

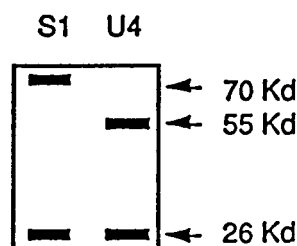
Activation B/T; Commutation; Fonctions effectrices

I.

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

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

Figure 1



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

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

Tableau 1

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

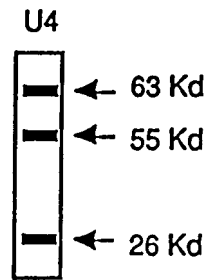
* Titre d'hémagglutination

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

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

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

Figure 2



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

II.

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

Tableau 2

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

a: Nomenclature des inhibiteurs,

b: Isotype des chaînes légère et lourde,

c: Nature de l'antigène reconnu

PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.

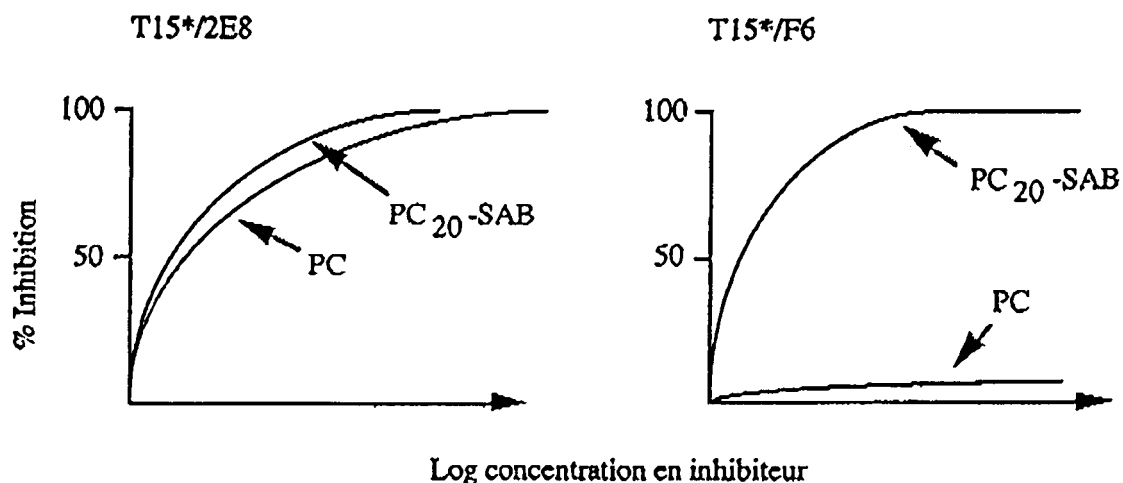
+ = inhibition, - = pas d'inhibition.

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

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

Question 2. Interpréter ces résultats.

Figure 3



Les quatre anticorps monoclonaux ont été utilisés pour tenter d'inhiber des plages d'hémolyses locales (PFC) obtenues en mélangeant *in vitro* des cellules de souris BALB/c anti-PC, de la PC couplée à des globules rouges de mouton et du complément. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3

Anticorps inhibiteurs	Nombre de PFC anti-PC/rate
-	120 000
S1 60	115 000
S1 04	117 000
2E8	800
F6	950

Question 3. Ces résultats sont-ils en accord avec la spécificité supposée de chaque hybridome ?

III.

