

Université Pierre et Marie Curie-Paris 6

Epreuve d'Immunologie Fondamentale - juin 2003

Durée de l'épreuve : 3 heures

Vous devez obligatoirement traiter les exercices I et II sur deux copies distinctes.

Barème indicatif :

Exercice I noté sur 14 points

Exercice II noté sur 6 points

Epreuve d'Immunologie Fondamentale - juin 2003

Exercice I (noté sur 14 points)

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

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

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

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

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

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

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

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

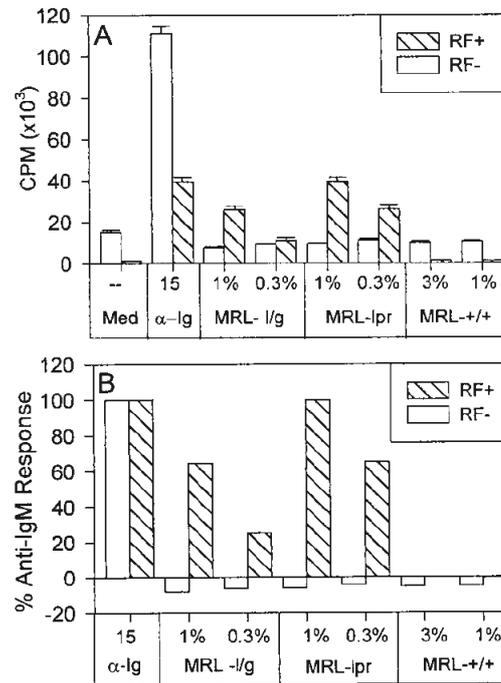
Question 4. *Quel est le rôle du traitement avec CD40-ligand dans cette expérience ? Pourquoi avoir traité les cellules avec un anticorps anti-IgM ? (5 lignes maximum)*

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

Figure 1

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

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

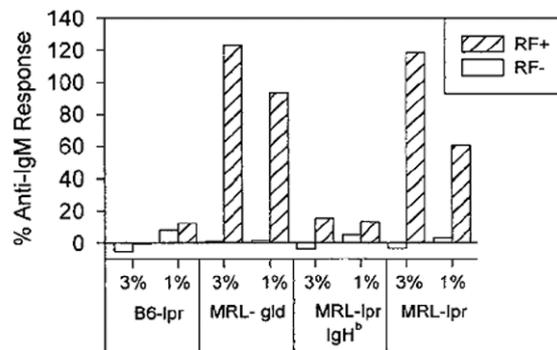


Pour préciser la spécificité des anticorps RF, des sérums provenant de souris B6-*lpr* (*Igh*^b), de souris MRL-*gld* (*Igh*^b), de souris congéniques MRL-*lpr.Igh*^b (*Igh*^b) ou de souris MRL-*lpr* (*Igh*^b) âgées de 4 à 5 mois ont été ajoutés à des lymphocytes B provenant de souris RF⁺ ou RF⁻. La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

Figure 2

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

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



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

Lorsque les sérums collectés proviennent de souris MRL-*lpr*, MRL-*gld* ou MRL-*lpr/gld* âgées de 11 semaines, ceux-ci n'ont aucun effet de stimulation des lymphocytes B RF⁺. Par un test de fixation de la molécule C1q, il a été montré qu'il y a davantage de complexes immuns dans les sérums ayant une activité de stimulation que dans les sérums non stimulants. La corrélation entre certaines caractéristiques des sérums de souris MRL-*lpr* et MRL-*lpr/gld* et leur capacité à stimuler des lymphocytes B RF⁺ a été déterminée (Tableau 1).

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

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

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

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

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

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

Ab	Isotype	Fine Specificity	% Anti-IgM Prolifération ^a	
			RF ⁺	RF ⁻
PL 2-3	IgG2a ^j	H2A-H2B-DNA	317	6
PR 1-3	IgG2a ^j	H2A-H2B-DNA	312	-7
LG4-1	IgG2a ^j	Nucleosome core particle	126	2
MRB4	IgG2a ^j	H2A-H2B-DNA	138	11
LG10-1	IgG2a ^j	H3-H4-DNA	154	9
LG8-1	IgG2a ^j	H2A-H2B-DNA	48	9
PL 2-6	IgG2b ^j	H2A-H2B-DNA	1	-6
PL 9-7	IgG3 ^j	H2A-H2B-DNA	-6	-16
PL 2-8	IgG2b ^j	H2A-H2B-DNA	-1	-1
PL 2-7	IgG2b ^j	H2A-H2B-DNA	-4	0
MGC 23	IgG2b ^j	Nucleosome core particle	5	9

