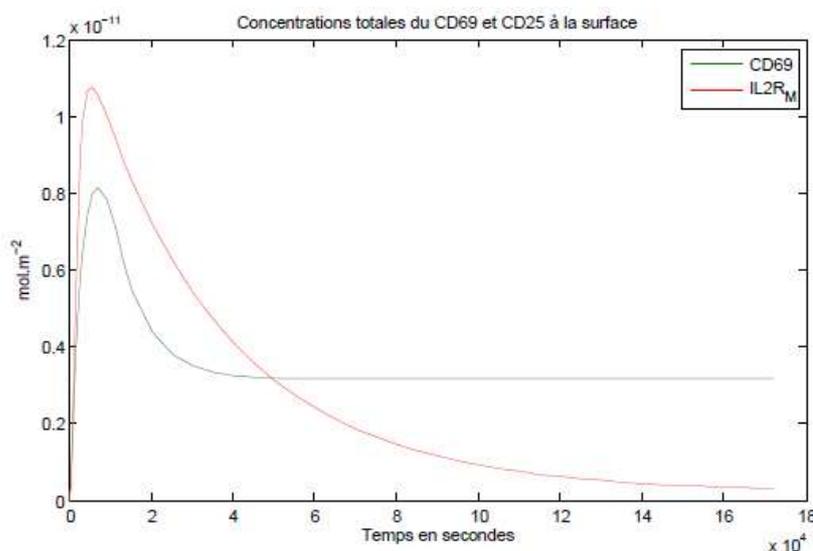
Les paramètres corrigés ont été choisis aléatoirement par C.Bidot, et donc grâce à nos courbes expérimentales nous avons pu définir les valeurs réelles.

#### 4.4.3. Expression du récepteur CD69 et CD25 après activation des lymphocytes T :

Dans le cas de l’expression des 2 récepteurs CD69 et CD25, nous nous sommes contentés de comparer l’allure des courbes simulées (Figure 86) avec celles obtenues expérimentalement (Figure 85) pour une concentration de peptide donnée (10µM).



**Figure 85 : Mesure par cytométrie en flux de l'évolution au cours du temps de l'expression des récepteurs CD69 et CD25 en médiane de fluorescence pour une concentration de 10µg/ml de peptide HA 512-520.**



**Figure 86 : Courbes simulées de concentrations totales de CD69 et IL2R<sub>M</sub> (CD25) pour la concentration de 10µg/ml (1106 pCMH). Application numérique du modèle complet d'activation. La résolution du système de 22 ODE a été effectuée avec la fonction ode15s du logiciel Matlab.**

Après ajustement de certains paramètres cinétiques pour le CD69 ( $K_{m1}$ (constante de production de CD69),  $K_{e1}$  (constante d'élimination de CD69),  $K_{f3}$ (constante de formation de CD69)), et pour le CD25 ( $K_{m2}$ (constante de production de CD25),  $K_{e2}$  (constante d'élimination du CD25)...), nous avons constaté que les courbes de l'évolution des récepteurs CD25 et CD69 obtenues avec le modèle complet de C.BIDOT pour la concentration de 10µg/ml (Figure 86), présentent un décalage d'expression par rapport aux courbes obtenues expérimentalement pour la même concentration (Figure 85). Ce qui souligne la nécessité de modifier d'autres paramètres de notre modèle d'activation lymphocytaire.

## 4.5. Conclusions

1- La confrontation de nos résultats expérimentaux avec le modèle mathématique, nous a permis d'effectuer plusieurs modifications du modèle afin qu'il soit plus proche de la réalité.

- La comparaison des courbes expérimentales relative à la diminution de l'expression du CD3 avec celles du modèle, nous a montré la nécessité d'une correction manuelle des paramètres du modèle.

Sachant que le modèle a été réalisé en prenant en compte les résultats de Valitutti, la différence constatée entre ces derniers et ceux obtenus par notre équipe peut être expliquée par le fait de l'utilisation de protocoles expérimentaux différents.

Les modifications réalisées sur le modèle pour la correction de la courbe du CD3 ont été effectuées au niveau de la constante de renouvellement du TCR à la surface du lymphocyte T ( $S_1$ ), et de la constante d'intériorisation du TCR activé ( $K_{i1}$ ). Après réalisation des ajustements nous avons obtenu une superposition totale entre les courbes simulées et les courbes expérimentales.

- La comparaison des courbes expérimentales de la sécrétion de l'IL-2 avec celles obtenues avec le modèle, nous a montré une grande différence tant au niveau de la quantité secrétée, qu'au niveau du temps du déclenchement de la sécrétion.

Cette différence constatée nécessite la réalisation d'une modification au niveau du choix du volume extérieur d'IL2 (volume moyen de solution dans lequel un LT secrète de l'IL2). En effet, ce volume dans le modèle de C.Bidot a été supposé dans les ganglions, alors que dans nos conditions expérimentales il était beaucoup plus grand (faible densité de LT dans les puits). Cette modification a permis d'avoir un ordre de grandeur de sécrétion similaire, mais malgré cela les courbes simulées restent différentes de celles obtenues expérimentalement. Dans le but de réaliser une superposition totale de ces courbes, nous avons effectué plusieurs modifications au niveau des paramètres du modèle qui ont été en majorité choisis aléatoirement. Grâce à nos courbes expérimentales nous avons pu déterminer les valeurs de certains paramètres non trouvés dans la littérature:

$$K_{onIL2} \text{ (constante d'association de L'IL2)} = 7.10^5 M^{-1} s^{-1}$$

$$k_{offIL2} \text{ (constante de dissociation de L'IL2)} = 8.10^{-5} s^{-1}$$

$$K_{m2} \text{ (constante de production de l'IL2R}_M) = 10^{-6} s^{-1}$$

$$K_{m3} \text{ (constante de production de l'IL2)} = 1,4.10^{-6} s^{-1}$$

$$K_{p2} \text{ (constante de production de l'IL2R}_M \text{ en présence de CD28)} = 4000 m^3 mol^{-1} s^{-1}$$

$$K_{p3} \text{ (constante de production de l'IL2 par consommation de CD69}_i^*) = 2,5.10^{-6} s^{-1}$$

$$K_{p3}' \text{ (constante de production de l'IL2 en présence de IL2-IL2R}_{Mi}^*) = 5.10^{-5} s^{-1}$$

$$K_{e2} \text{ (constante de disparition de l'IL2R}_M) = 3,4.10^{-5} s^{-1} - 3,8.10^{-5} s^{-1}$$

$$K_{e4} \text{ (constante de disparition de l'IL2)} = 5,9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} - 8,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

2- Certaines courbes simulées restent difficile à comparer avec celles obtenues expérimentalement, en particulier celles relatives aux récepteurs surfaciques CD69, CD25. Ces derniers sont exprimés en concentration surfacique au niveau du modèle, alors qu'expérimentalement ils sont exprimés en médiane de fluorescence. La conversion de la médiane de fluorescence en concentration surfacique reste difficile à réaliser, puisque la médiane de fluorescence émise par les anticorps couplés aux récepteurs présents à la surface d'un lymphocyte T ne correspond pas à une quantité connue de récepteur. Malgré cette différence nous avons réalisé une comparaison des courbes simulées et expérimentales des 2 récepteurs CD69 et CD25, en effectuant des modifications au niveau de leurs constantes cinétiques (constante de production, élimination et formation). Ces modifications n'ont pas pu mener à l'obtention de courbes d'expression similaires, confirmant le fait qu'il faut opérer au niveau d'autres constantes cinétiques du modèle, mais aussi qu'il faut pouvoir avoir la même unité d'expression afin de réaliser une meilleure comparaison pour une meilleure correction et validation du modèle.

Cependant, il existe des méthodes de quantification tels que Qifikit, Quantum beads, QuantiBrite...pour convertir la médiane de fluorescence des différents récepteurs en concentration surfacique, afin de pouvoir les comparer aux courbes simulées avec le modèle de C.Bidot. Ces dispositifs contiennent des billes non fluorescentes dotées d'une capacité de fixation des anticorps fluorescents (ABC pour *Antibody Binding Capacity*). Ils sont adaptés à l'immunofluorescence directe et étalonnées en nombre de molécules d'anticorps fixées par billes (ABC) à saturation complète, permettant ainsi de relier l'intensité de fluorescence mesurée par l'instrument au nombre de molécules d'anticorps monoclonaux fixées sur l'antigène cellulaire. A ce titre ils réclament une maîtrise du F/P (Fluorescence/protéine). Malheureusement, ces dispositifs restent limités par le choix des fluorochromes et le nombre de protéines quantifiées à la fois.

3- Certaines variables (comme par exemple l'IL-2 captée et intériorisée IL-2-IL-2R<sub>M</sub><sup>i\*</sup>) ne peuvent pas être mesurées expérimentalement, puisque la réalisation de ces expériences reste difficile et fastidieuse.

4- En cytométrie en flux, l'usage veut que les résultats soient exprimés en médiane de fluorescence. Cette approche présente un certain nombre d'inconvénients.

Pour les surmonter, nous avons réalisé un nouveau modèle mathématique, adapté à l'interprétation des données de cytométrie, afin de mieux interpréter les résultats obtenus, et aussi d'extraire le maximum de paramètres (vitesse d'intériorisation du CD3, vitesse d'apparition et de disparition du CD25 et CD69...). Ce modèle fait l'objet du chapitre suivant.



### III. Interprétation des expériences de cytométrie en flux

#### 1. Introduction

Nous avons vu, lors de l'analyse des résultats expérimentaux réalisée dans le chapitre précédent, que les données de cytométrie en flux sont exprimées en médiane de fluorescence de toute la population. L'exploitation de ces résultats représente plusieurs inconvénients, on n'en cite que deux :

-L'information contenue dans la distribution est beaucoup plus riche que sa réduction à la médiane.

-La médiane n'a pas de sens quand on a affaire à des distributions multimodales.

Nous avons réalisé un modèle mathématique permettant d'interpréter les résultats expérimentaux relatifs à l'évolution des récepteurs membranaires (CD3, CD8, CD69, CD25) en fonction du temps, en tenant compte de la richesse de l'information issue du cytomètre. Pour une meilleure exploitation et interprétation des données.

#### 2. La modélisation

Nous avons réalisé un modèle décrivant l'interaction entre un lymphocyte T et un antigène (porté par une cellule présentatrice d'antigène). Il se présente sous la forme d'un système d'équations différentielles ordinaires donnant les concentrations volumiques ou surfaciques des protéines (CD3, CD69, CD25, IL2...) en fonction du temps. Celui-ci peut se mettre sous la forme:

$$\frac{dC_i}{dt} = F(C_j, t) \quad 1 \leq i, j \leq n$$

Ce modèle a été validé en le comparant à des données expérimentales. Classiquement, celles-ci sont issues de mesures en cytométrie en flux.

Principe de l'analyse par cytométrie en flux : Les cellules (de l'ordre de quelques milliers) passent devant un faisceau lumineux, qui excite les fluorochromes associés à des détecteurs spécifiques des protéines. L'analyse de chaque cellule est caractérisée par une intensité de fluorescence proportionnelle à la concentration (surfacique) pour la protéine membranaire.

Les cellules sont mises en contact avec le peptide spécifique et analysées périodiquement. Pour l'ensemble des cellules analysées (issues d'un prélèvement à un instant  $t$ ), on dispose donc d'une distribution (discrète), qui représente le nombre de cellules ayant une valeur de concentration en protéine dans l'intervalle donné  $[C_i, C_i + \Delta C_i]$ . L'usage est d'en déduire une valeur médiane, qui, seule, sera utilisée par la suite : on compare la solution du système différentiel aux valeurs de concentrations proportionnelles à la médiane de fluorescence. Cette approche présente un certain nombre d'inconvénients, que nous avons déjà cité (paragraphe III.1).

Nous proposons une approche plus rigoureuse, quitte à la simplifier après coup.

Soit une population de lymphocytes T en présence d'antigène. Un lymphocyte est porteur de différentes protéines, chacune caractérisée par sa concentration  $C_i$ . Chaque concentration est une variable interne du problème. Elles seront considérées comme formellement indépendantes.

On définit ainsi la densité de population  $n(t, C_1, \dots, C_i, \dots, C_n)$ .

Le nombre de lymphocyte T dont les concentrations en protéines sont dans les intervalles  $[C_1, C_1 + dC_1], \dots, [C_i, C_i + dC_i]$  peut être représenté ainsi :

$$dN = n(t, C_1, \dots, C_i, \dots, C_n) dC_1 \dots dC_i \dots dC_n$$

La densité de population obéit alors à l'équation de bilan de population :

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \frac{\partial(G_1 n)}{\partial C_1} \dots + \frac{\partial(G_i n)}{\partial C_i} \dots + \frac{\partial(G_n n)}{\partial C_n} = 0$$

On suppose qu'il n'y a pas de création ou de mort de lymphocytes T dans l'intervalle considéré.

Les fonctions  $G_i$  sont des fonctions de « croissance », que l'on peut exprimer comme (thèse Caroline Bidot) :

$$G_i = \frac{dC_i}{dt} = u + \sum_{k=1}^n v_k^i C_k + \sum_{k,l=1, k \neq l}^n w_{kl}^i C_k C_l$$

Les paramètres  $u, v_i, w_{ij}$  sont des constantes cinétiques.

Pour résoudre cette équation (qualifiée de bilan de population multidimensionnel), il faut préciser les conditions initiales et aux limites.

Supposons que nous sachions résoudre cette EDP par un jeu de constantes cinétiques données. Comment comparer la solution, qui est une fonction de plusieurs variables, aux données de cytométrie ?

Le cytomètre nous procure une densité de population intégrée (ou réduite): par exemple, la densité de population relative à la protéine CD3, indépendamment de son contenu en CD69. En fait, L'appareil nous donne le nombre de lymphocytes ayant un contenu donné en protéines CD3 et CD69, mais ce nombre serait trop petit pour en déduire des densités croisées. La traduction mathématique de la densité de population indiquée par le cytomètre est :

$$n_i(C_i) = \iiint n(t, C_1, \dots, C_{i-1}, C_i, C_{i+1}, \dots, C_n) dC_1 \dots dC_{i-1} dC_{i+1} \dots dC_n$$

$n(t, C_i) dC_i$  est donc le nombre de cellules par unité de volume de suspension dont la concentration  $i$  en protéine est comprise entre  $C_i$  et  $C_i + dC_i$ . Nous allons maintenant nous intéresser exclusivement à  $n(t, C_i)$  du point de vue expérimental et théorique. L'équation traduisant le bilan de population multidimensionnel est remplacée par un ensemble d'équations aux dérivées partielles, chacune faisant intervenir  $n(t, C_i)$ .

La modélisation doit être adaptée aux données expérimentales dont on dispose. Ainsi, seul un mécanisme simplifié est pour l'instant légitime (Figure 87):

- rencontre :  $L + T \rightarrow LT$  et activation  $T \rightarrow T^*$  (ou  $LT \rightarrow LT^*$ )
- intériorisation  $T \rightarrow T^*_i$
- formation des protéines membranaires CD69 et CD25 (plus tardivement) :
  - o  $T^*_i \rightarrow CD69$
  - o  $T^*_i \rightarrow CD25$
- intériorisation de CD69 :  $CD69 \rightarrow CD69^*_i$
- formation de IL2 (en solution) :  $CD69^*_i \rightarrow IL2$
- formation du complexe :  $CD25 + IL2 \rightarrow CD25-IL2$  qui conduit à la prolifération.

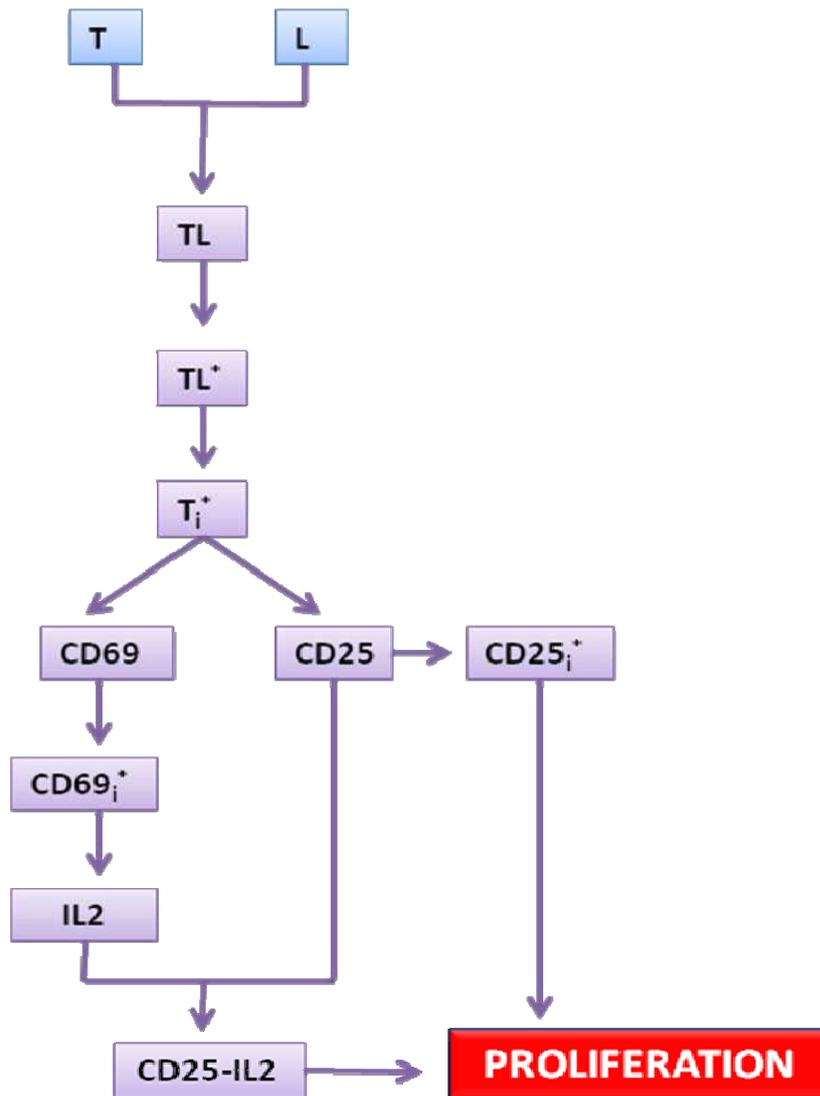


Figure 87 : Schéma simplifié de la prolifération lymphocytaire T (T) suite à la rencontre avec un ligand (L).

La technique de modélisation consiste donc à calculer:

- $n(t, C)$  (pour CD3)
- $n(t, \Gamma_i)$  (pour CD3 intériorisé)
- $n(t, C_j)$  (pour CD69 et CD25).

Où  $n(t, C_x)$  représente la densité de population relative aux cellules contenant la protéine x à la concentration  $C_x$ .

Nous nous sommes limités aux dynamiques de concentration du CD3, CD25 et CD69 qui sont les marqueurs les plus significatifs de l'activation cellulaire.

Ce modèle est détaillé en annexe I.

### 3. Extraction des données expérimentales

L'intensité de fluorescence est décrite en 1024 canaux, le fichier source de données du cytomètre comporte pour chaque cellule (lymphocyte) plusieurs nombres entiers compris entre 0 et 1023 pour chaque paramètre. Chaque nombre  $m$  représente une intensité lumineuse  $I$  (de fluorescence ou non) relative à une variable interne (FSC pour forward scattering indiquant la taille de la cellule, SSC pour side scattering indiquant la granularité, l'intensité de fluorescence représentant la concentration en CD3, en CD69, en CD25). Le nombre 0 correspond à une intensité lumineuse de valeur 0 ; 1023 correspond à une intensité lumineuse de  $2,62 \cdot 10^5$ . L'échelle est logarithmique :

$$\log_{10} I = \frac{m}{1024} \log_{10} 2.6210^5$$

$10^5$  événements cellulaires (débris et cellules) ont été analysés. Prenons l'exemple de CD3 : nous avons définis 1024 classes (canaux), chacune contenant un nombre de cellules  $m$  (c'est-à-dire l'intensité lumineuse proportionnelle à la concentration en CD3) et le nombre d'évènements  $N_m$  correspondant (ayant le même  $m$ ). On a ainsi :

$$N_m = (0.0053 \times 2.718) n I$$

$n$  est ici la densité de population (c'est elle qui est comparée à la modélisation).

Nous avons mis au point un petit programme d'extraction des données. Le programme « FZ\_recup.m », écrit en Matlab permet de récupérer les données du cytomètre (pour CD3, CD69 et CD25). Pour chaque protéine, nous avons construit 3 diagrammes :  $N_m=f(m)$ ,  $n=f(I)$  et  $n_{norm}=f(C/C_{max})$  (densité de population normalisée). Seul, le troisième diagramme nous sera utile.

Les résultats de stimulation de cellules issues de quatre souris différentes montraient que :

- le nombre (total) de cellules  $k_{max}$  répondant aux critères de sélection (les fenêtrages de la population cible ont été réalisés par le logiciel Diva®) ne dépend pas du temps
- la densité de population normalisée  $n_{norm}$  est proportionnelle à la densité de population non normalisée :

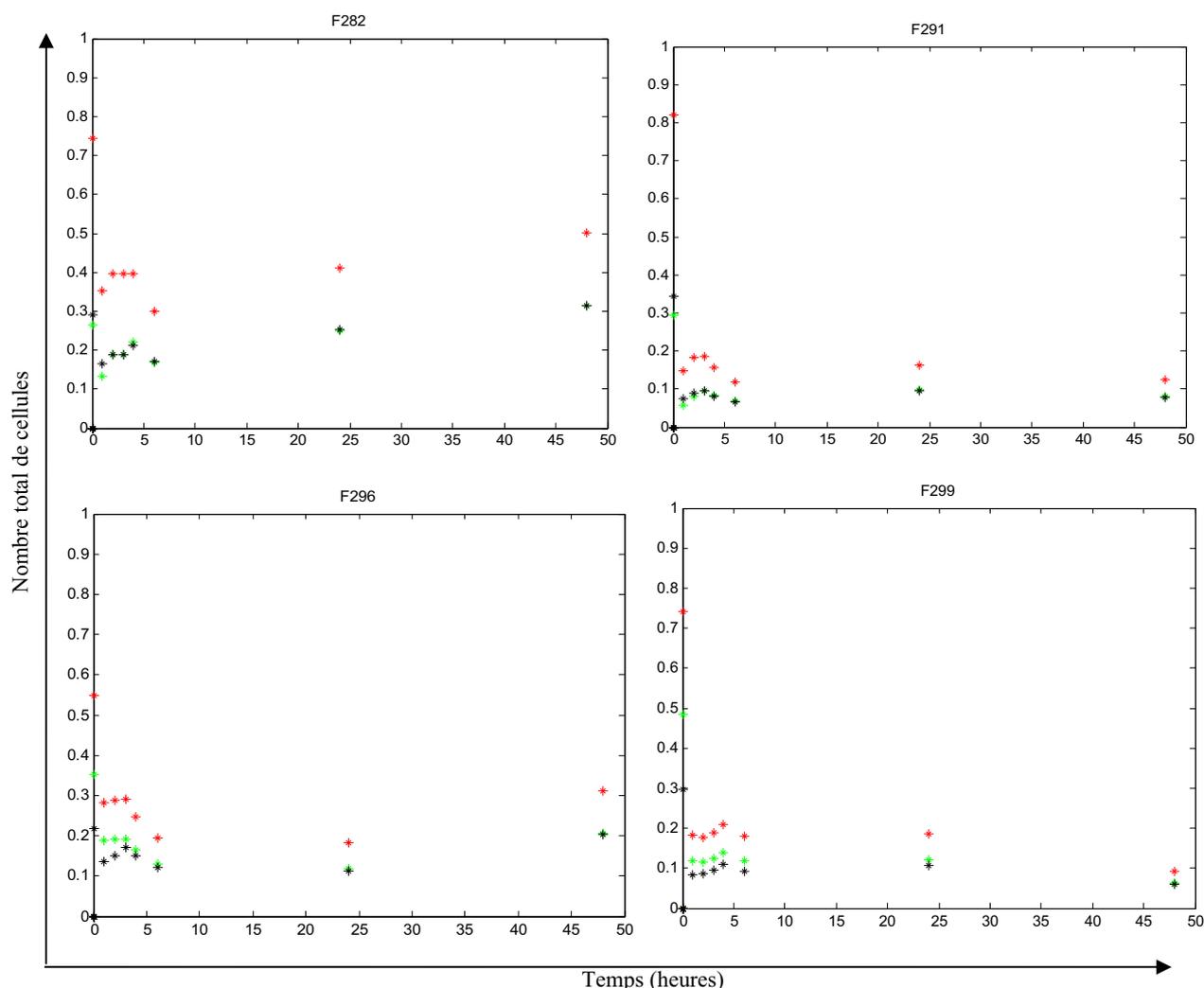
Nous avons les relations suivantes :

$$\int_0^{I_{max}} n dI = k_{max}$$

$$\int_0^1 n_{norm} d(I / I_{max}) = 1$$

$$n = \frac{k_{max}}{I_{max}} n_{norm}$$

Ceci justifie le choix des densités normalisées pour la présentation des résultats :



**Figure 88 : Nombre total de cellules concernées en fonction du temps.** En rouge (CD3), en vert (CD69) et en noir (CD25) pour quatre souris CL4 différentes (F282, F 291, F296 et F299). Données expérimentales de cytométrie extraites avec le programme « FZ\_recup.m »

Les résultats montrent une bonne reproductibilité entre les souris testées, de l'évolution des populations de cellules.

Pour une concentration donnée en antigène, la figure 88 nous montre que :

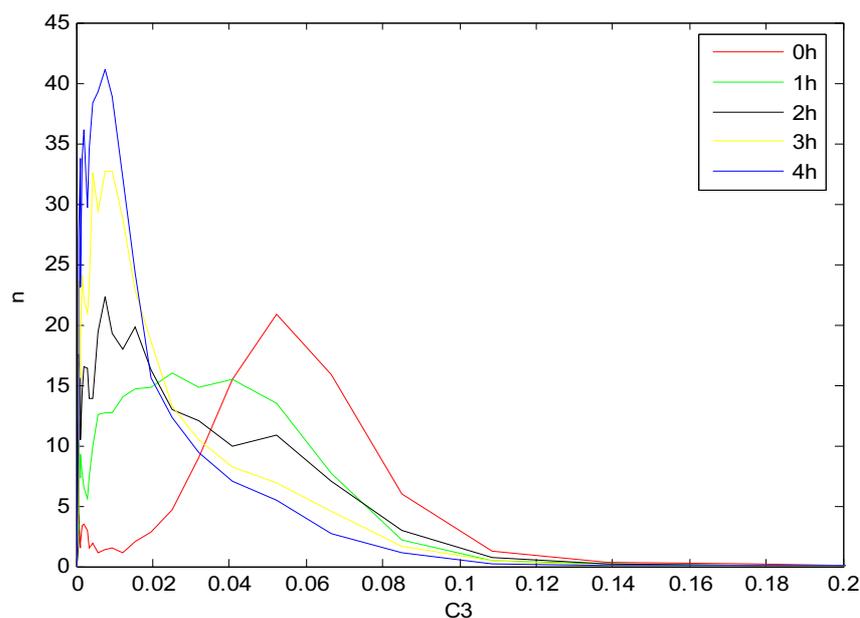
- Les variations temporelles du nombre total de cellules étaient très voisines d'une protéine à l'autre.
- En premier approximation, le nombre total de cellules était indépendant du temps.
- En deuxième approximation, ce nombre croît légèrement jusqu'à 3-4h pour décroître jusqu'à 6h et rester sensiblement constant après.
- Le nombre total de cellules exprimant le CD69 est égal au nombre total de cellules exprimant le CD25
- Le nombre total de cellules exprimant le CD3 est le double du nombre total de cellules exprimant le CD69 ou le CD25

Nous avons choisi de travailler avec la densité normalisée (par le nombre total de cellules). Notre nouveau modèle a permis d'obtenir des résultats que nous décrivons dans les paragraphes suivants.

### 3.1. Densité de la population CD3

#### ○ [0h ; 4h]

Les données analysées ont été extraites du cytomètre pour la population CD3 issues d'une souris CL4 stimulé avec HA (10 $\mu$ g/ml) pour une durée entre [0- 4h]. Il apparaît clairement sur la figure 89 que la distribution en CD3 est bimodale (pic 2 : [0,002 ; 0,1] ; pic 1 : [ $5 \cdot 10^{-4}$  ;  $10^{-2}$ ]). Au cours du temps la concentration en CD3 sur les lymphocytes T diminue, ce qui reflète le phénomène d'intériorisation. La cinétique étant déterminée par la collision entre lymphocyte et CPA, ce sont donc les conditions expérimentales qui fixent la cinétique des premières étapes de l'activation. Nous avons constaté (confirmé par la modélisation) que l'intériorisation est très rapide quelque soit le contenu initial de CD3.



**Figure 89 : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD3 entre 0 et 4 heures. Données expérimentales de cytométrie extraites avec le programme « FZ\_recup.m ».**

#### ○ [4h ; 48h]

Nous avons constaté, à partir de 4h une production du CD3 à la surface des lymphocytes : Le nombre de lymphocyte T sur le pic 2 [ $5 \cdot 10^{-4}$  ;  $10^{-2}$ ] diminue (Figure 90), et apparait, particulièrement à 48h une population de lymphocyte exprimant une concentration plus élevée de CD3.

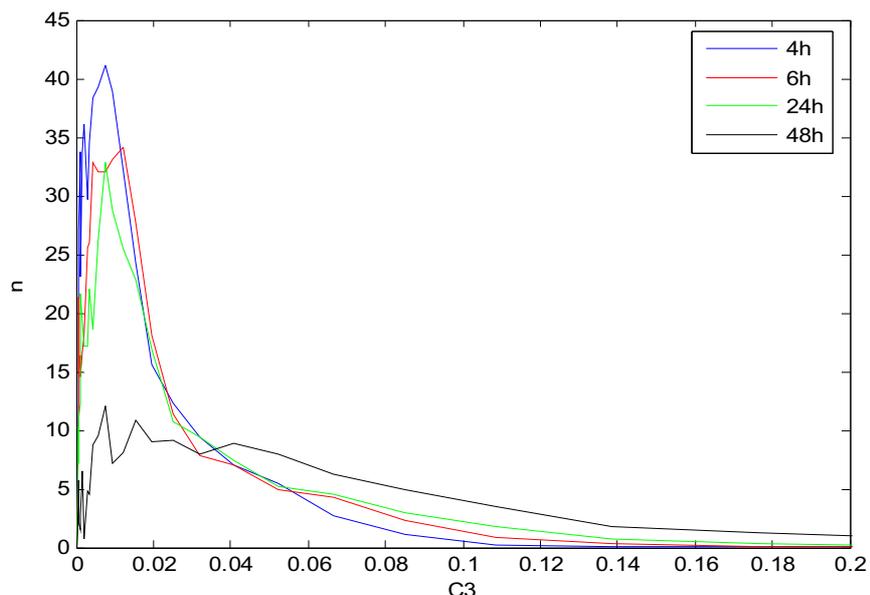


Figure 90 : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD3 entre 4 et 48 heures. Données expérimentales de cytométrie extraites avec le programme « FZ\_recup.m ».

### 3.2. Densité de la population CD69

#### ○ [0h ; 4h]

Nous avons constaté que le contenu initial en CD69 n'était pas nul ( $[10^{-4}; 10^{-3}]$ ) ; au fur et à mesure de l'activation, nous avons observé une expression lente de CD69 (Figure 91).

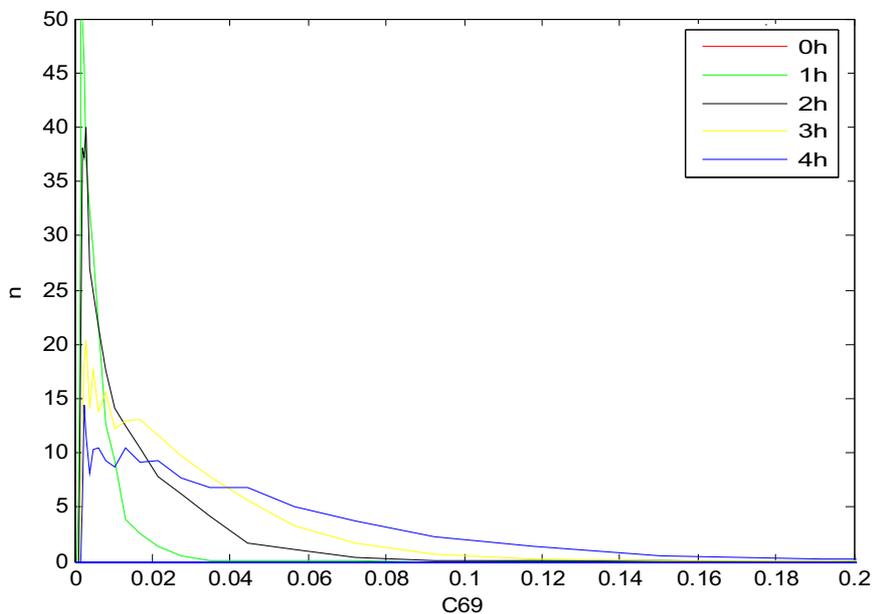


Figure 91 : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD69 entre 0 et 4 heures. Données expérimentales de cytométrie extraites avec le programme « FZ\_recup.m ».

○ [4h ; 48h]

A partir de 4h, nous observons une disparition progressive du CD69 de la surface. Cette disparition était maximale à 48h (Figure 92).

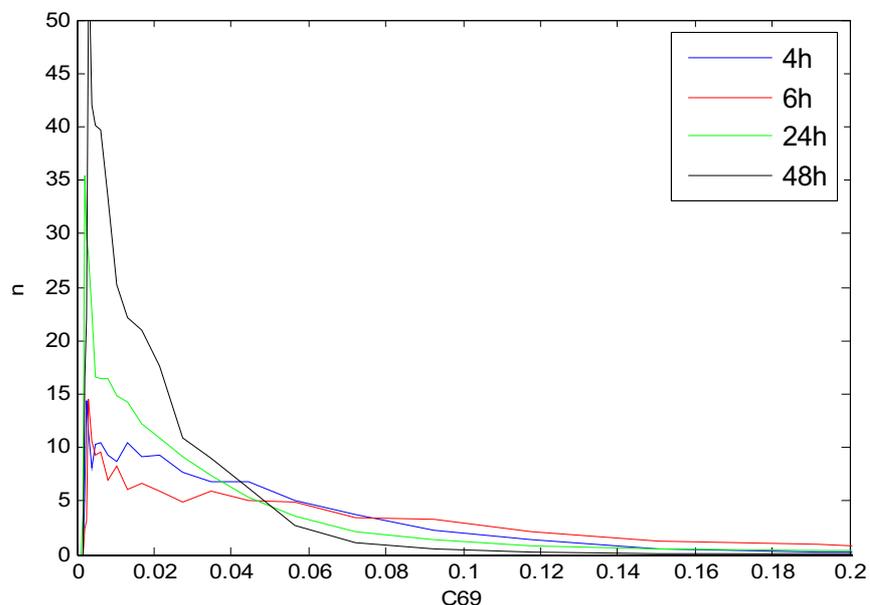


Figure 92 : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD69 entre 4 et 48 heures. Données expérimentales de cytométrie extraites avec le programme « FZ\_recup.m ».

### 3.3. Densité de la population CD25

● [0h ; 4h]

La concentration en CD25 était quasi-nulle au temps 0. Au cours du temps, son expression subit une croissance lente à la surface des lymphocytes T significative à partir de 3h. (Figure 93).

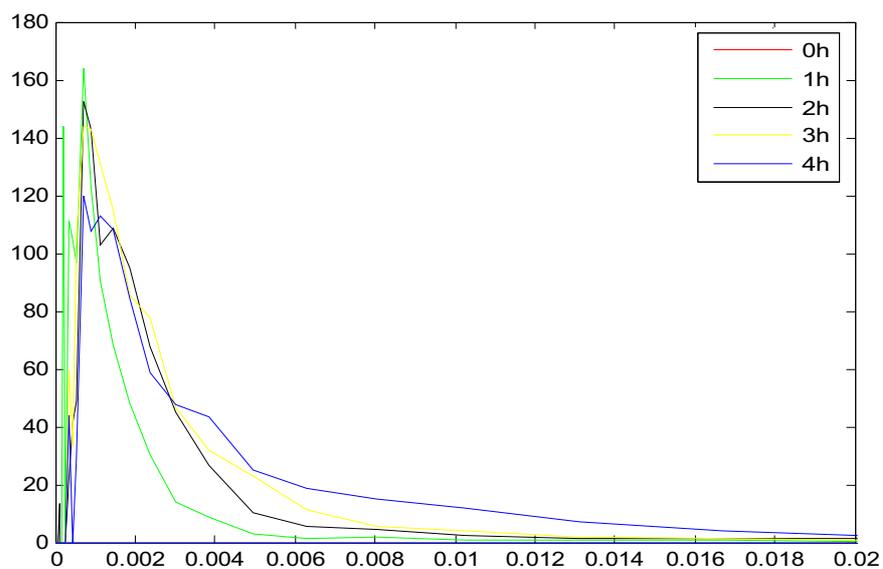


Figure 93 : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD25 entre 0 et 4 heures. Données expérimentales de cytométrie extraites avec le programme « FZ\_recup.m ».

- [4h ; 48h]

Le CD25 continue d'être produit régulièrement à la surface, contrairement au CD69 qui disparaît progressivement (Figure 94).

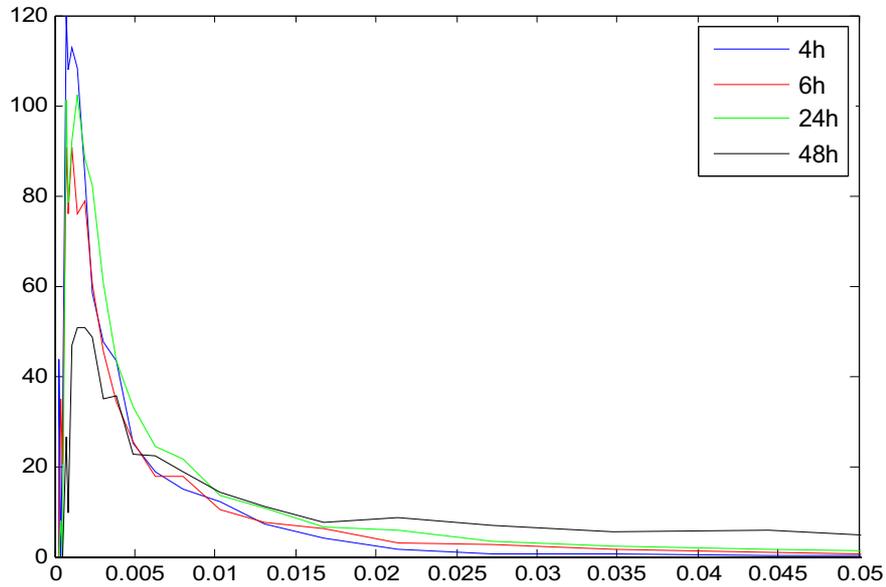


Figure 94 : Distribution de la densité de population de lymphocytes T selon leur niveau d'expression de CD25 entre 4 et 48 heures. Données expérimentales de cytométrie extraites avec le programme « FZ\_recup.m ».

#### 4. Confrontation des résultats expérimentaux aux simulations

Nous nous sommes intéressés à la comparaison des courbes expérimentales obtenues après le traitement ci-dessus aux courbes obtenues avec les simulations numériques dans les 2 domaines temporels [0h; 6h] et [6h; 48h].

Ce traitement des données nous a permis de convertir les données expérimentales aux données telles qu'elles sont exprimées dans le modèle.

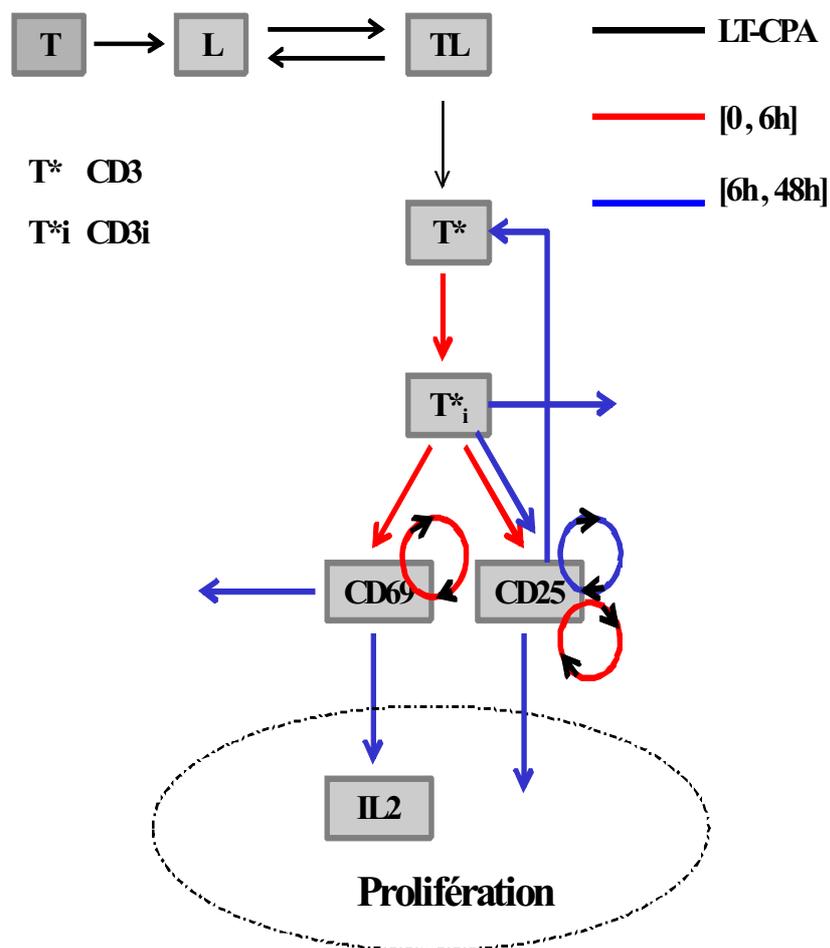
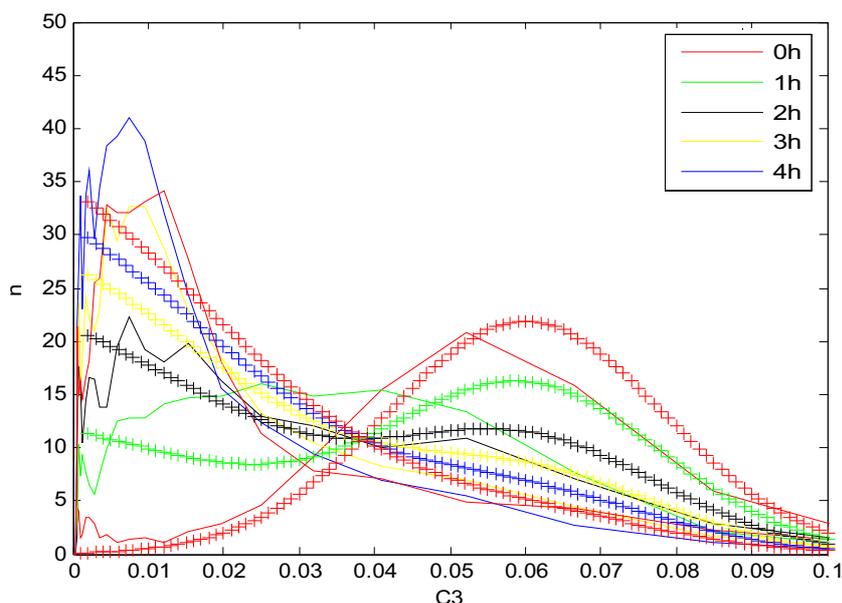


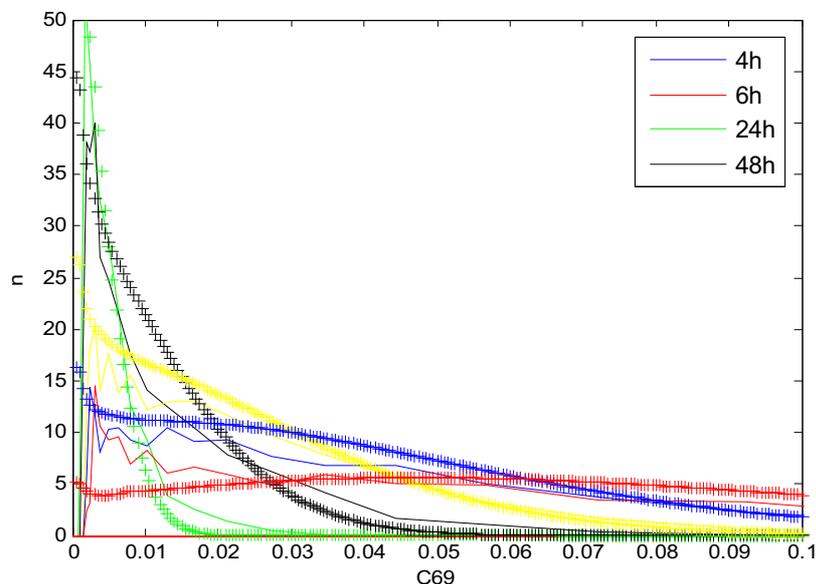
Figure 95 : Schéma détaillé de la prolifération lymphocytaire T

○ [0h ; 6h]



**Figure 96 :** Evolution de la densité de population relative à CD3. Ligne continue : expérience ; ++++ : modélisation.

Pour le CD3, les fonctions de densité ont été parfaitement retrouvées par modélisation (Figure 96). Ceci n'est pas le cas dans la période [6h ; 48h] (Figure 97).