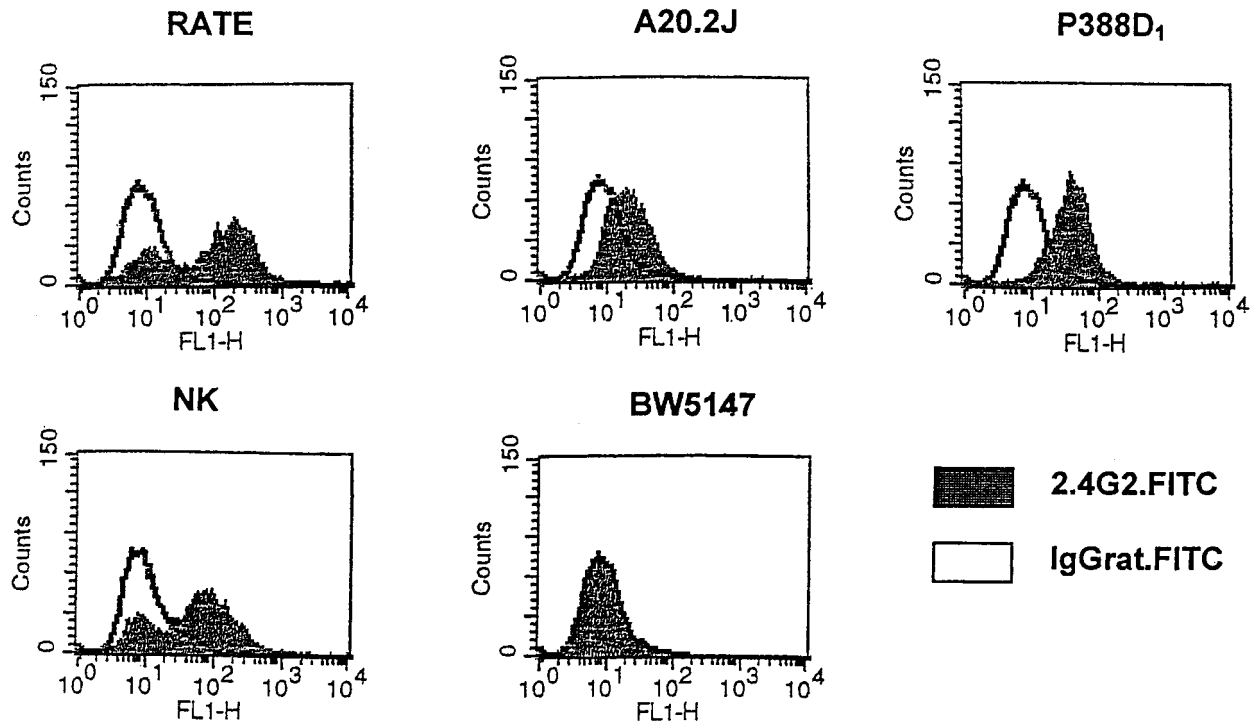
Il existe, chez la souris, deux types de récepteurs $Fc\gamma$ liant les complexes immuns à IgG, les $RFc\gamma II$ et $RFc\gamma III$ qui sont codés par deux gènes distincts. Les $RFc\gamma II$ et $RFc\gamma III$ sont des glycoprotéines transmembranaires qui présentent une forte identité de séquence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

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

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

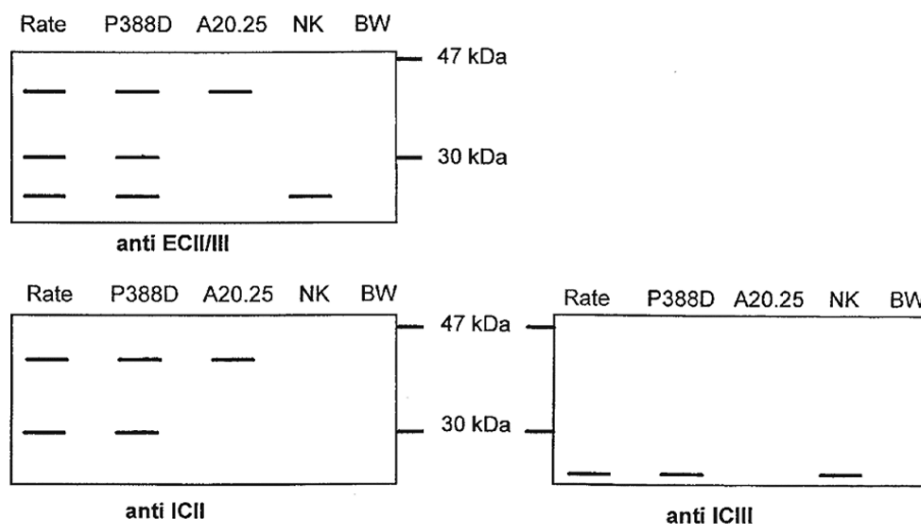
Question 1. Que concluez-vous ?