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

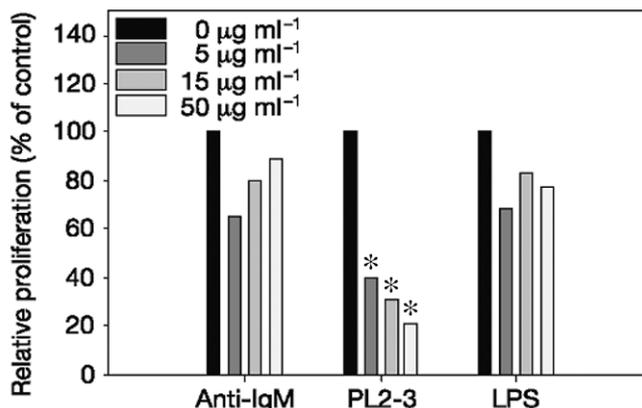
Question 8. *En interprétant les données du Tableau 2 et sachant que des anticorps monoclonaux IgG2a^j spécifiques d'haptènes ou d'antigènes autres que les nucléosomes ne font pas proliférer les lymphocytes B RF⁺, quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer ces résultats ? (8 lignes maximum)*

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

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

Figure 3

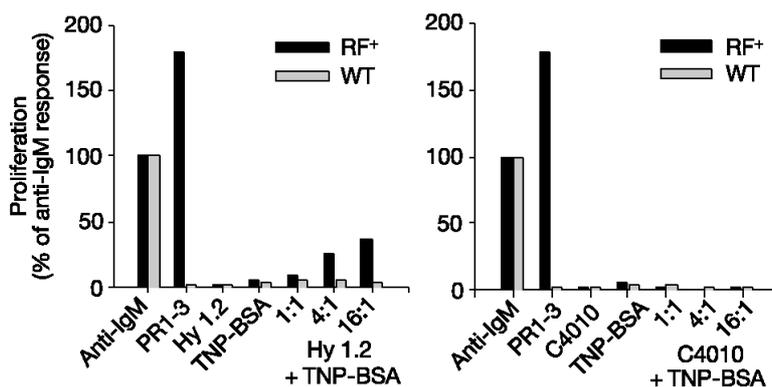
Prolifération des lymphocytes B RF⁺ incubés avec l'anticorps anti-IgM, l'anticorps PL2-3 (cf. Tableau 2) ou le LPS, en présence de DNase (0 à 50 µg/ml). Les valeurs de prolifération sont exprimées en pourcentage de la valeur obtenue, pour chaque activateur, en l'absence de DNase. Un astérisque indique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



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

Figure 4

Les lymphocytes B RF⁺ ou RF⁻ (WT) ont été incubés avec l'anticorps anti-IgM, l'anticorps PR1-3 anti-nucléosome (IgG2aⁱ), l'anticorps Hy1.2 anti-TNP (IgG2aⁱ), l'anticorps C4010 anti-TNP (IgG2a^b), l'haptène TNP-BSA, des complexes immuns Hy1.2+TNP-BSA ou des complexes immuns C4010+TNP-BSA. Après 2 jours de culture, la prolifération des lymphocytes B a été déterminée et exprimée en pourcentage de la prolifération observée en présence de l'anticorps anti-IgM.



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

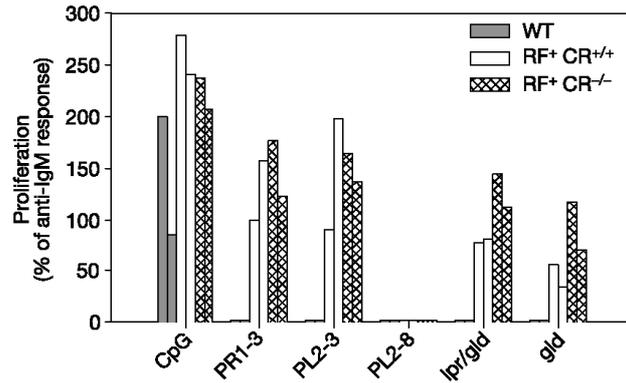
Les récepteurs du complément sont capables de fixer des complexes immuns opsonisés. Des souris transgéniques AM14 déficientes en récepteur CR2 du complément (appelées souris RF⁺ CR^{-/-}) ont été produites par croisements des souris transgéniques AM14 (RF⁺ CR^{+/+}) avec des souris déficientes en CR2. Les lymphocytes B de souris non transgéniques RF⁻ CR^{+/+} (WT), ou de souris transgéniques RF⁺ CR^{+/+} ou RF⁺ CR^{-/-} ont été incubés avec les anticorps monoclonaux PR1-3 (IgG2aⁱ), PL2-3 (IgG2a^j), PL2-8 (IgG2b^j) ou du sérum provenant de souris *lpr/gld* ou *gld*. La prolifération des lymphocytes B a été déterminée après 2 jours de culture (Figure 5).