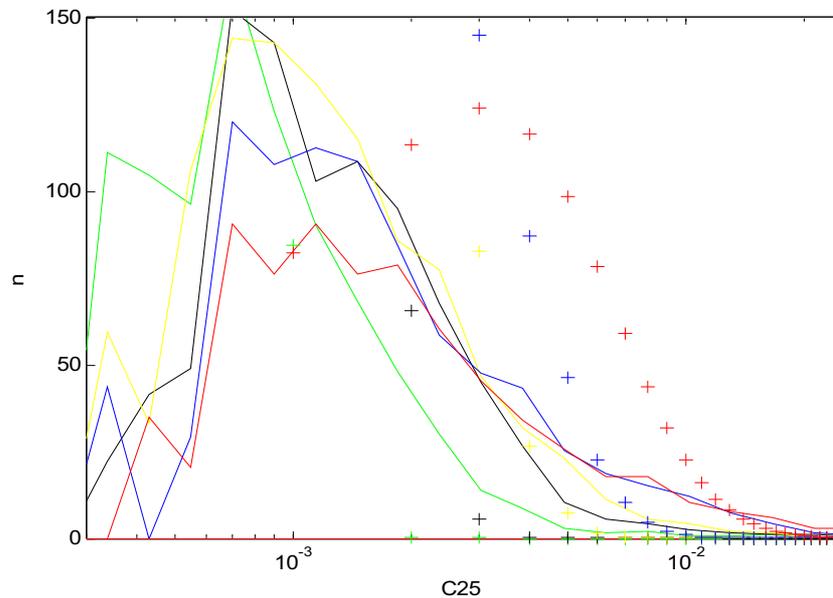
**Figure 97 :** Evolution de la densité de population relative à CD69. Ligne continue : expérience ; ++++ : modélisation.

Quand  $t$  est inférieur à 6h, les fonctions de densité de population pour CD69 sont retrouvées par modélisation si la loi de formation est :

$$G_{69} = \frac{dC_{69}}{dt} = 0,5C_{3i}C_{69}^{1/2}$$

En prenant à l'instant initial  $C_{69}=0,001$ .

A partir des résultats nous avons pu suggérer que la production du CD69 était encouragée (autocatalysée) par la présence de CD69.



**Figure 98 : Evolution de la densité de population relative à CD25.** Vert : 1h ; noir : 2h ; jaune : 3h ; bleu : 4h ; rouge : 6h. Ligne continue : expérience ; ++++ : modélisation.

Quand  $t$  est inférieur à 6h, il y a production du CD25. Cette production est analogue à celle de CD69. La loi de formation peut être écrite:

$$G_{25} = \frac{dC_{25}}{dt} = 0,5C_{3i}C_{69}^{1/2}$$

en prenant à l'instant initial  $C_{69}=0,001$ ,

ou bien ;

$$G_{25} = \frac{dC_{25}}{dt} = 0,14C_{3i}C_{25}^{0,45}$$

en prenant à l'instant initial  $C_{25}=0,0001$ .

Nous n'avons pas pu déterminer laquelle de ces deux lois représente le mieux la formation de CD25.

○ [6h ; 48h]

- Nous avons constaté, à partir de 4h, une production de CD3 à la surface du lymphocyte. De façon concomitante, les CD69 disparaissent progressivement de la surface. Par contre, les CD25 continuent d'être produits régulièrement.

La production de CD3 ne peut être traitée comme l'intériorisation. Il s'agit d'une formation lente, caractérisée par une vitesse  $G_3$ . D'un point de vue algorithmique, les productions de CD3, CD69 et CD25 sont traitées de la même façon.

- Le CD25 étant produit continuellement depuis les premières heures, il semble plus facile d'établir la loi cinétique correspondante. Il faut noter que la forme de la distribution (longue queue de distribution vers l'infini) n'est compatible qu'avec :  $G_{25} \propto C_{25}$ .

Cependant, il n'est pas si facile d'expliquer pourquoi la production de CD25 est fortement ralentie à partir de 6h. Ceci ne peut se produire que si la concentration en CD3i (CD3 intériorisé) diminue aussi avec le temps :  $G_{i3} = -0,15C_{3i}$ .

L'identification des paramètres a été difficile ; des instabilités numériques apparaissent pour les temps élevés.

Une étude paramétrique nous a montré que le résultat dépendait beaucoup de la condition initiale en  $C_{25}$ . Afin d'être moins sensible à ces conditions, nous proposons les lois suivantes :

$$G_{3i} = -k_{3i} C_{3i} \quad \text{avec } a_{25}=2,5 \cdot 10^{-3} ; k_{3i}=0,02 ; b_{25}=1 ; C_{25}^0 = 0$$

$$G_{25} = C_{3i}^n (a_{25} + b_{25} C_{25})$$

- Il faut noter que l'identification des CD69 et CD3 dans cet intervalle de temps est relativement claire : on a une disparition de CD69 de la surface des lymphocytes (augmentation du nombre de lymphocytes à bas niveau de CD69) et formation de CD3 à la surface (augmentation du nombre de lymphocytes à haut niveau de CD3). Cependant, il est difficile de modéliser (quantitativement) ces comportements. La loi suivante n'est qu'une approximation :

$$G_3 = C_{25} (a_3 + b_3 C_3) \quad \text{avec } a_3=0,08, b_3=80.$$

Les courbes issues de cette modélisation semblent être éloignées des courbes expérimentales pour être montrées.

## 5. Conclusions

L'objectif de cette modélisation était de mieux comprendre les résultats de cytométrie afin de mieux les interpréter.

Il semble que le modèle créé prédise de manière correcte les événements pendant les premières heures [0-6h], c'est-à-dire le profil de l'évolution de la densité des récepteurs membranaires CD3, CD25 et CD69.

Il permet de connaître, a priori :

- Le comportement des récepteurs membranaires suite à une stimulation antigénique.
- La vitesse d'intériorisation du CD3
- La vitesse d'intériorisation du CD8
- La vitesse de formation de CD25 et CD69.

Ces données cinétiques de simulation que nous avons produites dans cette étude pourront par la suite être utilisées pour corriger et valider le modèle d'activation des lymphocytes T précédemment décrit.

D'autre part, il a été montré expérimentalement que les différentes concentrations en peptide testées expérimentalement donnaient le même profil cinétique, en accord avec la saturation en des CPA en peptide.

Néanmoins, la modélisation des événements qui se déroulent entre [6 - 48h] reste très éloignée de l'expérience. Ceci est certainement lié à l'existence d'un phénomène physique non pris en compte par cette modélisation.



## **IV. Comparaison de l'expérience à la modélisation dans l'intervalle temps [0-6h]**

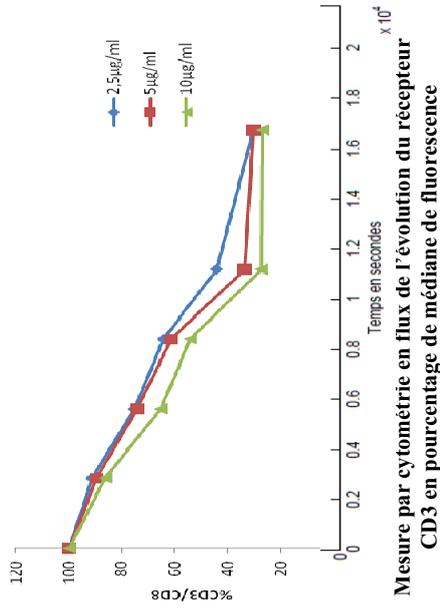
Les données brutes issues du cytomètre peuvent être exploitées de deux façons différentes :

- Soit par une interprétation réalisée par le logiciel Facs Diva fourni avec l'appareil, permettant ainsi la réalisation des courbes de cinétique des récepteurs membranaires en médiane de fluorescence,
- Soit par le modèle interprétatif de cytométrie développé par nous-mêmes, en se basant sur les données expérimentales brutes du cytomètre.

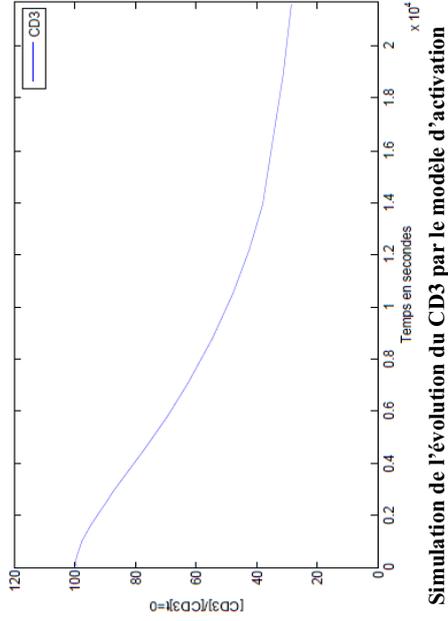
Nous tenons à rappeler que le modèle d'activation (C.Bidot) a été réalisé sur des bases théoriques connues sur l'activation lymphocytaire T et faisant intervenir plusieurs paramètres déjà décrits dans la littérature.

Dans cette partie, nous avons réalisé une confrontation entre les courbes expérimentales et le modèle d'activation de C. Bidot. Cette confrontation s'est avérée difficile à réaliser suite à la complexité de notre modèle ainsi qu'à l'expression des grandeurs avec différentes unités (concentration surfacique ou volumique pour le modèle d'activation et intensité de fluorescence pour les courbes issues du logiciel FACS Divas ou celles obtenues par le modèle interprétatif de cytométrie). De ce fait, nous nous sommes contentés d'une comparaison partielle en se basant sur l'allure des différentes courbes.

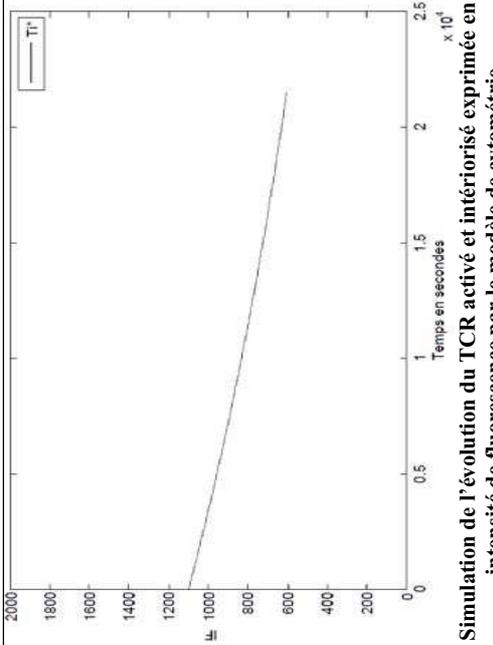
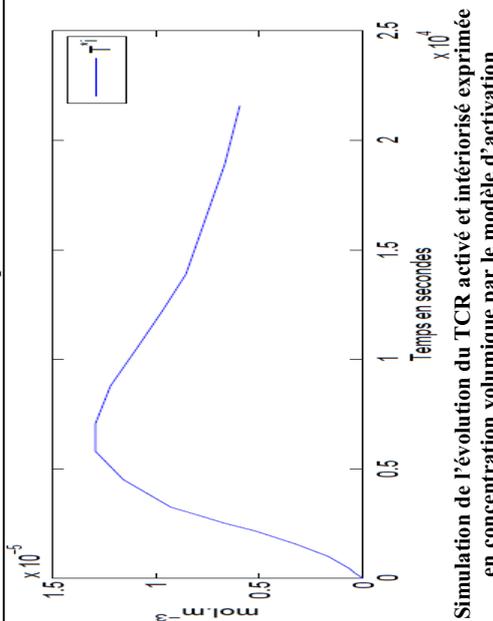
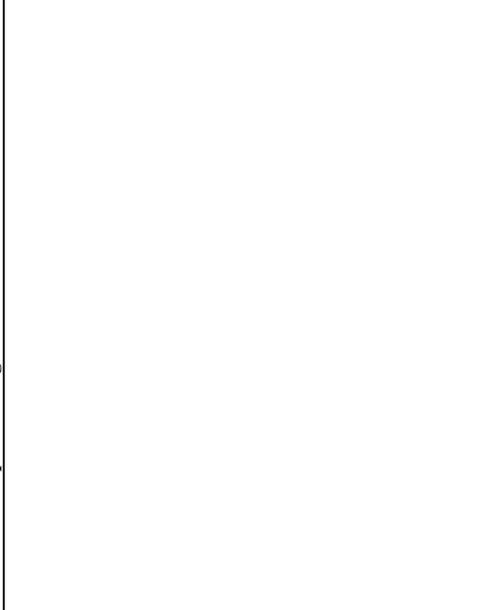
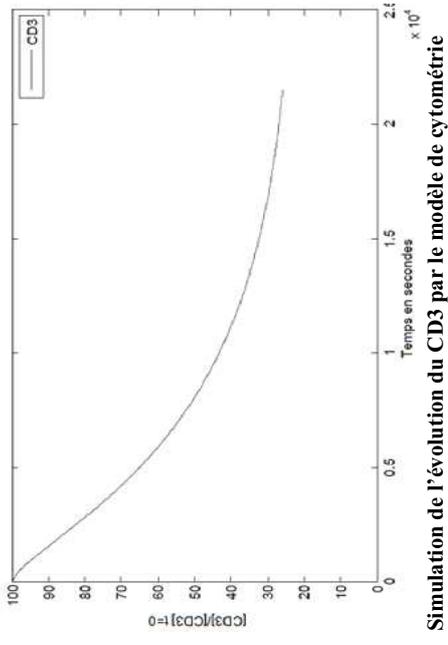
### Expérience



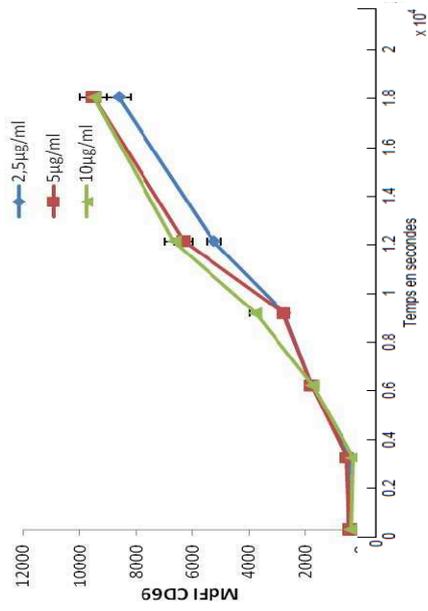
### Modèle d'activation



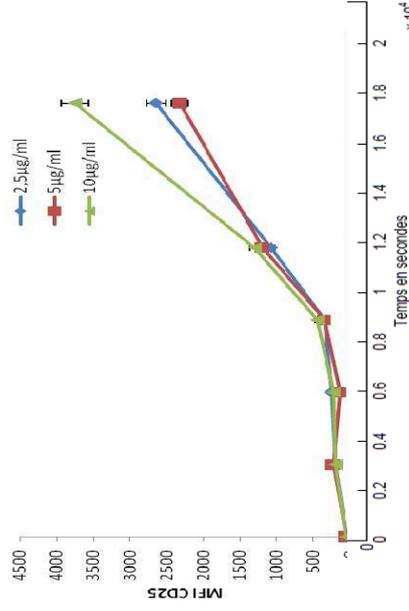
### Modèle de cytométrie



## Expériences

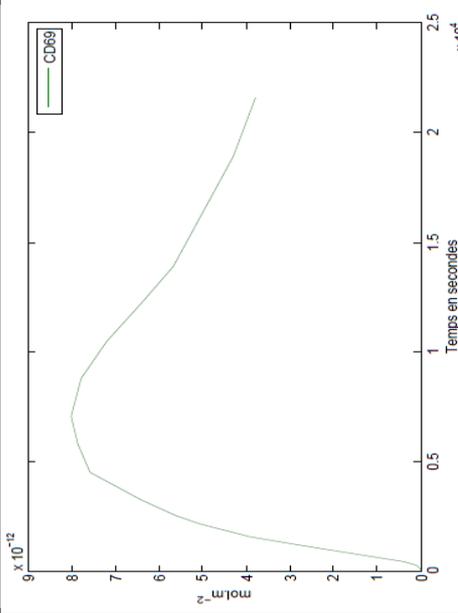


Mesure par cytométrie en flux de l'évolution du récepteur CD69 en médiane de fluorescence

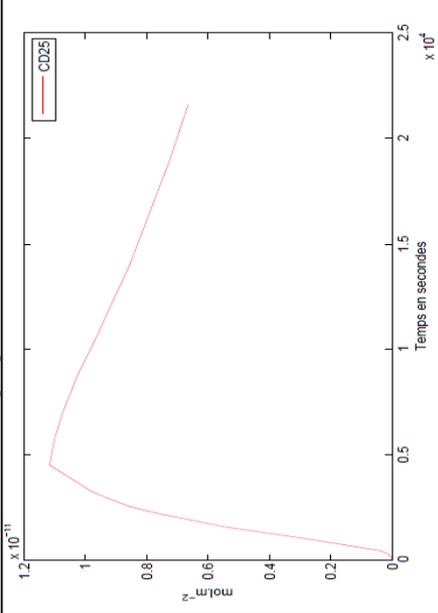


Mesure par cytométrie en flux de l'évolution du récepteur CD25 en médiane de fluorescence

## Modèle d'activation

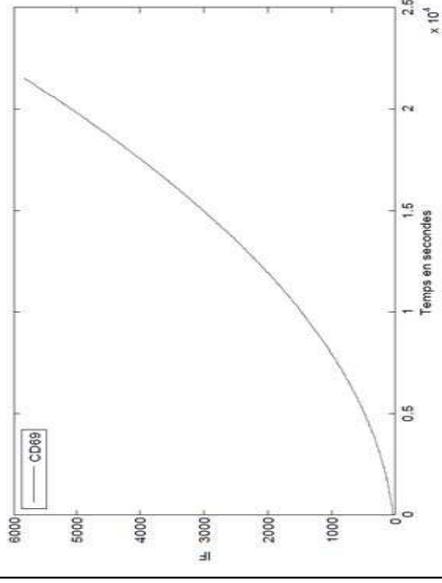


Simulation de l'évolution du CD69 exprimée en concentration surfacique par le modèle d'activation

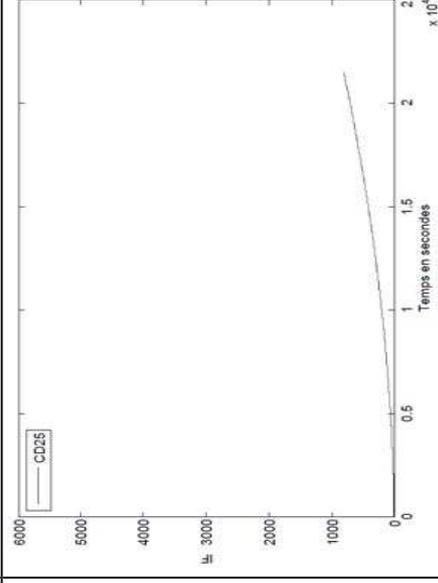


Simulation de l'évolution du CD25 exprimée en concentration surfacique par le modèle d'activation

## Modèle de cytométrie



Simulation de l'évolution du CD69 exprimée en intensité de fluorescence par le modèle de cytométrie



Simulation de l'évolution du CD25 exprimée en intensité de fluorescence par le modèle de cytométrie

Nous constatons que :

- **Pour le CD3 :**

Les courbes expérimentales d'intériorisation du CD3 se rapprochent fortement de la courbe obtenue avec le modèle d'activation. Cependant, la représentation choisie pour les 3 courbes (concentration relative en CD3 moyenne en fonction du temps) ne doit pas cacher la différence fondamentale entre les deux modélisations :

La modélisation de C.Bidot révèle une lente disparition du CD3 de la surface du lymphocyte, alors que la modélisation du « cytomètre » révèle une intériorisation très rapide du CD3 associé à une cinétique lente de rencontre entre LT et CPA.

- **Pour le T\*i (TCR activé et intériorisé) :**

L'obtention de données expérimentales sur ce paramètre reste difficile à réaliser. Nous nous sommes contentés de comparer la courbe du modèle d'activation avec celle du modèle de cytométrie obtenue par déduction. Dans le modèle d'activation lymphocytaire T, nous avons suivi l'intériorisation en quantifiant la concentration volumique de ce récepteur à l'intérieur de la cellule, alors que dans le modèle dédié aux données de cytométrie, ce paramètre a été évalué au travers la disparition de son intensité de fluorescence (en supposant que tous les TCR marqués ont été intériorisés suite à une activation et pas suite à un autre phénomène tel que le recyclage).

Toutefois ces résultats restent très préliminaires suite au manque de plusieurs paramètres clé dans l'activation des lymphocytes T.

- **Pour le CD69 :**

La comparaison entre les courbes expérimentales et la courbe obtenue avec le modèle complet d'activation montre une grande différence.

Le CD69 expérimental a été quantifié par mesure de la médiane de fluorescence, alors que dans le modèle de C. Bidot en concentration surfacique. Cependant, malgré cette différence au niveau de l'unité d'expression nous aurions du avoir des courbes voisines, puisque dans les deux cas nous avons suivi l'évolution du récepteur CD69 à la surface de la cellule. Cette différence peut être expliquée par le mauvais choix des paramètres cinétiques liés au CD69 qui doivent être corrigés en tenant compte des résultats expérimentaux, chose que nous n'avons pas pu réaliser actuellement.

La courbe expérimentale et celle obtenue avec le modèle dédié aux données de cytométrie sont proches. L'expression surfacique de CD69 atteint la valeur de 10 000 en médiane de fluorescence pour l'expérience et 6 000 en intensité de fluorescence pour le modèle de cytométrie. Rappelons que ce modèle extrait le comportement d'une cellule individuelle des données relatives à

l'ensemble de la population. La courbe présentée est donc relative à un état initial donné de la cellule. Il est normal qu'il y ait un écart entre la courbe expérimentale « moyenne » et celle issue de la modélisation.

- **Pour le CD25 :**

Les courbes de CD25 obtenues soit expérimentalement, soit avec les deux modélisations montrent des similitudes d'interprétation avec les courbes de CD69 décrites ci-dessus. La comparaison des données expérimentales avec la courbe du modèle de cytométrie montre une différence du niveau de l'expression du récepteur qui atteint la valeur de 3 500 en médiane de fluorescence pour l'expérience et 1 000 en intensité de fluorescence pour le modèle de cytométrie.

### **Conclusion :**

Dans ce paragraphe nous avons comparé le modèle d'activation avec les résultats expérimentaux (issus soit du logiciel du cytomètre ou de notre modèle d'exploitation) pendant les 6 premières heures d'activation. Comme nous l'avons cité précédemment certains paramètres du modèle complet d'activation reste difficile à comparer à l'expérience, suite soit à des difficultés de réalisation expérimentales ( $T^*i$ ) ou à la non disponibilité de techniques de quantification adaptées à la cytométrie qui permettent ainsi la traduction de la médiane de fluorescence en concentration surfacique utilisée fréquemment par notre modèle complet (CD69, CD25).

Ces difficultés peuvent être soulevées soit en utilisation des techniques expérimentales autres que la cytométrie, ou en adaptant le modèle aux unités de cytomètre.

Dans cette perspective, nous avons réalisé un deuxième modèle mathématique plus adapté aux données du cytomètre. Ainsi, lors de la comparaison des courbes simulées avec celles obtenues expérimentalement, nous avons constaté une grande similarité. Cette approche et les lois cinétiques correspondantes semblent être plus proches de la réalité. Toutefois, il n'est pas aussi complet que le modèle d'activation lymphocytaire de C. Bidot, car il ne permet pas de réaliser des prédictions sur d'autres paramètres clés de l'activation lymphocytaire.



**Quatrième partie :**  
**Conclusions et perspectives**



Le modèle mathématique développé par notre équipe récemment (Bidot *et al.* , 2008), n'est malheureusement pas encore achevé parce que plusieurs paramètres qui sont impliqués dans le processus d'activation doivent encore être déterminés avec précision. Toutefois, les premières confrontations des données calculées avec les données expérimentales obtenues à partir de la littérature (Grakoui *et al.* , 1999, Itoh *et al.* , 1999, Rosette *et al.* , 2001, Williams *et al.* , 1999) ont montré que ce modèle est réaliste.

Dans le but de compléter, corriger et valider notre modèle, nous nous sommes intéressés à l'étude détaillée du lymphocyte T sous différents aspects.

1-Dans un premier temps, nous avons étudié la variabilité de l'expression des CD3 membranaire et leur capacité d'activation chez l'homme. Nous avons abouti aux résultats suivants :

La diversité des lymphocytes T observée a une signification fonctionnelle. En effet :

-L'activation des TCR est accompagnée de leur internalisation ; d'autres complexes peuvent être recrutés de l'extérieur de la synapse à l'aide du transfert surfacique pour une meilleure activation. Ce transfert peut prendre du temps, la distance du transfert peut augmenter avec la taille des cellules. Le nombre initial de CD3 influe certainement sur la vitesse d'activation des LT.

-Cette hypothèse a été argumentée avec l'aide de notre modèle mathématique (Bidot *et al.* , 2008). Nous avons simulé l'activation en choisissant un ensemble de paramètres initiaux (peptide agoniste, la taille des cellules CD3 et les niveaux d'expression) qui sont proches des conditions de la pratique clinique. Ces simulations montrent que le nombre initial de CD3 disponibles influence l'activation avec le même ordre de grandeur que les différences observées avec les peptides agonistes et antagonistes.

-L'importance fonctionnelle du niveau initial de l'expression du CD3/TCR a été confirmée par l'activation des LT avec des APC artificielles induisant l'activation de toutes les LT indépendamment de leur structure ou de l'avidité de leur TCR pour le pCMH.

-Nous avons constaté que l'expression de CD3 est reliée à la taille des cellules mais la relation n'est pas linéaire. Nous avons aussi pu relier l'expression de CD3 à la densité surfacique, en utilisant le signal FSC du cytomètre qui est directement relié à la taille des cellules. Dans le modèle, nous avons utilisé une taille de cellule moyenne (rayon entre 5 et 6  $\mu\text{m}$ ), une densité initiale de CD3 (50 à 70 000 CD3 $\epsilon$  molécules correspondant à 25-35 000 complexes par cellule) et une vitesse surfacique constante tirée des données expérimentales publiées dans la littérature

(Favier *et al.* , 2001). En général, nos données théoriques et expérimentales ont prouvé que la variabilité de l'expression de CD3 a une signification fonctionnelle.

-Nous avons aussi vérifié expérimentalement l'effet des clonotypes et des sous populations des LT sur l'activation des LT. En effet, l'activation in vitro des LT a été maintes fois plus efficace sur les clonotypes avec un niveau d'expression de CD3 plus élevé et les CD4 (exprimant un niveau élevé de CD3) par rapport aux clonotypes avec un niveau d'expression de CD3 plus bas et les CD8 (exprimant un niveau bas de CD3). Cela confirme la signification fonctionnelle de la variabilité de l'expression de CD3.

2-Les études précédentes ont été réalisées chez l'homme, nous nous sommes par la suite intéressés à la souris suite à des facilités de manipulations, ainsi que la disponibilité de LT avec une grande spécificité pour le peptide HA (>97% des LT spécifiques). Nous avons réalisé des cinétiques d'activation :

-Dans un premier temps, nous avons quantifié l'absorption du peptide HA par DC, avant de les mettre en contact avec les lymphocytes T. Le dosage de peptide absorbé par HPLC-MS, a permis de déterminer la capacité d'absorption des DC, qui a été évaluée à  $2,56.10^{10}$  peptides/cellule pour  $10\mu\text{M}$  de peptide HA pendant les 5 premières minutes. Il faut noter qu'une analyse physique de ces résultats préliminaires a démontré leur non réalisme, ce qui nécessite une réévaluation de ces expériences.

-Lors de la mise en contact des DC chargées avec les LT, nous avons une activation des lymphocytes T qui se manifeste par l'expression du CD25 et CD69, et par une intériorisation du récepteur CD3. Nous avons pu calculer la vitesse d'intériorisation du CD3 : 0,2%/min pour  $2,5\mu\text{M}$  ; 0,22%/min pour  $5\mu\text{M}$  et 0,25%/min pour  $10\mu\text{M}$  pendant les 3 premières heures de stimulation. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par (Valitutti *et al.* , 1995) suite à des conditions expérimentales différentes.

-Nous avons remarqué que, dans nos conditions expérimentales, l'effet dose n'a pas été observé car les cellules dendritiques sont saturées en peptide.

-En plus de l'intériorisation des TCR, et de l'expression des récepteurs d'activation (CD69 et CD25), l'activation des LT se manifeste aussi par la sécrétion de l'IL-2. Nous n'avons pas pu en déduire la concentration réelle secrétée suite à l'utilisation d'une partie de l'IL-2 secrétée soit par les cellules elles-mêmes pour une boucle d'auto-amplification soit par les récepteurs CD25

soluble. Cependant la quantité dosée peut donner une idée qualitative de l'intensité de l'activation.

3- La confrontation de nos résultats expérimentaux avec le modèle mathématique, nous a permis d'effectuer plusieurs modifications du modèle afin qu'il soit plus proche de la réalité :

-Pour la correction de la courbe d'intériorisation de CD3, nous avons opéré au niveau de la constante d'intériorisation du TCR activé ( $K_{i1}$ ) et la constante de renouvellement du TCR à la surface du lymphocyte T ( $S_1$ ). Après réalisation des ajustements nous avons obtenu une superposition totale entre les courbes simulées et les expérimentales.

-Pour la courbe de sécrétion d'IL-2, nous avons réalisé une modification de la valeur au niveau du volume extérieur d'IL2 (volume moyen de solution dans lequel un LT secrète de l'IL2). En effet, ce volume dans le modèle de C.Bidot est très faible car les LT sont confinés dans les ganglions, alors que, dans nos conditions expérimentales, il est beaucoup plus grand (faible densité de LT dans les puits). Cette modification a permis d'avoir un ordre de grandeur de sécrétion similaire, mais malgré cela les courbes simulées restent différentes de celles obtenues expérimentalement. Afin d'obtenir une meilleur concordance, nous avons corrigé d'autres paramètres du modèle. Nous avons à la suite pu en déduire plusieurs paramètres manquants, tels que :  $K_{onIL2}$ ,  $k_{offIL2}$ ,  $K_{m2}$ ,  $K_{m3}$ ,  $K_{p2}$ ,  $K_{p3}$ ,  $K_{p3'}$ ,  $K_{e2}$  et  $K_{e4}$ .

-Certaines courbes simulées restent difficiles à comparer à celles obtenues expérimentalement comme le CD25 et le CD69. Ces derniers sont exprimés en concentration surfacique au niveau du modèle, alors qu'expérimentalement ils sont exprimés en médiane de fluorescence. La conversion de la médiane de fluorescence en concentration surfacique reste difficile à réaliser, puisque la médiane de fluorescence émise par les anticorps couplés aux récepteurs présents à la surface d'un lymphocyte T ne correspond pas à une quantité connue de récepteur. D'autres variables (comme par exemple l'IL-2 captée et intériorisée  $IL-2-IL-2R_M^{i*}$ ) ne peuvent pas être mesurées expérimentalement, car la réalisation de ces expériences reste difficile et fastidieuse.

4-Nos résultats expérimentaux sont exprimés en médiane de fluorescence. Cette approche présente un certain nombre d'inconvénients. Pour résoudre ce problème nous avons réalisé un modèle mathématique adapté à l'interprétation des données de cytométrie, afin de mieux interpréter les résultats obtenus et aussi d'extraire un maximum de données.

Le modèle permet la prédiction correcte des événements pendant les premières heures d'activation (les 6 premières heures), permettant ainsi de connaître :

-Le comportement des récepteurs membranaires suite à une stimulation antigénique

- La vitesse d'intériorisation du CD3
- La vitesse d'intériorisation du CD8
- La vitesse de croissance de CD25 et CD69.

Ces derniers pourront être utilisés pour corriger et valider le modèle d'activation lymphocytaire T. Cependant, les événements tardifs d'activation restent difficiles à modéliser, suite à l'obtention de courbes très éloignées de celles obtenues expérimentalement. Ceci peut être lié à l'existence d'un phénomène physique non pris en compte par la modélisation.

Ce travail de recherche n'a pas abouti à une correction parfaite du modèle d'activation, suite au manque de nombreux paramètres cinétiques, que nous n'avons pas pu déterminer expérimentalement. Toutefois, nous avons pu développer un nouveau modèle de traitement de résultats de cytométrie.

Afin de finaliser le modèle d'activation, les prochains efforts doivent porter sur :

- L'amélioration du modèle complet en prenant en compte tous les événements qui se passent au niveau de la synapse, en réalisant une compartimentation de cette zone. 3 zones peuvent être prises en compte en suivant l'exemple de Coombs et coll.(Coombs *et al.* , 2002) En effet cette compartimentation peut aider à affiner notre analyse des événements qui se déroulent dans la zone cruciale dans l'activation lymphocytaire T. ces 3 zones au lieu de 2 dans le modèle de C. Bidot seront :
  - o La zone centrale où se déroule l'intériorisation du CD3
  - o La zone de transition correspond à la zone de migration du complexe TCR/pCMH vers la zone centrale ; elle est composée principalement de taline, LFA.... Cette zone, négligée par notre modèle, s'avère jouer un rôle crucial dans l'induction de l'activation et par la suite la prolifération.
  - o Zone de périphérie ; représente la zone de stockage des TCR qui seront à priori utilisés pour la reconnaissance du complexe pCMH. Ces TCR seront dirigés vers la zone centrale par diffusion membranaire.
- Afin d'améliorer notre modèle, une prise en considération des phénomènes de « serial engagement » et « kinetic proofreading » est souhaitable. En effet, leur rôle semble très important dans l'activation lymphocytaire. Cependant, nous n'avons pas pour l'instant d'arguments expérimentaux pour les évaluer.
- la polarité du trafic membranaire semble être un facteur prépondérant dans l'activation lymphocytaire qui est déterminée par la polarisation des microtubules au centre de la synapse immunologique et par la polarité des récepteurs et leurs recyclages (Arkhipov & Maly. , 2006). Toutefois, dans notre modèle ce facteur a été négligé.

- Le nouveau modèle dédié au traitement des résultats de cytométrie, peut être amélioré par la prise en compte d'événements physiques qui se déroulent durant la période tardive d'activation. Dans l'optique d'une meilleure interprétation et modélisation de ces événements, une thèse de mathématiques a été proposée dans le projet du LPMG UMR 5148 CNRS sur la dynamique de populations complexes à l'école des mines de Saint-Étienne. Elle débutera en Octobre 2009.



# **Références bibliographiques**



- Abbas, A.K., Williams, M.E., Burstein, H.J., Chang, T.L., Bossu, P. & Lichtman, A.H. (1991) Activation and functions of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. *Immunological reviews* **123**, 5-22.
- Adachi, Y., Oyaizu, N., Than, S., McCloskey, T.W. & Pahwa, S. (1996) IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection: correlation with its ability to block culture-induced down-modulation of Bcl-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **157**, 4184-4193.
- Alam, S.M., Travers, P.J., Wung, J.L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S.C. & Gascoigne, N.R. (1996) T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* **381**, 616-620.
- Alarcon, B., Swamy, M., van Santen, H.M. & Schamel, W.W. (2006) T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. *EMBO reports* **7**, 490-495.
- Alarcon, B., Berkhout, B., Breitmeyer, J. & Terhorst, C. (1988) Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma.delta.epsilon core and single T cell receptor alpha or beta chains. *The Journal of biological chemistry* **263**, 2953-2961.
- Alcover, A. & Alarcon, B. (2000) Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Critical reviews in immunology* **20**, 325-346.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. & Mathis, D. (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N.Y.)* **298**, 1395-1401.
- Andres, P.G., Howland, K.C., Dresnek, D., Edmondson, S., Abbas, A.K. & Krummel, M.F. (2004) CD28 signals in the immature immunological synapse. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **172**, 5880-5886.
- Anton van der Merwe, P., Davis, S.J., Shaw, A.S. & Dustin, M.L. (2000) Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Seminars in immunology* **12**, 5-21.
- Arkhipov, S.N. & Maly, I.V. (2006) Quantitative analysis of the role of receptor recycling in T cell polarization. *Biophysical journal* **91**, 4306-4316.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. & Kourilsky, P. (1999) A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science (New York, N.Y.)* **286**, 958-961.
- Bachmann, M.F., Sebzda, E., Kundig, T.M., Shahinian, A., Speiser, D.E., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. (1996) T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *European journal of immunology* **26**, 2017-2022.
- Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D.E., Mak, T.W. & Ohashi, P.S. (1997) Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* **7**, 549-557.
- Badovinac, V.P. & Harty, J.T. (2000) Intracellular staining for TNF and IFN-gamma detects different frequencies of antigen-specific CD8(+) T cells. *Journal of immunological methods* **238**, 107-117.

- Badovinac, V.P., Porter, B.B. & Harty, J.T. (2004) CD8<sup>+</sup> T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature immunology* **5**, 809-817.
- Bajenoff, M., Breart, B., Huang, A.Y., Qi, H., Cazareth, J., Braud, V.M., Germain, R.N. & Glaichenhaus, N. (2006) Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *The Journal of experimental medicine* **203**, 619-631.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. & Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **18**, 767-811.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. & Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.
- Benjamini, E. (1996) *Immunology: A Short Course, 3rd edition, Wiley-Liss, New York.* .
- Benoist, C. & Mathis, D. (1989) Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* **58**, 1027-1033.
- Benvenuti, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Grandjean, I., Jancic, C., Hivroz, C., Trautmann, A., Lantz, O. & Amigorena, S. (2004) Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **172**, 292-301.
- Beresford, P.J., Zhang, D., Oh, D.Y., Fan, Z., Greer, E.L., Russo, M.L., Jaju, M. & Lieberman, J. (2001) Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *The Journal of biological chemistry* **276**, 43285-43293.
- Berg, L.J., Pullen, A.M., Fazekas de St Groth, B., Mathis, D., Benoist, C. & Davis, M.M. (1989) Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell* **58**, 1035-1046.
- Bettens, F., Kristensen, F., Walker, C., Schwulera, U., Bonnard, G.D. & de Weck, A.L. (1984) Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. II. Glucocorticoid and anti-Tac-induced inhibition of human T lymphocyte proliferation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **132**, 261-265.
- Bhardwaj, N., Young, J.W., Nisanian, A.J., Baggers, J. & Steinman, R.M. (1993) Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *The Journal of experimental medicine* **178**, 633-642.
- Bidot, C., Gruy, F., Haudin, C.S., El Hentati, F., Guy, B. & Lambert, C. (2008) Mathematical modeling of T-cell activation kinetic. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* **15**, 105-128.
- Bitmansour, A.D., Douek, D.C., Maino, V.C. & Picker, L.J. (2002) Direct ex vivo analysis of human CD4(+) memory T cell activation requirements at the single clonotype level. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **169**, 1207-1218.

- Blattman, J.N., Antia, R., Sourdive, D.J., Wang, X., Kaech, S.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D. & Ahmed, R. (2002) Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine* **195**, 657-664.
- Boniface, J.J., Rabinowitz, J.D., Wulfig, C., Hampl, J., Reich, Z., Altman, J.D., Kantor, R.M., Beeson, C., McConnell, H.M. & Davis, M.M. (1998) Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected. *Immunity* **9**, 459-466.
- Borisova, L.R. & Kuznetsov, V.A. (1997) A mathematical model of T lymphocyte proliferation controlled by interleukin-2 internalization. *Membrane & cell biology* **11**, 259-267.
- Borisova, L.R., Andreev, S.G. & Kuznetsov, V.A. (1998) Kinetics of T cell proliferation: a mathematical model and data analysis. *Membrane & cell biology* **12**, 111-119.
- Bouso, P. & Robey, E. (2003) Dynamics of CD8<sup>+</sup> T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nature immunology* **4**, 579-585.
- Bouso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S. & Robey, E. (2002) Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 1876-1880.
- Bretscher, P. (1992) The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunology today* **13**, 74-76.
- Brocker, T. (1997) Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **186**, 1223-1232.
- Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. & Dustin, M.L. (2001) The immunological synapse. *Annual Review of Immunology* **19**, 375-396.
- Burack, W.R., Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L. & Shaw, A.S. (2002) Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **169**, 2837-2841.
- Call, M.E. & Wucherpfennig, K.W. (2005) The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annual Review of Immunology* **23**, 101-125.
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. & Wucherpfennig, K.W. (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* **111**, 967-979.
- Carneiro, J., Coutinho, A., Faro, J. & Stewart, J. (1996) A model of the immune network with B-T cell co-operation. I--Prototypical structures and dynamics. *Journal of theoretical biology* **182**, 513-529.
- Carreno, L.J., Gonzalez, P.A. & Kalergis, A.M. (2006) Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. *Immunobiology* **211**, 47-64.
- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A.D., De Francesco, M.A., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A. & Turano, A. (1997) Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* **27**, 71-76.