Figure 4



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

Figure 5



Question 2. Comment interprétez-vous ces résultats ?

IV.

On prépare une suspension cellulaire par traitement de cellules de rate de souris C57BL/6 par un mélange d'anticorps monoclonaux anti-Thy1.1 et de complément.

Question 1. *Quel(s) type(s) cellulaire(s) cette suspension contient-elle ?*

Question 2. *Comment l'évaluer rapidement (en quelques heures) ?*

On prépare selon ce protocole des suspensions cellulaires à partir de rates de souris B6 (+/+) ou de souris B6 invalidées pour le gène codant pour le RFc γ II de type II (-/-). On cultive des cellules en présence d'anticorps de chèvre anti-IgM (qui réagit avec le BCR) entiers (anti-IgM) ou de leurs fragments Fab'2 (Fab'2 anti-IgM) ou de LPS. On mesure la prolifération cellulaire après 48 heures de culture par incubation des cellules pendant 16 heures avec de la thymidine ^3H qui s'incorpore à l'ADN des cellules en phase S. On obtient les résultats suivants (l'anticorps 2.4G2 est un anticorps monoclonal de rat anti-RFc γ II et RFc γ III de souris) :

	cpm [^3H] $\pm$ SD	
	Rate RFc γ II ^{+/+}	Rate RFc γ II ^{-/-}
Contrôle	800 $\pm$ 100	700 $\pm$ 200
Fab'2 anti-IgM (20 $\mu\text{g/ml}$)	4000 $\pm$ 800	5000 $\pm$ 900
IgG anti-IgM (30 $\mu\text{g/ml}$)	500 $\pm$ 100	6000 $\pm$ 1000
IgG anti-IgM (30 $\mu\text{g/ml}$) + 2.4G2 (1,5 $\mu\text{g/ml}$)	3800 $\pm$ 800	5000 $\pm$ 700
LPS	14000 $\pm$ 1200	12000 $\pm$ 1200

Question 3. *Quelles conclusions tirez-vous quant au rôle des RFc γ II sur la prolifération cellulaire provoquée par l'agrégation du BCR ?*

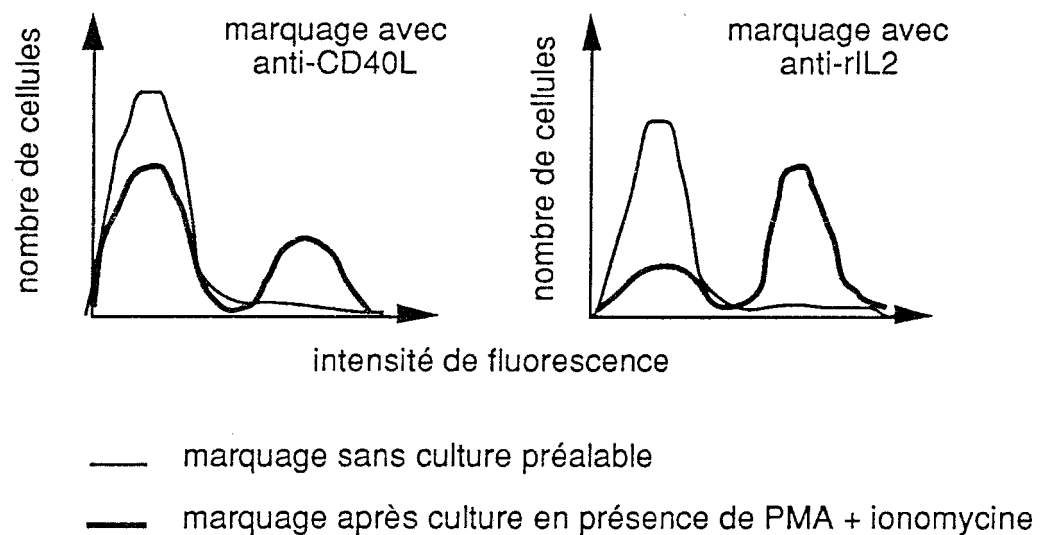
V.