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

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

Figure 5

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



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

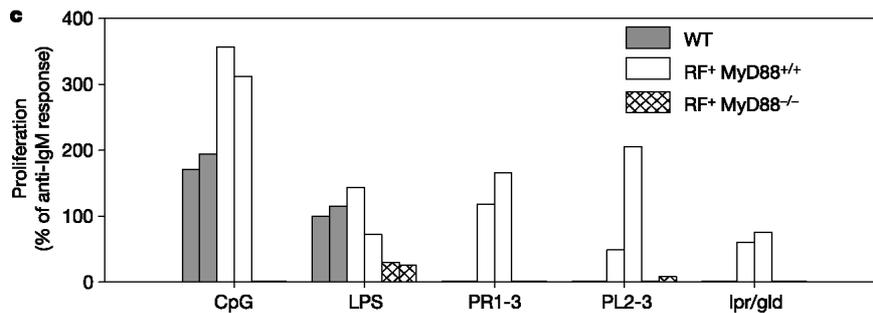


Figure 6

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

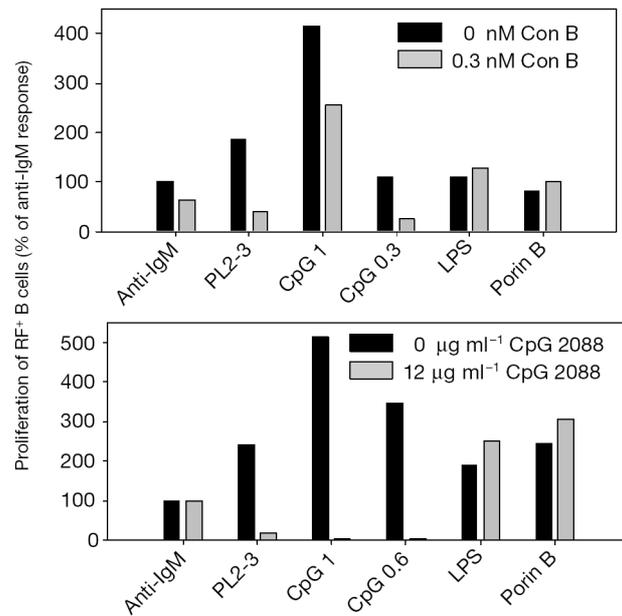
Question 13. Quels éléments nouveaux apportent ces résultats ? Quel(s) récepteur(s) est(sont) engagé(s) dans cette réponse ? (8 lignes maximum)

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

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

Figure 7

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



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

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

Exercice II (noté sur 6 points)

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

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

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

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

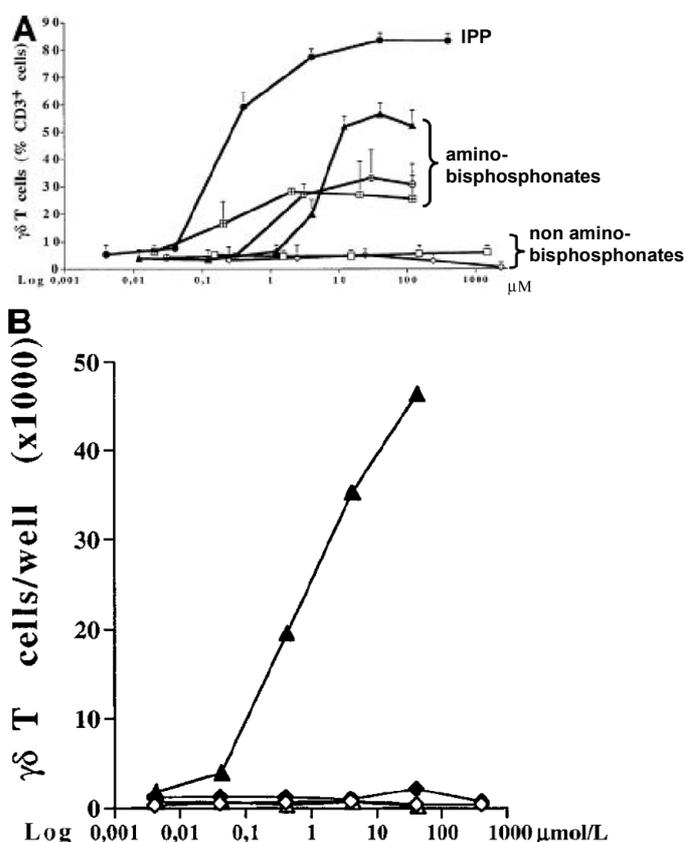
Les bisphosphonates sont un traitement de choix pour les maladies qui impliquent une résorption osseuse excessive ; ils ont été notamment montrés efficaces dans la prévention de l'ostéolyse chez des patients atteints de myélome multiple. Les bisphosphonates sont des analogues synthétiques de pyrophosphates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