- Casal, A., Sumen, C., Reddy, T.E., Alber, M.S. & Lee, P.P. (2005) Agent-based modeling of the context dependency in T cell recognition. *Journal of theoretical biology* **236**, 376-391.
- Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C. & Germain, R.N. (2006) Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8<sup>+</sup> T cells to sites of CD4<sup>+</sup> T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890-895.
- Cella, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current opinion in immunology* **9**, 10-16.
- Cemerski, S. & Shaw, A. (2006) Immune synapses in T-cell activation. *Current opinion in immunology* **18**, 298-304.
- Cerundolo, V., Elliott, T., Elvin, J., Bastin, J., Rammensee, H.G. & Townsend, A. (1991) The binding affinity and dissociation rates of peptides for class I major histocompatibility complex molecules. *European journal of immunology* **21**, 2069-2075.
- Chakraborty, A.K., Dustin, M.L. & Shaw, A.S. (2003) In silico models for cellular and molecular immunology: successes, promises and challenges. *Nature immunology* **4**, 933-936.
- Chen, C.Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z. & Karin, M. (1998) Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)* **280**, 1945-1949.
- Chothia, C., Boswell, D.R. & Lesk, A.M. (1988) The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *The EMBO journal* **7**, 3745-3755.
- Ciechanover, A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews.Molecular cell biology* **6**, 79-87.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. & Terhorst, C. (1988) The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annual Review of Immunology* **6**, 629-662.
- Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T. & Bottomly, K. (1995) Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1591-1596.
- Coombs, D., Kalergis, A.M., Nathenson, S.G., Wofsy, C. & Goldstein, B. (2002) Activated TCRs remain marked for internalization after dissociation from pMHC. *Nature immunology* **3**, 926-931.
- Cornet, A., Bettelli, E., Oukka, M., Cambouris, C., Avellana-Adalid, V., Kosmatopoulos, K. & Liblau, R.S. (2000) Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *Journal of neuroimmunology* **106**, 69-77.
- Corr, M., Slanetz, A.E., Boyd, L.F., Jelonek, M.T., Khilko, S., al-Ramadi, B.K., Kim, Y.S., Maher, S.E., Bothwell, A.L. & Margulies, D.H. (1994) T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science (New York, N.Y.)* **265**, 946-949.
- Coyle, A.J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J.A., Gosselin, M., Owen, L.R., Rudd, C.E. & Gutierrez-Ramos, J.C. (2000) The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* **13**, 95-105.

Cyster, J.G., Shotton, D.M. & Williams, A.F. (1991) The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *The EMBO journal* **10**, 893-902.

Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B. & Chien, Y. (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annual Review of Immunology* **16**, 523-544.

Davis, S.J. & van der Merwe, P.A. (2006) The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nature immunology* **7**, 803-809.

Delon, J., Kaibuchi, K. & Germain, R.N. (2001) Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* **15**, 691-701.

Delon, J., Gregoire, C., Malissen, B., Darche, S., Lemaitre, F., Kourilsky, P., Abastado, J.P. & Trautmann, A. (1998) CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity* **9**, 467-473.

Demotz, S., Grey, H.M. & Sette, A. (1990) The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science (New York, N.Y.)* **249**, 1028-1030.

Denkberg, G., Cohen, C.J. & Reiter, Y. (2001) Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **167**, 270-276.

Dietrich, J., Menne, C., Lauritsen, J.P., von Essen, M., Rasmussen, A.B., Odum, N. & Geisler, C. (2002) Ligand-induced TCR down-regulation is not dependent on constitutive TCR cycling. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **168**, 5434-5440.

Donnadieu, E., Bismuth, G. & Trautmann, A. (1994) Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Current biology : CB* **4**, 584-595.

D'Oro, U., Sakaguchi, K., Appella, E. & Ashwell, J.D. (1996) Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity. *Molecular and cellular biology* **16**, 4996-5003.

Dushek, O. & Coombs, D. (2008) Analysis of serial engagement and peptide-MHC transport in T cell receptor microclusters. *Biophysical journal* **94**, 3447-3460.

Dustin, M.L. & Shaw, A.S. (1999) Costimulation: building an immunological synapse. *Science (New York, N.Y.)* **283**, 649-650.

Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M. & Shaw, A.S. (1998) A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* **94**, 667-677.

Egen, J.G. & Allison, J.P. (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* **16**, 23-35.

Engelhard, V.H. (1994) Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Current opinion in immunology* **6**, 13-23.

- Faroudi, M., Utzny, C., Salio, M., Cerundolo, V., Guiraud, M., Muller, S. & Valitutti, S. (2003) Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 14145-14150.
- Favier, B., Burroughs, N.J., Wedderburn, L. & Valitutti, S. (2001) TCR dynamics on the surface of living T cells. *International immunology* **13**, 1525-1532.
- Feito, M.J., Ballester, S., Diez-Orejas, R., Ojeda, G., Criado, G., Portoles, P. & Rojo, J.M. (1997) CD4 dependence of activation threshold and TCR signalling in mouse T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* **45**, 166-174.
- Fernandez-Miguel, G., Alarcon, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E. & de la Hera, A. (1999) Multivalent structure of an alphabeta T cell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1547-1552.
- Figge, M.T. & Meyer-Hermann, M. (2006) Geometrically repatterned immunological synapses uncover formation mechanisms. *PLoS computational biology* **2**, e171.
- Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R. & Weiss, A. (1991) Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science (New York, N.Y.)* **251**, 313-316.
- Freiberg, B.A., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D.M. & Kupfer, A. (2002) Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nature immunology* **3**, 911-917.
- Friedl, P. & Brocker, E.B. (2002) TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunological reviews* **186**, 83-89.
- Friedl, P., den Boer, A.T. & Gunzer, M. (2005) Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature reviews.Immunology* **5**, 532-545.
- Furukawa, T., Itoh, M., Krueger, N.X., Streuli, M. & Saito, H. (1994) Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 zeta chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 10928-10932.
- Garboczi, D.N., Utz, U., Ghosh, P., Seth, A., Kim, J., VanTienhoven, E.A., Biddison, W.E. & Wiley, D.C. (1996) Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alphabeta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **157**, 5403-5410.
- Garcia, K.C., Scott, C.A., Brunmark, A., Carbone, F.R., Peterson, P.A., Wilson, I.A. & Teyton, L. (1996a) CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* **384**, 577-581.
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L. & Wilson, I.A. (1996b) An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science (New York, N.Y.)* **274**, 209-219.
- Garcia, K.C., Tallquist, M.D., Pease, L.R., Brunmark, A., Scott, C.A., Degano, M., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A. & Teyton, L. (1997) Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 13838-13843.

Geisler, C. (2004) TCR trafficking in resting and stimulated T cells. *Critical reviews in immunology* **24**, 67-86.

Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F. & Alarcon, B. (2002) Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* **109**, 901-912.

Gonzalez, P.A., Carreno, L.J., Coombs, D., Mora, J.E., Palmieri, E., Goldstein, B., Nathenson, S.G. & Kalergis, A.M. (2005) T cell receptor binding kinetics required for T cell activation depend on the density of cognate ligand on the antigen-presenting cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4824-4829.

Gouaillard, C., Huchenq-Champagne, A., Arnaud, J., Chen Cl, C.L. & Rubin, B. (2001) Evolution of T cell receptor (TCR) alpha beta heterodimer assembly with the CD3 complex. *European journal of immunology* **31**, 3798-3805.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. & Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227.

Gunzer, M., Weishaupt, C., Hillmer, A., Basoglu, Y., Friedl, P., Dittmar, K.E., Kolanus, W., Varga, G. & Grabbe, S. (2004) A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo. *Blood* **104**, 2801-2809.

Harriague, J. & Bismuth, G. (2002) Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nature immunology* **3**, 1090-1096.

Hemmer, B., Stefanova, I., Vergelli, M., Germain, R.N. & Martin, R. (1998) Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **160**, 5807-5814.

Henkart, M.P. & Henkart, P.A. (1982) Lymphocyte mediated cytolysis as a secretory phenomenon. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **146**, 227-247.

Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L. & Sherman, L.A. (2001) Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *The Journal of experimental medicine* **194**, 707-717.

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H. & Ley, T.J. (1994) Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**, 977-987.

Hlavacek, W.S., Redondo, A., Wofsy, C. & Goldstein, B. (2002) Kinetic proofreading in receptor-mediated transduction of cellular signals: receptor aggregation, partially activated receptors, and cytosolic messengers. *Bulletin of mathematical biology* **64**, 887-911.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. & Murphy, K.M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 547-549.

- Hudrisier, D., Kessler, B., Valitutti, S., Horvath, C., Cerottini, J.C. & Luescher, I.F. (1998) The efficiency of antigen recognition by CD8+ CTL clones is determined by the frequency of serial TCR engagement. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **161**, 553-562.
- Huppa, J.B. & Ploegh, H.L. (1997) In vitro translation and assembly of a complete T cell receptor-CD3 complex. *The Journal of experimental medicine* **186**, 393-403.
- Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C. & Davis, M.M. (2003) Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nature immunology* **4**, 749-755.
- Hutchinson, P., Divola, L.A. & Holdsworth, S.R. (1999) Mitogen-induced T-cell CD69 expression is a less sensitive measure of T-cell function than [(3)H]-thymidine uptake. *Cytometry* **38**, 244-249.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsaard, M. & Davis, M.M. (2002) Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* **419**, 845-849.
- Itoh, Y., Hemmer, B., Martin, R. & Germain, R.N. (1999) Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: relationship to the quality of individual TCR signaling events. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **162**, 2073-2080.
- Jordan, S. & Rodgers, W. (2003) T cell glycolipid-enriched membrane domains are constitutively assembled as membrane patches that translocate to immune synapses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **171**, 78-87.
- Jorgensen, J.L., Reay, P.A., Ehrlich, E.W. & Davis, M.M. (1992) Molecular components of T-cell recognition. *Annual Review of Immunology* **10**, 835-873.
- Kaech, S.M. & Ahmed, R. (2001) Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nature immunology* **2**, 415-422.
- Kalergis, A.M., Boucheron, N., Doucey, M.A., Palmieri, E., Goyarts, E.C., Vegh, Z., Luescher, I.F. & Nathenson, S.G. (2001) Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nature immunology* **2**, 229-234.
- Kappler, J., Kubo, R., Haskins, K., White, J. & Marrack, P. (1983) The mouse T cell receptor: comparison of MHC-restricted receptors on two T cell hybridomas. *Cell* **34**, 727-737.
- Kapsenberg, M.L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews.Immunology* **3**, 984-993.
- Kaye, J., Hsu, M.L., Sauron, M.E., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R. & Hedrick, S.M. (1989) Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* **341**, 746-749.
- Kedl, R.M., Schaefer, B.C., Kappler, J.W. & Marrack, P. (2002) T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. *Nature immunology* **3**, 27-32.
- Kim, H.J., Guo, D. & Sant'Angelo, D.B. (2005) Coevolution of TCR-MHC interactions: conserved MHC tertiary structure is not sufficient for interactions with the TCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 7263-7267.

- Kleijmeer, M.J., Ossevoort, M.A., van Veen, C.J., van Hellemond, J.J., Neefjes, J.J., Kast, W.M., Melief, C.J. & Geuze, H.J. (1995) MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **154**, 5715-5724.
- Kolumam, G.A., Thomas, S., Thompson, L.J., Sprent, J. & Murali-Krishna, K. (2005) Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of experimental medicine* **202**, 637-650.
- Krangel, M.S. (1987) Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *The Journal of experimental medicine* **165**, 1141-1159.
- Krogsgaard, M., Li, Q.J., Sumen, C., Huppa, J.B., Huse, M. & Davis, M.M. (2005) Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* **434**, 238-243.
- Krummel, M., Wulfig, C., Sumen, C. & Davis, M.M. (2000) Thirty-six views of T-cell recognition. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **355**, 1071-1076.
- Krummel, M.F. & Allison, J.P. (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *The Journal of experimental medicine* **183**, 2533-2540.
- Kubo, R.T. & Grey, H.M. (1976) Structure and function of beta2-microglobulin. *Contemporary topics in immunobiology* **5**, 267-295.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N. & Glimcher, L.H. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707-718.
- Kupfer, A. & Singer, S.J. (1989) The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose. *The Journal of experimental medicine* **170**, 1697-1713.
- Kupfer, A., Swain, S.L. & Singer, S.J. (1987) The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *The Journal of experimental medicine* **165**, 1565-1580.
- Kupfer, A., Swain, S.L., Janeway, C.A., Jr & Singer, S.J. (1986) The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 6080-6083.
- Labrecque, N., Whitfield, L.S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C. & Mathis, D. (2001) How much TCR does a T cell need? *Immunity* **15**, 71-82.
- Lambert, C., Cristina, I. & Christian, G. (2006) Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of a new flowcytometer. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* **70**, 29-38.

- Lanzavecchia, A., Lezzi, G. & Viola, A. (1999) From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* **96**, 1-4.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D. & Paul, W.E. (1990) Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine* **172**, 921-929.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M. & Shaw, A.S. (2002) T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science (New York, N.Y.)* **295**, 1539-1542.
- Lee, K.H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P.M., Dustin, M.L., Chakraborty, A.K. & Shaw, A.S. (2003a) The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 1218-1222.
- Lee, K.H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P.M., Dustin, M.L., Chakraborty, A.K. & Shaw, A.S. (2003b) The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 1218-1222.
- Lee, S.J., Hori, Y., Groves, J.T., Dustin, M.L. & Chakraborty, A.K. (2002a) Correlation of a dynamic model for immunological synapse formation with effector functions: two pathways to synapse formation. *Trends in immunology* **23**, 492-499.
- Lee, S.J.E., Hori, Y., Groves, J.T., Dustin, M.L. & Chakraborty, A.K. (2002b) The synapse assembly model. *Trends in immunology* **23**, 500-502.
- Leon, K., Perez, R., Lage, A. & Carneiro, J. (2001) Three-cell interactions in T cell-mediated suppression? A mathematical analysis of its quantitative implications. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**, 5356-5365.
- Leupin, O., Zaru, R., Laroche, T., Muller, S. & Valitutti, S. (2000) Exclusion of CD45 from the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. *Current biology : CB* **10**, 277-280.
- Li, Q.J., Dinner, A.R., Qi, S., Irvine, D.J., Huppa, J.B., Davis, M.M. & Chakraborty, A.K. (2004) CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse. *Nature immunology* **5**, 791-799.
- Liew, F.Y. (2002) T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature reviews.Immunology* **2**, 55-60.
- Lin, J. & Weiss, A. (2003) The tyrosine phosphatase CD148 is excluded from the immunologic synapse and down-regulates prolonged T cell signaling. *The Journal of cell biology* **162**, 673-682.
- Lindquist, R.L., Shakhar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M.L. & Nussenzweig, M.C. (2004) Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nature immunology* **5**, 1243-1250.
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D.L. & Vignali, D.A. (2000) On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* **13**, 665-675.

Liu, Y., Graham, C., Li, A., Fisher, R.J. & Shaw, S. (2002) Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor-kappaB induction. *The Biochemical journal* **361**, 255-265.

Liu, Y.J. (2001) Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.

Lord, G.M., Lechler, R.I. & George, A.J. (1999) A kinetic differentiation model for the action of altered TCR ligands. *Immunology today* **20**, 33-39.

Lowin, B., Peitsch, M.C. & Tschopp, J. (1995) Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Current topics in microbiology and immunology* **198**, 1-24.

Luster, A.D. (2002) The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology* **14**, 129-135.

Lyons, D.S., Lieberman, S.A., Hampl, J., Boniface, J.J., Chien, Y., Berg, L.J. & Davis, M.M. (1996) A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity* **5**, 53-61.

Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M. & O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **154**, 5071-5079.

Madrenas, J. (1999) Differential signalling by variant ligands of the T cell receptor and the kinetic model of T cell activation. *Life Sciences* **64**, 717-731.

Maino, V.C., Suni, M.A. & Ruitenberg, J.J. (1995) Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* **20**, 127-133.

Margulies, D.H. (1997) Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes: a quantitative basis for mechanistic models. *Current opinion in immunology* **9**, 390-395.

Marrack, P. & Kappler, J. (1997) Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. *Current opinion in immunology* **9**, 250-255.

Marrack, P.C. & Kappler, J.W. (1975) Antigen-specific and nonspecific mediators of T cell/B cell cooperation. I. Evidence for their production by different T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **114**, 1116-1125.

Matsui, K., Boniface, J.J., Steffner, P., Reay, P.A. & Davis, M.M. (1994) Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12862-12866.

Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., Schild, H., Fazekas de St Groth, B. & Davis, M.M. (1991) Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science (New York, N.Y.)* **254**, 1788-1791.

- Matthews, L. & Woolhouse, M. (2005) New approaches to quantifying the spread of infection. *Nature reviews.Microbiology* **3**, 529-536.
- Maxwell, J.R., Rossi, R.J., McSorley, S.J. & Vella, A.T. (2004) T cell clonal conditioning: a phase occurring early after antigen presentation but before clonal expansion is impacted by Toll-like receptor stimulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **172**, 248-259.
- McGavern, D.B., Christen, U. & Oldstone, M.B. (2002) Molecular anatomy of antigen-specific CD8(+) T cell engagement and synapse formation in vivo. *Nature immunology* **3**, 918-925.
- McKeithan, T.W. (1995) Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5042-5046.
- McNeil, L.K. & Evavold, B.D. (2003) TCR reserve: a novel principle of CD4 T cell activation by weak ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **170**, 1224-1230.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E. & Von Andrian, U.H. (2004) T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154-159.
- Mercado, R., Vijh, S., Allen, S.E., Kerksiek, K., Pilip, I.M. & Pamer, E.G. (2000) Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **165**, 6833-6839.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. & Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* **7**, 766-772.
- Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I. & Cahalan, M.D. (2004) Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* **200**, 847-856.
- Miller, M.J., Wei, S.H., Cahalan, M.D. & Parker, I. (2003) Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2604-2609.
- Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I. & Cahalan, M.D. (2002) Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 1869-1873.
- Miller, M.J., Hejazi, A.S., Wei, S.H., Cahalan, M.D. & Parker, I. (2004) T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 998-1003.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82-86.
- Morgan, D.J., Liblau, R., Scott, B., Fleck, S., McDevitt, H.O., Sarvetnick, N., Lo, D. & Sherman, L.A. (1996) CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **157**, 978-983.
- Moser, M. (2001) Dendritic cells and the control of the immune response. *Pathologie-biologie* **49**, 450-453.

- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **136**, 2348-2357.
- Muller, S., Demotz, S., Bulliard, C. & Valitutti, S. (1999) Kinetics and extent of protein tyrosine kinase activation in individual T cells upon antigenic stimulation. *Immunology* **97**, 287-293.
- Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J. & Ahmed, R. (1998) Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-187.
- Naramura, M., Jang, I.K., Kole, H., Huang, F., Haines, D. & Gu, H. (2002) c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nature immunology* **3**, 1192-1199.
- Nelson, D.L., Rubin, L.A., Kurman, C.C., Fritz, M.E. & Boutin, B. (1986) An analysis of the cellular requirements for the production of soluble interleukin-2 receptors in vitro. *Journal of clinical immunology* **6**, 114-120.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K. & Messaoudi, I. (2004) The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature reviews.Immunology* **4**, 123-132.
- Nuriya, S., Enomoto, S. & Azuma, M. (2001) The role of CTLA-4 in murine contact hypersensitivity. *The Journal of investigative dermatology* **116**, 764-768.
- Ostergaard, H.L., Kane, K.P., Mescher, M.F. & Clark, W.R. (1987) Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. *Nature* **330**, 71-72.
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M. & Lanzavecchia, A. (1993) Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science (New York, N.Y.)* **262**, 422-424.
- Page, D.M., Kane, L.P., Onami, T.M. & Hedrick, S.M. (1996) Cellular and biochemical requirements for thymocyte negative selection. *Seminars in immunology* **8**, 69-82.
- Pardigon, N., Bercovici, N., Calbo, S., Santos-Lima, E.C., Liblau, R., Kourilsky, P. & Abastado, J.P. (1998) Role of co-stimulation in CD8+ T cell activation. *International immunology* **10**, 619-630.
- Parish, C.R. (1972) The relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Transplantation reviews* **13**, 35-66.
- Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Rugiu, F.S., Piccinni, M.P., Maggi, E. & Romagnani, S. (1991) Cytokine production by allergen (Der pI)-specific CD4+ T cell clones derived from a patient with severe atopic disease. *International journal of clinical & laboratory research* **21**, 186-189.
- Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W. & Geuze, H.J. (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *The Journal of experimental medicine* **173**, 1099-1109.

- Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R.P. & Paul, W.E. (1989) Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* **339**, 64-67.
- Poncelet, P. & Carayon, P. (1985) Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods* **85**, 65-74.
- Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B. & Davis, M.M. (2004) T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nature immunology* **5**, 524-530.
- Qi, S.Y., Groves, J.T. & Chakraborty, A.K. (2001) Synaptic pattern formation during cellular recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6548-6553.
- Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Lyons, D.S., Davis, M.M. & McConnell, H.M. (1996) Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1401-1405.
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H.M. & Prabhakar, U. (2004) Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods* **293**, 127-142.
- Reichert, P., Reinhardt, R.L., Ingulli, E. & Jenkins, M.K. (2001) Cutting edge: in vivo identification of TCR redistribution and polarized IL-2 production by naive CD4 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**, 4278-4281.
- Reiser, H. & Schneeberger, E.E. (1996) Expression and function of B7-1 and B7-2 in hapten-induced contact sensitivity. *European journal of immunology* **26**, 880-885.
- Reiser, J.B., Gregoire, C., Darnault, C., Mosser, T., Guimezanes, A., Schmitt-Verhulst, A.M., Fontecilla-Camps, J.C., Mazza, G., Malissen, B. & Housset, D. (2002) A T cell receptor CDR3beta loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. *Immunity* **16**, 345-354.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B. & Trautmann, A. (2001) Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nature immunology* **2**, 925-931.
- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. & Liu, Y.J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science (New York, N.Y.)* **283**, 1183-1186.
- Risueno, R.M., Gil, D., Fernandez, E., Sanchez-Madrid, F. & Alarcon, B. (2005) Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood* **106**, 601-608.
- Rojo, J.M., Kerner, J.D. & Janeway, C.A., Jr. (1989) Selective induction of growth factor production and growth factor receptor expression by different signals to a single T cell. *European journal of immunology* **19**, 2061-2067.

- Rosette, C., Werlen, G., Daniels, M.A., Holman, P.O., Alam, S.M., Travers, P.J., Gascoigne, N.R., Palmer, E. & Jameson, S.C. (2001) The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: a revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* **15**, 59-70.
- Rubin, L.A., Kurman, C.C., Fritz, M.E., Biddison, W.E., Boutin, B., Yarchoan, R. & Nelson, D.L. (1985) Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **135**, 3172-3177.
- Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., al-Ramadi, B.K., Rothbard, J. & Janeway, C.A., Jr. (1992) Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* **359**, 429-431.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L. & Wilson, I.A. (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual Review of Immunology* **24**, 419-466.
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J. & von Boehmer, H. (1994) Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science (New York, N.Y.)* **266**, 1208-1212.
- Saito, T. & Yokosuka, T. (2006) Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Current opinion in immunology* **18**, 305-313.
- Saito, T. & Yamasaki, S. (2003) Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunological reviews* **192**, 143-160.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* **182**, 389-400.
- Samelson, L.E., Harford, J.B. & Klausner, R.D. (1985) Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* **43**, 223-231.
- Santamaria, P. (2003a) Kinetic evolution of a diabetogenic CD8<sup>+</sup> T cell response. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1005**, 88-97.
- Santamaria, P. (2003b) Effector lymphocytes in islet cell autoimmunity. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **4**, 271-280.
- Sant'Angelo, D.B., Waterbury, G., Preston-Hurlburt, P., Yoon, S.T., Medzhitov, R., Hong, S.C. & Janeway, C.A., Jr. (1996) The specificity and orientation of a TCR to its peptide-MHC class II ligands. *Immunity* **4**, 367-376.
- Savage, P.A., Boniface, J.J. & Davis, M.M. (1999) A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity* **10**, 485-492.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* **17**, 1675-1687.
- Schamel, W.W., Arechaga, I., Risueno, R.M., van Santen, H.M., Cabezas, P., Risco, C., Valpuesta, J.M. & Alarcon, B. (2005) Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *The Journal of experimental medicine* **202**, 493-503.

- Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X. & Lefrancois, L. (2002) Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **168**, 4827-4831.
- Schmitz, J., Thiel, A., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W., Assenmacher, M. & Radbruch, A. (1994) Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1349-1353.
- Schumacher, T.N. (2002) T-cell-receptor gene therapy. *Nature reviews.Immunology* **2**, 512-519.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F. & Ohashi, P.S. (1999) Selection of the T cell repertoire. *Annual Review of Immunology* **17**, 829-874.
- Seder, R.A., Paul, W.E., Ben-Sasson, S.Z., LeGros, G.S., Kagey-Sobotka, A., Finkelman, F.D., Pierce, J.H. & Plaut, M. (1991) Production of interleukin-4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells/basophils. *International archives of allergy and applied immunology* **94**, 137-140.
- Semyanov, K., Zharinov, A., Tarasov, P., Yurkin, M., Skribunov, I., van Bockstaele, D. & Maltsev, V. (2007) OPTICS OF LEUCOCYTES. *Optics of Biological Particles* **238**, .
- Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell, J.H. & Loh, D.Y. (1988) Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **335**, 271-274.
- Shahabuddin, S. (1991) Expression and release of IL-2 receptor and production of IL-2 by activated T lymphocyte subsets. *Journal of clinical & laboratory immunology* **36**, 27-32.
- Shedlock, D.J. & Shen, H. (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science (New York, N.Y.)* **300**, 337-339.
- Shortman, K. & Liu, Y.J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews.Immunology* **2**, 151-161.
- Sidorov, I.A. & Romanyukha, A.A. (1993) Mathematical modeling of T-cell proliferation. *Mathematical biosciences* **115**, 187-232.
- Sitar, G., Manenti, L., Farina, A., Lanati, V., Mascheretti, P., Forabosco, A., Montanari, L. & Ascari, E. (1997) Characterization of the biophysical properties of human erythroblasts as a preliminary step to the isolation of fetal erythroblasts from maternal peripheral blood for non invasive prenatal genetic investigation. *Haematologica* **82**, 5-10.
- Sloot, P.M., Hoekstra, A.G. & Figdor, C.G. (1988) Osmotic response of lymphocytes measured by means of forward light scattering: theoretical considerations. *Cytometry* **9**, 636-641.
- Sousa, J. & Carneiro, J. (2000) A mathematical analysis of TCR serial triggering and down-regulation. *European journal of immunology* **30**, 3219-3227.
- Steinman, R.M. & Swanson, J. (1995) The endocytic activity of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **182**, 283-288.

- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* **137**, 1142-1162.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M. & Germain, R.N. (2002) Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 1873-1876.
- Sun, J.C., Williams, M.A. & Bevan, M.J. (2004) CD4<sup>+</sup> T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8<sup>+</sup> T cells after acute infection. *Nature immunology* **5**, 927-933.
- Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M. & Trapani, J.A. (2003) Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* **18**, 319-329.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T.J. & Eisen, H.N. (1996) Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* **4**, 565-571.
- Symington, F.W., Brady, W. & Linsley, P.S. (1993) Expression and function of B7 on human epidermal Langerhans cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **150**, 1286-1295.
- Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J. & Dustin, M.L. (2006) Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* **203**, 505-511.
- Tanchot, C., Barber, D.L., Chiodetti, L. & Schwartz, R.H. (2001) Adaptive tolerance of CD4<sup>+</sup> T cells in vivo: multiple thresholds in response to a constant level of antigen presentation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **167**, 2030-2039.
- Tang, A., Judge, T.A., Nickoloff, B.J. & Turka, L.A. (1996) Suppression of murine allergic contact dermatitis by CTLA4Ig. Tolerance induction of Th2 responses requires additional blockade of CD40-ligand. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **157**, 117-125.
- Tang, Q. & Krummel, M.F. (2006) Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Current opinion in immunology* **18**, 496-502.
- Taniguchi, T. & Minami, Y. (1993) The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* **73**, 5-8.
- Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Bluthmann, H. & von Boehmer, H. (1988) Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* **335**, 229-233.
- Testi, R., Phillips, J.H. & Lanier, L.L. (1989) T cell activation via Leu-23 (CD69). *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **143**, 1123-1128.
- Trombetta, E.S. & Mellman, I. (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology* **23**, 975-1028.
- Utzny, C., Coombs, D., Muller, S. & Valitutti, S. (2006) Analysis of peptide/MHC-induced TCR downregulation: deciphering the triggering kinetics. *Cell biochemistry and biophysics* **46**, 101-111.

Valitutti, S. & Lanzavecchia, A. (1997) Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunology today* **18**, 299-304.

Valitutti, S., Muller, S., Salio, M. & Lanzavecchia, A. (1997) Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *The Journal of experimental medicine* **185**, 1859-1864.

Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. & Lanzavecchia, A. (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**, 148-151.

van der Merwe, P.A. (2002) Formation and function of the immunological synapse. *Current opinion in immunology* **14**, 293-298.

van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., Daenke, S., Linsley, P. & Davis, S.J. (1997) CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *The Journal of experimental medicine* **185**, 393-403.

van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E. & Schoenberger, S.P. (2001) Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nature immunology* **2**, 423-429.

Vella, A.T., Dow, S., Potter, T.A., Kappler, J. & Marrack, P. (1998) Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3810-3815.

Vermaelen, K. & Pauwels, R. (2005) Pulmonary dendritic cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* **172**, 530-551.

Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F., Tanaka, Y., Schoenberger, S. & Altman, A. (2001) Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *The Journal of cell biology* **155**, 331-338.

Villasenor, J., Benoist, C. & Mathis, D. (2005) AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunological reviews* **204**, 156-164.

Voisine, C., Hubert, F.X., Trinite, B., Heslan, M. & Josien, R. (2002) Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **169**, 2284-2291.

von Boehmer, H. & Fehling, H.J. (1997) Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annual Review of Immunology* **15**, 433-452.

Waldrop, S.L., Davis, K.A., Maino, V.C. & Picker, L.J. (1998) Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **161**, 5284-5295.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavioli, M. & Murphy, K.M. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**, 677-688.

Weber, S., Traunecker, A., Oliveri, F., Gerhard, W. & Karjalainen, K. (1992) Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* **356**, 793-796.

- Wei, X., Tromberg, B.J. & Cahalan, M.D. (1999) Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca(2+) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8471-8476.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.P., Lira, S.A. & Bravo, R. (1995) Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**, 331-340.
- Whitmire, J.K., Tan, J.T. & Whitton, J.L. (2005) Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1053-1059.
- Wigginton, J.E. & Kirschner, D. (2001) A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **166**, 1951-1967.
- Williams, C.B., Engle, D.L., Kersh, G.J., Michael White, J. & Allen, P.M. (1999) A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *The Journal of experimental medicine* **189**, 1531-1544.
- Wilson, N.S. & Villadangos, J.A. (2005) Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Advances in Immunology* **86**, 241-305.
- Wong, P., Barton, G.M., Forbush, K.A. & Rudensky, A.Y. (2001) Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *The Journal of experimental medicine* **193**, 1179-1187.
- Wu, Z., Johnson, K.W., Choi, Y. & Ciardelli, T.L. (1995) Ligand binding analysis of soluble interleukin-2 receptor complexes by surface plasmon resonance. *The Journal of biological chemistry* **270**, 16045-16051.
- Wulfing, C., Tskvitaria-Fuller, I., Burroughs, N., Sjaastad, M.D., Klem, J. & Schatzle, J.D. (2002) Interface accumulation of receptor/ligand couples in lymphocyte activation: methods, mechanisms, and significance. *Immunological reviews* **189**, 64-83.
- Wulfing, C., Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Sjaastad, M.D., McConnell, H.M. & Davis, M.M. (1997) Kinetics and extent of T cell activation as measured with the calcium signal. *The Journal of experimental medicine* **185**, 1815-1825.
- Yannelli, J.R., Sullivan, J.A., Mandell, G.L. & Engelhard, V.H. (1986) Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **136**, 377-382.
- Yoshimoto, T. & Paul, W.E. (1994) CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1285-1295.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D. & Ahmed, R. (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine* **188**, 2205-2213.



# **Annexe I**



## Modélisation par bilan de population

La modélisation sera guidée par quelques éléments qualitatifs d'interprétation.

Nous allons d'abord considérer la protéine CD3.

Il se trouve que, dans le cas particulier de CD3, une distribution bimodale apparaît nettement. Deux interprétations (de sophistication différente) sont possibles.

### Interprétation n°1 :

Les deux modes sont caractérisés par des valeurs de concentration ( $C_1$  et  $C_2$ ) ou des domaines de concentration disjoints ne changeant pas avec le temps. Par contre, les hauteurs relatives des pics évoluent avec le temps. On a, semble-t-il, transition d'un état 2 (forte concentration membranaire en CD3) à un état 1 (faible concentration membranaire en CD3).

On pourrait écrire :

$$\frac{dN_2}{dt} = -k_{\text{int}} N_2 \quad (1a)$$

$$\frac{dN_1}{dt} = k_{\text{int}} N_2 \quad (1b)$$

$N_1$  et  $N_2$  représentent les nombres de lymphocytes T caractérisés respectivement par les concentrations  $C_1$  et  $C_2$ .

### Interprétation n°2 :

On conserve la notion de pics. Mais, le pic 1, plus étalé, est décrit plus finement. L'enchaînement des phénomènes est le suivant :

- réaction  $T + L \rightarrow TL$

La vitesse de disparition des lymphocytes est telle que :

$$\frac{dN_T}{dt} = -k_{TCPA} N_T N_{CPA} \quad (2a)$$

- réaction  $TL \rightarrow TL^*$

La vitesse de transformation des TL ( $L=CPA$ ) est :

$$\frac{dN_{TL}}{dt} = k_{TCPA} N_T N_{CPA} - k_{TT^*} N_{TL} \quad (2b)$$

- réaction  $TL^* \rightarrow TLi^*$

On aurait pu écrire :

$$\frac{dN_{TL^*}}{dt} = -k_{\text{int}} N_{TL^*} \quad (2c)$$

Avec la relation de conservation des lymphocytes :

$$N_T + N_{TL} + N_{TL^*} + N_{TLi^*} = N_{T,0} \quad (2d)$$

et la relation de conservation des CPA :

$$N_{CPA} + N_{TL} + N_{TL^*} + N_{TLi^*} = N_{CPA0} \quad (2e)$$

D'où

$$N_{CPA} - N_T = N_{CPA,0} - N_{T,0} \quad (2f)$$

Mais l'écriture  $TL^* \rightarrow TLi^*$  suppose un état unique de cellule intériorisée. On peut faire mieux en considérant une multitude d'états d'intériorisation : ainsi, on définit la densité de population  $n$  en lymphocyte avec intériorisation :

$$dN_{TLi^*} = n(t, C_{CD3}) dC_{CD3} \quad (3)$$

$C_{CD3}$  est la concentration surfacique en CD3 lors de l'intériorisation des récepteurs (du lymphocyte).  $dN_{TLi^*}$  représente la concentration en (cellules)  $TLi^*$  dont la concentration en CD3 appartient à l'intervalle  $[C_{CD3}, C_{CD3} + dC_{CD3}]$ .

On remplace alors l'équation 2c par une EDP représentant un bilan de population :

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \frac{\partial(Gn)}{\partial C} = B\delta(C - C_0) \quad (4)$$

Cette écriture est empruntée au domaine de la cristallisation/précipitation, où on étudie l'évolution d'une population de cristaux ou de particules : La fonction recherchée est la densité de population ou distribution granulométrique. Les variables sont le temps et la taille (diamètre) des particules. En présence d'une sursaturation, les cristaux naissent par germination (germes de taille  $C_0$  apparaissant à la vitesse B), puis grossissent (à la vitesse G) et enfin s'agglomèrent entre eux quand ils ont atteint une taille suffisante (non représenté dans l'équation précédente). Dans notre cas (activation des lymphocytes), la particule est le lymphocyte et la taille d'une particule est remplacée par la concentration en CD3 à la surface d'un lymphocyte. On notera cette dernière  $C_{CD3} = C$ .

Le premier terme  $\frac{\partial n}{\partial t}$  est un terme d'accumulation. Le deuxième terme est un terme de « croissance »  $\frac{\partial(Gn)}{\partial C}$  qui contient la vitesse de croissance G, qui, dans notre contexte, est la loi d'intériorisation (à l'échelle d'un lymphocyte). Le troisième terme  $B\delta(C - C_0)$  est un terme de nucléation, qui, dans notre contexte, est la vitesse d'apparition de  $TL^*$ , ceux-ci ayant une concentration surfacique en CD3 notée  $C_0$  (c'est celle des lymphocytes avant activation).

Il convient maintenant de préciser les grandeurs G et B.

G est la vitesse d'intériorisation. Il s'agit de la grandeur principale recherchée. De façon générale, elle est telle que :

$$G = \frac{dC}{dt} = f(C) \quad (5)$$

B est la vitesse d'apparition de  $TL^*$  :

$$B = \frac{dN_{TL^*}}{dt} = k_{TT^*} N_{TL} \quad B > 0 \quad (6)$$

B et  $N_{TL}$  sont obtenues à partir de la résolution des équations 2a-2b. B est donc introduit dans le bilan de population comme une fonction du temps.

Remarque : la présence de la fonction de Dirac  $\delta$  complique un peu la résolution. On préfère alors transformer l'équation 4 en :

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \frac{\partial(Gn)}{\partial C} = 0 \quad (7a)$$

$$\text{avec } n(t, C_0) = -B/G(C_0) \quad (7b)$$

Ceci est obtenu en intégrant les deux membres de l'équation 4 par rapport à C entre  $C_0^-$  et  $C_0^+$ .

Ajoutons à cela les conditions initiales :

$$n(0, C) = 0 \quad C < C_0 \quad (7c)$$

**En résumé : nous avons à résoudre les équations 7a-c, sachant que B est donnée par 2a-2b et que plusieurs expressions seront proposées pour G.**

**\* Pic 2**

**Le pic 2 correspond à  $N_T + N_{TL}$ .**

**Remarque :** elle concerne les temps caractéristiques des phénomènes relatifs au contact entre cellules dendritiques et lymphocytes T. Le contact ou la collision peuvent être due au mouvement Brownien ou à la sédimentation différentielle.

le « réacteur » est un cylindre de diamètre 6,5mm contenant 0,2mL de suspension (soit une hauteur de liquide de 6mm). Sachant que la vitesse de sédimentation est comprise entre 3 et 6,3mm/h (Sitar et al., Haematologica 1997 ; 82 :5-10), toutes les cellules sont au fond du récipient en moins de 2h.

Le temps caractéristique de collision Brownienne (entre lymphocyte et cellule dendritique) est :  $\left( \frac{4kT}{3\mu} N_{CPA,0} \right)^{-1}$ , soit 12h (avec  $N_{CPA,0} = 410^6 \text{ \# / mL}$ ).

Le temps caractéristique de sédimentation différentielle est :  $\left( \frac{2\pi g \Delta \rho}{9\mu} 0,2d_{cell}^4 N_{CPA,0} \right)^{-1}$ , soit entre 0,05 et 0,1h.

On en déduit que le contact se fait en grande partie par sédimentation différentielle et dans une moindre mesure quand les cellules sont au fond du récipient. Compte tenu du nombre de cellules dans le récipient et la surface projetée d'une cellule, on s'attend à ce que le fond soit complètement tapissé de cellules et ceci sur 3 épaisseurs.

Il faut noter que le temps caractéristique (expérimental) total (contact + intériorisation) est inférieur à 4h.

**\* Pic 1**

Reprenons le système 7a-7c

La solution de l'équation 7a peut être obtenue mathématiquement. Nous la présenterons plutôt à partir d'arguments physiques.

Un lymphocyte donné (c'est-à-dire ayant un contenu en protéine  $C_0$ ) fait une rencontre déclenchant l'activation à l'instant  $t_0$ , l'origine des temps correspondant au mélange. L'intériorisation et la formation des protéines CD25 et CD69 commencent alors ; les cellules se comportent de façon autonome. Il suffit donc de suivre le « chemin » suivi par une cellule partant de l'état 0 ( $t_0, C_0$ ) jusqu'à l'état ( $t, C$ ).

$$G(C)n(t, C) = G(C_0)n(t_0, C_0) = G(C_0)n_0(t_0, C_0) = -B(t_0)$$

Avec

$$t - t_0 = \int_{C_0}^C \frac{dC}{G}$$

D'où

$$n(t, C) = - \frac{B \left( t + \int_c^{c_0} \frac{dC}{G(C)} \right)}{G} \quad (8)$$

Ceci est vrai pour CD3, mais aussi CD69 et CD25. D'ailleurs, quelque soit la nature de la protéine, on peut écrire :

$$C / C_0 = f(t - t_0)$$

Le comportement collectif ne se fait qu'au travers de la formation d'IL2 (qui passe en solution) et de sa liaison avec CD25. Il n'intervient donc qu'à la fin du processus.

Considérons maintenant le cas général, c'est-à-dire, une vitesse d'intériorisation  $G$ , une vitesse de mis en contact  $B$  et une distribution initiale  $D_L(C)$  en lymphocyte quelconque (et non plus  $\delta(C - C_0)$ ). Recherchons  $n(t, C)$ .

L'EDP à résoudre est :

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \frac{\partial(Gn)}{\partial C} = BD_L(C) \quad (9)$$

$$D_L(C) \text{ est normalisée : } \int_0^{\infty} D_L(C) dC = 1$$

L'écriture du terme source  $BD_L(C)$  mérite un commentaire : il est supposé que la distribution initiale (normalisée) en lymphocyte vierge (non activé) se conserve :

$$D_L(t, C) = D_L(0, C) = D_L(C)$$

En procédant de la même manière que précédemment et en partant de (peigne de Dirac) :

$$D_L(C) = \sum_{i=1}^M a_i \delta(C - C_i) \quad (10)$$

Les coefficients  $a_i$  représentent le poids de chaque fonction de Dirac.

On obtient :

$$n(t, C) = - \sum_{i=j+1}^M a_i \frac{B \left( t + \int_c^{c_i} \frac{dC}{G(C)} \right)}{G} \quad \text{pour } C_j < C < C_{j+1} \quad (11)$$

La forme continue de cette équation fait apparaître la fonction  $D_L(C)$  :

$$n(t, C) = - \int_{C_{\min}}^{C_{\max}} du D_L(u) \frac{B \left( t + \int_c^u \frac{dC}{G(C)} \right)}{G} \quad \text{pour } C < C_{\min} \quad (12a)$$

$$n(t, C) = - \int_C^{C_{\max}} du D_L(u) \frac{B \left( t + \int_C^u \frac{dC}{G(C)} \right)}{G} \quad \text{pour } C > C_{\min} \quad (12b)$$

$C_{\min}, C_{\max}$  sont les bornes de la fonction  $D_L(C)$ .