Les expériences décrites ci-dessous ont pour objet de mettre en évidence le rôle de deux protéines (appelées CD40 et CD40L) dans la mise en place d'une réponse immune contre certains antigènes. La protéine CD40 est une protéine membranaire exprimée à la surface de cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules B, les cellules dendritiques et certaines cellules épithéliales. La protéine CD40L est une protéine membranaire exprimée de façon transitoire à la surface de cellules T comme le montre l'expérience suivante.

Des cellules spléniques de souris sont marquées à l'aide d'anticorps fluorescents dirigés contre CD40L ou contre le récepteur de l'interleukine 2 (rIL2), puis analysées pour leur capacité à fixer ces anticorps à leur surface. Les cellules ont été ou non préalablement cultivées en présence de PMA (phorbol myristyl acetate) et d'ionomycine qui sont des agents chimiques permettant une activation polyclonale des cellules T (c'est-à-dire une activation indépendante de la spécificité du récepteur T et indépendante de la présence d'antigène). Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

Question 1. *Analyser ces résultats en précisant la nature des cellules présentant une forte intensité de fluorescence.*

Figure 6



Deux lignées de souris mutantes ($CD40^{-/-}$ et $CD40L^{-/-}$), obtenues par manipulation génétique, sont respectivement déficientes pour l'expression des molécules CD40 et CD40L. Ces souris présentent une certaine fragilité vis-à-vis d'agents infectieux bien que les nombres de cellules B et T soient comparables à ceux de souris contrôles non-mutantes. Leur capacité à répondre contre les antigènes globules rouges de mouton (GRM), ovalbumine de poulet (OVP) ou trinitrophényl couplé au lipopolysaccharide (TNP-LPS) est testée en déterminant la réponse anticorps. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 4**.

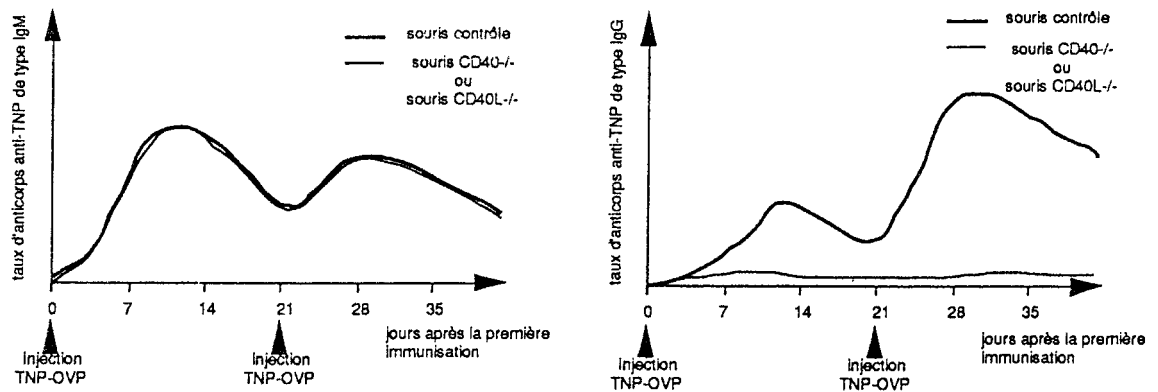
Tableau 4

Lignées de souris	Plages de lyse anti-GRM	Anticorps anti-OVP	Anticorps anti-TNP
Contrôle	+++	+++	+++
$CD40L^{-/-}$	+/-	+/-	+++
$CD40^{-/-}$	+/-	+/-	+++
<i>Nude</i>	-	-	+++