Il existe des relations structurales entre les bisphosphonates et certains ligands identifiés des lymphocytes T $\gamma\delta$. Sur la base de cette observation, la capacité de stimulation des lymphocytes T $\gamma\delta$ par les bisphosphonates a été évaluée. Les résultats sont présentés à la **Figure 8**.

Figure 8

A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés avec des concentrations croissantes de différents bisphosphonates en présence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le pourcentage de cellules T $\gamma\delta$ parmi les cellules CD3⁺ a été mesuré en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps anti-CD3 et anti-C δ couplés à des fluorochromes. Comme contrôle positif, les cellules ont été stimulées avec IPP, un stimulateur des cellules T $\gamma\delta$ isolés des mycobactéries.

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

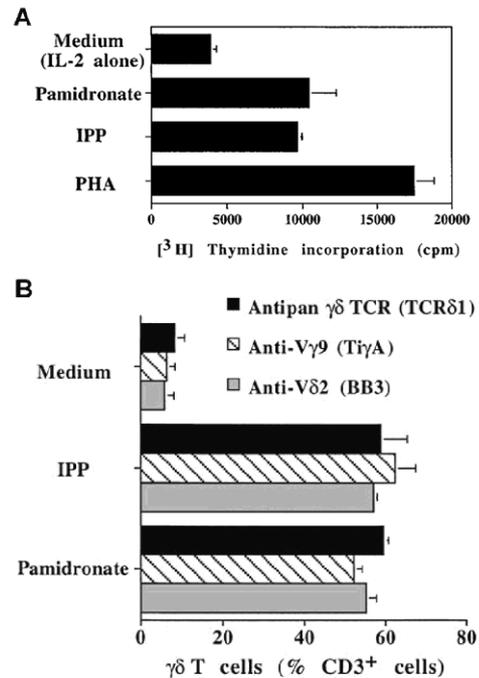


Question 3. *Interprétez les résultats de cette expérience. On notera qu'aucune autre population cellulaire parmi les PBMC ne prolifère dans les conditions de l'expérience. (8 lignes maximum)*

Dans une deuxième expérience, l'expression de V γ 9 et V δ 2 à la surface de lymphocytes T $\gamma\delta$ activés par le pamidronate, l'IPP ou la PHA a été évaluée. Les résultats sont présentés à la **Figure 9**.

Figure 9

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



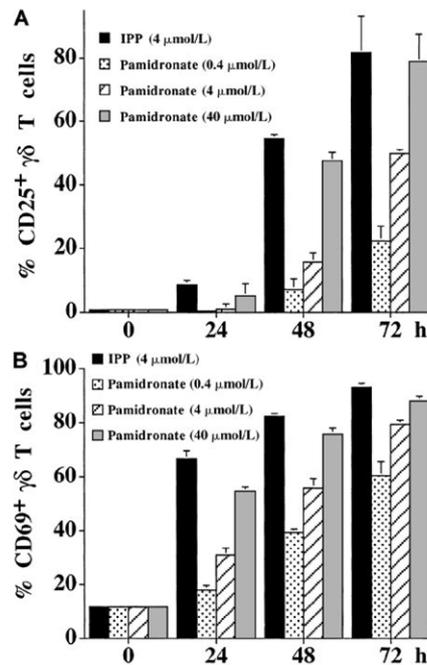
Question 4. *Qu'apportent les résultats de cette expérience ? (5 lignes maximum)*

Dans une autre expérience, l'activation des cellules T $\gamma\delta$ par le pamidronate en l'absence d'IL-2 a été évaluée par la mesure de l'expression de CD25 et CD69, deux marqueurs d'activation des lymphocytes T. Les résultats sont présentés dans la **Figure 10**.