On en déduit facilement la distribution de lymphocytes ayant un contenu en récepteurs intériorisés (CD3) donné (on appellera  $C_i$  la variable interne relative à la concentration en récepteur intériorisé et  $\Gamma_i$  la même grandeur ramenée à la surface du lymphocyte). On a alors :

$$\begin{aligned} \Gamma_i + C &= C_0 && \text{pour une suspension monodisperse} \\ \text{ou } \Gamma_i + C &= u && \text{pour une suspension polydisperse} \end{aligned}$$

d'où :

$$n_i(t, \Gamma_i) = \int_{\Gamma_i}^{C_{\max}} du D_L(u) n(u - \Gamma_i) \quad (13)$$

Le cytomètre en flux nous fournit les distributions de lymphocytes par rapport à la concentration surfacique en CD69 et CD25. Nous calculerons celles-ci à partir d'un bilan de population similaire à celui établi pour le CD3. Cela suppose une « certaine » indépendance entre l'intériorisation des CD3 et la production de CD69 et CD25 (nous reviendrons plus tard sur cette hypothèse).

On appellera les concentrations en CD69 et CD25 respectivement  $C_1$  et  $C_2$ . Le bilan de population se traduit par l'équation (inspirée de 9) :

$$\frac{\partial n_j}{\partial t} + \frac{\partial (G_j n_j)}{\partial C_j} = B \delta(0) \quad j = 1, 2 \quad (14)$$

$$\text{Avec } n(0, C_j) = 0 \quad C_j < C_{\max, j}$$

$G_j$  est la vitesse (à l'échelle du lymphocyte) de production en CD69 et CD25. Cette vitesse est positive contrairement à la vitesse d'intériorisation. La solution de l'équation 14 est :

$$n_j(t, C_j) = \frac{B \left( t + \int_{C_j}^0 \frac{dC}{G_j(C)} \right)}{G_j} \quad (15)$$

Remarque : il y a cependant une difficulté importante, qui n'existait pas pour CD3. La vitesse d'intériorisation (de CD3) ne dépend que de la concentration en CD3, alors que les vitesses de production de CD69 ou CD25 ne dépendent pas uniquement des concentrations correspondantes, mais aussi d'autres. L'intégrale dans l'équation 15 cache donc un système d'équations différentielles ordinaires à résoudre dans le but de connaître la durée du processus à l'échelle d'une cellule pour avoir une concentration donnée en CD25 ou CD69 :

$$C_{69} / C_0 = f(t - t_0) \quad \text{ou} \quad C_{25} / C_0 = f(t - t_0)$$

**Remarque** : la modélisation doit être adaptée aux données expérimentales dont on dispose. Ainsi, seul un mécanisme simplifié est légitime :

- rencontre :  $L + T \rightarrow LT$  et activation  $T \rightarrow T^*$
- intériorisation  $T \rightarrow T^*i$
- formation des protéines membranaires CD69 et CD25 (plus tardivement)  $T^*i \rightarrow CD69$   
 $T^*i \rightarrow CD25$
- intériorisation de CD69 :  $CD69 \rightarrow CD69^*i$
- formation de IL2 (en solution) :  $CD69^*i \rightarrow IL2$
- formation du complexe :  $CD25 + IL2 \rightarrow CD25-IL2$  qui conduit à la prolifération

La technique consiste donc à calculer successivement :

- $n(t, C)$  (pour CD3)
- $n(t, \Gamma_i)$  (pour CD3 intériorisé)
- $n(t, C_j)$  (pour CD69 et CD25). Cependant, pour y parvenir, on doit résoudre le système d'EDO pour des conditions initiales variables  $(C_0, t_0)$ .

Boucle sur le temps

    Boucle sur  $C_0$

        Résolution du système d'EDO (mécanisme)

            Calcul de  $n(t, C)$  (pour CD3)

            Calcul de  $n(t, C)$  (pour CD69)

            Calcul de  $n(t, C)$  (pour CD25)

# **Annexe II**



# Mathematical Modeling of T-Cell Activation Kinetic

C. BIDOT, F. GRUY, C.-S. HAUDIN, F. EL HENTATI, B. GUY, and C. LAMBERT

## ABSTRACT

**T-cell activation is a crucial step in mounting of the immune response. The dynamics of T-cell receptor (TCR) specific recognition of peptide presented by major histocompatibility complex (MHC) molecule decides the fate of the T cell. Several biochemical interactions interfere resulting in a highly complex mechanism that would be difficult to understand without computer help. The aim of the present study was to define a mathematical model in order to approach the kinetics of monoclonal T-cell-specific activation. The reaction scheme was first described and the model was tested using experimental parameters from the published data. Simulations were concordant with experimental data showing proportional decrease of membrane TCR and production of interleukin-2 (IL-2). Agonist and antagonist peptides induce different levels of intracellular signal that could make the yes or no decision for entry to cell cycle. Different conditions (peptide concentrations, initial TCR density and exogenous IL-2 levels) can be tested. Several parameters are missing for parameters estimation and adjustment before it could be adapted for a polyclonal T-cell reaction model. However, the model should be of interest in setting experiments, simulation of clinical responses and optimization of preventive or therapeutic immunotherapy.**

**Key words:** activation, kinetics, mathematical model, ordinary differential equations, T cells.

## 1. INTRODUCTION

**T**-CELL ACTIVATION is a crucial mechanism in mounting of the immune response, acting at any stage from thymopoiesis (negative and positive) selection, differentiation, proliferation up to the final function of T cell, and long-term memory (Carneiro et al., 1996; Gronski et al., 2004; Lord et al., 1999; Sousa and Carneiro, 2000).

When the organism is exposed to a pathogen, the antigen presenting cell (APC) captures and processes the antigen for peptide presentation. The initiated APC acquires the capacity for migration to the local lymphoid tissue (Busch and Pamer, 1998; Miller et al., 2004), an environment that facilitate encounter with T cells. The T cell randomly scans APC peptide–major histocompatibility complex (p-MHC) with partial engagements until the relevant peptide is met (Miller et al., 2004). T-cell activation is initiated by T-cell receptor (TCR) recognition of the specific peptide presented by MHC molecule (p-MHC). The binding leads to T-cell activation at different levels and eventually ends in T-cell mitosis, clonal expansion and maturation. Mature cells acquire tools for immune protection.

The present study focused on the T-cell activation step from p-MHC recognition to signal accumulation for mitosis. Numerous studies have dissected its mechanism that appears more and more complex and difficult to predict. Briefly, the TCR-p-MHC interaction is very short and with highly variable affinity (Alam et al., 1999; Bachmann et al., 1996; Carreno et al., 2006; Harding, 1996; Kumar and Sercarz, 2001; Lanzavecchia et al., 1999; Madrenas, 1999; Manning and Kranz, 1999; Margulies, 1997; Salzman and Bachmann, 1998; Valitutti et al., 1995). A recent technology (plasmon surface resonance affinity measurement) has quantified the differential roles of association ( $k_{on}$ ) and dissociation ( $k_{off}$ ) kinetics (Corr et al., 1994; Grakoui et al., 1999; Lyons et al., 2006; Matsui et al., 1991). Because of this weakness, the binding has to be consolidated to be efficient. The binding is strengthened by a non specific co-binding of CD4 or CD8 on the MHC molecule with non variable affinity.

Beside TCR-p-MHC affinity, the signal level also depends on the number of activated TCR (Valitutti et al., 1995) and implicitly the number of specific peptides on the partner APC (Gonzalez et al., 2005; Kersh et al., 2001; Korb et al., 1999). Because the binding of TCR to P-MHC is very short and not all synchronous, the duration of close contact between the two cells is crucial for quantitative and qualitative T cell response (Kalergis et al., 2001; Langenkamp et al., 2000; Williams et al., 1999).

The close contact between the two cells is localized and get organized, inducing cell polarization and creating an intimate microenvironment called "immune synapse (IS)" with the help of adhesion molecules (e.g., LFA1, CD2) (Davis et al., 2003; Goldstein et al., 2000; Krummel et al., 2000; van der Merwe and Davis, 2003). Several consecutive synapses (Miller et al., 2004) or clusters inside the synapse (Figge and Meyer-Hermann, 2006; Lee et al., 2002b; Qi et al., 2001) may be constituted. The IS allow engagement of a great amount of TCR. Free TCR may be recruited from outside of the IS (Favier et al., 2001; Figge and Meyer-Hermann, 2006; Lee et al., 2002b; Qi et al., 2001). If the amount of relevant peptides is not sufficient on APC, several TCR can be engaged serially on the same p-MHC (Hudrisier et al., 1998; Itoh et al., 1999; Sousa and Carneiro, 2000; Valitutti et al., 1995; Wofsy et al., 2001). Moreover, the IS facilitates the activation process allowing the concentration of all different partners required for the signal transduction (kinases [Rachmilewitz and Lanzavecchia, 2002]) and excluding regulatory molecules such as CD45 phosphatase (Xu and Weiss, 2002).

TCR binding induces TCR internalization depending on the strength (Wei et al., 1999), duration (Schrum and Turka, 2002) of the binding and is used as marker of T-cell activation (D'Oro and Ashwell, 1999; Lord et al., 1999; Valitutti et al., 1995) and signal transduction in the cell through CD3 and TCR $\xi$  chains (D'Oro and Ashwell, 1999; Xu and Weiss, 2002). The TCR engagement induces transduction signal, a complex, multiple and redundant pathway, leading to production of tools required in the activation process and eventual cell division/maturation. Several steps are necessary and limiting but no quantitative variability has been evidenced so far. To get an efficient response, the amount of signal has to rise up to a threshold level (Lanzavecchia et al., 1999; Rachmilewitz and Lanzavecchia, 2002; Rosette et al., 2001; Wei et al., 1999).

The transduction signal is amplified with the help of accessory molecules. Part of accessory molecules is constitutively expressed on T cell membrane according to its maturity (CD28; CD40L; ICOSL) signal (Azuma et al., 1993; Bromley et al., 2001; Edmead et al., 1997; Kuiper et al., 1994; Ledbetter et al., 1990; Zhai et al., 2002). The respective ligands (CD80/CD87; CD40; ICOS) are expressed on the partner APC (Carreno and Collins, 2002; Linsley et al., 1994; van der Merwe et al., 1997). Other accessory systems (e.g., CD69; IL2-receptor) are induced by the initial TCR activation with autocrine (IL-2 family) or paracrine (CD69L) ligands (Bezouska et al., 1995; Cantrell et al., 1998; Fallon and Lauffenburger, 2000). IL2 binding to IL2-R induce receptor activation and internalization. It is usually admitted that the amount of IL2-R activated is the most significant step for decision of T cell cycling (Bettens et al., 1984; Cantrell et al., 1998).

Intriguingly, the response intensity is not linearly related to the kinetics of the TCR binding. Indeed, TCR recognition of peptides with close sequences could lead either to death, anergy or proliferation of T cells according to their avidity (Alam et al., 1999; Bachmann et al., 1996; Kersh et al., 2001; Lee et al., 2002a), the amount of peptides (Kersh et al., 2001; Korb et al., 1999), and the duration of binding (Kalergis et al., 2001; Langenkamp et al., 2000; Williams et al., 1999). The optimal response is limited to a window of signal intensity. An insufficient signal leads to prolonged unresponsiveness and an excessive activation induces T-cell suicide (apoptosis). This is not really explained so far. Several hypotheses have been proposed (Carreno et al., 2006): the "two signals" model (Acuto and Michel, 2003) considers that the

level of response is a result of the combination of TCR-p-MHC and accessory molecules interaction. The “proofreading” model (Coombs et al., 2002; Hlavacek et al., 2002; McKeithan, 1995; Rosette et al., 2001) considers that several steps of signal transduction have to be accomplished sequentially in order to reach a no return point threshold. The duration of the binding could also be limiting (“kinetic determination”) (Davis and van der Merwe, 2006; Lord et al., 1999; Rabinowitz et al., 1996) and the activation should end in a limited period of time (Bitmansour et al., 2002; Kalergis et al., 2001; Tanchot et al., 2001; Waldrop et al., 1998). These hypotheses are probably complementary but not sufficient.

We hypothesize that the kinetics of T-cell activation results from a combination of several biochemical interactions that end in a highly complex (chaotic) (McNeil and Evavold, 2003; Savage et al., 1999) not easily predictable without computer help. Previous studies have used mathematical assistance to test physiological hypotheses of T-cell activation (Kim et al., 2005; Krummel et al., 2000; Lord et al., 1999; Sousa and Carneiro, 2000) or to study the dynamics of the global population under non specific activation (Borisova and Kuznetsov, 1997; Borisova et al., 1998; Sidorov and Romanyukha, 1993). Systems of ordinary differential equations (ODE) were used. Cell interaction kinetics has also been studied with a mathematical approach (Carneiro et al., 1996; Leon et al., 2001) using thermodynamic rules (Rognan et al., 2000). One study has attempted to mimic the dynamics of a global (nonspecific) immune response using an experimental model of mycobacterium tuberculosis immunization (Wigginton and Kirschner, 2001). However, there is no attempt of predicting model for the complete specific T-cell activation that eventually leads to cell proliferation.

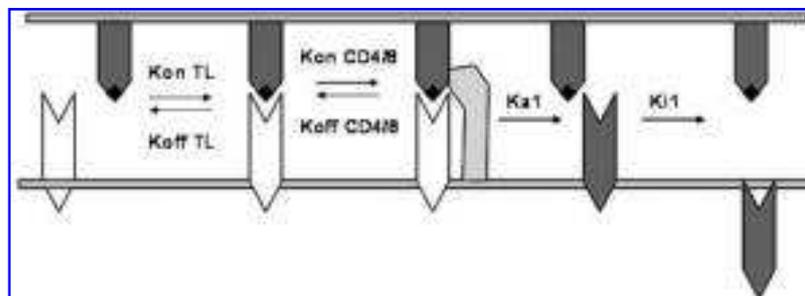
The aim of the present study was to define an ODE model in order to approach the kinetics of the specific activation at a single (monoclonal) T-cell level, from the peptide recognition to cell division, *in vivo*, in human. Because each step involves protein interaction, we used thermodynamic and kinetics rules to consider each major, limiting, steps. The model was tested using experimental parameters estimated from data reported in literature.

## 2. DETAILED PHYSIOLOGICAL AND KINETIC SCHEMES

The different physiological steps of T-cell activation were transformed into kinetics schemes on the basis of receptor-ligand interaction (Fig. 1), considering a one single T cell specific and a single relevant peptide MHC system. The definitions and names of the variables that were used are listed in Table 1. The kinetic parameters that are needed into the kinetic schemes are given in Table 2.

### *Antigen presentation*

Only approximately 0.1–0.3% of MHC molecules on one APC surface present the relevant peptide, resulting in 100–7500 peptide-MHC complex per cell (Harding, 1996). As few as 20–30 p-MHC are



**FIG. 1.** Antigen presentation. In immunological synapse, the antigen presenting cell (APC) shows peptide-MHC complex to the T cell. T-cell receptors (TCR) are triggered and internalized, others TCR come in front of peptide-MHC complex. Others proteins like CD28 and CD69 bind to their ligands on APC (CD80 and CD69L). By phosphorylation, signal goes to the T cell nucleus. The T cell produces cytokines (Interleukin-2) and receptors to these cytokines. These events lead to activation and clonal expansion of T cell.

TABLE 1. DEFINITION OF VARIABLES USED IN OUR ORDINARY DIFFERENTIAL EQUATION (ODE) SYSTEM<sup>1</sup>

<i>Who</i>	<i>What</i>	<i>Where</i>	<i>Unit</i>
$T$	T cell receptor standing in synapse	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
$S$	TCR standing outside the synapse	Outside synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
$TL$	TCR/p-MHC complexes	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
$TL^*$	TCR/p-MHC activated	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
$T^*$	TCR activated	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
$T^{*i}$	TCR activated internalized	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
CD28	CD28 proteins standing in synapse	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
CD28 <sub>hs</sub>	CD28 proteins standing outside the synapse	Outside synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
CD28 – CD80	CD28/CD80 complex	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
CD28*	CD28 activated	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
CD28* <sup>i</sup>	CD28 activated internalized	Inside T cell	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
CD69	CD69 protein on T cell	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
CD69 – CD69L	CD69/CD69L complex	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
CD69*	CD69 activated	Synapse area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
CD69* <sup>i</sup>	CD69 activated internalized	Inside T cell	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
IL2R <sub>M</sub>	Interleukin 2 membranous receptor	T cell area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
IL2R <sub>S</sub>	Interleukin 2 soluble receptor	Outside T cell	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
IL2	Interleukin 2	Outside T cell	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
IL2 – IL2R <sub>S</sub>	IL2/IL2R <sub>S</sub> complex	Outside T cell	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
IL2 – IL2R <sub>M</sub>	IL2/IL2R <sub>M</sub> complex	T cell area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
IL2 – IL2R <sub>M</sub> *	IL2/IL2R <sub>M</sub> complex activated	T cell area	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$
IL2 – IL2R <sub>M</sub> * <sup>i</sup>	IL2/IL2R <sub>M</sub> complex activated internalized	Inside T cell	$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$

<sup>1</sup>The variables represent, where they are located with regard to the T cell, and the result unit are given.

required for an efficient CD8<sup>+</sup> T-cell activation and probably more (50–500) for CD4<sup>+</sup> T-cell activation (Demotz et al., 1990; Harding, 1996; Irvine et al., 2002; Valitutti et al., 1995).

### Specific recognition and fate of engaged TCR

T-cell receptor ( $T$ ) binding to a p-MHC ( $L$ ) with sufficient affinity ( $K_1$ ) initiate the recognition process (Salzmann and Bachmann, 1998; Wang et al., 2002).



The immune synapse concerns about 10–20% of the T cell surface ( $\lambda$  [Grakoui et al., 1999; Sousa and Carneiro, 2000]), introducing a two-compartment dynamics. TCR are numerous on T-cell surface (Wei et al., 1999) but only TCR inside the synapse ( $T$ ) are available for p-MHC binding. TCRs from outside ( $S$ ) move toward the synapse at linear speed of 0.12  $\mu\text{m}/\text{sec}$  and could speed up to 0.15  $\mu\text{m}/\text{sec}$  under activation (Favier et al., 2001; Figge and Meyer-Hermann, 2006; Wei et al., 1999).

The TCR motion can be modeled as a mass transfer process. Thus, we introduced a transfer coefficient (terms  $\varphi$ ) that can be linked to the TCR velocity or diffusivity. The flux of TCR toward the synapse is written  $\Phi = \varphi([S] - [T])$  (terms:  $\varphi[S] - [T]$  in Eqs. (1) and (2)).

TCR-p-MHC interaction is very faint (half life = 25–40 sec [Corr et al., 1994; Matsui et al., 1991; Salzmann and Bachmann, 1998; Wang et al., 2002]) partly because the association rate is very low ( $k_{\text{on}}$  2  $10^5$  to  $10^7/\text{M}/\text{sec}$ ) and the dissociation rate very high ( $k_{\text{off}}$  2–3  $10^{-2}/\text{sec}$  [Alam et al., 1999; Corr et al., 1994; Krummel et al., 2000; McKeithan, 1995]). CD4 or CD8 co-receptor are required to stabilize the binding (Arcaro et al., 2001; Denkberg et al., 2001; Garcia et al., 1997; Kerry et al., 2003; Krummel et al., 2000; Moldovan et al., 2002; Purbhoo et al., 2001; Renard et al., 1996) and facilitate the T-cell activation (Feito et al., 1997; Luescher et al., 1995; Vignali, 1994). The consolidated ligand recognition

TABLE 2. DEFINITION OF KINETIC PARAMETERS USED IN THE MODEL

Parameter symbol	Definition, unit	Typical range	References
$\varphi$	Exchange rate ( $s^{-1}$ ) TCR and CD28	$0.0055 \text{ mn}^{-1} \approx 9.16 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	Sousa and Carneiro (2000)
$\lambda$	Ratio between the areas of the interface over the spare pool	[0.25; 0.43]	Estimation: synapse area $\approx$ 20–30% of T cell surface
CD4/8	CD4 or CD8 protein on T cell synapse area ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ )	CD4: 40,000 molecules per cell CD8: 60,000–90,000 molecules per cell	
CD69L	CD69 ligand on APC synapse area ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ )		
CD80	CD28 ligand on APC, named B7 synapse area ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ )	$[5 \cdot 10^4; 10^5]$ molecules per cell	Acuto and Michel (2003)
$k_1$	TCR production amplified ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$60 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k_1^v = \frac{\text{Synapse area}}{\text{T cell bulk}} k_1$
$k_2$	TCR production amplified ( $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$= k_1$	$k_2^v = \frac{\text{Outside synapse area}}{\text{T cell bulk}} k_2$
$k_{a1}$	TCR activation ( $s^{-1}$ )	$= k_{off \text{ TL}}$	Rabinowitz et al. (1996)
$k_{d1}$	$T^*i$ dissipation ( $s^{-1}$ )	$10^{-3} \text{ s}^{-1}$	
$k_{d2}$	CD28 $^*i$ dissipation ( $s^{-1}$ )	$= k_{d1}$	
$k_{d3}$	CD69 $^*i$ dissipation ( $s^{-1}$ )	$= k_{d1}$	
$k_{d4}$	IL2 – IL2R $^*i_M$ dissipation ( $s^{-1}$ )	$= k_{d1}$	
$k_{e1}$	CD69 dissipation ( $s^{-1}$ )	$10^{-3} \text{ s}^{-1}$	
$k_{e2}$	IL2R $_M$ dissipation ( $s^{-1}$ )	$= k_{e1}$	
$k_{e3}$	IL2R $_S$ dissipation ( $s^{-1}$ )	$= k_{d3}$	
$k_{e4}$	IL2 dissipation ( $s^{-1}$ )	$= k_{e3}$	
$k_{e5}$	IL2 – IL2R $_S$ dissipation ( $s^{-1}$ )	$= k_{e3}$	
$k_{f2}$	CD28 $^*$ formation ( $s^{-1}$ )	$0.01 \text{ s}^{-1}$	
$k_{f3}$	CD69 $^*$ formation ( $s^{-1}$ )	$0.015 \text{ s}^{-1}$	
$k_{f4}$	IL2 – IL2 $^*R_M$ formation ( $s^{-1}$ )	$0.015 \text{ s}^{-1}$	
$k_{f5}$	IL2R $_S$ formation ( $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$150 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$k_{f5}^e = \frac{\text{T cell area}}{\text{Outside T cell bulk}} k_{f5}$ $k_{f5}^v = \frac{\text{T cell area}}{\text{T cell bulk}} k_{f5}$
$k_{i1}$	TCR internalization ( $s^{-1}$ )	$0.094 \text{ mn}^{-1} \approx 1.56 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	Sousa and Carneiro (2000), Dietrich et al. (2002)
		$0.012 \text{ mn}^{-1}$	$k_{i1}^v = \frac{\text{Synapse area}}{\text{T cell bulk}} k_{i1}$
$k_{i2}$	CD28 $^*$ internalization ( $s^{-1}$ )	$= k_{i1}$	$k_{i2}^v = \frac{\text{Synapse area}}{\text{T cell bulk}} k_{i2}$
$k_{i3}$	CD69 $^*$ internalization ( $s^{-1}$ )	$= k_{i1}$	$k_{i3}^v = \frac{\text{Synapse area}}{\text{T cell bulk}} k_{i3}$
$k_{i4}$	IL2 – IL2R $^*_M$ internalization ( $s^{-1}$ )	$= k_{i1}$	$k_{i4}^v = \frac{\text{T cell area}}{\text{T cell bulk}} k_{i4}$
$k_{m1}$	CD69 production ( $s^{-1}$ )	$10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$k_{m1}^s = \frac{\text{T cell bulk}}{\text{Synapse area}} k_{m1}$
$k_{m2}$	IL2R $_M$ production ( $s^{-1}$ )	$10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$k_{m2}^s = \frac{\text{T cell bulk}}{\text{T cell area}} k_{m2}$
$k_{m3}$	IL2 production ( $s^{-1}$ )	$10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$k_{m3}^e = \frac{\text{T cell bulk}}{\text{Outside T cell bulk}} k_{m3}$
$k_{off \text{ CD28}}$	Dissociation rate: CD28 with CD80 ( $s^{-1}$ )	$1.6 \text{ s}^{-1}$	van der Merwe (1997)

(continued)

TABLE 2. (Continued)

Parameter symbol	Definition, unit	Typical range	References
$k_{off\ CD4/8}$	Dissociation rate: CD4 (or CD8) with MHC ( $s^{-1}$ )	CD4:CD8 [0.05; 18]	Krummel et al. (2000)
$k_{off\ CD69}$	Dissociation rate: CD69 with CD69L ( $s^{-1}$ )	0.01 $s^{-1}$	
$k_{off\ IL2m}$	Dissociation rate: IL2 with receptors ( $s^{-1}$ )	0.035 $s^{-1}$	Wu et al. (1995) $k_{off\ IL2m}^e = \frac{\text{T cell area}}{\text{Outside T cell bulk}} k_{off\ IL2m}$
$k_{off\ IL2s}$	Dissociation rate: IL2 with receptors ( $s^{-1}$ )	0.035 $s^{-1}$	Wu et al. (1995)
$k_{off\ TL}$	Dissociation rate: TCR with peptide-MHC ( $s^{-1}$ )	[0.01; 5] $s^{-1}$	Krummel et al. (2000), Grakoui et al. (1999)
$k_{on\ CD28}$	Association rate: CD28 with CD80 ( $m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	6.6e5 $M^{-1} \cdot s^{-1}$	van der Merwe (1997)
$k_{on\ CD4/8}$	Association rate: CD4 (or CD8) with MHC ( $m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	CD4:CD8 [1200; 10 <sup>5</sup> ] $M^{-1} \cdot s^{-1}$	Krummel et al. (2000)
$k_{on\ CD69}$	Association rate: CD69 with CD69L ( $m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	7e3 $M^{-1} \cdot s^{-1}$	
$k_{on\ IL2m}$	Association rate: IL2 with receptors ( $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	1.06e6 $M^{-1} \cdot s^{-1}$	Wu et al. (1995) $k_{on\ IL2m}^e = \frac{\text{T cell area}}{\text{Outside T cell bulk}} k_{on\ IL2m}$
$k_{on\ IL2s}$	Association rate: IL2 with receptors ( $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	1.06e6 $M^{-1} \cdot s^{-1}$	Wu et al. (1995)
$k_{on\ TL}$	Association rate: TCR with peptide-MHC ( $m^2 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	[850; 25e3] $M^{-1} \cdot s^{-1}$	Krummel et al. (2000), Grakoui et al. (1999)
$k_{p'1}$	CD69 production amplified ( $m \cdot s^{-1}$ )	5e-10 $m \cdot s^{-1}$	$k_{p'1}^v = \frac{\text{Synapse area}}{\text{T cell bulk}} k_{p'1}$
$k_{p'2}$	IL2R <sub>M</sub> production amplified ( $m \cdot s^{-1}$ )	5e-10 $m \cdot s^{-1}$	$k_{p'2}^v = \frac{\text{T cell area}}{\text{T cell bulk}} k_{p'2}$
$k_{p'3}$	IL2 production amplified ( $s^{-1}$ )	5e-4 $s^{-1}$	$k_{p'3}^v = \frac{\text{Outside T cell bulk}}{\text{T cell bulk}} k_{p'3}$
$k_{p1}$	CD69 production with CD28 ( $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	760 $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	$k_{p1}^s = \frac{\text{T cell bulk}}{\text{Synapse area}} k_{p1}$
$k_{p2}$	IL2R <sub>M</sub> production with CD28 ( $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )	940 $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$	$k_{p2}^s = \frac{\text{T cell bulk}}{\text{T cell area}} k_{p2}$
$k_{p3}$	IL2 production ( $s^{-1}$ )	0.019 $s^{-1}$	$k_{p3}^e = \frac{\text{T cell bulk}}{\text{Outside T cell bulk}} k_{p3}$
$L$	Peptide-MHC complexes, on APC synapse area ( $mol \cdot m^{-2}$ )	Depends on APC	
$s$	TCR exocytic rate ( $s^{-1}$ )	0.0011 $mn^{-1} \approx 1.83 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ 10 <sup>-4</sup> $s^{-1}$	Sousa and Carneiro (2000)
$s'$	CD28 exocytic rate ( $s^{-1}$ )	0 $s^{-1}$	Memory cells bear no CD28
$S_{max}$	Maximum TCR outside synapse ( $mol \cdot m^{-2}$ )	$S_{max} + T_{max}$ : 20,000–40,000 molecules per cell	
$T_{max}$	Maximum TCR in synapse ( $mol \cdot m^{-2}$ )		

Data values are listed when available from experimental data in the literature. Some experimental data are extrapolated from mouse experiments.

induces physical changes of the TCR (K2).



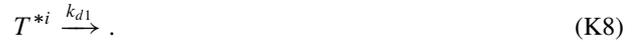
The complex dissociates (K3) and the activated TCR is internalized (K4) (Alam et al., 1999; Coombs et al., 2002; Valitutti et al., 1995; Xu and Weiss, 2002).



The schema of the T-cell engagement is resumed in Figure 1. The dynamics of transduction steps is common to all types of peptides and was considered as not kinetically determining for the quality of T-cell activation. T-cell activation results in the production of new receptors CD69 (K5) and IL-2 receptor (K6). The IL-2 receptor is an hetero-trimer composed of chains alpha, beta, and gamma. The alpha chain is a widely used marker of T-cell activation (CD25). Later on, activated T cell produces IL-2 as a soluble factor (K7).



Finally, the modified receptor internalized is eliminated (K8).

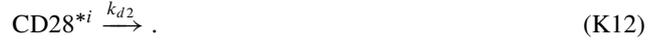
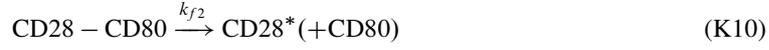


As a result, membrane TCRs (and associated CD3) progressively decrease. The extent of TCR internalization depends of the strength (Wei et al., 1999) and duration (Schrum and Turka, 2002) of specific engagement and has been used as a marker for modeling T-cell activation (Sousa and Carneiro, 2000). In fact, membrane TCR are continuously recycling with an internalization rate at 1.4% (primary T cells) to 2.3% (hybridoma) of molecule/min. A complete turnover has been estimated at 1 h (Liu et al., 2000). The cytoplasmic pool is estimated at 29% (Liu et al., 2000). Under activation, the turnover rate is not modified by TCR engagement but activated TCR are excluded from recycling, independently of the constitutive cycling (Dietrich et al., 2002) leading to a decay of the membrane TCR-CD3 complex (Liu et al., 2000; Valitutti et al., 1995). A small fraction of TCR is spontaneously eliminated and replaced by newly synthesized molecules. We assume this happen evenly in both compartments. The baseline replacement is at constant rate resulting in a steady state. Activation induces a raise of replacement rate (terms  $s(T_{max} - [T])$  and  $s(S_{max} - [S])$  in Eqs. (1) and (2)) in accordance with Sousa and Carneiro (2000).

#### *Co-activation molecules, amplification system*

Accessory molecules (i.e., CD28/CTLA4) enhance the TCR signal (Azuma et al., 1993; Carreno and Collins, 2002; Edmead et al., 1997; Kuiper et al., 1994; Ledbetter et al., 1990), independently of IL-2 signal (Boulougouris et al., 1999) by linking their own ligand on APC (CD80 or CD87) (Linsley et al., 1994) with known affinities (van der Merwe et al., 1997). A reaction scheme similar to TCR engagement was used. CD28 in the synapse might be engaged (K9), activated (K10), internalized (K11), and consumed (K12) in the same way as TCR. Similarly to other systems although not documented, we considered that a part is replaced by CD28 from outside the synapse (CD28<sub>hs</sub>) and CD28 self-renewal ( $s'$ ). In absence of documented data, we considered that other possible accessory molecules have the same kinetic parameters

and considered all together.



CD28 engagement with TCR activation enhanced production of CD69 (K13) and IL-2R (K14).



Newly expressed CD69 has the capacity to bind to membrane oligosaccharides largely expressed on different cells (Anderson and Gorski, 2005; Bezouska et al., 1995). Similarly, CD69 binds its ligand (K15), is activated, released (K16), and internalized (K17), and eventually degraded (K18).



CD69 activation is a required step in T-cell activation (D'Ambrosio et al., 1993; Mardiney et al., 1996; Marzio et al., 1999) and IL-2 production (K19). We considered that the activated CD69 is then eliminated (K20).



### Role of IL2

Similarly, the newly produced IL-2 binds (K21) to its newly expressed receptor (IL2R<sub>M</sub>) on the T-cell membrane. The receptor is activated (K22) and subsequently internalized ((K23) [Smith, 1989]).



However, under IL-2 activation, part of the membrane IL-2R is enzymatically released in the environment (K24). The soluble receptor (IL2R<sub>S</sub>) diffuses in the environment and partly enters in competition to the

membrane one for IL-2 binding (K25).



It should be noticed that we considered CD69 and  $\text{IL2R}_M$  as evenly distributed on the T-cell surface (and were expressed as mol/surface) while IL-2 and  $\text{IL2R}_S$  were diffused in T-cell microenvironment and were expressed as mol/volume. Only a fraction of it is available to the cell. Considering *in vivo* T-cell reaction, in lymph node promiscuity, the volume of diffusion was estimated at approximately one cell volume. Conversely, a polarization of secretion can be envisaged with smaller diffusion volumes.

Finally,  $\text{IL2R}_S$ ,  $\text{IL2R}_M$ , IL-2, and  $\text{IL2-IL2R}_S$  are naturally degraded (K26)–(K29).



In the natural environment, exogenous IL-2 or  $\text{IL2R}$  produced by close cells or experimentally added can interfere. The initial amount of IL-2 would be different from null. Dynamic changes of exogenous IL-2 can be considered by the model (not shown). Other Interleukins, related to IL-2, have been described since but with similar effect. Because of redundancy, IL-2 only was considered but as a generic factor for all related cytokines produced.

The level of  $\text{IL2R}_M$  internalization was considered as the critical step for triggering T-cell activation and proliferation in accordance with others (Borisova and Kuznetsov, 1997; Borisova et al., 1998; Cantrell et al., 1998; Sidorov and Romanyukha, 1993). This leads to an amplification loop on CD69 (K30),  $\text{IL2R}_M$  (K31), IL-2 (K32), and TCR (K33, K34) production.



If a signal threshold is reached, the cell passes the check point, enters cell cycle and divides and acquires new functions. Otherwise, the cell can either come back gradually to a resting state or die. The threshold must be achieved within a limited period of time (Bitmansour et al., 2002; Tanchot et al., 2001; Waldrop et al., 1998) while internalized  $\text{IL2-IL2R}_M$  is progressively degraded (K35):



### Parameters determination

Numerical values for the parameters were chosen from the literature when available (Table 2). Some have been evaluated in animal models giving a probable range for human data. Missing parameters were

arbitrarily defined in reasonable ranges. Some could be defined in experiments to be designed. Others will be estimated using parameter determination methods.

Affinity constants of peptides with different T cell effects (from anergy to stimulation) have been chosen from the literature (Corr et al., 1994; Grakoui et al., 1999; Matsui et al., 1991). Mean values of published CD8 and CD28 affinity constants have been calculated (Krummel et al., 2000). We chose to use the international units (meters, seconds, moles) and molecules were expressed in absolute values: concentrations = moles per surface ( $\text{mol}/\text{m}^2$ ) or per volume ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ). Molecular surface speed rates were expressed as m/sec.

Membrane TCR internalization rate has been evaluated at 1.4% of molecule/min on primary T cells (Liu et al., 2000).

The initial parameters and constant values were estimated according to experimental values from the literature (Table 2). The T cell volume was estimated at a radius of  $3.5 \mu\text{m}$ , with membrane receptor density at 30,000 TCR/cell ( $300/\mu\text{m}^2$ ) and 1500 CD28/cell, and the synapse area covering 20% of the surface (Labrecque et al., 2001; Wei et al., 1999).

The complex p-MHC is exposed for a sufficient period of time (Hwang et al., 2000; Langenkamp et al., 2000) and its concentration was considered as constant regarding to the duration of T cell contact that has been estimated at 15–60 min (Faroudi et al., 2003; Harding, 1996; Lee et al., 2002b, 2003; Qi et al., 2001).

### *Mathematical programming and numerical methods*

A Matlab solver was used to integrate the system of ordinary differential equations. ODE15s is a variable order solver based on the numerical differentiation formulas. Numerical experiments started at time 0, and stop time was set at 5 h. Variables values were calculated at periodic time points.

## 3. RESULTS

### *Numerical experiments*

We have tested the model on a naive  $\text{CD8}^+$  T cell MHC class I system because of available data (TCR at resting level, CD28 positive, CD69 and CD25 negative) for a 5-h period of time from recognition of the relevant peptide recognition (time 0). The 22 ODE system resolutions could be solved within 3 min of computer time.

Two main kinetic patterns were observed. Firstly, initially expressed receptors had a monotonous decrease, leading to a plateau due to consumption during the recognition process (Fig. 2), in accordance with the literature. Secondly, induced proteins follow a two stage kinetics with a rising followed by a decrease leading to a plateau too (Figs. 2–4). The TCR numerical dynamics were highly correlated to the CD3 down-expression experimentally measured by DRBI\*1104-restricted T-cell clone (KS 140) specific for tetanus toxin (TT) peptide 830–843 (Valitutti et al., 1995) in Figure 5. The crucial step (i.e., internalized IL-2) and all intermediate steps can be plotted (not shown) but experimental data are missing for comparison and parameter adjustments.

### *Evolution curves for several variables*

The affinity effect was tested using data of cytochrome P450–MCC88-103 and two substituted analogs (partial agonistic T102S or antagonist T102G) with determined affinity parameters ( $k_{on \text{ TCR}}/k_{off \text{ TCR}}$ ) for T cell line (Grakoui et al., 1999). These simulations have shown concordant, proportional decreases of membrane TCR (Fig. 6a) and raise of internalized IL-2 amount (Fig. 6b) and a signal threshold allowing decision for cell division could be estimated.

The effect of the peptide density was tested at 10–10,000 molecules in the synapse with concordant results for membrane TCR (Fig. 7a) and internalized IL-2 (Fig. 7b). Considering soluble concentrations of peptides usually used in experimental conditions for efficient  $\text{CD8}^+$  T-cell activation (Demetz et al., 1990; Harding, 1996; Irvine et al., 2002), the range was estimated at 20–1500 peptide-MHC complex per synapse (Harding, 1996; Irvine et al., 2002; Valitutti et al., 1995).

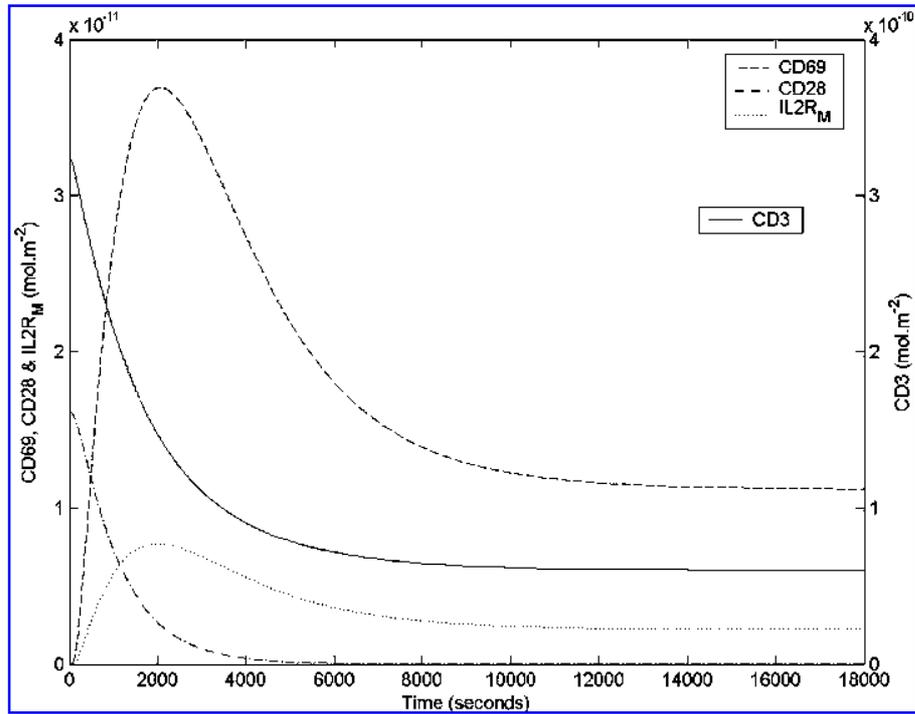


FIG. 2. Plots of CD3, CD28, CD69, and IL2R<sub>M</sub> concentrations (mol/m<sup>2</sup>) with time (right scale for CD3; left scale for CD28, CD69, and IL2R<sub>M</sub>). Numerical solution based on our model applied to a naive T cell.