Question 2. *Décrire succinctement les tests permettant d'analyser la réponse anticorps vis-à-vis des différents antigènes utilisés. Sachant que les souris nude sont des souris dépourvues de thymus, interpréter les résultats ci-dessus.*

L'expression des classes IgM et IgG est recherchée parmi les anticorps anti-TNP induits en réponses primaire et secondaire au TNP couplé à l'ovalbumine (TNP-OVP). Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

Figure 7



D'autre part, les taux dans le sérum d'IgM, d'IgG et d'IgA sont déterminés dans les différentes lignées de souris non-immunisées. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 5**

Tableau 5

Lignées de souris	Taux dans le sérum en µg/ml		
	IgM	IgG	IgA
Contrôle	400	1500	50
CD40L ^{-/-}	380	50	10
CD40 ^{-/-}	390	48	11

Question 3. Interpréter les résultats de la **Figure 7**.

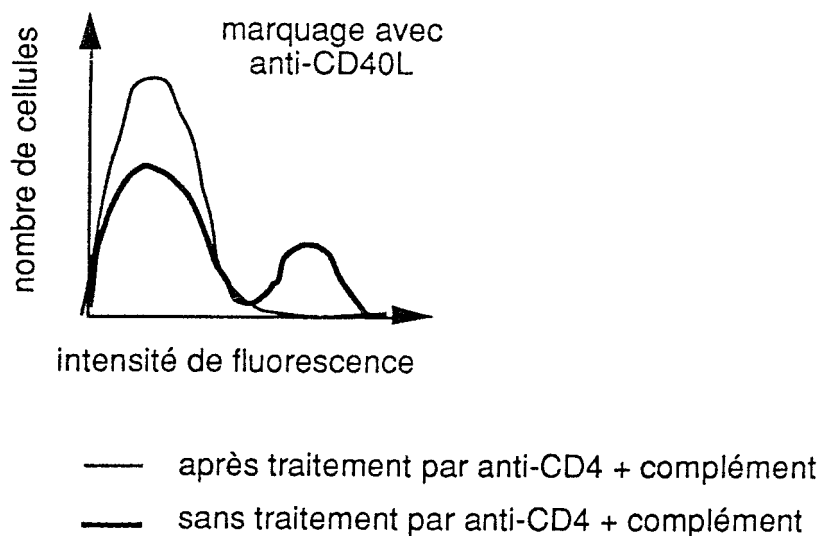
Question 4. Comment interpréter les données du **Tableau 1** ci-dessus à la lumière des résultats obtenus après immunisation contre le TNP-OVP ?

L'expérience décrite à la première question est de nouveau réalisée à partir de cellules spléniques de souris contrôles. Avant la mise en culture en présence de PMA et d'ionomycine, les cellules sont traitées avec des anticorps anti-CD4 plus du complément. Les résultats de la **Figure 8** concernent uniquement le marquage des cellules activées à l'aide l'anti-CD40L fluorescent.

Question 5. Sachant que le nombre de cellules T a diminué après traitement par l'anti-CD4+ complément, préciser l'action du traitement.

Question 6. Que conclure des résultats présentés sur la **Figure 8** ? A l'aide de ces nouvelles données, proposer un schéma d'interaction cellulaire illustrant le rôle des molécules CD40 et CD40L lors de la réponse anticorps anti-TNP après immunisation contre le TNP-OVP.