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

Figure 10

Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en présence de 4 μM d'IPP ou de 0,4, 4 et 40 μM de pamidronate, en l'absence d'IL-2. L'expression de CD25 (A) ou CD69 (B) a été déterminée à 0, 24, 48 et 72h de culture par double marquage avec les anticorps anti-C δ et anti-CD25(A) ou anti-CD69 (B).

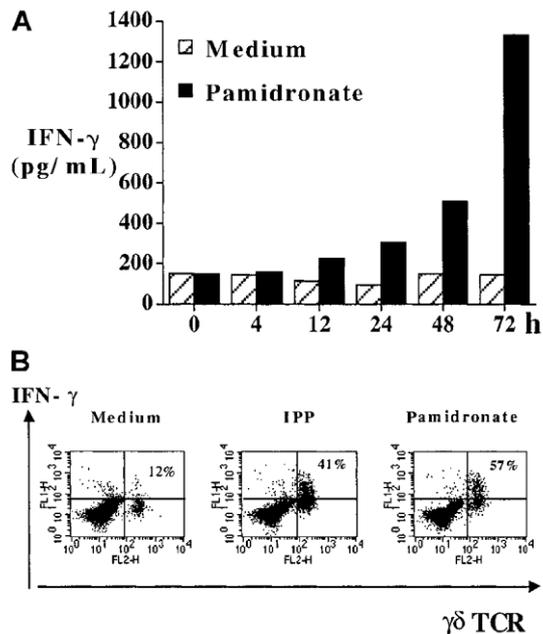


La production d'IFN γ par les cellules T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 11**.

Figure 11

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

- (A) La production d'IFN γ a été mesurée par ELISA au cours du temps pour les cellules incubées en absence ou en présence de pamidronate.
- (B) L'expression d'IFN γ intracellulaire par les cellules T $\gamma\delta$ a été déterminée après 72h de culture par double marquage avec les anticorps anti-C δ et anti-IFN γ .



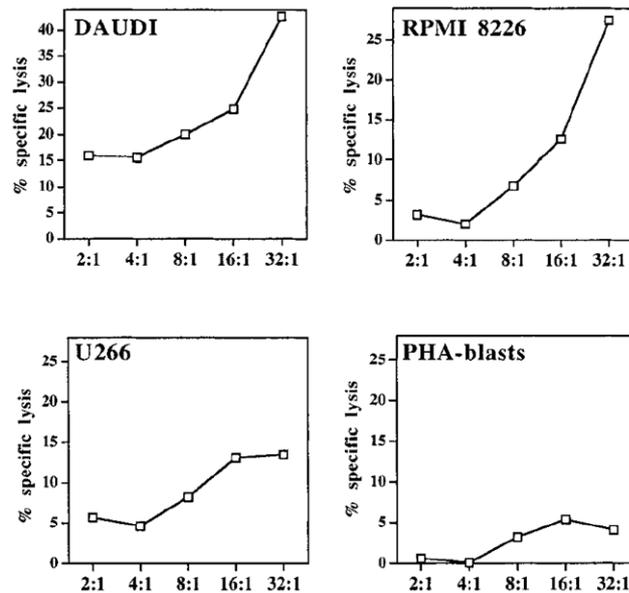
Question 6. Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 11B. (5 lignes maximum)

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

La capacité de cytolyse *in vitro* d'une lignée T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée vis-à-vis de différentes lignées tumorales. Les résultats sont présentés dans la **Figure 12**.

Figure 12

La cytotoxicité d'une lignée T $\gamma\delta$ activée par le pamidronate a été testée vis-à-vis de cellules de la lignée de lymphome DAUDI, des lignées de myélome RPMI 8826 et U266 ou de PBMC allogéniques activés par la PHA, préalablement chargés en Cr⁵¹. La capacité de lyse a été mesurée pour différents ratios effecteur:cible.



Question 8. Analysez ces résultats. En particulier, vous indiquerez de quelle(s) expérience(s) contrôle(s) vous auriez souhaité disposer afin de préciser votre interprétation. (5 lignes maximum)

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

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

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

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

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

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