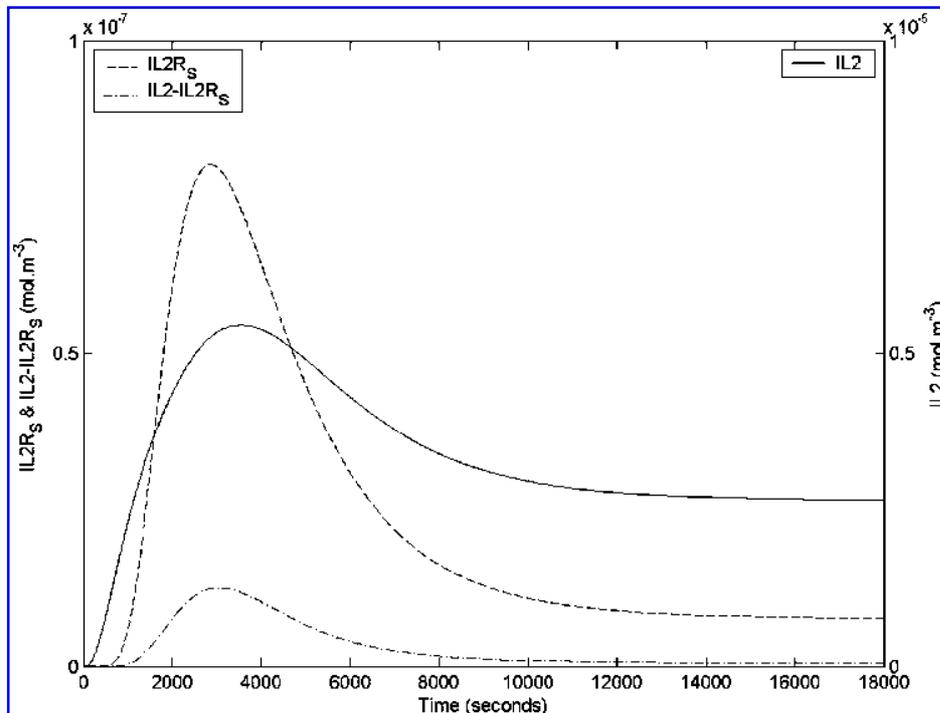
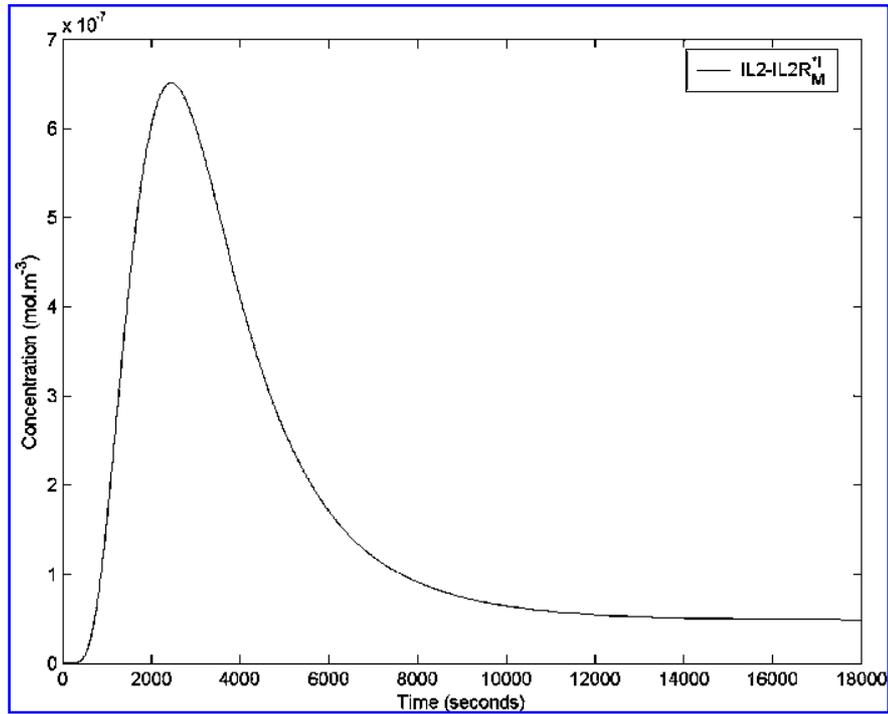
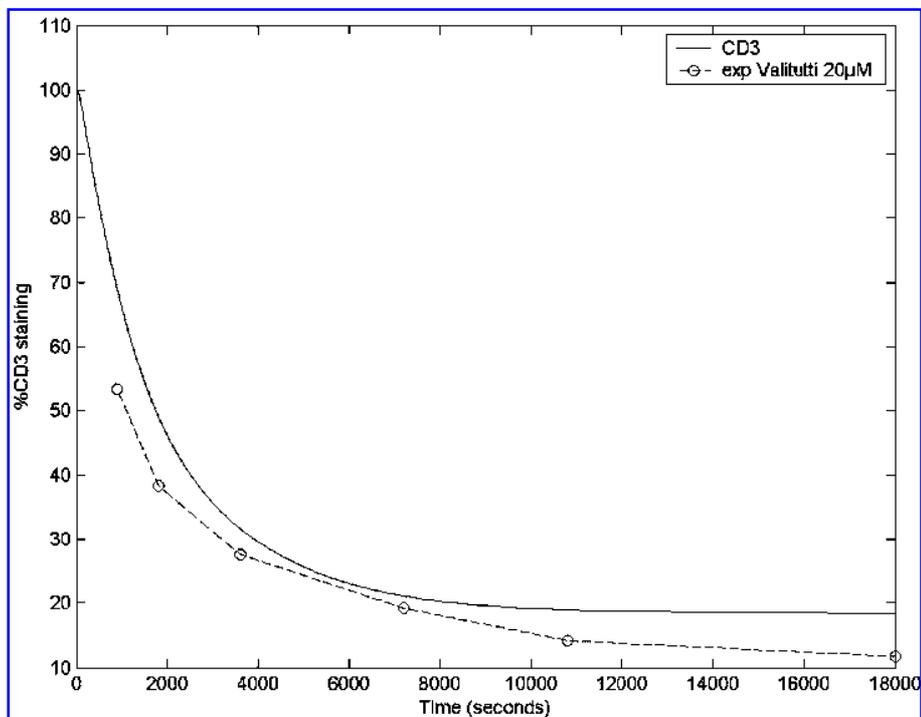


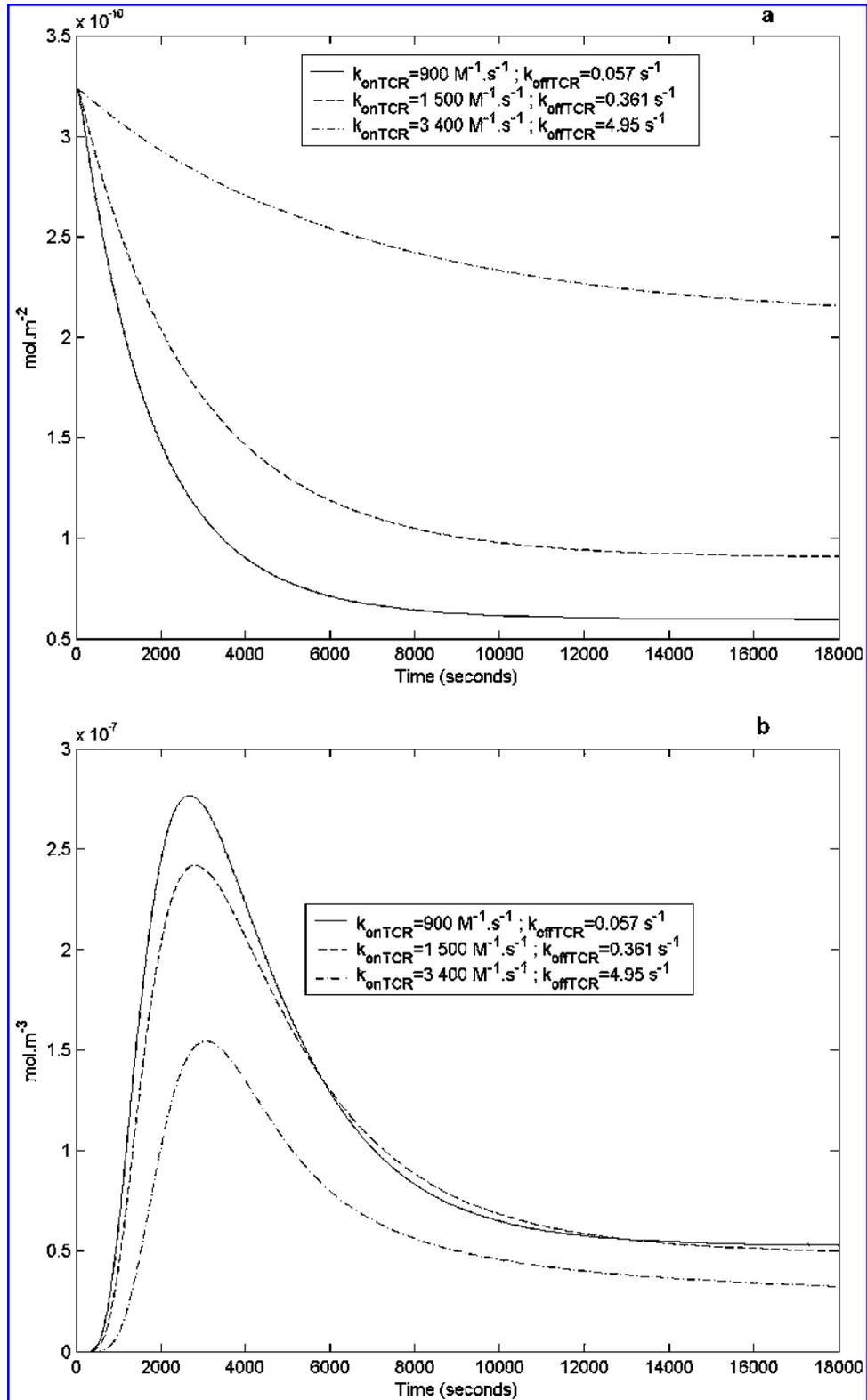
FIG. 3. Plots of IL2, IL2R<sub>S</sub>, and IL2-IL2R<sub>S</sub> concentrations (mol/m<sup>3</sup>) with time (right scale for IL2; left scale for IL2R<sub>S</sub> and IL2-IL2R<sub>S</sub>). Numerical solution based on our model applied to a naive T cell.



**FIG. 4.** Plot of  $IL2IL2R_M^{*i}$  concentration ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ) with time. Numerical solution based on our model applied to a naive T cell with CD28. We focus attention on  $IL2IL2R_M^{*i}$  concentration to determine when the T cell is activated.



**FIG. 5.** Plot of CD3 (percentage of control) obtained with our model compared to experiment from Valitutti et al. (1995).



**FIG. 6.** Plots of TCR (mol/m<sup>2</sup>) (a) and IL2IL2R<sub>M</sub><sup>\*i</sup> (mol/m<sup>3</sup>) (b) concentrations with time, with 3 couples of parameters  $k_{onTCR}/k_{offTCR}$  from Grakoui et al. (1999). The ligand considered is said agonist for  $k_{onTCR} = 900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}/k_{offTCR} = 0.057 \text{ s}^{-1}$ , weak agonist for  $k_{onTCR} = 1500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}/k_{offTCR} = 0.361 \text{ s}^{-1}$ , or antagonist for  $k_{onTCR} = 3400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}/k_{offTCR} = 4.95 \text{ s}^{-1}$ .

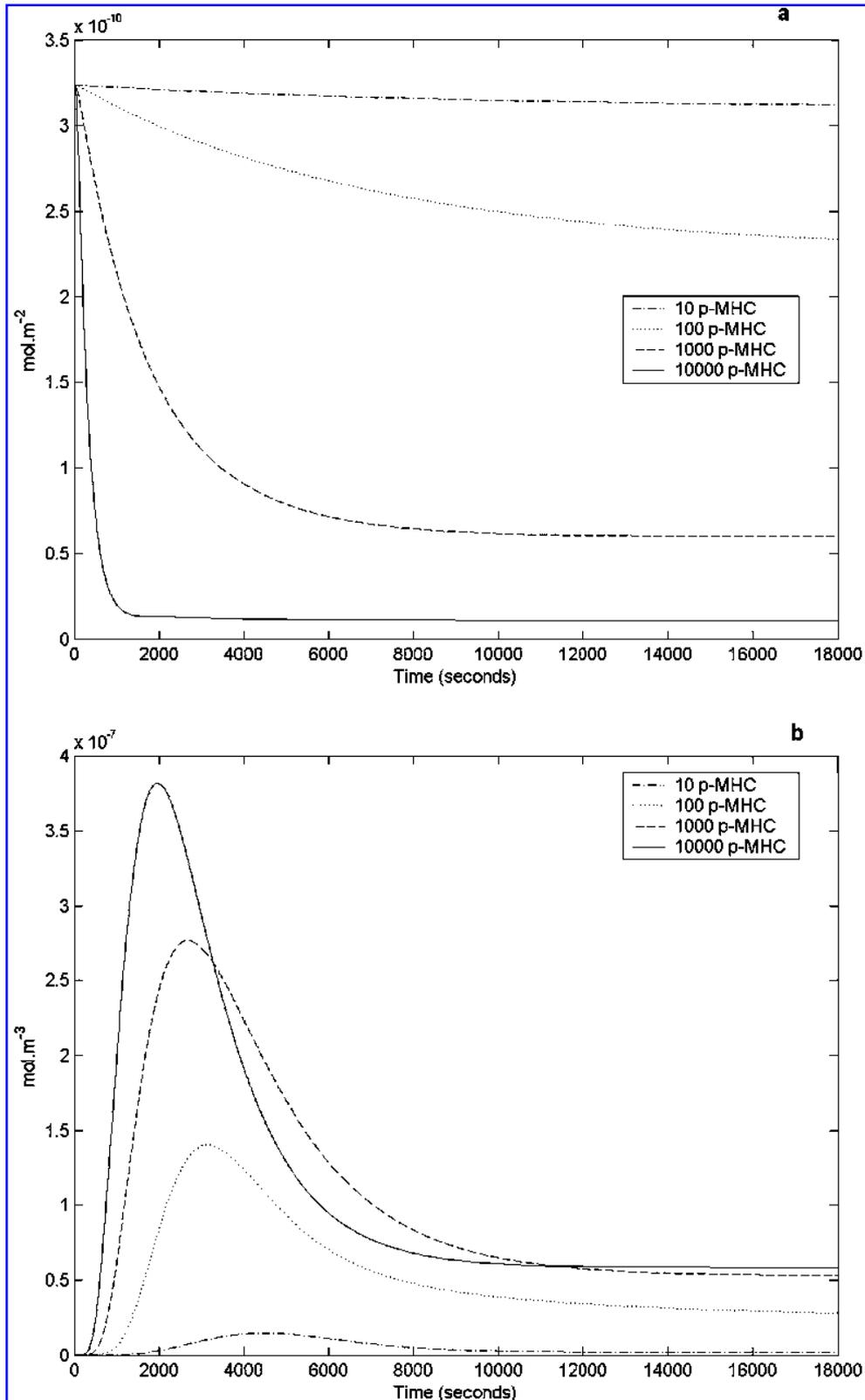


FIG. 7. Plots of TCR (mol/m<sup>2</sup>) (a) and IL2IL2R<sub>M</sub><sup>\*i</sup> (mol/m<sup>3</sup>) (b) with time, for cases where APC bears 10, 100, 1000, or 10,000 peptide-MHC complex (in synapse).

Because the initial TCR membrane density could be lowered due to previous partial engagement, we have tested initial TCR levels (from 10,000 to 40,000 TCR per cell). Our results show that reduced initial TCR level could be insufficient to reach efficient signal explaining refractory or anergy status (Fig. 8).

Considering that T cells are not isolated during activation we considered the possible presence of exogenous IL-2 testing initial levels from 0 to  $10^{-3}$  mol/m<sup>3</sup>. Simulations show multicellular system has synergistic effect on T cell response (Fig. 9). Several other conditions could be tested that are not presented here.

### *Mathematical analysis*

The numerical sensitivity has shown that the model was highly stable over a wide range of parameters providing physiological conditions were respected. Higher variation could lead to oscillatory effects. Similarly, values appeared highly stable on longer time of reaction, all ending in a plateau.

The sensitivity to initial status was also tested over a wide range of initial values. Changes in initial states induced expected qualitative evolutions but little effects on the final stationary status (Figs. 8 and 9).

## 4. DISCUSSION

The mathematical model presented in this paper makes possible to mimic the dynamics of T-cell activation from specific peptide recognition toward IL2 receptor activation, monitoring the major intermediate steps. It obviously oversimplifies the system. For example, we did not detail the signal transduction steps. However, getting deeper in details would expose too much higher risks of error and aberrant results. Many steps are not limiting regarding to the major determinant steps and are most probably invariable whatever the initial conditions are. Preliminary testing show a good correlation with the CD3 quantitative analysis previously published. Similarly, CD69 and CD25 expressions corroborate with other observations (Miller et al., 2004).

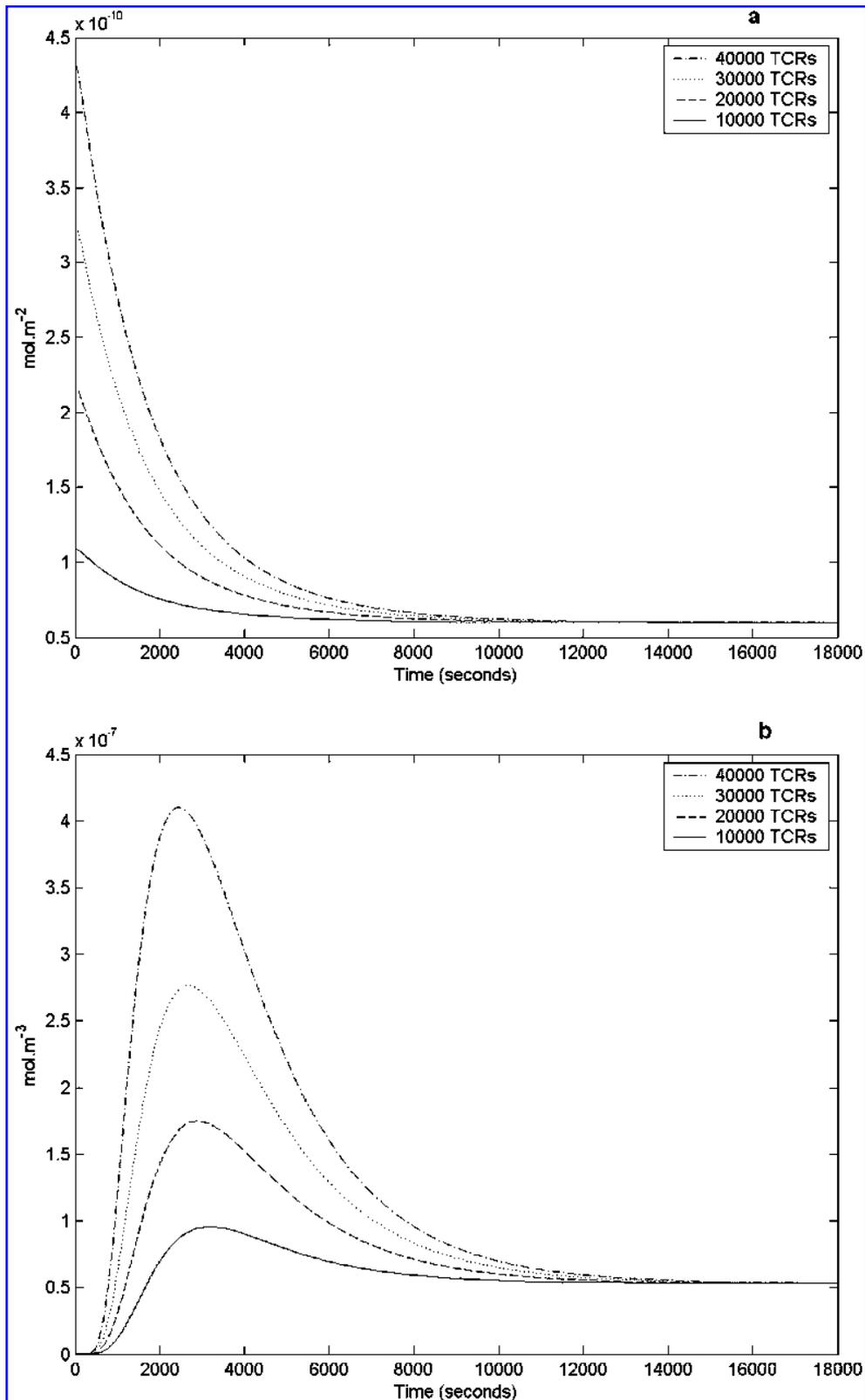
Adapted experiments especially in human are now necessary for parameter adjustments and more precise simulations. This may be possible in next years with the help of recent techniques such as MHC multimers and affinity ( $k_{on}$  and  $k_{off}$ ) determination using plasmon resonance techniques (Alam et al., 1999; Wu et al., 1995) with possible adaptation (Marquez et al., 2005). Still some parameters (i.e., activated molecule internalization, signal transduction delay) won't be available soon but could be estimated mathematically.

Our model was also in accordance with the multiple signal hypotheses (Bachmann et al., 1996; Lord et al., 1999). Our TCR ( $T$ ) engagement scheme is close to the model described by Coombs et al. (2002), except that Coombs did not describe the intermediate steps. Their number and kinetic parameters were not determined. Accordingly, we considered more than two signals (co-stimulatory molecules) with a restricted but probably sufficient number of intermediate steps to mimic the complexity of the mechanism (van der Merwe and Davis, 2003) and the proof-reading paradigm (Hlavacek et al., 2002; Rosette et al., 2001). The parameter values we have chosen from the literature are in the same range as Coombs.

Unlike Coombs, we considered that activated TCR internalization was not reversible in accordance with the exclusion of the activated TCR out of recycling (Dietrich et al., 2002) and resulting in TCR decay on the membrane. All the other steps were reversible according to thermodynamic rules of ligand-receptor interaction.

We considered the p-MHC ( $L$ ) constant during the TCR ( $L$ ) engagement phase, considering that the complex  $T-L$  needs to be dissociated before TCR internalization. This is consistent with serial engagement of several  $T$  on a limited number of  $L$  in case of low peptide concentrations. Coombs has considered a variable p-MHC value, because of the three-compartments hypothesis and the possibility for internalization of the complex in the T cell as initially suggested (Hwang et al., 2000). This step was found not likely in theoretical study (Coombs et al., 2002). However, the global number of  $L$  in all the synapse was considered as constant and simulation data show that  $T-L$  internalization was not likely.

We have described only one type of accessory molecules engagement as little information is available yet on differential affinity parameters of the main three systems (CD28/CTLA, CD40L, and ICOSL). The role of these accessory molecules is crucial especially for weak agonists (Sarkar and Franza, 2004; Uhlin et al., 2006; van der Merwe, 2002). Similarly, we only considered IL-2 autocrine production but other interleukins can be added. On the other hand, we have considered a role of negative feedback of part of IL2-R that is released during the activation process and should limit the IL2 activity by competition with membrane receptor.



**FIG. 8.** Plots of TCR (mol/m<sup>2</sup>) (a) and IL2IL2R<sub>M</sub><sup>\*i</sup> (mol/m<sup>3</sup>) (b) with time, for cases where T cell bearing 10,000, 20,000, 30,000, or 40,000 receptors (TCR) initially.

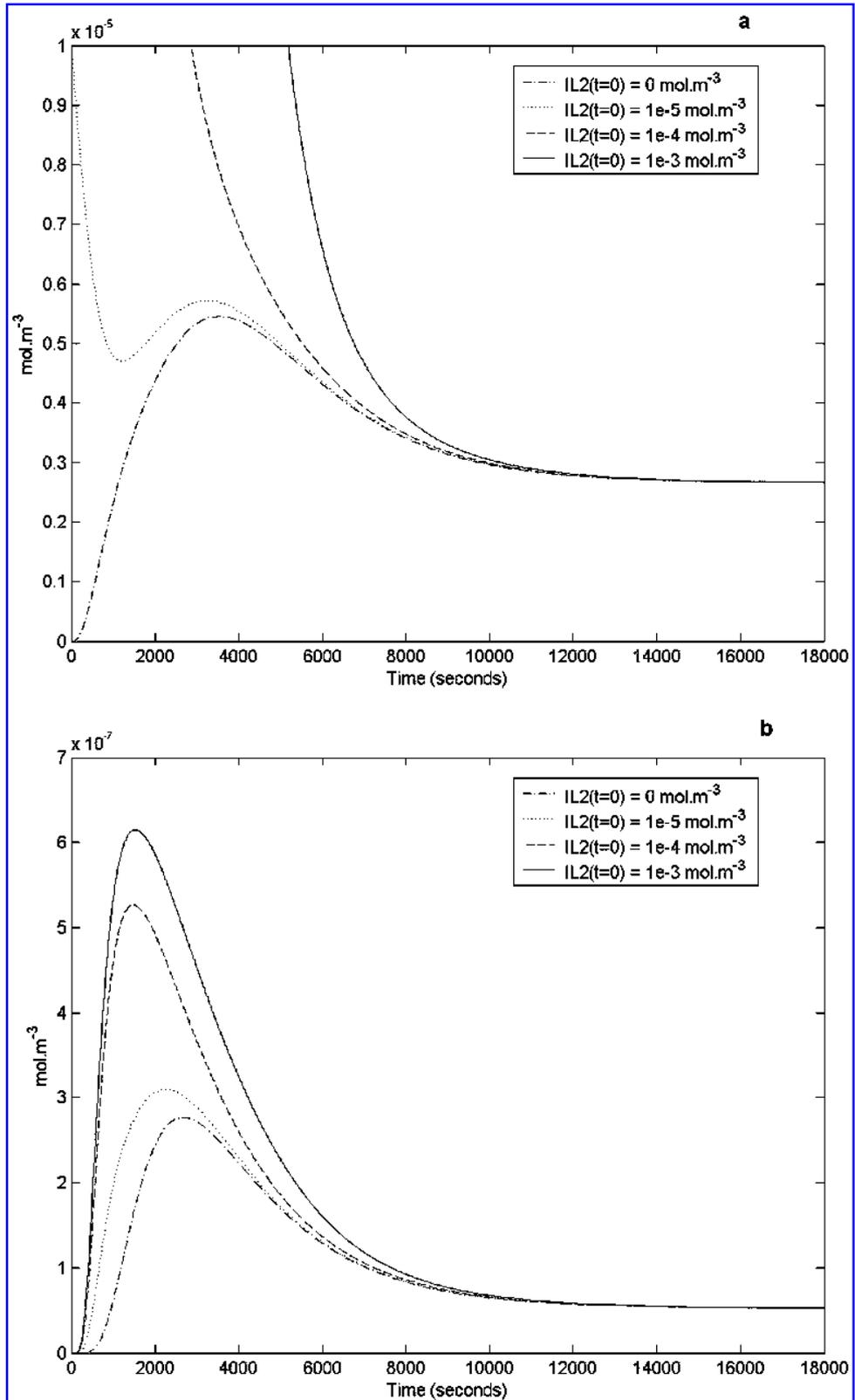


FIG. 9. Plots of IL2 ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ) and  $IL2IL2R_M^{*i}$  ( $\text{mol}/\text{m}^3$ ) concentrations with time, for various initial states of outside IL2: 0,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ , and  $10^{-3} \text{ mol}/\text{m}^3$ .

The synapse formation has been recently modeled considering molecular mobility in membrane (Cemerski and Shaw, 2006; Chakraborty et al., 2003; Figge and Meyer-Hermann, 2006; Lee et al., 2002a; Shaw, 2005) explaining its geometrical organization. Several compartments have been observed (peripheral -p-SMAC- and central -c-SMAC-zones). They may be the result of the move of TCR from outside toward the p-MHC rich central zone of the synapse even if the transfer is dependant on membrane fluidity and cytoskeleton moves. The natural motion of the receptors and internalization of activated receptor implies a concentration of TCR-p-MHC complexes in clusters in the center of the synapse. The kinetics consequences of these compartments are not evaluated yet. Accordingly, we have considered TCR migration from outside of the synapse in a two compartment model. However, our transfer coefficient (term:  $\varphi$  in Eqs. (1) and (2)) is similar to the Coombs diffusion coefficient related to the area:  $\varphi = D/L^2$  and calculated values are very close ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  in our model;  $3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  in Coombs et al. [2002]).

We have considered that the signal transduction was an invariable kinetic, independently of TCR and peptide parameters. This approximation may not be acceptable because the synapse maturation, with prolonged contact, may amplify the signal transduction by optimizing the cytoplasm machinery (Lee et al., 2002a). An appropriate equation can be added if required. Experimental data should elucidate the significance of this phenomenon on the kinetics of the TCR activation.

Modeling such complex system using computer assistance could help in understanding and prediction of the immune response according to parameters of immunization and possibly optimizing immunization strategy such as vaccines or immuno-interventions. The main mechanistic insight so far is that in our complex model, we obtained a biphasic curve of the essential signal transduction effect (i.e., IL-2 receptor internalization). This could explain the non linear response. In case of low affinity or concentration, the signal needs to be accumulated (Rachmilewitz and Lanzavecchia, 2002; Wedagedera and Burroughs, 2006). Several synapses can be constituted sequentially (Faroudi et al., 2003; Miller et al., 2004). Because any prolonged challenge could end in reaching the triggering threshold, even at very low affinity recognition, the signal accumulation has to be limited in time. Our results are consistent with the time limitation in accordance with the kinetic discrimination and the optimal dwell-time window hypothesis (Carreno et al., 2006). The CD43 may play a role in the timing of the synapse (Fierro et al., 2006) but was not necessary in our model. Several other mechanistic hypotheses have been raised and deserve to be tested in order to better understanding of the T cell response.

So far, our system only considers a monoclonal reaction. Polyclonal reaction simulations are possible using several simultaneous ODE resolutions with different initial values. However, the single model should be further adjusted with experimental data before moving to the next step. Furthermore, because of calculation complexity of multimodal system, it would be advantageous to reduce the complexity of our model by eliminating non determinant steps when proper experimental data will be available.

The model could also be adapted for mature/memory T cells. Indeed, accessory molecules such as CD28 have different expression that can be explored. Similarly, CTLA-4, analogous of CD28, has been reported as having an inhibitory instead of amplifying effect. The immune response is more rapid and intense response to second and successive exposures. This effect is not clearly understood. Our model could help in clarify if the effect is due to a more efficient mechanism, a lower triggering threshold or a higher initial number of cells.

The single model on its own could have interesting implications on peptide immunotherapy protocols, specially using dendritic cell immunization. The model could apply to activation dependent cell selection during thymopoiesis, and in primary immune response. The ultimate objective would be to approach the natural mechanism in human during immunotherapy, considering polyclonal population and the cell motion in the anatomical space. The multimodal version would be of interest in following vaccine or therapeutic immunotherapy clinical assays.

## 5. APPENDIX

### *Ordinary differential equation system (ODE) description*

The different kinetics schemes described in the preceding section were transformed into ordinary differential equations.

The synapse TCR ( $T$ ; Eq. (1)) kinetics was modeled as a result of its engagement with a relevant ligand (corresponding to (K1)), its continuous production, inter-compartment exchanges related to their gradient and its activation induced production.

$$\begin{aligned} \frac{d[T]}{dt} = & k_{on\ TL}[T][L] + k_{off\ TL}[TL] + s(T_{max} - [T]) + \varphi([S] - [T]) \\ & + k_1[IL2 - IL2R_M^{*i}](T_{max} - [T]) \end{aligned} \quad (1)$$

The TCR membrane concentration outside the synapse ( $S$ ; Eq. (2)) was calculated according to its continuous production, its motion and consumption in the synapse and its activation induced production.

$$\frac{d[S]}{dt} = s(S_{max} - [S]) - \lambda\varphi([S] - [T]) + k_2[IL2 - IL2R_M^{*i}](S_{max} - [S]) \quad (2)$$

The kinetics of engaged TCR with the specific ligand ( $TL$ ; Eq. (3)) was calculated according to their affinity (association and dissociation rate; (K1)) minus consolidated binding due to the interference of CD4 or CD8 (K2). The activated complex ( $TL^*$ ; Eq. (4)) kinetics was calculated due to the binding of CD4 or CD8 (K2) minus the dissociation with the p-MHC (K3).

$$\frac{d[TL]}{dt} = k_{on\ TL}[T][L] - k_{off\ TL}[TL] - k_{on\ CD4/8}[TL][CD4/8] + k_{off\ CD4/8}[TL^*] \quad (3)$$

$$\frac{d[TL]^*}{dt} = k_{on\ CD4/8}[TL][CD4/8] - k_{off\ CD4/8}[TL^*] - k_{d1}[TL^*] \quad (4)$$

The amount of activated, dissociated TCR ( $T^*$ ; Eq. (5)) was calculated as a coefficient of activated complex (K3) minus the internalized fraction (K4).

$$\frac{d[T^*]}{dt} = k_{d1}[TL^*] - k_{i1}[T^*] \quad (5)$$

The internalized activated TCR ( $T^{*i}$ ; Eq. (6)) fraction was derived from the released, activated receptor (K4) minus the natural degradation (K8). Consumption (sometimes combined with CD28 $^{*i}$ ) to produce CD69 (K5), (K13), IL2 (K7), and IL2RM (K6), (K14) was considered.

$$\frac{d[T^{*i}]}{dt} = k_{i1}^v[T^*] - (k_{p1} + k_{p2})[T^{*i}][CD28^{*i}] - (k_{m1} + k_{m2} + k_{m3})[T^{*i}] - k_{d1}[T^{*i}] \quad (6)$$

The number of CD28 in or outside the synapse and its different stages of activation were calculated in the same way (Eqs. (7)–(11)).

$$\frac{d[CD28_{hs}]}{dt} = s'(CD28_{hs\ max} - [CD28_{hs}]) - \lambda\varphi([CD28_{hs}] - [CD28]) \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[CD28]}{dt} = & \varphi([CD28_{hs}] - [CD28]) - k_{on\ CD28}[CD28][CD80] \\ & + k_{off\ CD28}[CD28 - CD80] + s'(CD28_{max} - [CD28]) \end{aligned} \quad (8)$$

$$\frac{d[CD28 - CD80]}{dt} = k_{on\ CD28}[CD28][CD80] - k_{off\ CD28}[CD28 - CD80] - k_{f2}[CD28 - CD80] \quad (9)$$

$$\frac{d[CD28^*]}{dt} = k_{f2}[CD28 - CD80] - k_{i2}[CD28^*] \quad (10)$$

$$\frac{d[CD28^{*i}]}{dt} = k_{i2}^v[CD28^*] - (k_{p1} + k_{p2})[T^{*i}][CD28^{*i}] - k_{d2}[CD28^{*i}] \quad (11)$$

The global membrane expression of CD69 was calculated according to TCR, and CD69 itself activation minus its natural degradation (Eqs. (12)–(15)).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{CD69}]}{dt} = & k_{m1}^s [T^{*i}] + k_{p1}^s [T^{*i}][\text{CD28}^{*i}] + k_{p'1} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}] \\ & - k_{on \text{CD69}} [\text{CD69}][\text{CD69L}] + k_{off \text{CD69}} [\text{CD69} - \text{CD69L}] - k_{e1} [\text{CD69}] \end{aligned} \quad (12)$$

$$\frac{d[\text{CD69} - \text{CD69L}]}{dt} = k_{on \text{CD69}} [\text{CD69}][\text{CD69L}] - k_{off \text{CD69}} [\text{CD69} - \text{CD69L}] - k_{f3} [\text{CD69} - \text{CD69L}] \quad (13)$$

$$\frac{d[\text{CD69}^*]}{dt} = k_{f3} [\text{CD69} - \text{CD69L}] - k_{i3} [\text{CD69}^*] \quad (14)$$

$$\frac{d[\text{CD69}^{*i}]}{dt} = k_{i3}^v [\text{CD69}^*] - k_{p3} [\text{CD69}^{*i}] - k_{d3} [\text{CD69}^{*i}] \quad (15)$$

IL2R<sub>M</sub> was calculated in the same way (Eqs. (16)–(22)).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{IL2R}_M]}{dt} = & k_{m2}^s [T^{*i}] + k_{p2}^s [T^{*i}][\text{CD28}^{*i}] + k_{p'2} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}] - k_{on \text{IL2m}} [\text{IL2}][\text{IL2R}_M] \\ & + k_{off \text{IL2m}} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M] - k_{f5} [\text{IL2R}_M][\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}] - k_{e2} [\text{IL2R}_M] \end{aligned} \quad (16)$$

Free IL2R<sub>S</sub> (Eq. (17)) was induced by IL-2 internalization (K24).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{IL2R}_S]}{dt} = & -k_{on \text{IL2s}} [\text{IL2}][\text{IL2R}_S] + k_{off \text{IL2s}} [\text{IL2} - \text{IL2R}_S] \\ & + k_{f5}^e [\text{IL2R}_M][\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}] - k_{e3} [\text{IL2R}_S] \end{aligned} \quad (17)$$

Interleukin 2 is induced by CD69 activation and amplified by IL2R<sub>M</sub> activation (Eq. (18)). The kinetics of the free molecules depends on the competitive binding of IL-2 to membrane and soluble receptor (Eqs. (19)–(20)).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{IL2}]}{dt} = & k_{p3}^e [\text{CD69}^{*i}] + k_{m3}^e [T^{*i}] + k_{p'3} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}] - k_{on \text{IL2s}} [\text{IL2}][\text{IL2R}_S] \\ & + k_{off \text{IL2s}} [\text{IL2} - \text{IL2R}_S] - k_{on \text{IL2m}}^e [\text{IL2}][\text{IL2R}_M] + k_{off \text{IL2m}}^e [\text{IL2} - \text{IL2R}_M] - k_{e4} [\text{IL2}] \end{aligned} \quad (18)$$

$$\frac{d[\text{IL2} - \text{IL2R}_S]}{dt} = k_{on \text{IL2s}} [\text{IL2}][\text{IL2R}_S] - k_{off \text{IL2s}} [\text{IL2} - \text{IL2R}_S] - k_{e5} [\text{IL2} - \text{IL2R}_S] \quad (19)$$

$$\frac{d[\text{IL2} - \text{IL2R}_M]}{dt} = -k_{f4} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M] + k_{on \text{IL2m}} [\text{IL2}][\text{IL2R}_M] - k_{off \text{IL2m}} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M] \quad (20)$$

The amount of activated IL2R<sub>M</sub> was calculated from its binding by IL-2 minus complex internalization (Eq. (21)).

$$\frac{d[\text{IL2} - \text{IL2R}_M^*]}{dt} = k_{f4} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M] - k_{i4} [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^*] \quad (21)$$

IL-2 internalization was calculated from IL2–IL2R<sub>M</sub> activation, minus release of IL2R<sub>M</sub> in IL2R<sub>S</sub> and amplifying TCR, CD69, IL2R<sub>M</sub>, or IL2 production. The complex degradation is also considered (Eq. (22)).

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}]}{dt} = & k_{i4}^v [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^*] - k_{f5}^v [\text{IL2R}_M][\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}] - k_1^v [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}](T_{\max} - [T]) \\ & - (k_{p'1}^v + k_{p'2}^v + k_{p'3}^v + k_{d4}) [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}] - k_2^v [\text{IL2} - \text{IL2R}_M^{*i}](S_{\max} - [S]) \end{aligned} \quad (22)$$

## ACKNOWLEDGMENTS

This work has been funded by the Ecole Nationale Supérieure des Mines de St. Etienne .

## REFERENCES

- Acuto, O., and Michel, F. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 939–951.
- Alam, S.M., Davies, G.M., et al. 1999. Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity* 10, 227–237.
- Anderson, M.W., and Gorski, J. 2005. Cooperativity during the formation of peptide/MHC class II complexes. *Biochemistry* 44, 5617–5624.
- Arcaro, A., Gregoire, C., et al. 2001. CD8<sub>beta</sub> endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56(lck) complexes. *J. Exp. Med.* 194, 1485–1495.
- Azuma, M., Phillips, J.H., et al. 1993. CD28<sup>-</sup> T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J. Immunol.* 150, 1147–1159.
- Bachmann, M.F., Sebзда, E., et al. 1996. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur. J. Immunol.* 26, 2017–2022.
- Bettens, F., Kristensen, F., et al. 1984. Lymphokine regulation of human lymphocyte proliferation: formation of resting G0 cells by removal of interleukin 2 in cultures of proliferating T lymphocytes. *Cell Immunol.* 86, 337–346.
- Bezouska, K., Nepovim, A., et al. 1995. CD69 antigen of human lymphocytes is a calcium-dependent carbohydrate-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 68–74.
- Bitmansour, A.D., Douek, D.C., et al. 2002. Direct ex vivo analysis of human CD4<sup>(+)</sup> memory T cell activation requirements at the single clonotype level. *J. Immunol.* 169, 1207–1218.
- Borisova, L.R., Andreev, S.G., et al. 1998. Kinetics of T cell proliferation: a mathematical model and data analysis. *Membr. Cell Biol.* 12, 111–119.
- Borisova, L.R., Kuznetsov, V.A. 1997. A mathematical model of T lymphocyte proliferation controlled by interleukin-2 internalization. *Membr. Cell Biol.* 11, 259–267.
- Boulougouris, G., McLeod, J.D., et al. 1999. IL-2-independent activation and proliferation in human T cells induced by CD28. *J. Immunol.* 163, 1809–1816.
- Bromley, S.K., Iaboni, A., et al. 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat. Immunol.* 2, 1159–1166.
- Busch, D.H., and Pamer, E.G. 1998. MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, *in vitro* proliferation, and diversity of responding CTL. *J. Immunol.* 160, 4441–4448.
- Cantrell, D., Bluestone, J., et al. 1998. Signalling through the TCR. *Res. Immunol.* 149, 866–867.
- Carneiro, J., Coutinho, A., et al. 1996. A model of the immune network with B-T cell co-operation. I—Prototypical structures and dynamics. *J. Theor. Biol.* 182, 513–529.
- Carreno, B.M., and Collins, M. 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 29–53.
- Carreno, L.J., Gonzalez, P.A., et al. 2006. Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. *Immunobiology* 211, 47–64.
- Cemerski, S., and Shaw, A. 2006. Immune synapses in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 298–304.
- Chakraborty, A.K., Dustin, M.L., et al. 2003. *In silico* models for cellular and molecular immunology: successes, promises and challenges. *Nat. Immunol.* 4, 933–936.
- Coombs, D., Kalergis, A.M., et al. 2002. Activated TCRs remain marked for internalization after dissociation from pMHC. *Nat. Immunol.* 3, 926–931.
- Corr, M., Slanetz, A.E., et al. 1994. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 265, 946–949.
- D'Ambrosio, D., Trotta, R., et al. 1993. Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69-generated signals. *Eur. J. Immunol.* 23, 2993–2997.
- D'Oro, U., and Ashwell, J.D. 1999. Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J. Immunol.* 162, 1879–1883.
- Davis, S.J., Ikemizu, S., et al. 2003. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat. Immunol.* 4, 217–224.
- Davis, S.J., and van der Merwe, P.A. 2006. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* 7, 803–809.
- Demotz, S., Grey, H.M., et al. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249, 1028–1030.