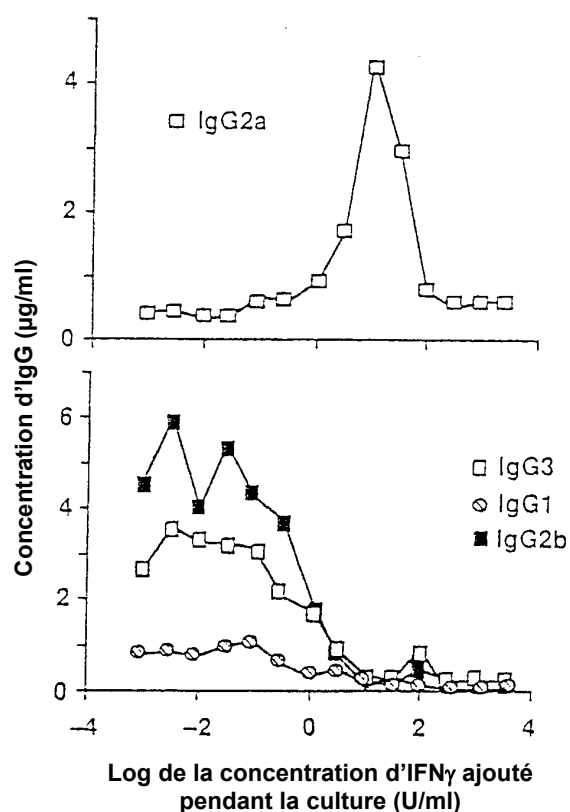
Figure 8



VI.

On étudie l'effet d'une cytokine produite par les cellules T activées, l'interféron γ (IFN γ), sur la sécrétion des immunoglobulines (Ig) par des lymphocytes B. Pour cela, on cultive des lymphocytes B au repos pendant 6 jours en présence d'IFN γ et de LPS (un activateur polyclonal des lymphocytes B). La production des IgG est mesurée dans les surnageants de culture par ELISA spécifique d'isotype. On note que pour les concentrations fortes d'IFN γ (>100 U/ml), la mortalité des cellules en culture est très importante. On obtient les résultats suivants présentés dans la **Figure 9**.

Figure 9



Question 1. Interpréter ces résultats.

Question 2. Imaginer un mécanisme pouvant expliquer ces résultats.

VII.

(Exercice I, Examen d'Immunologie Fondamentale - juin 2002. D'après Tamada, K. *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164, 4105-4110 ; Zhai, Y. *et al.* (1998) *J. Clin. Invest.* 102, 1142-1151; Rooney, I. A. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 14307-14315; Wang, J. *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167, 5099-5105 ; Tamada, K. *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168, 4832-4835)

Les membres de la famille du TNF et du récepteur du TNF sont des molécules impliquées dans la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire ou l'apoptose et jouent un rôle très important dans la régulation de certaines fonctions du système immunitaire.

Parmi ces molécules, la protéine LIGHT a récemment été identifiée et son expression a été observée surtout dans les tissus lymphoïdes (thymus et rate). Des analyses par cytométrie de flux ont montré que LIGHT est exprimée par les cellules dendritiques immatures et par les lymphocytes activés. Cette protéine peut se fixer sur 3 récepteurs : HVEM, LT β R et TR6. On se propose d'étudier le rôle de la molécule LIGHT au sein du système immunitaire.