- Denkberg, G., Cohen, C.J., et al. 2001. Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *J. Immunol.* 167, 270–276.
- Dietrich, J., Menne, C., et al. 2002. Ligand-induced TCR down-regulation is not dependent on constitutive TCR cycling. *J. Immunol.* 168, 5434–5440.
- Edmead, C.E., Lamb, J.R., et al. 1997. The T cell surface protein, CD28. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 1053–1057.
- Fallon, E.M., and Lauffenburger, D.A. 2000. Computational model for effects of ligand/receptor binding properties on interleukin-2 trafficking dynamics and T cell proliferation response. *Biotechnol. Prog.* 16, 905–916.
- Faroudi, M., Zaru, R., et al. 2003. Cutting edge: T lymphocyte activation by repeated immunological synapse formation and intermittent signaling. *J. Immunol.* 171, 1128–1132.
- Favier, B., Burroughs, N.J., et al. 2001. TCR dynamics on the surface of living T cells. *Int. Immunol.* 13, 1525–1532.
- Feito, M.J., Ballester, S., et al. 1997. CD4 dependence of activation threshold and TCR signalling in mouse T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 45, 166–174.
- Fierro, N.A., Pedraza-Alva, G., et al. 2006. TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement. *J. Immunol.* 176, 7346–7353.
- Figge, M.T., and Meyer-Hermann, M. 2006. Geometrically repatterned immunological synapses uncover formation mechanisms. *PLoS Comput. Biol.* 2, e171.
- Garcia, K.C., Tallquist, M.D., et al. 1997. Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13838–13843.
- Goldstein, J.S., Chen, T., et al. 2000. ICAM-1 enhances MHC-peptide activation of CD8<sup>(+)</sup> T cells without an organized immunological synapse. *Eur. J. Immunol.* 30, 3266–3270.
- Gonzalez, P.A., Carreno, L.J., et al. 2005. T cell receptor binding kinetics required for T cell activation depend on the density of cognate ligand on the antigen-presenting cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4824–4829.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., et al. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.
- Gronski, M.A., Boulter, J.M., et al. 2004. TCR affinity and negative regulation limit autoimmunity. *Nat. Med.* 10, 1234–1239.
- Harding, C.V. 1996. Class I MHC presentation of exogenous antigens. *J. Clin. Immunol.* 16, 90–96.
- Hlavacek, W.S., Redondo, A., et al. 2002. Kinetic proofreading in receptor-mediated transduction of cellular signals: receptor aggregation, partially activated receptors, and cytosolic messengers. *Bull. Math. Biol.* 64, 887–911.
- Hudrisier, D., Kessler, B., et al. 1998. The efficiency of antigen recognition by CD8<sup>+</sup> CTL clones is determined by the frequency of serial TCR engagement. *J. Immunol.* 161, 553–562.
- Hwang, I., Huang, J.F., et al. 2000. T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 191, 1137–1148.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., et al. 2002. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 419, 845–849.
- Itoh, Y., Hemmer, B., et al. 1999. Serial TCR engagement and down-modulation by peptide:MHC molecule ligands: relationship to the quality of individual TCR signaling events. *J. Immunol.* 162, 2073–2080.
- Kalergis, A.M., Boucheron, N., et al. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat. Immunol.* 2, 229–234.
- Kerry, S.E., Buslepp, J., et al. 2003. Interplay between TCR affinity and necessity of coreceptor ligation: high-affinity peptide-MHC/TCR interaction overcomes lack of CD8 engagement. *J. Immunol.* 171, 4493–4503.
- Kersh, G.J., Miley, M.J., et al. 2001. Structural and functional consequences of altering a peptide MHC anchor residue. *J. Immunol.* 166, 3345–3354.
- Kim, H.J., Guo, D., et al. 2005. Coevolution of TCR-MHC interactions: conserved MHC tertiary structure is not sufficient for interactions with the TCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7263–7267.
- Korb, L.C., Mirshahidi, S., et al. 1999. Induction of T cell anergy by low numbers of agonist ligands. *J. Immunol.* 162, 6401–6409.
- Krummel, M., Wulfig, C., et al. 2000. Thirty-six views of T-cell recognition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355, 1071–1076.
- Kuiper, H.M., de Jong, R., et al. 1994. Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunology* 83, 38–44.
- Kumar, V., and Sercarz, E. 2001. An integrative model of regulation centered on recognition of TCR peptide/MHC complexes. *Immunol. Rev.* 182, 113–121.
- Labrecque, N., Whitfield, L.S., et al. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15, 71–82.
- Langenkamp, A., Messi, M., et al. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1, 311–316.
- Lanzavecchia, A., Lezzi, G., et al. 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96, 1–4.
- Ledbetter, J.A., Imboden, J.B., et al. 1990. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood* 75, 1531–1539.

- Lee, K.H., Holdorf, A.D., et al. 2002a. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539–1542.
- Lee, S.J., Hori, Y., et al. 2003. Low T cell receptor expression and thermal fluctuations contribute to formation of dynamic multifocal synapses in thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4383–4388.
- Lee, S.J., Hori, Y., et al. 2002b. Correlation of a dynamic model for immunological synapse formation with effector functions: two pathways to synapse formation. *Trends Immunol.* 23, 492–499.
- Leon, K., Perez, R., et al. 2001. Three-cell interactions in T cell-mediated suppression? A mathematical analysis of its quantitative implications. *J. Immunol.* 166, 5356–5365.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., et al. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793–801.
- Liu, H., Rhodes, M., et al. 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13, 665–675.
- Lord, G.M., Lechler, R.I., et al. 1999. A kinetic differentiation model for the action of altered TCR ligands. *Immunol. Today* 20, 33–39.
- Luescher, I.F., Vivier, E., et al. 1995. CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 373, 353–356.
- Lyons, G.E., Moore, T., et al. 2006. Influence of human CD8 on antigen recognition by T-cell receptor-transduced cells. *Cancer Res.* 66, 11455–11461.
- Madrenas, J. 1999. Differential signalling by variant ligands of the T cell receptor and the kinetic model of T cell activation. *Life Sci.* 64, 717–731.
- Manning, T.C., and Kranz, D.M. 1999. Binding energetics of T-cell receptors: correlation with immunological consequences. *Immunol. Today* 20, 417–422.
- Mardiney, M., 3rd, Brown, M.R., et al. 1996. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. *Cytometry* 26, 305–310.
- Margulies, D.H. 1997. Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes: a quantitative basis for mechanistic models. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 390–395.
- Marquez, M.E., Ellmeier, W., et al. 2005. CD8 T cell sensory adaptation dependent on TCR avidity for self-antigens. *J. Immunol.* 175, 7388–7397.
- Marzio, R., Mauer, J., et al. 1999. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 21, 565–582.
- Matsui, K., Boniface, J.J., et al. 1991. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science* 254, 1788–1791.
- McKeithan, T.W. 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5042–5046.
- McNeil, L.K., and Evavold, B.D. 2003. TCR reserve: a novel principle of CD4 T cell activation by weak ligands. *J. Immunol.* 170, 1224–1230.
- Miller, M.J., Safrina, O., et al. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4<sup>+</sup> T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J. Exp. Med.* 200, 847–856.
- Moldovan, M.C., Yachou, A., et al. 2002. CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J. Immunol.* 169, 6261–6268.
- Purbhoo, M.A., Boulter, J.M., et al. 2001. The human CD8 coreceptor effects cytotoxic T cell activation and antigen sensitivity primarily by mediating complete phosphorylation of the T cell receptor zeta chain. *J. Biol. Chem.* 276, 32786–32792.
- Qi, S.Y., Groves, J.T., et al. 2001. Synaptic pattern formation during cellular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6548–6553.
- Rabinowitz, J.D., Beeson, C., et al. 1996. Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1401–1405.
- Rachmilewitz, J., and Lanzavecchia, A. 2002. A temporal and spatial summation model for T-cell activation: signal integration and antigen decoding. *Trends Immunol.* 23, 592–595.
- Renard, V., Romero, P., et al. 1996. CD8 beta increases CD8 coreceptor function and participation in TCR-ligand binding. *J. Exp. Med.* 184, 2439–2444.
- Rognan, D., Stryhn, A., et al. 2000. Modeling the interactions of a peptide-major histocompatibility class I ligand with its receptors. I. Recognition by two alpha beta T cell receptors. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 14, 53–69.
- Rosette, C., Werlen, G., et al. 2001. The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: a revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* 15, 59–70.
- Salzmann, M., and Bachmann, M. F. 1998. Estimation of maximal affinities between T-cell receptors and MHC/peptide complexes. *Mol. Immunol.* 35, 65–71.
- Sarkar, A., and Franza, B.R. 2004. A logical analysis of the process of T cell activation: different consequences depending on the state of CD28 engagement. *J. Theor. Biol.* 226, 455–466.

- Savage, P.A., Boniface, J.J., et al. 1999. A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity* 10, 485–492.
- Schrum, A.G., and Turka, L.A. 2002. The proliferative capacity of individual naive CD4<sup>(+)</sup> T cells is amplified by prolonged T cell antigen receptor triggering. *J. Exp. Med.* 196, 793–803.
- Shaw, A.S. 2005. T-cell activation and immunologic synapse. *Immunol. Res.* 32, 247–252.
- Sidorov, I.A., and Romanyukha, A.A. 1993. Mathematical modeling of T-cell proliferation. *Math Biosci.* 115, 187–232.
- Smith, K.A. 1989. The interleukin 2 receptor. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 397–425.
- Sousa, J., and Carneiro, J. 2000. A mathematical analysis of TCR serial triggering and down-regulation. *Eur. J. Immunol.* 30, 3219–3227.
- Tanchot, C., Barber, D.L., et al. 2001. Adaptive tolerance of CD4<sup>+</sup> T cells in vivo: multiple thresholds in response to a constant level of antigen presentation. *J. Immunol.* 167, 2030–2039.
- Uhlin, M., Masucci, M., et al. 2006. Is the activity of partially agonistic MHC:peptide ligands dependent on the quality of immunological help? *Scand. J. Immunol.* 64, 581–587.
- Valitutti, S., Muller, S., et al. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375, 148–151.
- van der Merwe, P.A. 2002. Do T cell receptors do it alone? *Nat. Immunol.* 3, 1122–1123.
- van der Merwe, P.A., Bodian, D.L., et al. 1997. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* 185, 393–403.
- van der Merwe, P.A., and Davis, S.J. 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 659–684.
- Vignali, D.A. 1994. The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function. *Behring Inst. Mitt.* 94, 133–147.
- Waldrop, S.L., Davis, K.A., et al. 1998. Normal human CD4<sup>+</sup> memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J. Immunol.* 161, 5284–5295.
- Wang, B., Sharma, A., et al. 2002. Peptidic termini play a significant role in TCR recognition. *J. Immunol.* 169, 3137–3145.
- Wedagedera, J.R., and Burroughs, N.J. 2006. T-cell activation: a queuing theory analysis at low agonist density. *Biophys. J.* 91, 1604–1618.
- Wei, X., Tromberg, B.J., et al. 1999. Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca<sup>(2+)</sup> signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8471–8476.
- Wigginton, J.E., and Kirschner, D. 2001. A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* 166, 1951–1967.
- Williams, C.B., Engle, D.L., et al. 1999. A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *J. Exp. Med.* 189, 1531–1544.
- Wofsy, C., Coombs, D., et al. 2001. Calculations show substantial serial engagement of T cell receptors. *Biophys. J.* 80, 606–612.
- Wu, Z., Johnson, K.W., et al. 1995. Ligand binding analysis of soluble interleukin-2 receptor complexes by surface plasmon resonance. *J. Biol. Chem.* 270, 16045–16051.
- Xu, Z., and Weiss, A. 2002. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat. Immunol.* 3, 764–771.
- Zhai, Y., Shen, X.D., et al. 2002. The CD154-CD40 T cell costimulation pathway is required for host sensitization of CD8<sup>(+)</sup> T cells by skin grafts via direct antigen presentation. *J. Immunol.* 169, 1270–1276.

Address reprint requests to:

Dr. Claude Lambert  
Immunology Laboratory  
Plateau de Biologie  
CHU St. Etienne  
F 42055 St. Etienne Cedex 2, France

E-mail: Claude.lambert@univ-st-etienne.fr

# **Annexe III**



# Cytométrie et ses applications en immunologie clinique

Fatima-Zahra El Hentati<sup>a</sup>, Cristina Iobagiu<sup>a</sup>, Claude Lambert<sup>a,\*</sup>

## RÉSUMÉ

La cytométrie (cyto = cellule; métrie = mesure) consiste en l'analyse objective, quantitative et multiparamétrique des cellules. Elle utilise la fluorescence, des moyens fluidiques, optiques et le soutien informatique pour le traitement des signaux ou des images. Ses performances sont exceptionnelles et permettent l'analyse simultanée de 4, 6, 8 paramètres, voire plus, à très grande vitesse (de 500 à 10 000 cellules par seconde). La cytométrie en image est encore une technique de recherche. En analyse médicale, la cytométrie en flux est de plus en plus utilisée, pour le typage des leucémies, la numération des très nombreux sous-types cellulaires, par exemple pour le suivi du sida ou des traitements immunosuppresseurs et des greffes. De plus, l'état d'activation, de maturation et de prolifération des cellules peut être mesuré. La haute précision et large utilisation de la cytométrie en routine a déjà permis de décrire de nouveaux sous-types cellulaires tels que les lymphocytes T gamma delta, muqueux, les cellules TNK, les lymphocytes régulateurs, dont l'action est ciblée au sein de la réponse immune. Des proliférations monoclonales de signification indéterminées mais potentiellement évolutives ont pu être observées. Les désordres prolifératifs et des hétéropléidies peuvent être rapidement analysés. D'autres applications en cancérologie et microbiologie sont en cours de développement. En conclusion, l'apport majeur de la cytométrie est de pouvoir aborder les populations cellulaires dans leur grande diversité et complexité. Il serait en effet aujourd'hui ridicule de limiter ces systèmes à des ensembles homogènes et uniformes. La « sociologie » des populations cellulaires est un nouveau champ encore à défricher.

**Cytométrie en flux – typage cellulaire – gamma delta – lymphocytes T régulateurs – lymphocytes T non conventionnels – clonotypage – sociologie cellulaire.**

## 1. La cytométrie

Grâce au développement récent des technologies instrumentales, de nombreuses applications de la cytométrie ont été développées pour l'analyse quantitative du système immunitaire surtout dans ses composantes cellulaires. Ces applications sont progressivement transférées aux applications cliniques. Cette technologie est en plein essor

### <sup>a</sup> Laboratoire d'Immunologie

Pôle de biologie pathologie  
Hôpital Nord – Centre hospitalier universitaire de Saint-Etienne  
42055 Saint-Etienne cedex 2

### \* Correspondance

claude.lambert@chu-st-etienne.fr

article reçu le 19 novembre 2008, accepté le 10 janvier 2009.

© 2009 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

## SUMMARY

### Cytometry and its clinical applications in immunology

Cytometry (cyto = cell; metry = measuring) consist in an objective, quantitative and multiparametric analysis of cells. It is based on fluorescence, fluidic and optical tools with the help of signal or image computer treatment. It is a high performance system allowing simultaneous analysis of 4, 6, 8 or more parameters, at very high speed from 500 to 10 000 cells per second. Image cytometry is largely used in research. In medical analysis, Flow-cytometry is more and more used for leukaemia typing, lymphocyte counting, among them HIV monitoring or immunological treatments follow-up. Identification of numerous cell subtypes and their activation, maturation or proliferation status is now possible. Its high precision and wide use have lead to the description of new cell subtypes (e.g. gamma delta, mucosal, T.NK or regulatory T cells...) that have targeted activity. Recently, oligoclonal clonopathies of undetermined significance but with risks for pathological development have been described. Proliferative or heteroploidy disorders can also be evaluated. Applications in solid tumor and microbiology are under development. In conclusion, the major point of cytometry is to bring tools to approach cell populations in their diversity and complexity. It would be ridiculous today to consider them as homogeneous, uniform systems. In other words, cell « sociology » is a wide new field that remains to be explored.

**Cytometry – flowcytometry – cell characterisation – unconventional T cells – gamma delta T cells – treg – clonotyping – cell sociology.**

et devrait nettement améliorer les moyens de monitoring objectif de l'état immunitaire chez les patients dans différentes maladies (déficits immunitaires, infections graves, maladies inflammatoires chroniques, auto-immunité), au décours de traitements (immunostimulants, immunosuppresseurs, vaccinations préventive, thérapeutique) ou encore lors de tentatives d'induction de tolérance. La cytométrie est une spécialité récente qui s'est développée principalement au cours des quinze dernières années. Elle consiste en l'analyse objective, quantitative et multiparamétrique des cellules (cyto = cellule; métrie = mesure).

## Abréviations

**BCECF** : bis carboxyéthyl carboxy fluorescéine  
**CD** : cluster de différenciation  
**CFSE** : carboxyfluoresceine succinimidyl ester  
**CMF** : cytométrie en flux  
**CMV** : cytomégalovirus  
**Cy** : cyanines  
**FITC** : isothiocyanate de fluorescéine  
**FSC** : diffraction en angle faible (forward scatter)  
**GFP** : green fluorescent protein  
**HIV** : virus humain du déficit immunitaire  
**HPN** : hémoglobinurie paroxystique nocturne  
**MFI** : moyenne de fluorescence  
**PE** : phycoérythrine  
**PMT** : photomultiplicateurs  
**SIDA** : syndrome d'immunodéficit aigu  
**SSC** : diffraction latérale (side scatter)  
**TMRM** : tétraméthylrhodamine méthyl ester  
**Treg** : T régulateurs  
**T $\gamma\delta$**  : lymphocytes T de type gamma-delta

La cytométrie a recours à des moyens technologiques très sophistiqués, alliant optique et traitement du signal ou de l'image. On en distingue deux grandes familles.

## 1.1. La cytométrie en image

À partir de la microscopie optique avec traitement informatique des images, elle comprend la microscopie en fluorescence classique mais à plusieurs couleurs et la microscopie confocale qui scanne les préparations cellulaires sur plusieurs plans optiques permettant d'une part, d'avoir des images d'une très haute définition et d'autre part des possibilités de construction d'images en trois dimensions. Elle peut être appliquée sur des frottis cellulaires et des cellules fixées mais également sur des cellules vivantes. Il est possible de cinématographier les comportements cellulaires en culture voire directement dans les organismes chez l'animal mais également chez l'homme, à travers la

peau et les muqueuses fines. Très récemment, il a été mis au point un microscope confocal pour des applications par l'endoscopie au niveau broncho-pulmonaire et digestif.

## 1.2. La cytométrie en flux (CMF)

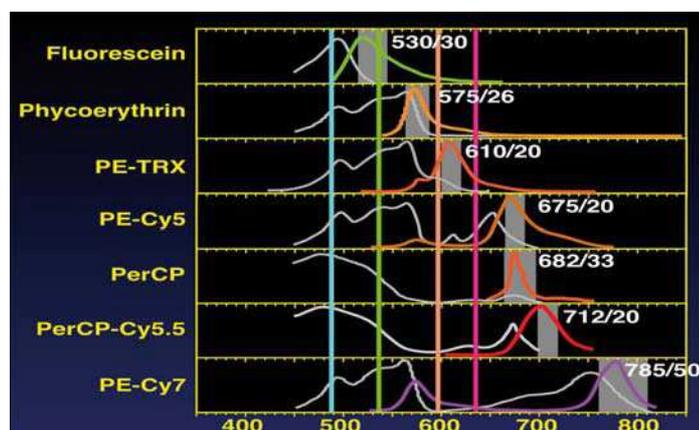
Sujet principal de cette revue, son principe est assez simple : les cellules sont propulsées une par une et à grande vitesse, dans un flux hydraulique de très faible diamètre (entre 50 et 150 microns) autocentré par un second flux liquide qui sert de gaine (liquide de gaine) [1]. Elles passent devant un (ou plusieurs) faisceau lumineux au niveau de la « cellule » d'analyse. Ce faisceau lumineux est généralement un faisceau laser de diamètre presque équivalent à la cellule (environ 50 microns), ce qui peut expliquer l'importance de son alignement sur le flux hydraulique. Les cellules ne sont généralement observées que par le signal lumineux qu'elles diffusent en passant devant le laser. Les lumières diffractées sont capturées par des détecteurs électroniques (photodiodes). Certains capteurs ont une forte amplification électronique (photomultiplicateurs (PMT)). L'utilisation de fluorochromes (colorant fluorescent) fixés sur des anticorps spécifiques permet de détecter la présence des molécules comme les marqueurs (CD) des leucocytes. La CMF s'applique donc uniquement à des cellules en suspension et est particulièrement adaptée à l'analyse de liquides biologiques : sang, lavage broncho-alvéolaire, ascite, épanchement pleural ou ascite, liquide céphalorachidien, aspiration médullaire... Mais il est possible de faire des études sur des cellules tissulaires après remise en suspension des cellules par dilacération des tissus. Un instrument très récent permet de capturer directement l'image de la cellule par une microcaméra disposée à la place des PMT.

La cytométrie est quantitative. L'intensité des signaux émis est directement dépendante de la taille de l'événement analysé et de la densité de molécules à sa surface. Le nombre d'éléments analysés peut également être compté avec précision. Elle est multiparamétrique : plusieurs signaux peuvent être analysés simultanément.

## 2. Principes de la cytométrie

La reconnaissance des cellules a été largement développée grâce à l'utilisation de la fluorescence. Les molécules fluorescentes excitées par une source de lumière à une longueur d'onde donnée émettent un signal lumineux d'une autre longueur d'onde. Leur application en cytométrie est limitée par la disponibilité des sources lumineuses utilisées. En microscopie, presque tout le spectre de l'UV au rouge profond est utilisable par filtration d'une source à large spectre. En CMF, les sources sont représentées par des lasers à une seule longueur d'onde chacun. Les plus courants sont des lasers à argon (bleus ; 488 nanomètres – nm –, laser), lasers à hélium-néon (rouges, 633 nm) et lasers ultra-violet (355 nm). Plus récentes, des diodes permettent des excitations violettes (405 nm) ou vertes (532 nm). Les cytomètres peuvent utiliser plusieurs sources d'excitation en même temps, en parallèle. Les instruments les plus récents utilisés dans les laboratoires de diagnostics utilisent deux à trois lasers. En recherche, certains appareils ont 4 ou 5 lasers.

Figure 1 – Différents fluorochromes utilisés en CFM, avec leurs spectres où ils peuvent être excités (en gris) et spectres qu'ils émettent (en couleur) en nm.



Archives de BD Biosciences.

De très nombreuses molécules fluorescentes sont disponibles. Elles sont caractérisées par leurs spectres d'excitation et d'émission (*figure 1*) et leurs propriétés physico-chimiques. Par exemple, la fluorescéine est excitée autour de 488 nm (bleu) et émet une lumière verte (pic à 525 nm). Certaines molécules fluorescentes sont directement utilisables par leurs capacités à se fixer de façon relativement spécifique à certains constituants cellulaires par exemple les acides nucléiques (ex : iodure de propidium - IP) ou de constituants membranaires (ex : carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE) ou PKH26).

Des molécules peuvent changer de couleur en fonction des conditions de leur environnement : selon le pH comme le bis carboxyéthyl carboxy fluorescéine (BCECF) ou le contenu en calcium comme le fluo-4, l'activité mitochondriale comme le tétraméthylrhodamine méthyl ester (TMRM).

Enfin, des molécules sont utilisées comme révélateurs, en couplage avec des ligands spécifiques. Les plus utilisées sont la fluorescéine (FITC, émission verte, pic maximum à 525 nm), la phycoérythrine (PE, émission orange, pic à 575 nm), les cyanines (Cy3, Cy5, Cy7 émission rouge) et les alexas. Le nombre de molécules excitables par un même laser est assez restreint. Des tandems de molécules élargissent les possibilités. Elles consistent à l'association de deux molécules, la première molécule (souvent PE) est activée par le laser. Elle émet une lumière qui active le deuxième fluorochrome qui émettra une couleur de longueur d'onde différente. Ce procédé s'appelle FRET qui signifie « fluorescence par résonance de transfert d'énergie ».

Plus récemment, des molécules physiologiques ont pu être marquées par génie génétique avec une molécule fluorescente comme la green fluorescent protein (GFP) et ses dérivés. Leur expression par la cellule est donc directement mesurable.

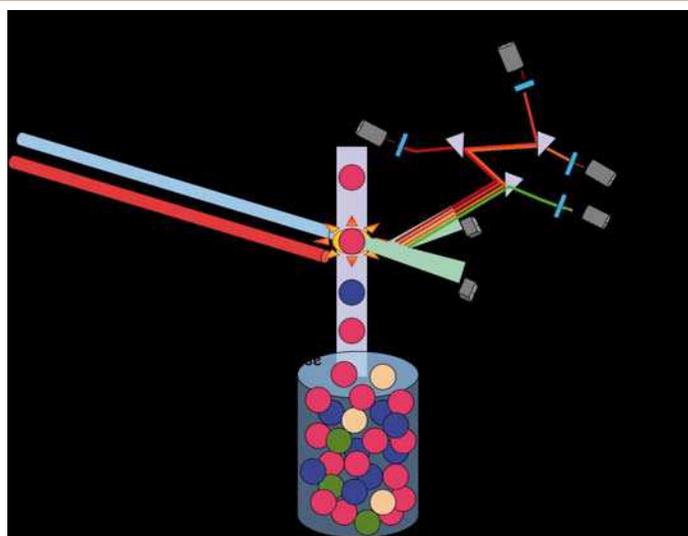
Les fluorochromes peuvent être couplés à des anticorps monoclonaux ou des ligands de récepteurs pour détecter la présence de la molécule sur ou dans la cellule. La liste des anticorps disponibles dans le commerce est extrêmement étendue. Les spécificités les plus connues sont codées internationalement (clusters de différenciation CD). Pour les anticorps les plus utilisés, beaucoup de couplages de différentes couleurs sont disponibles, prêts à l'emploi. Il suffit de faire son choix de combinaisons. Il est également possible de fabriquer ses propres couplages ou de demander des couplages à façon à des sociétés de service.

Les applications de la cytométrie en biologie médicale sont essentiellement développées à partir de la CMF et nous nous limiterons à analyser cette technique.

### 3. Données techniques (*figure 2*)

Le passage des cellules ou particules devant le faisceau laser entraîne une diffusion de la lumière en fonction de leurs caractères physiques. Le signal est capturé par deux photodiodes. La première est disposée dans le prolongement du laser (forward scatter, FSC) à faible angle. Le signal capté reflète approximativement la taille de la cellule. La seconde est placée latéralement, à 90° (side scatter, SS). Le signal capté reflète l'hétérogénéité des cellules (granularité du cytoplasme). Les cellules éventuellement marquées avec des fluorochromes émettent des signaux de différentes

Figure 2 – Schéma technique du cytomètre en flux.



Excitation des cellules par deux ou trois sources lasers. Injection monodispersée de cellules dans le flux hydraulique ; analyse de la dispersion de la lumière par des photodiodes (en ligne FSC et latéralement SSC). Capture de la fluorescence émise par les photomultiplicateurs (PMT) après redirection et sélection des longueurs d'ondes par des miroirs dichroïques et des filtres.

longueurs d'onde, triés par des jeux de miroirs sélectifs (dichroïques) et filtres (en ligne ou en étoile) et capturés par des photomultiplicateurs (PMT).

Le signal fluorescent émis par les cellules marquées est relatif. Le principe est de comparer le signal émis par la cellule en présence d'un marqueur spécifique au bruit de fond émis par les cellules seules (auto-fluorescence) ou incubées avec un marqueur non spécifique conjugué au même fluorochrome (marquage non spécifique). Le plus souvent, la référence est un anticorps de même isotype, même source, même fabricant mais sans spécificité (contrôle isotypique). La très forte amplification du signal permet de détecter une fluorescence non spécifique répartie en courbes en cloche. Le signal spécifique a généralement aussi une répartition en cloche mais il peut être de 100 à 1 000 fois plus fort. Dans les meilleurs cas qui sont très fréquents, il est aisé de distinguer les deux répartitions de signaux avec une vallée très nette entre les deux courbes. La fréquence de cellules « positives » est alors considérée. L'intensité de marquage sur les cellules marquées peut aussi être prise en compte (moyenne de fluorescence, MFI). Il existe des cas où la détermination de positivité n'est pas aussi nette, soit parce que le marqueur analysé est exprimé en faible quantité sur la cellule, soit parce que l'anticorps conjugué est de mauvaise qualité. Le signal positif correspond seulement à un glissement (shift) du pic de signal. Il est alors plus objectif de comparer le ratio positif/négatif.

La distinction entre les couleurs peut poser des problèmes techniques d'autant plus compliqués que le nombre de couleurs analysées simultanément est grand. La capture du signal est limitée par les filtres à une bande passante. Il n'est pas possible d'utiliser des bandes trop étroites car le signal serait trop faible. Les couleurs émises ont un spectre d'émission relativement large qui peut chevaucher,

en marge, dans la bande d'un autre signal adjacent. Ces chevauchements de spectres induisent du signal non spécifique sur les autres détecteurs. Par exemple, l'utilisation d'un anticorps couplé à de la PE émet un fort signal sur le détecteur rouge. Mais une faible proportion de ce signal est également détectée sur le détecteur du vert et sur le détecteur du rouge profond. Ces artefacts sont corrigés par traitement mathématique (compensations de fluorescence). Le réglage des compensations est un problème délicat en cytométrie. Il existe des procédures assistées par ordinateur pour les marquages courants. Cependant, pour un marquage donné, si le réglage des détecteurs et des compensations est correctement appliqué, il reste très stable pendant plusieurs mois et l'analyse est hautement robuste et fiable si des procédures de contrôles de qualité sont pratiquées avec rigueur. Dans notre expérience, nous voyons des résultats très proches chez des patients qui ont des bilans annuels.

Les analyses étant pratiquées dans un flux liquide, il est difficile de maîtriser le volume du liquide de l'échantillon qui est analysé et donc d'en déduire le compte des cellules. Cette difficulté a été solutionnée par l'utilisation d'un standard interne qui permet par calcul de déterminer la concentration exacte de cellules mesurées. Quelques instruments garantissent le volume analysé en utilisant des systèmes de seringues micrométriques.

La combinaison des sources lumineuses et des fluorochromes permet d'analyser couramment deux, trois, jusqu'à huit marquages simultanés. Sur certains instruments de recherche, il a été possible d'utiliser jusqu'à 17 marquages simultanés sur chaque cellule.

Les cytomètres ont des performances exceptionnelles. Ils sont très précis, extrêmement sensibles et rapides. Le seuil de détection de molécules sur chaque cellule est très bas : de l'ordre de 5 000 molécules par cellule. Il est possible d'analyser un très grand nombre de cellules : entre 1 000 et 500 000 cellules; ce qui donne des résultats fiables. L'analyse est à grande vitesse de 500 à 50 000 cellules par seconde. Enfin, l'analyse est objective et, comme nous l'avons vu, quantitative et multiparamétrique.

La CMF est utilisée dans de nombreux laboratoires hospitaliers. Il existe trois à quatre fournisseurs principaux qui proposent des instruments avec un à trois lasers, trois à neuf détecteurs de couleur. Le passage des échantillons peut être automatisé par l'utilisation de passeur de tubes ou de prise sur des plaques à 96 puits. La préparation peut être également automatisée pour les grandes séries. Les cytomètres d'analyse sont des instruments de paillasse dont la taille varie entre 50 cm et un mètre de long, 50 à 90 cm de profondeur et de hauteur. À cela, il faut ajouter l'encombrement dû à l'environnement informatique et le système de compresseur pour les mouvements des fluides. De nouveaux systèmes apparaissent qui sont de plus en plus miniaturisés jusqu'à des biopuces [2].

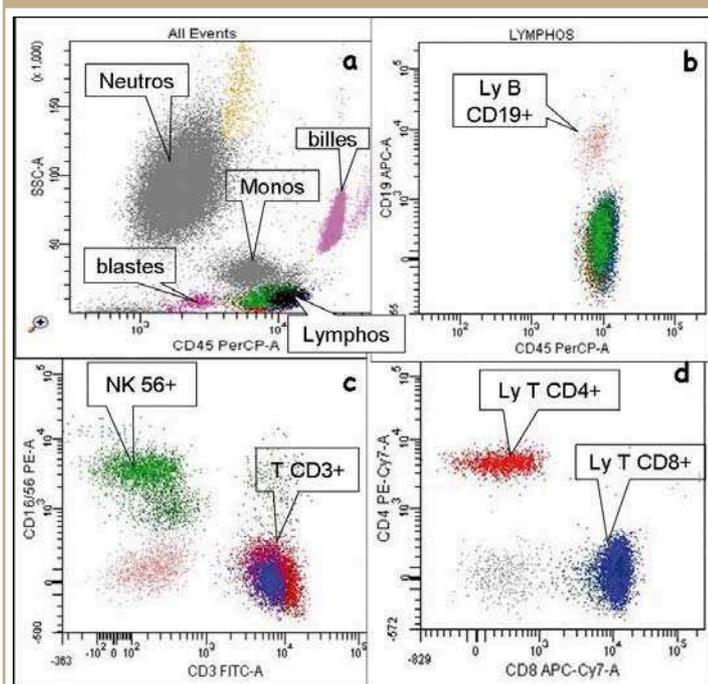
Il y a également des systèmes plus élaborés qui sont équipés d'un système de tri. Les cellules sont d'abord identifiées dans la cellule d'analyse puis elles sont récupérées par déviation de gouttelettes du flux à l'aide de vibrations et de champs piézo-électriques. Les instruments les plus modernes permettent de trier 4 sous-populations cellulaires en même temps. Ces instruments trieurs sont plus délicats à utiliser et nécessitent généralement un manipulateur ingénieur spécialisé [1].

Il existe d'autres méthodes de diagnostic récentes de haute technologie. La biologie moléculaire permet de mesurer de très faibles quantités d'acide nucléique pouvant provenir de très petits nombres de cellules puisqu'il est extrêmement amplifié. Elle peut être de très grande utilité dans les analyses de cellules tumorales, cellules infectées, d'activation cellulaire, de typage. Cependant, la biologie moléculaire beaucoup plus sensible que la cytométrie ne permet qu'une analyse globale de la population cellulaire dans le tube et donne un résultat moyenné de la population alors que la CMF propose des statistiques de données individuelles de la population.

Tous les types cellulaires peuvent être analysés par CMF. Les cellules idéales sont les lymphocytes qui ont la taille adaptée et sont très homogènes. Ils ont un faible contenu cytoplasmique, ce qui minimise le signal parasite. Il existe de nombreux outils d'immunomarquage pour les caractériser. L'analyse des granuleux est plus délicate du fait de leur fort contenu cytoplasmique source de signaux parasites et de leur grande fragilité.

L'application la plus courante dans les laboratoires d'immunologie est le compte des lymphocytes T (*figure 3*) notamment pour le suivi des infections à HIV ou de greffes. La technique est relativement simple et très robuste. Brièvement, un échantillon (50 à 100 µl) de sang est prélevé du tube, incubé avec des anticorps qui identifient les lymphocytes T CD4+ qui expriment CD3 et CD4. Il est possible d'ajouter dans la même analyse un marqueur pour les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B (CD19

Figure 3 – Séméiologie typique d'analyse lymphocytaire.



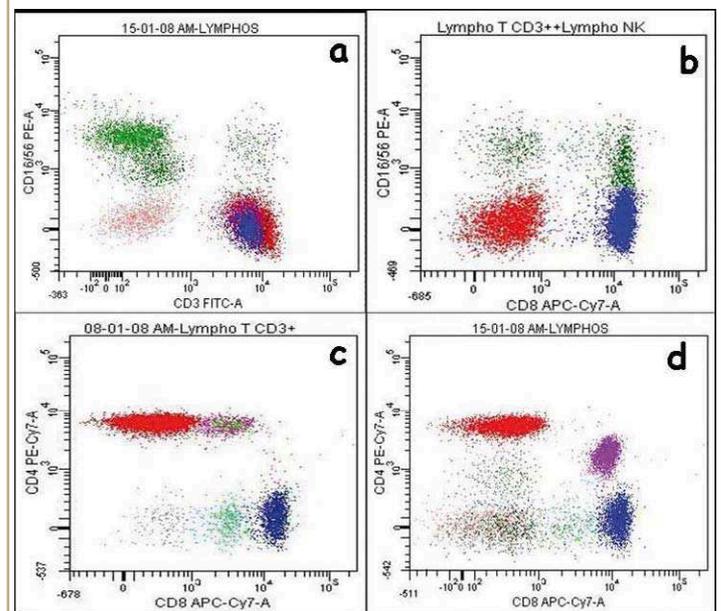
a) distribution des leucocytes ; b) sélection des lymphocytes B (CD19+) ; c) sélection des lymphocytes T (CD3+) et des NK (CD3-CD56+) ; d) et sélection des sous-populations lymphocytaires T CD4+ ou T CD8+.

ou CD20), les lymphocytes NK (CD56) voire CD16 (neutrophiles) et CD14 ou CD15 (monocytes). Enfin, CD45 (qui marque tous les leucocytes) est souvent utilisé pour mieux démarquer le signal du bruit de fond.

La CMF est la méthode la plus fiable de comptage des lymphocytes T [3]. Elle est rapide : maximum 30 minutes de préparation pour une à trois minutes d'analyse. L'utilisation simultanée de plusieurs paramètres permet une identification très précise des cellules comptées. Par exemple, les lymphocytes T qui expriment CD4 sont clairement distingués des monocytes qui expriment également CD4 (bien qu'en densité beaucoup plus faible) mais pas CD3. Ainsi, les lymphocytes T CD4+ conventionnels qui expriment CD3 et CD4 correspondent à 66 % des T du sang périphérique chez l'adulte en bonne santé (775-1450 cell/ $\mu$ L, dans notre laboratoire). Les lymphocytes T CD8 qui expriment CD3 et CD8 (33 % des T ; 290-765 cell/ $\mu$ L) sont également clairement identifiés. Le rapport entre ces deux sous-populations est de 2/3 à 1/3. Les résultats peuvent être directement transmis électroniquement au système de gestion informatique du laboratoire voire au dossier électronique du patient après validation biologique. En revanche, l'utilisation simultanée de ces trois anticorps et l'analyse d'un très grand nombre de cellules permet d'observer des sous-types rares et encore très méconnus (*figure 4*) : une petite fraction (< 2 %) de lymphocytes T CD4 exprime de faibles quantités de CD8 (T CD4+CD8dim) [4]. Inversement une petite fraction (< 3 %) de lymphocytes T CD8 exprime de faibles quantités de CD4 (TCD8+CD4dim) [5]. Une autre fraction (< 7 %) de lymphocytes T CD8 exprime une quantité normale de CD3 mais du CD8 en quantité très diminuée (de l'ordre de 1/4 à 1/8 de la quantité normalement exprimée). Enfin, il existe des lymphocytes T qui n'expriment ni CD4 ni CD8. En ajoutant CD56 à cette combinaison, il est possible d'identifier et d'énumérer les lymphocytes NK qui expriment du CD56 mais pas de CD3. Une petite fraction de NK exprime de forts niveaux de CD56 et serait moins cytotoxique mais producteur de cytokines. Mais certains lymphocytes T CD8+ authentiques peuvent aussi exprimer CD56 et pourraient être très cytotoxiques.

Des anticorps permettent de distinguer des lymphocytes T qui expriment les récepteurs (TCR) de type alpha-bêta (lymphocytes T $\alpha\beta$ ) ou de type gamma-delta (lymphocytes T $\gamma\delta$ ). Les lymphocytes T $\gamma\delta$  sont minoritaires dans le sang périphérique de donneurs sains (de 2 à 10 % des T) mais très nombreux dans les muqueuses [6]. Ils n'expriment jamais CD4 mais peuvent exprimer CD8 et parfois CD56. Les lymphocytes T $\gamma\delta$  sont un peu rudimentaires, peu discriminants et peu diversifiés, entre réponse spécifique et innée. Ils ne reconnaissent pas des peptides mais des glycolipides bactériens, fongiques ou tumoraux. Ils peuvent être cytotoxiques ou modulateurs. Ils sont impliqués dans des pathologies des muqueuses comme l'asthme ou les maladies inflammatoires de l'intestin. Ils ont également une activité de protection contre le cancer. Certaines infections comme le cytomégalovirus (CMV) peuvent induire de très fortes réponses lymphocytes T $\gamma\delta$  qui persistent plusieurs années [7]. Il a été montré qu'une telle réaction était associée à une plus faible incidence de tumeurs chez des greffés rénaux [7]. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Figure 4 – Séméiologie de quelques phénotypes non conventionnels qui peuvent être observés dans les analyses lymphocytaires.



a) double population NK CD56 fort ou faible ; b) population T CD8+ exprimant le CD56 ; c) T CD4+ exprimant du CD8 (T CD4+CD8dim) ; d) T CD8+ exprimant du CD4 (T CD8+CD4dim).

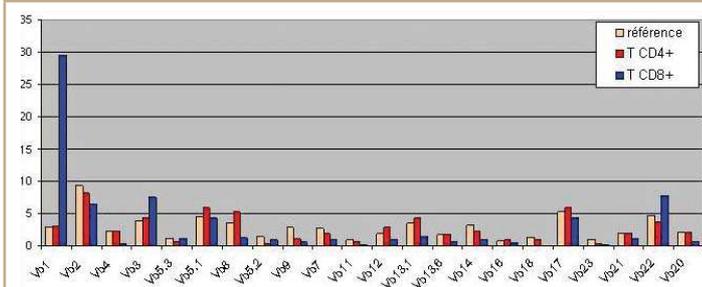
ont aussi une activité importante dans l'organogenèse et la cicatrisation [8]. La stimulation prolongée par un virus comme le CMV pourrait être à l'origine de syndromes lymphoprolifératifs [9].

Si ces sous-populations non conventionnelles sont rares chez le sujet en bonne santé, elles peuvent être très augmentées (jusqu'à 20-30 % des lymphocytes) dans certaines pathologies [4, 5]. Le même raisonnement pourrait être tenu pour les lymphocytes B circulants et pour les lymphocytes NK, pour lesquels de nombreuses sous populations sont également décrites.

Nous n'avons évoqué que des analyses de lymphocytes dans le sang périphérique. Les hématologues s'intéressent beaucoup à la moelle pour les diagnostics précoces d'hémopathies ou de leur maladie résiduelle après traitement. Il est également possible et serait probablement très intéressant d'analyser finement la répartition des cellules dans des liquides biologiques comme les lavages broncho-alvéolaires, les épanchements pleuraux ou les ascites [10, 11]. Il est aussi possible de le faire sur des tissus inflammatoires ou ganglions après dilacération. Ces méthodes devraient permettre de mieux identifier le type de réponse immunitaire et aider à la caractérisation de syndromes qui sont encore « monitorés » de façon très approximative.