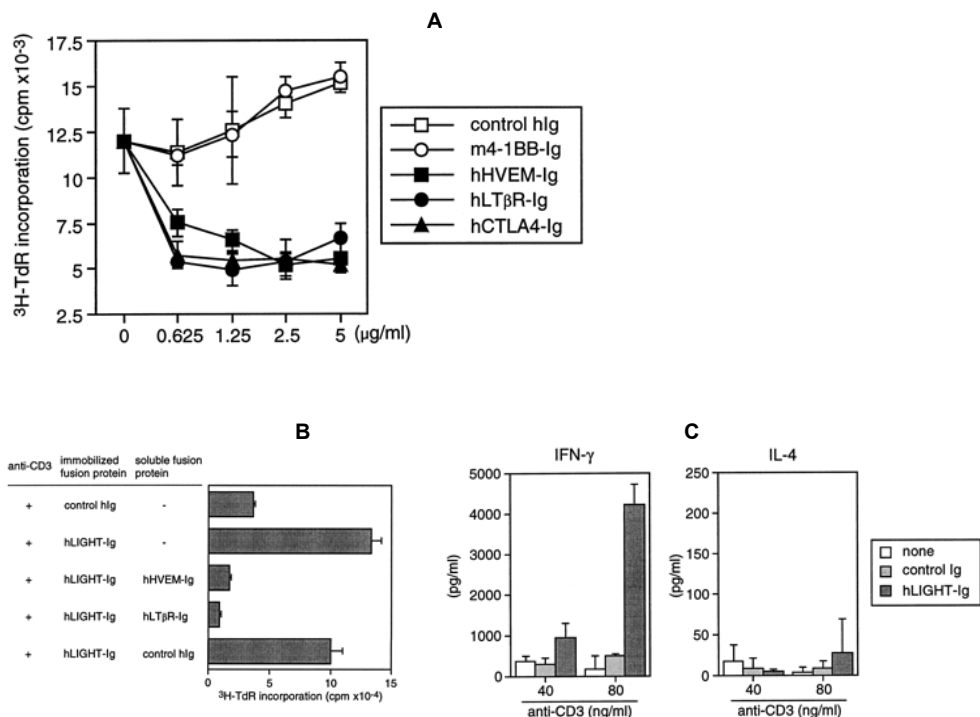
1^{ère} partie

- Dans un 1^{ère} expérience, des cellules T humaines purifiées ont été cultivées avec des cellules dendritiques allogéniques irradiées, en présence de doses croissantes des protéines de fusion HVEM-Ig, LT β R-Ig, m4-1BB-Ig (protéine contrôle) ou hCTLA4-Ig. La prolifération des lymphocytes T a été mesurée après 3 jours, par incorporation de thymidine ^3H . Les résultats de cette prolifération sont présentés dans la **Figure 10A**.

- Ensuite, des lymphocytes T ont été cultivés en présence d'anticorps anti-CD3, puis ont été lavés et incubés avec la protéine de fusion hLIGHT-Ig, en présence ou en absence des protéines de fusion hVEM-Ig, hLT β R-Ig ou control hIg. La prolifération des lymphocytes T a été mesurée après 3 jours par incorporation de thymidine ^3H . Les résultats sont présentés dans la **Figure 10B**.

- Enfin, des lymphocytes T ont été cultivés en présence d'anticorps anti-CD3 et de la protéine de fusion hLIGHT-Ig pendant 2 jours. La production des cytokines IFN- γ et IL-4 a été mesurée dans les surnageant de culture par ELISA. Les résultats sont présentés dans la **Figure 10C**.

Figure 10



Question 1. Expliquez pourquoi on a utilisé les molécules de fusion hHVEM-Ig, hLT β R-Ig et hCTLA4-Ig dans la **Figure 10A** ?

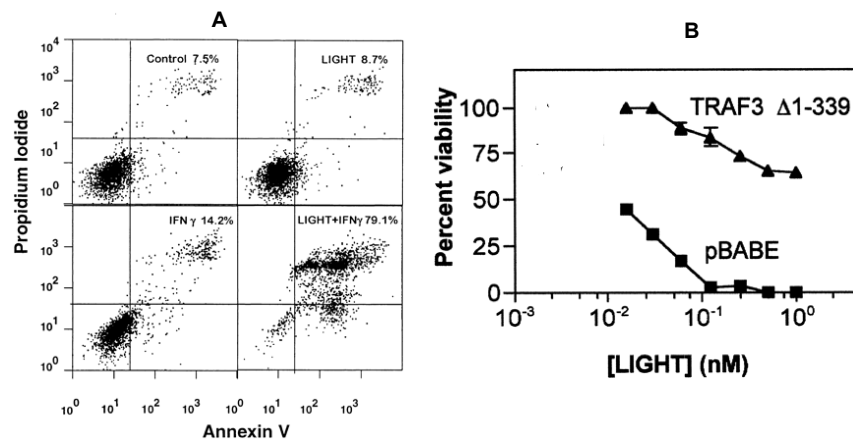
Question 2. Que pouvez vous conclure du(des) rôle(s) de la molécule LIGHT ?