Il est possible d'aborder la diversité des clones lymphocytaires T dans chaque sous population (TCD4+, TCD8+) en analysant les clonotypes V des chaînes du récepteur des lymphocytes T (TCR) [4, 5, 12]. Il existe actuellement entre 20 et 30 anticorps disponibles pour l'identification de la partie variable de la chaîne  $\beta$  du TCR. L'analyse dans 7 à 9 tubes différents de la diversité du répertoire V $\beta$

**Figure 5 – Diversité des chaînes bêta du récepteur TCR (portion V) sur les lymphocytes T CD4+ (rouge) et T CD8+ (bleu).**



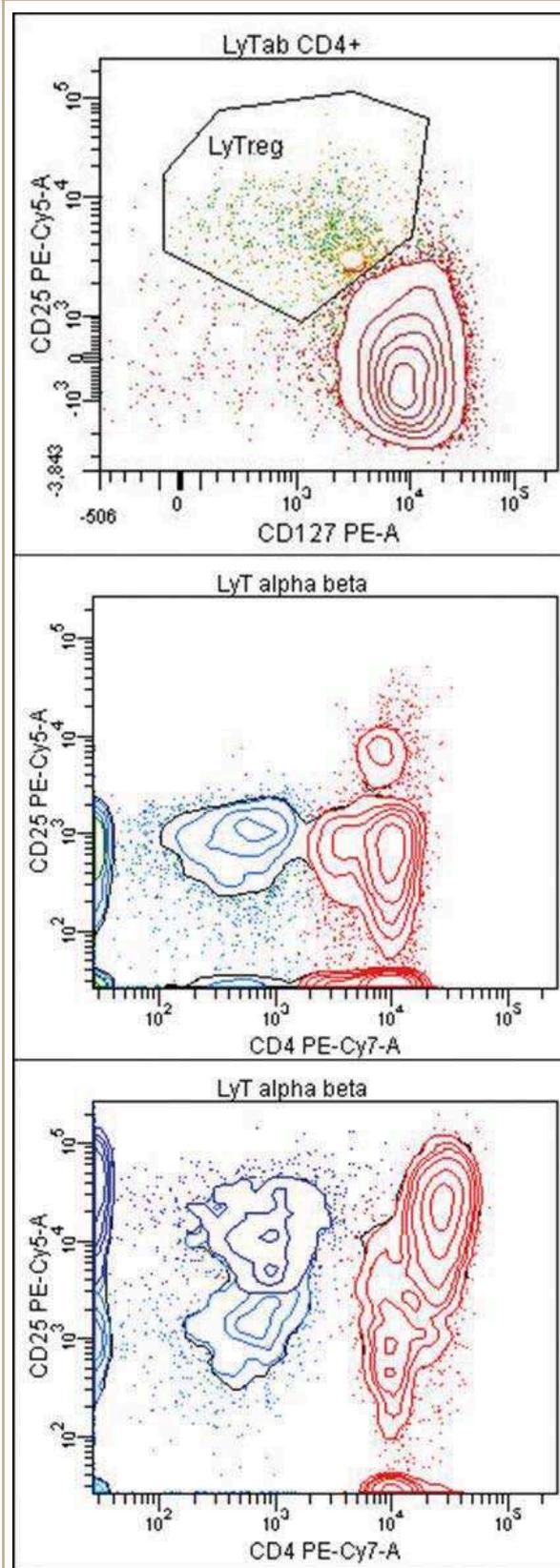
Exemple de présence d'une population monoclonale T CD8+ Vbéta1 de signification indéterminée.

permet d'identifier d'éventuelles proliférations monoclonales (figure 5) et d'en déterminer le phénotype par exemple les lymphocytes T CD4 dans la maladie de Sézary ou la prolifération de populations minoritaires monoclonales de signification indéterminée (OCUS) [4, 5], comparables aux dysglobulinémies monoclonales bénignes (MGUS) des lymphocytes B [11].

Il est encore possible d'utiliser des paramètres fonctionnels comme par exemple CD25 qui est une des chaînes du récepteur de l'interleukine 2 exprimée par des lymphocytes activés. En général, les lymphocytes T circulants n'expriment pas de marqueurs d'activation. Mais en fait, une minorité (< 2 %) de lymphocytes T CD4 (CD3+CD4+) circulants exprime de façon permanente CD25, associé à l'expression de niveaux réduits de récepteur d'IL-7 (CD127) qui facilite leur identification [13]. Il a été maintenant largement démontré que ces lymphocytes T CD4+CD25+CD127- avaient une très forte activité inhibitrice, en produisant notamment des cytokines immunosuppressives comme l'interleukine-10 et le TGF- $\beta$ . Ces lymphocytes T régulateurs (Treg) jouent un rôle très important dans plusieurs situations de tolérance immunologique comme la grossesse, les tumeurs ou les greffes. Leurs taux sont fréquemment diminués dans certaines pathologies inflammatoires chroniques comme les maladies auto-immunes. Il faut noter que l'expression de CD25 sur les lymphocytes T CD4 n'est pas absolument spécifique des lymphocytes T régulateurs. D'autres marquages ont été proposés comme l'expression d'un marqueur nucléaire : Fox P3.

La CMF permet également de faire des tests de fonctionnalité des cellules (figure 6). La mise en culture de lymphocytes avec des stimulants non spécifiques, des antigènes infectieux ou vaccinaux par exemple, induit une réponse immunitaire *in vitro*. La capacité de réponse cellulaire peut être mesurée par l'expression de marqueurs d'activation comme CD25 mais également CD69 et d'autres [14]. L'analyse est très précise et permet de déterminer exactement le type de cellules activées (CD4 plus souvent que CD8), si ces lymphocytes sont naïfs, effecteurs ou mémoires. Il est possible d'identifier les cytokines produites par chaque cellule, en capturant les cytokines dans le cytoplasme [15]. La haute sensibilité permet de rechercher des stimulations de lymphocytes spécifiques d'un peptide, cellules rares représentant moins de 1 % les lymphocytes totaux, en

**Figure 6 – Lymphocytes T exprimant.**



a) constitutivement du CD25 et CD 127 faible (Treg) au repos ; b) après 24 h de culture sans stimulant ; c) avec stimulant non spécifique (en rouge lymphocytes T CD4+, en bleu T CD8+).

utilisant des peptides purifiés, couplés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité [16]. La stimulation peut être détectée dès 24 heures, la prolifération dès 48 heures. Il est également possible de mesurer le nombre de divisions cellulaires en suivant les dilutions de moitié (division d'une cellule mère en 2 cellules filles) d'un marquage initial des cellules (CFSE, PKH26) [17, 18]. Après stimulation, un lymphocyte T peut se diviser 6 à 8 fois en moins de 10 jours. Le test historique de transformation lymphoblastique (TTL) par incorporation de nucléotides radioactifs dans l'ADN (tests à la thymidine tritiée) n'a plus aucun sens : il nécessite 7 jours de manipulation, utilise des produits radioactifs très toxiques et ne permet pas de distinguer le type cellulaire qui est activé. De plus, il détecte très difficilement les activations d'une faible quantité de lymphocytes spécifiques.

Il est possible par CMF de tester la cytotoxicité. En bref, des cellules cibles (tumorales ou infectées) sont marquées avec un fluorochrome (CFSE, PKH26) et incubées avec des leucocytes plus ou moins purifiés selon les objectifs. Après 24 et 48 heures d'incubation, il est possible de mesurer la fraction de cellules cibles qui a survécu [19], d'identifier les lymphocytes impliqués et les différents mécanismes de cytotoxicité. Cette technique reste encore délicate. Le test de cytotoxicité historique qui consistait à mesurer l'éclatement de cellules tumorales par libération de chrome 51 radioactif est trop imprécis et toxique pour être encore justifié.

D'autres nombreuses applications de tests fonctionnels des cellules peuvent être appliqués en CMF : il est possible de déclencher des réactions allergiques immédiates par incubation des basophiles avec des allergènes [20, 21]. Ce test est rapide, incomparablement précis par rapport aux tests historiques de dégranulation des basophiles interprétés au microscope, moins coûteux que les tests de libération de l'histamine. Cette méthode permet de tester plusieurs molécules, d'analyser les réactions croisées. Elle permet d'étudier des molécules potentiellement toxiques interdisant les tests cutanés chez le patient. Enfin, elle ne comporte aucun risque de choc anaphylactique contrairement aux tests de provocation chez le patient.

La capacité de phagocytose des monocytes et des polynucléaires peut être mesurée en mettant en culture les leucocytes avec des bactéries ou des billes de latex fluorescentes et en mesurant la proportion d'éléments ingérés par la cellule [22]. Il est possible également de mesurer la capacité de destruction des bactéries après phagocytose (mesure de l'activité oxydative).

Le cycle cellulaire peut être étudié en CMF par mesure du contenu en ADN des cellules, en utilisant de l'iodure de propidium, agent intercalant de l'ADN. La grande majorité des cellules saines est en phase de repos (Go-G1). Les cellules en mitose ou phase G2 ont exactement la double quantité d'ADN. Les cellules en apoptose en ont moins. Les clones avec aberration chromosomique ont un second pic Go-G1 et son corolaire en G2-M [23, 24].

Enfin, il est également possible d'analyser les étapes très précoces de mort cellulaire par apoptose [25] dans des maladies génétiques, des maladies inflammatoires, toxiques ou dans des syndromes prolifératifs et tumeurs. Ces techniques permettent également de mesurer la

sensibilité des cellules aux traitements cytotoxiques. Elle est très utilisée dans la recherche de nouvelles drogues cytotoxiques.

## 4. Les indications médicales courantes

En immunologie, le compte des leucocytes est très utile pour le suivi des déficits immunologiques constitutionnels ou acquis d'origine infectieuse (sida) ou toxique (immunosuppresseur, intoxication, cytopénie induite par des médicaments). Beaucoup de types de déficits immunitaires génétiques peuvent être identifiés. Il permet de suivre l'efficacité/toxicité des traitements immunosuppresseurs dans les maladies auto-immunes ou inflammatoires chroniques. Les tests fonctionnels peuvent aider au diagnostic des infections chroniques ou opportunistes, ou à évaluer le risque de complications infectieuses. Certains états de stress peuvent être à l'origine de déficit de réponse immunitaire (immunoparalysie) qui favorise les infections nosocomiales [26]. Cet état est très fréquent dans les services de soins intensifs suite à la traumatologie ou la chirurgie lourde.

Le deuxième champ d'application médicale de la CMF concerne le typage de toutes les hémopathies [27]. En utilisant des combinaisons de marqueurs, il a été possible de caractériser très précisément un grand nombre de types de leucémies aiguës, leucémies chroniques et lymphomes. Les cellules leucémiques peuvent être également identifiées par leurs caractères aberrants de marqueurs de surface : changement d'intensité du marquage, combinaison inappropriée pour la lignée ou le stade de maturité. Les hémopathies ont largement bénéficié des progrès de la CMF pour leur caractérisation précise et leur suivi (maladie résiduelle après traitement, récidence). De nouveaux phénotypes ont été décrits et corrélés avec des analyses de biologie moléculaire, des anomalies caryotypiques et des réponses aux protocoles thérapeutiques. Ces analyses sont réalisées sur du sang périphérique, sur de la moelle ou des ganglions remis en suspension. Ce domaine est plutôt réservé aux laboratoires d'hématologie et n'a pas été développé dans cette revue.

De nouvelles applications sont en cours de développement.

Le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) peut être porté par l'analyse de l'expression des récepteurs associés à une glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la surface des neutrophiles, monocytes ou globules rouges [28, 29]. L'HPN est une pathologie rare qui induit des crises d'hémolyse, d'hémoglobinurie et un risque augmenté d'hémopathies. L'HPN est liée à une anomalie génétique liée à l'X du gène PIG-A codant pour l'enzyme responsable de la biosynthèse de la partie lipidique nécessaire à l'ancrage des protéines dans la membrane cellulaire. Une douzaine de récepteurs sont concernés, presque tous impliqués dans la régulation de l'activation du complément, tels que CD55 et CD59. Le déficit est souvent clonal. Il empêche l'expression de ces protéines sur les cellules issues du clone pathologique permettant des activations inappropriées du complément et la lyse

cellulaire. Ce déficit peut être analysé par cytométrie en flux, en mettant en évidence une diminution d'expression membranaire de CD55 et CD59 sur les globules rouges et les monocytes, par exemple. Il existe actuellement un anticorps monoclonal thérapeutique qui bloque l'activation du C5 (eculizumab) [28].

Les études sur des cellules de tumeurs solides dans des liquides biologiques (épanchements..) ou après dilacération de tumeurs sont encore peu développées. Il est possible d'analyser l'expression de récepteurs de facteurs de croissance, hormone ou de marqueurs d'agressivité [30].

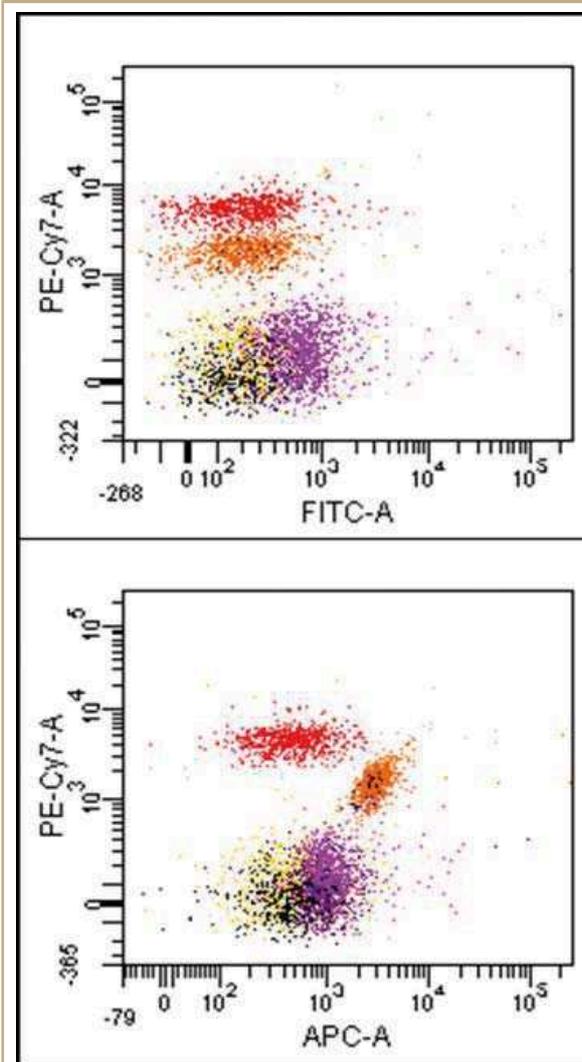
L'application de la CMF s'étend à des cellules procaryotes comme les parasites, les moisissures, les bactéries (< 1 µm) voire à des particules virales (< 0,1 µm) [31]. Ces applications sont très utiles dans l'industrie pharmaceutique (production de vaccins) et l'agro-alimentaire (qualité de préparations, contamination de jus de fruits, caractérisation du vin).

L'analyse de grands nombres d'éléments rend possible l'identification de très petites minorités cellulaires (< 0,01 % de cellules). C'est la problématique très délicate des « événements rares » qui fait l'objet de projets de recherche clinique [32] : détection dans le sang périphérique ou dans la moelle de cellules souches CD34+ pour la greffe ; de cellules dendritiques [33] ; de cellules fœtales chez la mère ; de cellules métastatiques de tumeurs solides ; plus récemment de cellules endothéliales dans les pathologies vasculaires. La mise en évidence de cellules leucémiques résiduelles après traitement dont la valeur pronostique de maladie résiduelle est démontrée [34] a permis de mieux préciser et d'abaisser les critères de guérison des patients ou d'adapter les protocoles thérapeutiques pour obtenir de meilleurs résultats. Le diagnostic très précoce des récidives devrait aussi améliorer leur prise en charge. Dans ces applications, la CMF est moins sensible mais plus précise que la biologie moléculaire.

## 5. Autres applications

De façon surprenante, la CMF a eu d'autres types de développement dans le cadre du diagnostic immunologique. En effet, les cytométristes utilisent beaucoup de billes qui ont approximativement la taille des cellules pour la standardisation et la validation de leurs méthodes. Récemment, il a été proposé d'utiliser des billes à la place des cellules pour faire des détections immunologiques (figure 7). En bref, chaque bille est utilisée comme support de test sandwich. Les billes sont incubées dans l'échantillon, l'antigène capturé est détecté par un second anticorps qui est couplé à un fluorochrome et mesuré par CMF [35-37]. Le test pratiqué sur 100 à 500 microbilles pour chaque échantillon est très sensible et très fiable. La gamme de valeurs s'étend sur plusieurs logs. Le test n'a que deux étapes et est très rapide. De plus, en utilisant des billes colorées par des fluorochromes, il est possible d'utiliser plusieurs tests en même temps. Les billes préparées pour différents immunodosages et colorées différemment sont mélangées avec l'échantillon dans le même tube. L'anticorps de révélation est ajouté après lavage. Les différents immunodosages sont identifiés sur la couleur des billes avec un photo-détecteur. La quantité d'antigène capturé est détectée avec un autre photo-détecteur. Il est ainsi relativement facile d'analyser entre 6 et 12 cytokines

Figure 7 – Exemple d'immunodosages multiples sur billes.



3 dosages simultanés (billes rouges, oranges et violettes). Contrôles en noir. Déviation des billes vers la droite selon la quantité d'antigène capturé sur chaque bille.

ou facteurs solubles simultanément dans un échantillon de très petit volume (de 25 à 100 µl) et dans un temps très court (moins d'une heure). Certains systèmes proposent jusqu'à 100 analyses simultanées. Les billes sont distinguées alors par la combinaison de deux couleurs, ce qui nécessite des réglages très délicats, des cytomètres sont en général développés spécifiquement pour cette application. Il reste à déterminer le nombre et le choix des analyses simultanées qui pourraient avoir un intérêt clinique [38].

## 6. Limites de la CMF en diagnostic

Le champ d'adaptation de la cytométrie est donc très large mais il reste encore des difficultés. Comme nous l'avons vu, les réglages du cytomètre et les déterminations des populations positives ou négatives comportent encore une part de

subjectivité et de dépendance de l'opérateur. Un travail de standardisation internationale a été élaboré pour la numération des lymphocytes T CD4+ pour le suivi des infections par HIV mais il reste à faire pour tous les tests fonctionnels et les populations non conventionnelles. Il existe actuellement plusieurs groupes de travail à l'échelle européenne, voire mondiale, pour essayer de standardiser les procédures et pour pouvoir mieux comparer les résultats de ces tests.

Les difficultés de réglage font que les analyses à plus de 4 couleurs sont encore limitées à des laboratoires très spécialisés. Enfin et surtout, l'augmentation du nombre de paramètres analysés augmente significativement le coût de l'analyse. Ces instruments sont coûteux en investissement, les lasers restent fragiles et les systèmes de fluidiques les plus sophistiqués sont très exposés au bouchage et à l'instabilité du flux. La maintenance de ces appareils est donc coûteuse et cruciale dans les pays émergents qui ont des problèmes de chaleur, poussière, humidité, stabilité de l'alimentation électrique, d'approvisionnement en liquides purifiés, d'achat des réactifs fluorescents coûteux, de maintenance par des ingénieurs spécialisés. Il existe des programmes de développement de systèmes à faible coût et robustes plus adaptés aux analyses dans ces pays. Des appareils ont été aussi développés pour l'océanographie ou l'espace.

## 7. Conclusion

La cytométrie est en plein essor, avec augmentation continue des performances et diminution des difficultés d'utilisation et de maintenance. Elle apporte de nouveaux outils à l'exploration du système immunitaire dont la précision et la quantification devrait permettre de pouvoir suivre de façon objective, reproductible et fiable le système immunitaire dans toute sa complexité. L'utilisation d'un nombre croissant de paramètres permet la découverte de nouveaux sous-types lymphocytaires qui ont des fonctions particulières souvent contradictoires et dont le suivi pourrait avoir un intérêt

en diagnostic. Le grand apport de la CMF en biologie médicale est de pouvoir aborder la grande complexité du système immunitaire, encore trop souvent négligée. Il serait bien ridicule aujourd'hui de considérer que tous les lymphocytes T sont équivalents et de se limiter à suivre leur nombre total. La sociologie de ces populations T est à ses balbutiements et reste encore un champ à défricher. La CMF et le support bio-informatique nous apportent maintenant les moyens extrêmement puissants pour le maîtriser. Le chemin est long et accidenté mais passionnant.

L'utilisation des méthodes historiques approximatives a donné aux immunologistes biologistes le sentiment d'impuissance et d'inutilité dans le support diagnostique et thérapeutique. La cytométrie apporte une nouvelle chance de support pour un suivi rationnel des pathologies, de leurs traitements et peut constituer une véritable révolution en immunologie clinique pourvu qu'on lui accorde suffisamment d'attention et la rigueur qu'elle mérite. Elle ne progressera pas en ayant peur de l'explorer. D'autres domaines plus complexes ont déjà été abordés avec succès par la science moderne.

### Remarque

Il existe des sociétés de cytométrie qui permettent à tous les amateurs de cette technologie de s'échanger des informations et du savoir faire :

- Association française de cytométrie :

[www.afcytométrie.fr](http://www.afcytométrie.fr)

- Société européenne de cytométrie clinique (ESCCA), sociétés internationales, clinique (CCS) ou scientifique et technique (ISAC).

Le prochain congrès européen de cytométrie clinique se déroulera à Saint-Etienne en septembre 2009 ([www.cytometry2009.eu](http://www.cytometry2009.eu)).

## Bibliographie

- [1] Ronot X, Grunwald D, Mayol JF, et al. La cytométrie en flux. In: Ronot X, Grunwald D, Mayol JF, Boutonnat J Editors, Paris/Lavoisier;2007;pp457.
- [2] Sims CE, Allbritton NL. Analysis of single mammalian cells on-chip. *Lab Chip*. 2007;7(4):423-40.
- [3] Lambert C, Iobagiu C, Genin C. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs 4 color staining: a clinical evaluation of a new flowcytometer. *Cytometry B Clin Cytom* 2006;70(1):29-38.
- [4] Lambert C, Ibrahim M, Iobagiu C, et al. Significance of unconventional CD4+CD8dim T cell subsets. *J Clin Immunol* 2005;25(5):418-27.
- [5] Lambert C, Iobagiu C, Genin C. Persistent oligoclonal CD4dimCD8+ T cells in peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;66B:10-17.
- [6] Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5):336-45.
- [7] Pitard V, Roumanes D, Lafarge X et al. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 2008;112(4):1317-24.

- [8] Jameson J, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* 2007;215:114-22.
- [9] Rodríguez-Caballero A, García-Montero AC, Bárcena P, et al. Expanded cells in monoclonal TCR-alpha beta+/CD4+/NKa+/CD8-/-dim T-LGL lymphocytosis recognize hCMV antigens. *Blood* 2008;112(12):4609-16.
- [10] Olteanu H, Wang HY, Chen W, et al. Immunophenotypic studies of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *BMC Clin Pathol* 2008;8(1):13-22.
- [11] Kolopp-Sarda MN, Kohler C, De March AK, et al. Discriminative immunophenotype of bronchoalveolar lavage CD4 lymphocytes in sarcoidosis. *Lab Invest* 2000;80(7):1065-9.
- [12] MacIsaac C, Curtis N, Cade J, Visvanathan K. Rapid analysis of the Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in whole blood. *J Immunol Methods* 2003;283(1-2):9-15.
- [13] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1693-700.
- [14] Fuhrmann S, Streitz M, Kern F. How flow cytometry is changing the study of TB immunology and clinical diagnosis. *Cytometry A* 2008;73(11):1100-6.

- [15] Arora SK. Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. *Methods Cell Sci* 2002;24(1-3):37-40.
- [16] Li Pira G, Kern F, Gratama J, et al. Measurement of antigen specific immune responses: 2006 update. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(2):77-85.
- [17] Caruso A, Licenziati S, Corulli M, et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 1997;27(1):71-76.
- [18] Wallace PK, Muirhead KA. Cell tracking 2007: a proliferation of probes and applications. *Immunol Invest* 2007;36(5-6):527-61.
- [19] Betts MR, Brenchley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281(1-2):65-78.
- [20] Lambert C, Guilloux L, Dzviga C, et al. Flow-cytometry versus histamine release tests analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to hymenoptera venom. *Cytometry* 2003;52B(1):13-9.
- [21] Beauvillain C, Drouet M, Renier G. Le test d'activation des basophiles. *Rev Fr Lab* 2008;404:67-77.
- [22] Vander Top EA, Perry GA, Gentry-Nielsen MJ. A novel flow cytometric assay for measurement of in vivo pulmonary neutrophil phagocytosis. *BMC Microbiol* 2006;6:61-8.
- [23] Li G, Cottier M, Sabido O, et al. The in vivo DNA aneuploidization during expansion of conventional renal cell carcinoma. *In Vivo* 2002;16(5):341-4.
- [24] Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM, et al. Contribution of DNA ploidy image cytometry to the management of ASC cervical lesions. *Cancer* 2008;114(4):263-9.
- [25] Macnamara B, Palucka KA, Porwit-MacDonald A. Balance between proliferation and apoptosis in leukemic cell lines resistant to cytostatics. *Leuk Lymphoma* 1999;36(1-2):179-89.
- [26] Döcke WD, Höflich C, Davis KA, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005;51(12):2341-7.
- [27] Drenou B, Fardel O, Fauchet R, et al. Flow cytometry: application for the diagnosis and the follow-up of hematological malignancies. *Ann Biol Clin* 2002;60(6):663-72.
- [28] Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev* 2008;22(2):65-74.
- [29] Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(5):291-8.
- [30] Li G, Passebosch-Faure K, Lambert C, et al. The expression of G250/MN/CA9 antigen by flowcytometry : its possible implication for detection of micrometastatic renal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7(1):89-92.
- [31] Klouche M, Schröder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(7):888-908.
- [32] Donnenberg AD, Donnenberg VS. Rare-event analysis in flow cytometry. *Clin Lab Med* 2007;27(3):627-52viii.
- [33] Della Bella S, Giannelli S, Taddeo A, et al. Application of six-color flow cytometry for the assessment of dendritic cell responses in whole blood assays. *J Immunol Methods* 2008;339(2):153-64.
- [34] Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008;12(1):4-16.
- [35] Hsu HY, Wittemann S, Schneider EM, Weiss M, Joos TO. Suspension microarrays for the identification of the response patterns in hyperinflammatory diseases. *Med Eng Phys* 2008;30(8):976-83.
- [36] Vedrine C, Caraion C, Lambert C, et al. Cytometric bead assay of cytokines in sepsis: clinical evaluation. *Cytometry*. 2004;60B(1):14-22.
- [37] de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(1):133-9.
- [38] Lakomya D, Olsson NO. Apport du multiplexage en pratique diagnostique immunologique. *Rev Fr Lab* 2008;404:59-66.

# **Annexe IV**



## Original Articles

## Variability of CD3 Membrane Expression and T Cell Activation Capacity

Fatima-Zahra El Hentati,<sup>1</sup> Frederic Gruy,<sup>1</sup> Cristina Iobagiu,<sup>2</sup> and Claude Lambert<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Engineering and Health, Ecole Nationale des Mines, Saint Etienne, France

<sup>2</sup>Immunology Laboratory, University Hospital, Saint Etienne, France

**Background:**  $\alpha\beta$ T cells have a wide distribution of CD3 membrane density. The aim of this article was to evaluate the significance of the CD3 differential expression on T cell subsets.

Analysis was performed on healthy donors and renal transplant patients by flow cytometry.

The results obtained are: (1) CD3 expression was widely distributed (CV =  $38.3 \pm 3.1$  to  $43 \pm 2.3\%$ ). (2) The CD4, CD8, CD45 and forward scatter were similarly distributed. (3) The diversity of CD3 expression was directly related to the clonotypes:  $\gamma 9$ , non  $\gamma 9$  from  $\gamma\delta$ T cells and V $\beta$  clonotype from  $\alpha\beta$ T cells (e.g., V $\beta$ 3FITC  $7,980 \pm 1,628$  V $\beta$ 8PE: V $\beta$ 20-FITC  $11,768 \pm 1,510$ ). (4) Using a computer simulation, we could confirm differential kinetics of T cell activation according to the initial parameters. Finally, in vitro activation was significantly higher on V $\beta$ 8 and V $\beta$ 9 (high CD3) compared with V $\beta$ 2 and V $\beta$ 3 (low CD3,  $P = 0.040$ – $0.0003$ ).

In conclusion, T cells have highly heterogeneous CD3 expression, possibly predetermined and with clear functional significance. © 2009 Clinical Cytometry Society

**Key terms:** T cells; CD3; membrane density; activation kinetics

How to cite this article: El Hentati F-Z, Gruy F, Iobagiu C, Lambert C. Variability of CD3 membrane expression and T cell activation capacity. *Cytometry Part B* 2010; 78B: 105–114.

During immunization, the T cell receptor (TCR) binds specifically to the peptide-MHC complex if their avidity is appropriate (1–6). The binding is strengthened by co-receptors, such as, CD4 or CD8 (7–9). Signal transduction is carried through CD3 that is physically associated to the TCR (10). The CD3-TCR complex is then internalized inducing a significant decrease of membrane CD3/TCR expression and partial activation leads to a non responsiveness status until the membrane level of CD3 is restored (11–14). A minimal level of TCR/CD3 engagement is required for efficient induction of T cell activation (15–17). If the number of p-MHC is restricted, serial engagement of TCR are possible (18–20). Further TCR/CD3 complexes need to be recruited from outside the synapse through surface transfer but this has to be completed during a short lag time (16,21–23) to be efficient. Activation induces IL-2 production and membrane expression of the  $\gamma$  chain of its receptor [CD25; (24)]. IL-2 binds to the receptor, induces signal and is internalized for subsequent steps of T cell activation. Membrane CD25 expression is correlated with T cell activation (25).

Experimental data have demonstrated that a number of CD3-TCR is crucial for T cell reactivity. It is thought that the starting membrane density is similar between individual T cells. These processes have been mimicked by computational models (26–29) and compared with published data using well described peptides (6). IL2-IL2R complex is rapidly produced up to a peak (zenith) before exponential decline. Testing peptides with different avidity have shown that the delay and height of the stimulation peak directly reflects of the cell capacity for anergy or proliferation (26).

It has been recently shown that CD3 membrane density could be heterogeneously distributed on T cell subsets with a bimodal distribution. Indeed,  $\gamma\delta$ T cells do

\*Correspondence to: Claude Lambert, Immunology Laboratory, Pole Biologie-Pathologie, Hop Nord, CHU, F 42055 ST ETIENNE Cedex 2, France. Eail: [claudelambert@chu-st-etienne.fr](mailto:claudelambert@chu-st-etienne.fr)

Received 30 October 2008; Revision 29 July 2009; Accepted 4 August 2009

Published online 15 October 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.20496

express higher levels of CD3 than  $\alpha\beta$ T cells (30–33) though CD3bright T cells do not include all  $\gamma\delta$ T cells. Peripheral  $\gamma\delta$  T cells have restricted diversity. In healthy donors, the  $\gamma 9$  clonotype is almost exclusively present in blood though in other circumstances, different  $\gamma\delta$  isotypes are present in blood (34–36) and express low CD3 levels. Looking more closely,  $\alpha\beta$ T cells themselves appear to have a wide distribution of their CD3 membrane density and size. This should theoretically influence their capacity to respond (26).

The aim of this article was to examine the significance of differential expression of CD3 on  $\alpha\beta$ T cells observed in healthy donors and immuno-compromised patients.

### PATIENTS AND METHODS

Lymphocyte analysis was performed on samples from 97 healthy adult blood donors and 56 consecutive samples from renal transplant patients, (time from graft 1–15 years). For regulatory reasons, blood donor sample could only be tested the day after withdrawal, whereas patient samples were tested fresh, within 6 h of withdrawal. Functional tests were performed on 10 fresh samples from patients from the cardiology department without immune defect (patients with non severe vascular diseases).

Lymphocytes were immunolabeled in routine practice using a combination of: CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC, IgG1, clone sk7), CD16-phycoerythrin (PE, IgG1, clone B73.1), CD56-PE (IgG1, clone NCAM 16.2), CD45-peridinin chlorophyll protein (PerCP, IgG1, clone 2D1), CD4-PE-cyanin7 (PE-Cy7, IgG1, clone SK3), CD19-allophycocyanin (APC, IgG1, clone SJ25C1), and CD8-APC-cyanin7 (APC-Cy7, IgG1, clone SK1). An alternative labeling was used for  $\gamma\delta$ T cell analysis using: CD3-APC-cyanine 7 (clone sk7), all from BD Biosciences (San Jose, CA) and CD8 $\alpha$ -APC (clone SFC121thyD3), CD4-PE-Cy7 (clone SFC112T4D11), CD8 $\beta$  PE-Cy5 (clone 2ST8.5H7), and either TCR $\gamma/\delta$  FITC (clone Immu 510) or TCR $\gamma 9$  (Immu 360) all from Beckman-Coulter (Fullerton, CA).

The clonotypes of TCR V beta chain were identified using pairs of conjugated monoclonal antibodies to: V $\beta$ 1 (clone BL37.2) PE and V $\beta$ 2 (clone MPB2D5) FITC, V $\beta$ 3 (clone CH92) FITC and V $\beta$ 4 (clone WJF24) PE, V $\beta$ 5.1 (clone IMM157) FITC and V $\beta$ 5.3 (clone 3D11) PE, V $\beta$ 5.2 (clone 36,213) FITC and V $\beta$ 8 (8.1 and 8.2; clone 56C5) PE, V $\beta$ 7 (clone ZOE) FITC and V $\beta$ 9 (clone FIN9) PE, V $\beta$ 11 (clone C21) PE and V $\beta$ 12 (clone VER2.32.1) FITC, V $\beta$ 13.1 (clone IMM222) PE and V $\beta$ 13.6 (clone JU-74) FITC, V $\beta$ 14 (clone CAS1.1.3) PE and V $\beta$ 16 (clone TAMAYA 1.2) FITC, V $\beta$ 17 (clone E17.5F3) FITC and V $\beta$ 18 (clone BA62) PE, V $\beta$ 20 (clone ELL 1.4) FITC and V $\beta$ 22 (clone IMM 546) PE, V $\beta$ 21.3 (clone IG125) FITC and V $\beta$ 23 (clone AF23) PE (all purchased from Beckman-Coulter). All associated with CD3-APC-Cy7, CD8 $\alpha$ -APC, CD4-PE-Cy7, and CD8 $\beta$  PE-Cy5.

For the activation test, fresh density gradient isolated mononuclear cells (PBMC) were incubated for 30 h with CD3/CD28 coated beads (Dyna, Norway) at approxi-

mately equal number according to manufacturer instructions. After incubation, cells from the same well were washed and labeled with three combinations of representative clonotype: V $\beta$ 1 PE/V $\beta$ 20 FITC; V $\beta$ 2 FITC/V $\beta$ 8 PE and V $\beta$ 3 FITC/V $\beta$ 9 PE, associated with CD3-APC-Cy7, CD8 $\alpha$ -APC, CD4-PE-Cy7, CD25 PE-Cy5 (clone MA251; BD Biosciences).

The absolute membrane density of receptors was evaluated by indirect labeling, using commercially available QuiFiKit<sup>®</sup> (Dako Denmark) according to the manufacturer instructions.

The immunolabeling procedures were performed on 100  $\mu$ L of ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) anticoagulated fresh peripheral blood, incubated with 10–20  $\mu$ L of antibody, gently mixed and incubated for 20 min at room temperature in the dark. The lysis and fixation were obtained by adding 500  $\mu$ L of FACSlysing solution<sup>™</sup> (BD Biosciences). Samples were analyzed within 1 h on a FACScanto II (BD Biosciences). For Vbeta labeling, erythrolysis was performed using Versalyse<sup>®</sup> solution (Beckman-Coulter) and samples were washed with 4 mL Phosphate buffer before analysis.

Instrument setting were performed on nine tubes (unlabeled, six single labeled, six isotype controls, and the mixed antibodies) using FACS Diva<sup>™</sup> calculation facilities (BD Biosciences) as previously described (37). Instrument settings were daily checked using standardized (7 color setup<sup>®</sup> beads). Blood analysing is daily validated using external quality control (Multi-check control; BD Biosciences).

Dot plots were analyzed using FACS Diva<sup>™</sup> (BD Biosciences): CD3 versus side scatter identification. CD4+ and CD8+ were analyzed on CD3+. Vbeta clonotypes were analyzed on 30,000 T cell events, on either CD3+CD4+CD8– or CD3+CD4–CD8+ lymphocytes. The  $\gamma\delta$ T cells were defined on CD3/ $\gamma\delta$ TCR.  $\gamma 9$  positive cells were determined on  $\gamma\delta$ TCR + T cells. CD4 or CD8 were determined on CD3+/ $\gamma\delta$ TCR negative cells.

The cell size was estimated from forward scatter according to Slood et al. and Semyanov et al. (38,39). In the absence of a bead standardized for size, we used commercially available beads with different sizes as described by individual manufacturers: Flowcount<sup>®</sup> beads (10  $\mu$ m; Beckman-Coulter), Qifikit<sup>®</sup> beads (10  $\mu$ m, Dako); 7 color setup<sup>®</sup> beads (4 and 6  $\mu$ m, BD Bioscience), Trucount<sup>®</sup> beads (4  $\mu$ m, BD Bioscience), Rainbow<sup>®</sup> beads (3–3.4  $\mu$ m, BD Bioscience). The cell sizes were analyzed by electronic microscopy. Briefly, beads were washed in distilled water, treated with cacodylate 0.2 M and washed in progressive concentration of ethanol up to 100% before complete desiccation. Samples were then sputtered with gold-palladium coating and analyzed with scanning electron microscope (JEOL 840). More than 25 beads were measured manually on photographs. The reflection index was evaluated at 1.592 for polystyrene beads and 1.456 (nucleus) and 1.355 (cytoplasm) for T cell. The size of the nucleus was estimated at 80% of the cell size according to the literature (38). The bead and cell volumes were calculated from

measured FSC peak height according to Mie's theory for spherical multilayer particles optics

Statistical analysis was performed using, paired Student's *t*-test for comparison of two cell sub-populations from the sample, linear regressions and expressed as median  $\pm$  1SD. Coefficient of variation (CV) were calculated as 1SD/mean.

Because the fluorescence intensity did not always have a normal distribution, we chose to consider the median fluorescence intensity (MdFI) instead of the mean fluorescence intensity (MFI). MdFI and each sample CV were calculated automatically by the FacsDiva software.

## RESULTS

### Wide Heterogeneity of CD3 Expression Inside T Cell Subsets

In routine blood T cell analysis, we observed a wide distribution of CD3 expression on T cells (Fig. 1a). We have confirmed this interindividual cell diversity in 96 healthy donors: the MdFI was  $1,100 \pm 178$  on CD8+ T cells meaning a 16.1% coefficient of variation (CV) between donors. The CD3 expression was significantly ( $P < 0.0001$ ) higher on CD4+ T cells ( $1,401 \pm 248$ ) with similar CV (17.7%; Figs. 1b and 1c). However, what was more intriguing was the wide variation between cells for each sample (intraindividual CV:  $38.3 \pm 3.1\%$  for CD8+ T cells and  $43 \pm 2.3\%$  for CD4+ T cells (Fig. 1b). A similar discrepancy was observed for 56 consecutive patients (intraindividual CV:  $32.7 \pm 2.7\%$ ; on CD8+ and  $37.0 \pm 2.3\%$  on CD4+ T cells). The discrepancy of CD3 expression was confirmed with an alternative antibody combination that included CD3 APC-Cy7, CD8 APC, CD4 PE-Cy7: CVs =  $27.8 \pm 6.4\%$  on CD8+ and  $34.4 \pm 6.7\%$  on CD4+ T cells ( $n = 40$  patients).

### The Intraindividual Variability was Repeatedly Observed in all T Cell Isotypes

There is good evidence that CD3 expression differs amongst some T cell subtypes particularly  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  TCRs. We confirmed that CD3 levels were significantly higher on  $\gamma\delta$  T cells (MdFI:  $17,933 \pm 3,214$  in 40 patients) compared with conventional T cells (paired *t*-test:  $P = 0.0001$ ). Similar to the conventional T cells, the CD3 expression was highly heterogeneous on  $\gamma\delta$  T cells (mean of individual CVs:  $36.6 \pm 8.0\%$ , Fig. 2a). Conversely, the CD3 expression was not as high as on "non- $\gamma\delta$ " T cells ( $14,005 \pm 4,386$  compared with  $\gamma\delta$  T cells,  $P = 0.0001$ ) but still significantly higher than on  $\alpha\beta$  T cells ( $P = 0.0187$ ) and large individual CVs:  $36.4 \pm 9.5\%$ .

In the same experiment, we have compared the levels of CD3 expression on CD4+ and CD8+ T cell after exclusion of  $\gamma\delta$  T cells that partially express CD8. Again, we observed that the CD3 APC-Cy7 expression was higher on CD4-PE-Cy7+ (MdFI:  $13,535 \pm 2,020$ ) than on CD8-APC+  $\alpha\beta$  T cells (MdFI:  $11,435 \pm 1,717$ ;  $P < 0.0001$ ; Fig. 2c). Because possible artifacts could be due

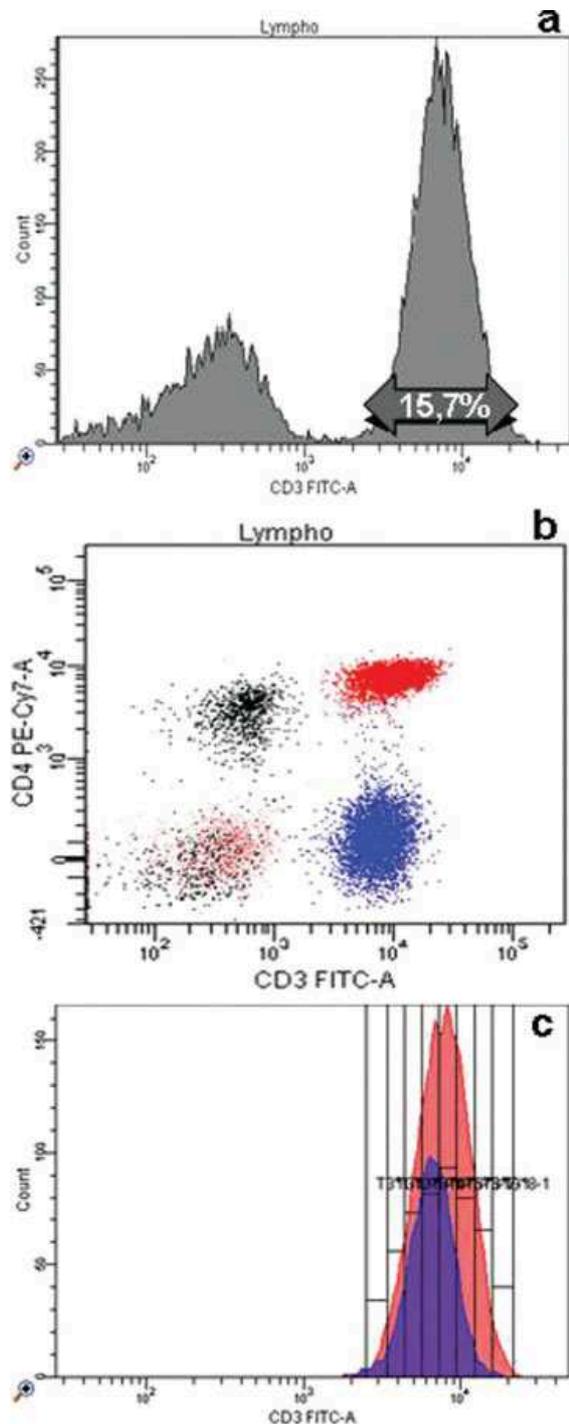


Fig. 1. High variability of CD3 FITC fluorescence intensity observed on CD3FITC/CD56 PE/CD4PE-Cy7/CD19APC/CD8APC-PE-Cy7/CD45PerCP routine lymphocyte analysis (one representative case; panel a). CD3 expression was higher on CD4+ T cells compared with CD8 (panels b and c). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

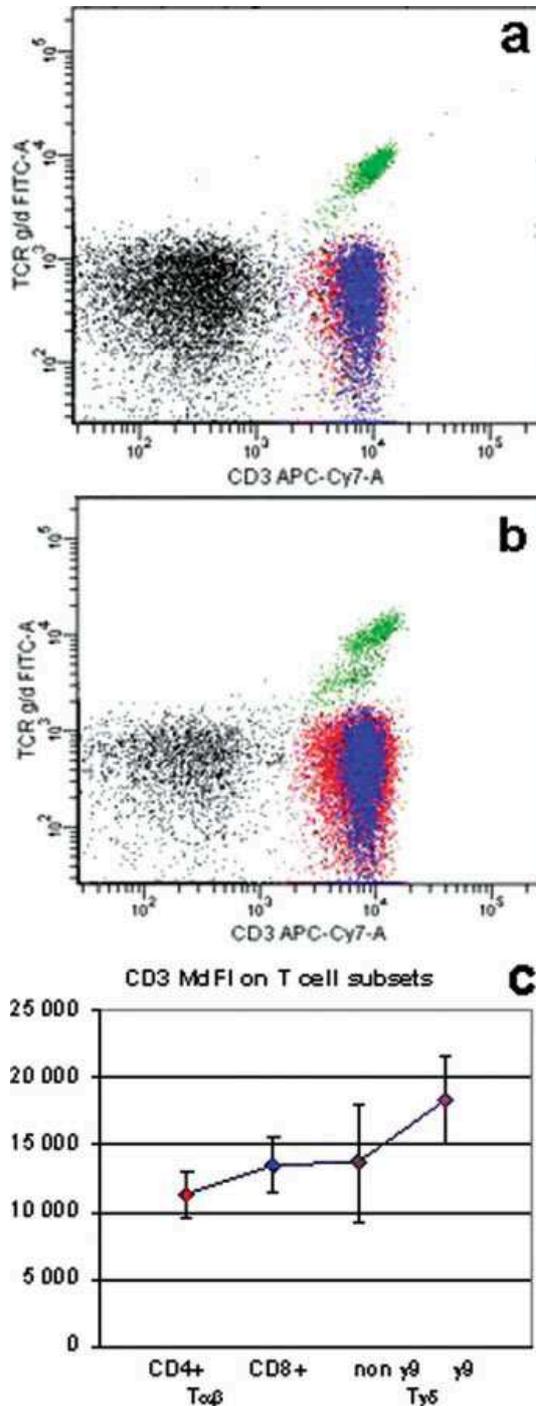


FIG. 2. CD3 APC-Cy7, CD8 APC, CD4 PE-Cy7, and  $\gamma\delta$  FITC were tested on 40 patients. CD3 expression was widely distributed on classical  $\gamma\delta$  peripheral  $\gamma\delta$ T and higher compared with  $\alpha\beta$  (panel a). Some patients had an additional non  $\gamma\delta$  population of  $\gamma\delta$ T cells (panel b) with even wider distribution of CD3. The two  $\gamma\delta$  populations had significantly higher CD3 expression compared with CD4+ and CD8+  $\alpha\beta$  T cells (panel c). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

to the spectral overlap compensations between the CD8 APC and the CD3 APC-Cy7 signals, we have confirmed the difference of CD3 expression between CD4+ and CD4-  $\alpha\beta$ T cells in five patients using the same labeling combination except CD8 APC (“fluorescence-minus-one” procedure; results not shown).

#### Were There Differences of CD3 Expression Between TCR V $\beta$ Clonotypes?

Because CD3 levels of expression varied between  $\gamma\delta$  clonotypes, we investigated if it also differed between  $\alpha\beta$  clonotypes. Using CD3 APC-Cy7, CD8 APC, CD4 PE-Cy7, and two anti-V $\beta$  clonotypes conjugated with either FITC or PE in 28 healthy blood donors, we observed consistent differences of CD3 expression according to the V $\beta$  clonotype (Fig. 3). MdfI were repeatedly very low on some clonotypes (e.g., for CD4+ T cells: V $\beta$ 1 PE: 7,366  $\pm$  1,236; V $\beta$ 2 FITC 8,023  $\pm$  1,140, V $\beta$ 3 FITC 7,980  $\pm$  1,628) and very high (paired *t*-test:  $P < 0.0001$ ) in few other clonotypes: (e.g., V $\beta$ 8 PE: 12,845  $\pm$  1,695; V $\beta$ 9 PE 12,435  $\pm$  2,093; V $\beta$ 20-FITC 11,768  $\pm$  1,510). In accordance with the initial experiments, CD3 expression was always higher on CD4+ than on CD8+ T cells but the differences between the clonotypes were the same for the CD4+ cells (Fig. 3 upper panel) and the CD8+ T cells (Fig. 3 lower panel). The differences were repeatedly observed in all patients and were not related to fluorochrome type (PE or FITC) used for the anti-clonotype conjugates; clonotypes that were labeled with either FITC or PE, CD3 was low (e.g., anti V $\beta$ 1-PE or anti V $\beta$ 2-FITC) or high (e.g., anti V $\beta$ 3-FITC or V $\beta$ 20-PE), see Figure 3.

#### Was the Variability of Expression Restricted to CD3?

If CD3 expression had wide variability in each samples, we also observed high variability of expression of other membrane receptors: CD45: 6,269  $\pm$  893 (CV = 14.2%) on CD4+ T cells and 7,976  $\pm$  1,186 (CV = 14.9%) on CD8+ T cells; CD4: 7,159  $\pm$  755 (CV = 10.5%) on CD4+ T cells and CD8: 12,054  $\pm$  1,518 (CV = 12.6%) on CD8+ T cells in 56 consecutive patients. To compare the level of two receptors, we arbitrarily divided the T cell population in eight equidistant sections on the logarithmic scale of CD3 fluorescence intensity (Fig. 4, insert). We then compared CD4 or CD8 and CD45 levels of expression between these CD3 sections. The CD4 gradually increased with CD3 levels ( $P < 0.001$ , paired *t*-tests between two consecutive CD3 levels sections). The CD8 also gradually increased in all but the highest sections ( $P < 0.001$ ). Similarly, the CD45 gradually increased on CD8+ T cells ( $P = 0.001$ ) but only in the first 5 sections of CD4+ T cells ( $P < 0.026$ ).

#### Was the Difference of Expression Due to Size Diversity of the Cells?

Because the levels of expression of all receptors tested were varying in the same way, we wanted to know if it was related to differences in sizes. The

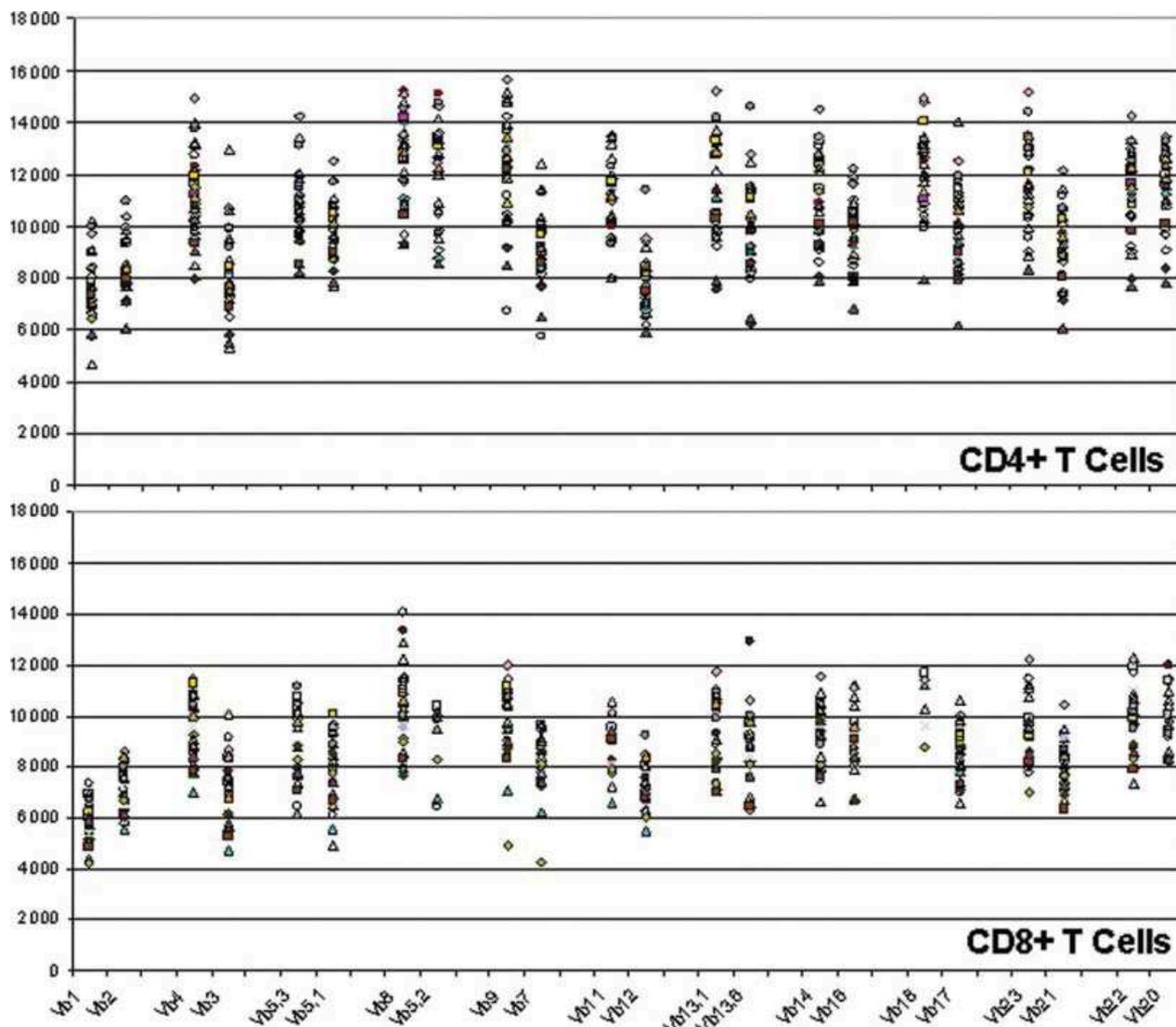


Fig. 3. CD3 APC-Cy7, CD8 APC, CD4 PE-Cy7, and V $\beta$  clonotype FITC/PE were tested on 28 healthy donors. CD3 median fluorescence intensity (MFI) was reproducibly different according to the clonotype of the cells. Values were always higher on CD4+ (upper) than CD8 T cells (lower panel) T cells. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

median of forward scattering (MdfSC) intensity (high of the peak: MdfSC-H) gradually increased with the level of CD3 (Fig. 4) on CD4+ T cells (upper panel) and CD8+ T cells (lower panel,  $P < 0.0001$  on paired  $t$ -test for each section compared with the previous one with low CD3 level). To estimate the cell sizes from the MdfSC, we have first determined the size of some setting beads that could be used as standards, by scanning electron microscopy (Fig. 5a). The bead diameters were  $8.35 \pm 0.32 \mu\text{m}$  for the Qifikit<sup>®</sup> beads ( $n = 34$ );  $3.22 \pm 0.089 \mu\text{m}$  ( $n = 25$ ) and  $4.48 \pm 0.16 \mu\text{m}$  for the 7 color setup<sup>®</sup> beads ( $n = 48$ );  $2.49 \pm 0.89 \mu\text{m}$  for the Trucount<sup>®</sup> beads ( $n = 37$ );  $8.60 \pm 0.22 \mu\text{m}$  for the Flowcount<sup>®</sup> beads ( $n = 31$ ) and  $27.8 \pm 2.8 \mu\text{m}$  for the Rainbow<sup>®</sup> beads ( $n = 75$ ). We then analyzed their FSC-H

(five repeats), using the same settings as the one used for the cell analysis. We could confirm that the bead MdfSC-H were directly correlated to the bead size in a linear relation)  $y = 7382.5x - 5671.7$ ;  $r^2 = 0.996$ . (Fig. 5). According to the Mie's theory and refractive index of cells, we could estimate the cell size (diameter,  $d$ ) with the function:  $[FHS-H = 1250 d^2]$  showing that the FSC-H was proportional to the cell surface rather than their diameter.

Accordingly, we have analyzed, the mean cell diameter of cells was  $11.1 \mu\text{m}$  for LyT CD4+ and  $11.5 \mu\text{m}$  for CD8+ T cells in the 56 consecutive samples. Interestingly, the cell sizes progressively increased with levels of CD3 from 10.5 to 11.6 for CD4+ and 10.5 to 12.2 for CD8+ T cell (Fig. 5b). In another test, we have

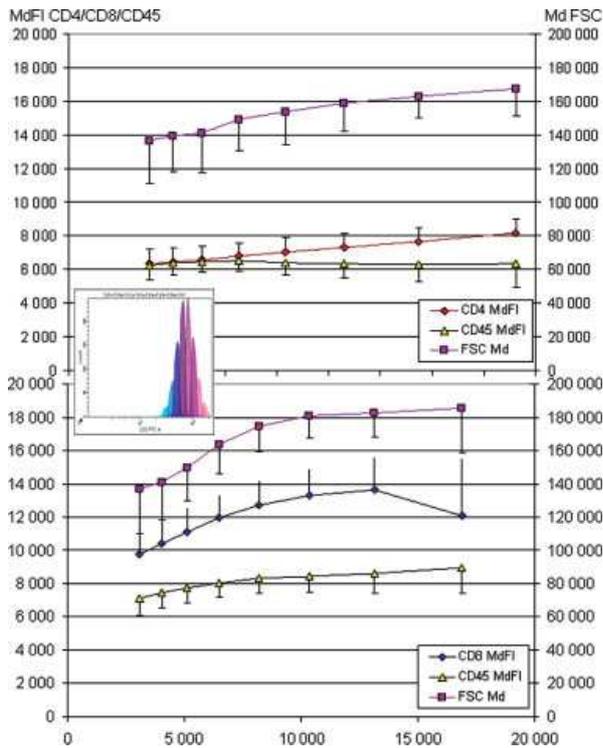


FIG. 4. CD3FITC/CD56 PE/CD4PE-Cy7/CD19APC/CD8APC-PE-Cy7/CD45PerCP was analyzed on 56 consecutive patients. The levels of CD4 or CD8; CD45 (left scale) and forward scatter (FSC; right scale) were analyzed on CD4+ (upper panel) or CD8+ (lower panel) according to the level of CD3 arbitrarily divided in eight equidistant sections (insert). CD4 and partly CD8, FSC increased with CD3 expression suggesting a cell size effect. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

considered the CD3/FSC-H ratio measured individually on each cell during analysis of 14 consecutive the samples. The ratio progressively rose with the level of CD3, from  $853 \pm 163$  to  $3,843 \pm 523$  for CD4+ T cell and  $829 \pm 144$  to  $3,314 \pm 303$  for CD8+ T cells (Fig. 5c) confirming the close relationship between the level of CD3 expression and the cell size. However, CD3 fluorescence intensities rose more than the cell size (Fig. 5b). This suggests that the differences in size were not sufficient to explain the large variability of CD3 expression and larger cells did indeed express high surface density of CD3, especially on CD8+ T cells.

#### Could the CD3 Differential Expression Have Functional Consequences?

Because the number of CD3, as part of the TCR complex, is crucial threshold for T cell activation after specific peptide recognition, we investigated whether differences in expression could influence the T cell reactivity. We simulated the kinetic effect of the size or CD3 density on the cell activation using a mathematical simulation, we have recently published (26), and also first estimated the absolute CD3 expression on lymphocytes using the Qifikit<sup>®</sup> system, in 39 healthy donors. The

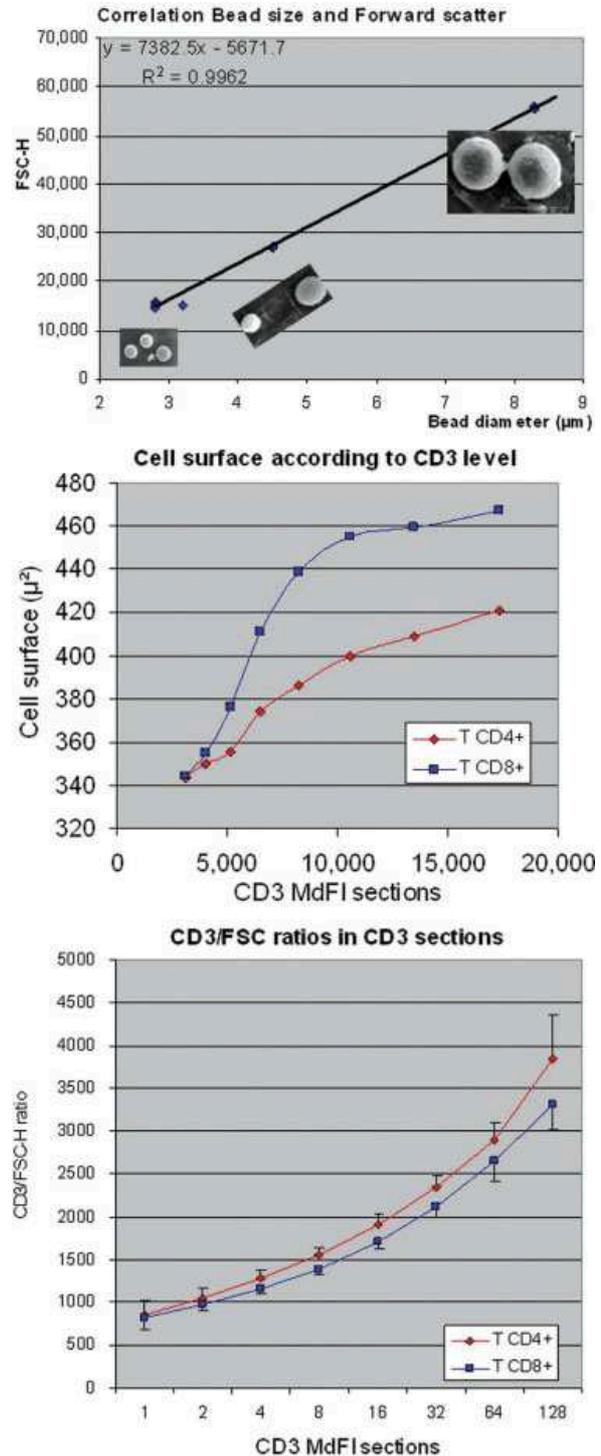


FIG. 5. Relationship between forward scatter and particle size (a) on beads with different size measured by scanning electron microscope; (b) Cell surface calculated from forward scatter according to the level of CD3 arbitrarily divided in equidistant sections in 56 consecutive patients; (c) Direct CD3 intensity/FSC-H ratio on individual cell sizes in the CD3 sections in 14 consecutive patients. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

level of CD3 was  $61,050 \pm 25,346$  molecules per cell corresponding to  $30,525 \pm 12,623$  TCR's/cell. Thus, we compared the activation kinetics for CD3 levels from 50,000 to 70,000 CD3 mol/cell for one given peptide. For a given size, the simulations have shown that the T cells with higher levels of membrane CD3 reached higher levels of activation (zenith of the peak, Fig. 6a). On the other hand, for each CD3 level, the cell size had little effect on the height of the peak (capacity of response) but smaller cells reached more rapid activation (reduced the time-lap) for achieving the zenith of the peak (Fig. 6b). Overall, the level of CD3 expression had a predominant influence on activation triggering whatever the size of the cells was.

We then checked that hypothesis experimentally, in an *in vitro* activation model in 13 healthy donors using anti-CD3-CD28 beads that guaranteed equal activation for all T cells. The activation was measured through the induction of IL-2 receptor (CD25) after 30 h on few V $\beta$  clonotypes with extreme CD3 levels. The CD4+ T cells (Fig. 7 left column) were significantly more activated than CD8+ T cells (Fig. 7 right column) that expressed lower levels of CD3. Furthermore, the activation was more efficient on clonotypes that were associated with high levels of CD3 high (V $\beta$ 8 and V $\beta$ 9) compared with CD3 low clonotypes (V $\beta$ 2 and V $\beta$ 3;  $P = 0.040$  and  $P = 0.0003$ ). The difference was not significant on CD8 V $\beta$ 1/V $\beta$ 20 and CD4 V $\beta$ 2/V $\beta$ 8 and even reversed in one case (CD4+: the V $\beta$ 1 cells were more reactive than V $\beta$ 20 cells;  $P = 0.007$ ).

## DISCUSSION

T cells are usually considered as a homogenous group of cells with similar properties and generally characterized by the mean or median of the whole population neglecting the population variability. T cells have been separated in two main subsets CD4/CD8 and more minor subsets, such as,  $\gamma\delta$ T, Th1/Th2, regulatory or Th17 T cells but this was only considered on the quality of their functions. The dynamics of T cell activation is generally considered as similar for all T cells of any subtypes. In this study, we have focused on the large diversity of T cells within any individual sample in terms of membrane expression of their receptors. We observed that variability was constant among healthy donors as well as amongst patients with immune disorders. It cannot be attributed to experimental error or variation as instruments have very narrow signal CV (<2%) when standardized quality assurance beads were tested (37). It cannot be due to technical factors as the cells were prepared in the same way, in the same tube, with the same reagents and the individual cells were compared within the same sample, with the same labeling. Furthermore, the differences were very reproducible between different samples.

The T cell diversity we have observed was large enough to have functional significance. Indeed, it has been demonstrated previously (3-5,10,15,17,20) that specific T cell activation is directly dependent on the

amount of antigens, the amount of TCRs and their mutual affinity. As soon as the T cell has recognized its specific peptide, the TCR-CD3 involved in the binding are activated and internalized. A minimum number of TCR need to be activated to reach the level of activation that is sufficient to make the decision for the cell function and fate (either proliferation, or anergy or activation induced apoptosis). The number of p-MHC complexes presented by dendritic cells is less critical because TCR binding is very brief and several TCR can sequentially bind one single p-MHC complex (serial engagement). However, if the number of CD3-TCR inside the synapse is not sufficient, more are recruited from the outside the synapse. The surface transfer of the receptor takes time and the distance for transfer rises with the cell size. Thus, the initial number of CD3 certainly influences the speed of T cell specific activation. We tested this hypothesis using computer model we have developed recently (26). This model was not completely achieved

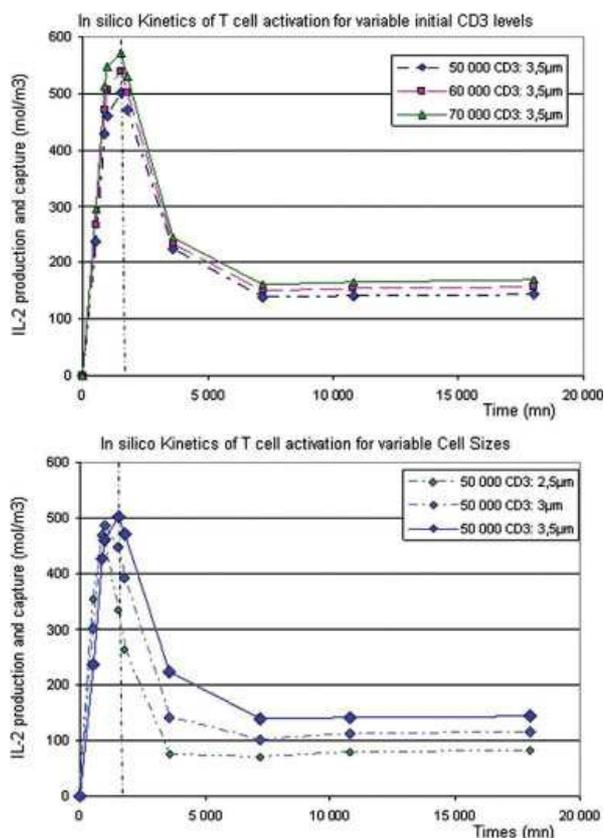


Fig. 6. In silico simulation of the T cell activation kinetic for different initial CD3/TCR densities (25–35,000 CD3-TCR complexes per cell) and cell sizes (radius 2.5–3.5  $\mu$ m). Activation induced IL-2 and its receptor production. IL-2 binds to its receptor. The complex internalization is considered as the decision parameter for entry in cell cycle. The peak height is the major parameter reflecting the intensity/optimal time for T cell activation as it could be checked using data from ago-antagonist peptides. CD3 level was related to the intensity of the signal, whereas cell size was related to the time delay. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

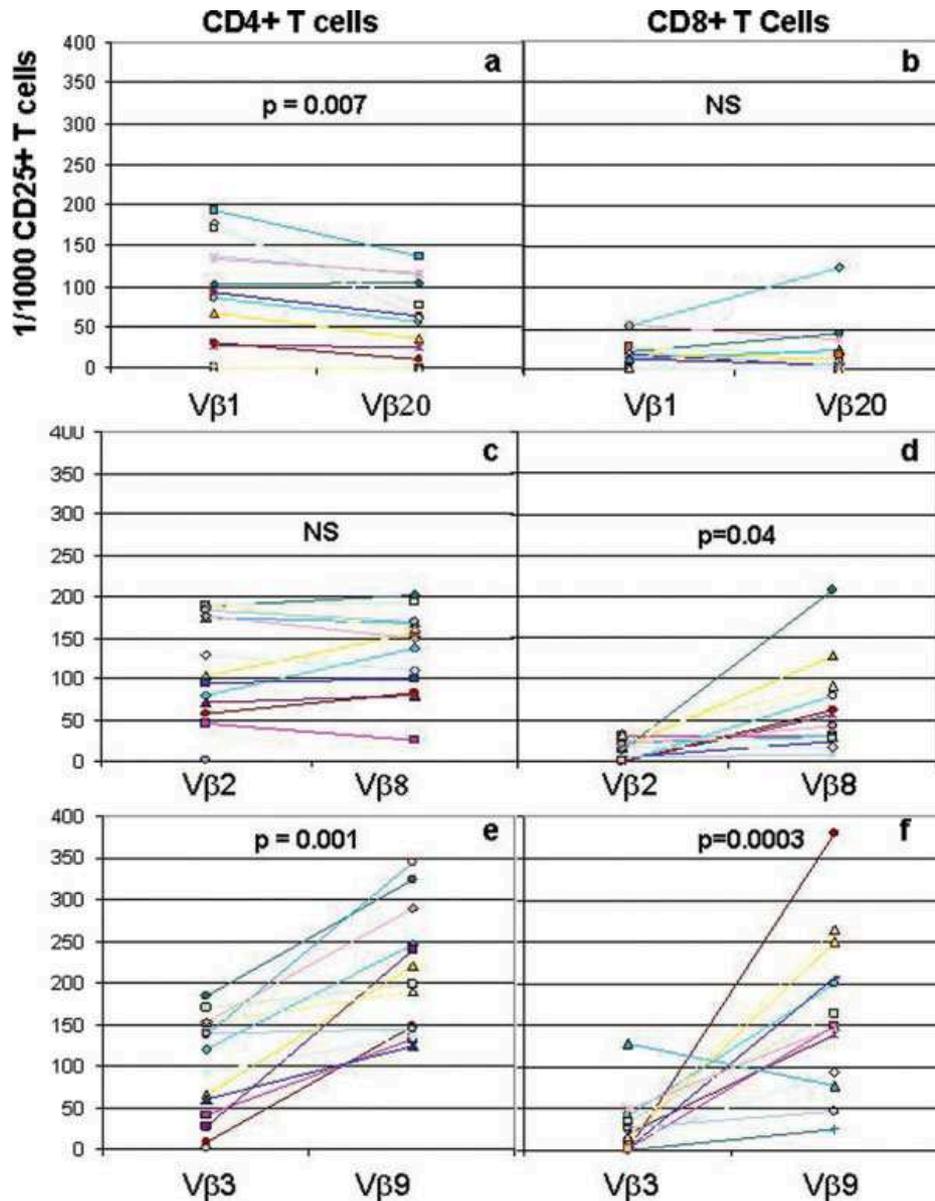


Fig. 7. Fresh peripheral blood mononuclear cell from 13 blood donor were activated with CD3-CD28 beads for 30 h. The activation levels was measured using CD25 PE-Cy5 on CD3 APC-Cy7, CD4 PE-Cy7, and CD8 APC T cells for the different clonotypes: Vβ1PE/Vβ20FITC, Vβ2FITC/Vβ8PE, and Vβ3FITC/Vβ9PE. These clonotypes were chosen for their extreme CD3 levels of expression: Vβ1 ( $7,366 \pm 1,236/5,857 \pm 841$ ); Vβ2 ( $8,023 \pm 1,140/7,368 \pm 886$ ); Vβ3 ( $7,980 \pm 1,628/6,947 \pm 1,315$ ); Vβ8 ( $12,845 \pm 1,695/10,457 \pm 1,732$ ); Vβ9 ( $12,435 \pm 2,093/10,430 \pm 1,568$ ); and Vβ20 ( $11,768 \pm 1,510/9,870 \pm 1,174$ ) on CD4/CD8, respectively. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

because many parameters that are involved in the activation process still need to be precisely determined. However, preliminary comparisons of calculated data with experimental data obtained from the literature (6,19,22,23) have shown that this model was realistic. In this study, we have used this computer simulation choosing a set of initial parameters (agonistic peptide, cell sizes, and CD3 levels of expression) that are close to the conditions in vivo. These simulations show that the initial number of CD3 available significantly influen-

ces activation in the same order of magnitude as the differences observed with agonistic and antagonistic peptides. We confirmed the functional significance of the initial level of CD3 expression experimentally. T cells were challenged with an artificial APC. Beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 should bind equally all T cells, regardless of the TCR structure or avidity for the p-MHC complex. Analysis of the early activation effects (membrane CD3, CD25, CD69 expression), during the first 30 h before first cell division because the

levels of expression of receptors and the cell size cannot be simply compared between activated mother and new daughters. We compared different clonotypes within the same samples so the cell preparations were performed in the same conditions, in the same well in order to reduce any technical biases. Experimental artifacts were minimized because T cells were exposed randomly, and with equal probability, in the same environmental conditions (same well and same environment) to the most physiological *in vitro* polyclonal activation system (anti-CD3/anti-CD28 on beads). Activation of each clonotype was compared in duplicate and with their unactivated homologs. The labeling should not interfere with the results and high/low CD3 groups were tested with alternative FITC/PE combinations.

The CD3 expression is related to the cell size but the relationship was not linear and cells with high FSC had much more CD3. This was confirmed on comparison of FSC values between sections of increasing CD3 levels and confirmed by measuring the individual CD3/FSC ratio. The physical study of FSC reveals that FSC is directly related to the square diameter of the particles, that is, the cell surface. This allowed us to relate the CD3 expression to a surface density. The real cell surface can be calculated but we had many difficulties to count the absolute number of CD3 on different cell subsets. The Qifikit® is the best way to measure it but it uses an indirect labeling method that is not compatible with multiple color analysis. This could have been solved with sorting of different T cell subsets but it would have needed a CD3 labeling that make quantization impossible.

There are physical considerations to explain a relationship between the level of CD3 available and T cell reactivity. A sufficient recruitment of CD3/TCR complex is needed in the synapse in order to reach a sufficient level of signal transduction (7,12,17-19,40). The number of p-MHC has low limiting role because of possible serial engagement of different TCR on the same p-MHC complex (17-20). The number of receptors in the synapse is not sufficient to reach that threshold and more molecules are needed from the rest of the membrane. The recruitment is due to membrane transfer of the molecule, at linear speed (13). It is reasonable to consider this speed as constant for different cell types because it depends on membrane constituents and cytoskeleton motion that is considered common for all T cells. On larger cells, the molecule pool is larger (higher fluorescence intensity) but the transfer takes more time to reach the synapse. In the model, we have used medium cell sizes (radius from 2.5 to 3.5  $\mu\text{m}$ ) and CD3 initial densities (50-70,000 CD3 $\epsilon$  molecules corresponding to 25-35,000 CD3/TCR complexes per cell) and a constant surface speed observed from published experiments (13). Overall, our theoretical and experimental data have proved that CD3 expression variability has functional implications. Opposite conclusions were raised regarding GPIIb-IIIa molecular density that was not correlated to aggregability of L platelets (41). *In vitro* activa-

tion of T cells was repeatedly more efficient on clonotypes with high CD3 levels compared with clonotypes with low CD3 levels. This was not unequivocal as all clonotypes were not tested and some clonotypes did not show significant differences.

Is CD3 level variability related to cell fate? Intriguing but repeatedly confirmed, that CD3 expression was significantly different on T cell subsets. Accordingly, CD4+ T cells (with higher CD3 expression) are more frequently activated in stimulation tests. The relationship with clonotypes was more surprising. The TCR design is a stochastic process that should not interfere with the cell physiognomy. This discrepancy was already known for  $\gamma\delta$ T cells but the ontogeny, the recognition skills and physiological role of these cells are very different from conventional  $\alpha\beta$ T cells. How could CD3 expression and activation potential be related to the clonotype? Because the V $\beta$  segment is involved in binding p-MHC complexes, it is possible that the T cells adapt their CD3 level and size with their avidity for the MHC and/or ligand. T cells could use physical means for a better adaptation of its reactivity to the frequency or intensity of the challenges. On the other hand, considering that the clonotype determination is relatively hazardous for one given peptide/MHC complex, our results suggests some individual variability in the responsiveness to a given antigen according to which TCR clonotype is chosen. The clonotype related mechanism could be influenced by the MHC haplotype, the peptide itself and TCR avidity for the p-MHC complex. The other co-stimulation molecules (CD4 or CD8, CD28...) should not strongly interfere because they are common to all cells. Regarding to cytometry data interpretation, membrane density of receptor on cell surface deserves attention because of possible functional significance but one must consider that an increase of mean fluorescence intensity of a cell population does not necessarily mean that surface density is increased on all individual cells (42).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pascale Saby, Nadine Bardel, and Martine Cell for their skillful technical assistance. Also thank Stephen Richards for skillful proofreading of the article.

#### LITERATURE CITED

1. Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, al-Ramadi BK, Kim YS, Maher SE, Bothwell AL, Margulies DH. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: Affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994;265:946-949.
2. Bachmann MF, Sebzda E, Kundig TM, Shahinian A, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur J Immunol* 1996;26:2017-2022.
3. Carreno LJ, Gonzalez PA, Kalergis AM. Modulation of T cell function by TCR/pMHC binding kinetics. *Immunobiology* 2006;211:47-64.
4. Madrenas J. Differential signalling by variant ligands of the T cell receptor and the kinetic model of T cell activation. *Life Sci* 1999;64:717-731.
5. Margulies DH. Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes: A quantitative basis for mechanistic models. *Curr Opin Immunol* 1997;9:390-395.
6. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285:221-227.

7. Denkberg G, Cohen CJ, Reiter Y. Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *J Immunol* 2001;167:270-276.
8. Feito MJ, Ballester S, Diez-Orejas R, Ojeda G, Criado G, Portoles P, Rojo JM. CD4 dependence of activation threshold and TCR signalling in mouse T lymphocytes. *Scand J Immunol* 1997;45:166-174.
9. Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996;384:577-581.
10. Lanzavecchia A, Lezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: A kinetic view of T cell behavior. *Cell* 1999;96:1-4.
11. Gouaillard C, Huchenq-Champagne A, Arnaud J, Chen CI CL, Rubin B. Evolution of T cell receptor (TCR) alpha beta heterodimer assembly with the CD3 complex. *Eur J Immunol* 2001;31:3798-3805.
12. Valitutti S, Muller S, Salio M, Lanzavecchia A. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 1997;185:1859-1864.
13. Favier B, Burroughs NJ, Wedderburn L, Valitutti S. TCR dynamics on the surface of living T cells. *Int Immunol* 2001;13:1525-1532.
14. Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 2000;13:665-675.
15. Labrecque N, Whitfield LS, Obst R, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 2001;15:71-82.
16. Rabinowitz JD, Beeson C, Lyons DS, Davis MM, McConnell HM. Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1401-1405.
17. Demotz S, Grey HM, Sette A. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 1990;249:1028-1030.
18. Hudrisier D, Kessler B, Valitutti S, Horvath C, Cerottini JC, Luescher IF. The efficiency of antigen recognition by CD8+ CTL clones is determined by the frequency of serial TCR engagement. *J Immunol* 1998;161:553-562.
19. Itoh Y, Hemmer B, Martin R, Germain RN. Serial TCR engagement and down-modulation by peptide: MHC molecule ligands: Relationship to the quality of individual TCR signaling events. *J Immunol* 1999;162:2073-2080.
20. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995;375:148-151.
21. Kalergis AM, Boucheron N, Doucey MA, Palmieri E, Goyarts EC, Vegh Z, Luescher IF, Nathanson SG. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol* 2001;2:229-234.
22. Rosette C, Werlen G, Daniels MA, Holman PO, Alam SM, Travers PJ, Gascoigne NR, Palmer E, Jameson SC. The impact of duration versus extent of TCR occupancy on T cell activation: A revision of the kinetic proofreading model. *Immunity* 2001;15:59-70.
23. Williams CB, Engle DL, Kersh GJ, Michael White J, Allen PM. A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex. *J Exp Med* 1999;189:1531-1544.
24. Bettens F, Kristensen F, Walker C, Schwulera U, Bonnard GD, de Weck AL. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. II. Glucocorticoid and anti-Tac-induced inhibition of human T lymphocyte proliferation. *J Immunol* 1984;132:261-265.
25. Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 1997;27:71-76.
26. Bidot C, Gruy F, Haudin CS, El Hentati F, Guy B, Lambert C. Mathematical modeling of T-cell activation kinetic. *J Comput Biol* 2008;15:105-128.
27. Fallon EM, Lauffenburger DA. Computational model for effects of ligand/receptor binding properties on interleukin-2 trafficking dynamics and T cell proliferation response. *Biotechnol Prog* 2000;16:905-916.
28. Lord GM, Lechler RI, George AJ. A kinetic differentiation model for the action of altered TCR ligands. *Immunol Today* 1999;20:33-39.
29. Sousa J, Carneiro J. A mathematical analysis of TCR serial triggering and down-regulation. *Eur J Immunol* 2000;30:3219-3227.
30. Lambert C, Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gammadelta T cells. *Cytometry Part B Clin Cytom* 2004;61B:45-53.
31. Mullersman JE, White G, Tung KS. Differential staining of human alpha beta and gamma delta T cells by the fluorescein conjugate of an anti-CD3 monoclonal antibody. *Clin Exp Immunol* 1991;84:324-328.
32. Nicolas L, Monneret G, Debard AL, Blesius A, Gutowski MC, Salles G, Biennu J. Human gammadelta T cells express a higher TCR/CD3 complex density than alphabeta T cells. *Clin Immunol* 2001;98:358-363.
33. Thibault G, Bardos P. Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 1995;154:3814-3820.
34. Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: Functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:336-345.
35. Hviid L, Akanmori BD, Loizon S, Kurtzhals JA, Ricke CH, Lim A, Koram KA, Nkrumah FK, Mercereau-Pujjalon O, Behr C. High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the v(delta)1 subset in a healthy population. *Int Immunol* 2000;12:797-805.
36. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis* 2001;184:533-541.
37. Lambert C, Iobagiu C, Genin C. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: A clinical evaluation of a new flowcytometer. *Cytometry Part B Clin Cytom* 2006;70B:29-38.
38. Sloat PM, Hoekstra AG, Figdor CG. Osmotic response of lymphocytes measured by means of forward light scattering: Theoretical considerations. *Cytometry* 1988;9:636-641.
39. Semyanov K, Zharinov A, Tarasov P, Yurkin M, Skribunov I, van Bockstaele D, Maltsev V. Optics of leukocytes. In: Hoekstra A, Maltsev V, Videen G, editors. *Optics of Biological Particles*. NATO Science Series 2007; p. 269-280.
40. McKeithan TW. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5042-5046.
41. Leytin V, Shapiro H, Novikov I, Radnay J. Flow cytometric analysis of the platelet surface area and surface density of glycoprotein IIb/IIIa of unactivated human platelets of various sizes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:94-100.
42. Mahalingam M. Analysis of surface density of expression of molecules by flow cytometry. *Cytometry* 1996;24:190.

**École Nationale Supérieure des Mines  
de Saint-Étienne**

N° d'ordre : 546 GP

Fatima-Zahra EL HENTATI

Experimental study and mathematical modeling of lymphocyte T responses

**Speciality** : Process engineering

**Keywords**: T Cells, Activation Kinetics, Modeling, Flow Cytometry, murine model, Vaccine.

**Abstract** :

The specific T Cell response is complex, because of the participation of many actors and it depends on several external and internal parameters that are difficult to dread. This make very difficult to anticipate the reaction, especially from the dynamic point of view, and to analyze immune disorders or monitor immuno-interventions (vaccines).

The numeric modeling and the simulation would allow to test hypotheses, to draw new experimental conditions and in fine to optimize therapeutic protocols. To this purpose, a mathematical model mimicking the dynamics of the Specific T cell response was recently proposed by our team (*Bidot et al.* 2008). The model uses published parameters and its confrontations with experimental data that were validated in the literature, has shown that how it is realistic. However, it still lack of precision because certain parameters arte still not determined.

In order to complete, correct and validate our model, we started a set of experiments to analyse the dynamic of the T cell response in details under various aspects. First, we studied the high variability of CD3 membrane expression and its relation to the level of T cell activation. Then, study the behavior of lymphocytes T for specific stimulations (peptide) in a TCR transgenic murine model. Finally, we realized a new mathematical model to overcome the lacks of the statistical treatments of cytometry data in commercial software using a dynamic of population approach.

**École Nationale Supérieure des Mines  
de Saint-Étienne**

N° d'ordre : 546 GP

Fatima-Zahra EL HENTATI

Etude expérimentale et modélisation mathématique de la réponse lymphocytaire T

**Spécialité :** Génie de Procédés

**Mots clés :** Lymphocyte T, Cinétique d'activation, Modélisation, Cytométrie en flux, Modèle murin, Vaccin.

**Résumé :**

La réponse lymphocytaire T, spécifique, est complexe, car elle fait intervenir plusieurs acteurs et dépend de paramètres externes et internes difficiles. Cette multitude de paramètres rend difficile d'appréhender la réaction, surtout du point de vue dynamique. Une meilleure connaissance de ce mécanisme permettrait d'analyser et si possible anticiper les désordres immunitaires ou d'immuno-intervention (vaccins, immunothérapies).

La modélisation et la simulation numériques permettraient de tester des hypothèses, de dessiner de nouvelles conditions expérimentales et in fine d'optimiser des protocoles thérapeutiques. Dans ce but, Un modèle mathématique mimant la réponse adaptative T a été proposé par notre équipe (*Bidot et al.* 2008). Le modèle utilise des paramètres publiés et les confrontations avec des données expérimentales validées dans la littérature montrent qu'il est réaliste. Cependant, il reste encore imprécis car certains paramètres n'ont pas été déterminés.

Dans le but de compléter, corriger et valider notre modèle, nous nous sommes intéressés à l'étude détaillée du lymphocyte T sous différents aspects. Dans un premier temps, nous avons étudié expérimentalement la variabilité d'expression des CD3 membranaires et ses conséquences dans l'activation des lymphocytes. Puis, nous avons cherché à étudier le comportement des lymphocytes T pour des stimulations spécifiques (selon le peptide) à l'aide d'un modèle murin spécifique d'un antigène par transfert de gène du récepteur T. Enfin, nous avons réalisé un modèle mathématique dans le but de surmonter les ambiguïtés des traitements statistiques des résultats de cytométrie en flux en utilisant les principes de dynamique de population.