2^{ème} partie

- Des cellules de la lignée HT-29 (cellules humaines de cancer du colon, qui expriment les récepteurs LT β -R et HVEM) ont été incubées pendant 3 jours en absence (control), ou en présence de la protéine LIGHT seule ou en combinaison avec de l'IFN- γ . Les cellules ont ensuite été marquées avec l'annexine V et l'iodure de propidium et analysées au cytomètre (**Figure 11A**).

- Les cellules HT-29 ont été transduites par un vecteur rétroviral contrôle (pBABE) ou par un vecteur permettant aux cellules d'exprimer en excès une forme inactive de la molécule TRAF3 (TRAF3 Δ 1-339). Les cellules transduites ont été incubées en présence de 80 unités/ml d'IFN- γ et de concentrations croissantes de LIGHT et leur viabilité a été mesurée (**Figure 11B**).

Figure 11



Question 3. Quelles sont les fonctions des molécules de la famille TRAF ?

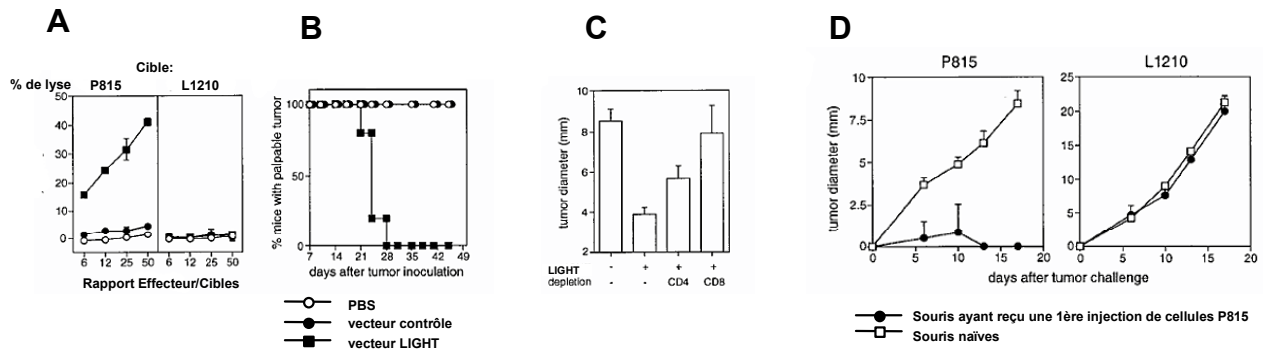
Question 4. Que pouvez-vous déduire de ces expériences ? L'expérience est-elle suffisamment contrôlée pour permettre de conclure précisément ?

- Des souris DBA/2 ont été inoculées par voie sous-cutanée avec des cellules tumorales P815 (mastocytome murin). Après une semaine, ces souris qui ont développé des tumeurs (palpables sous la peau), ont reçu des injections intra-tumorales de PBS, de vecteur permettant l'expression de LIGHT (vecteur LIGHT), ou d'un vecteur contrôle. Après 7 jours, les splénocytes des souris ont été re-stimulés *in vitro* avec des cellules P815 irradiées. L'activité cytotoxique de ces splénocytes a été mesurée (par un test de relargage du chrome 51) en utilisant comme cellules cibles des cellules P815 ou L1210 (lymphome murin) (**Figure 12A**). Parallèlement, le pourcentage de souris ayant développé des tumeurs a été déterminé (**Figure 12B**).

- La même expérience a été réalisée avec des souris dont on a déplété au préalable les cellules CD4⁺ ou CD8⁺ avant d'injecter le vecteur LIGHT dans les tumeurs. Le diamètre des tumeurs a été mesuré après 21 jours (**Figure 12C**).

- Les souris présentant une régression tumorale due à l'injection du vecteur LIGHT ont reçu 40 jours après l'inoculation de cellules P815, une seconde injection de cellules P815 ou L1210. Des souris DBA/2 naïves ont été utilisées comme souris contrôles (**Figure 12D**).

Figure 12



Question 5. Expliquez brièvement le principe d'un test de cytotoxicité et précisez l'importance des contrôles.

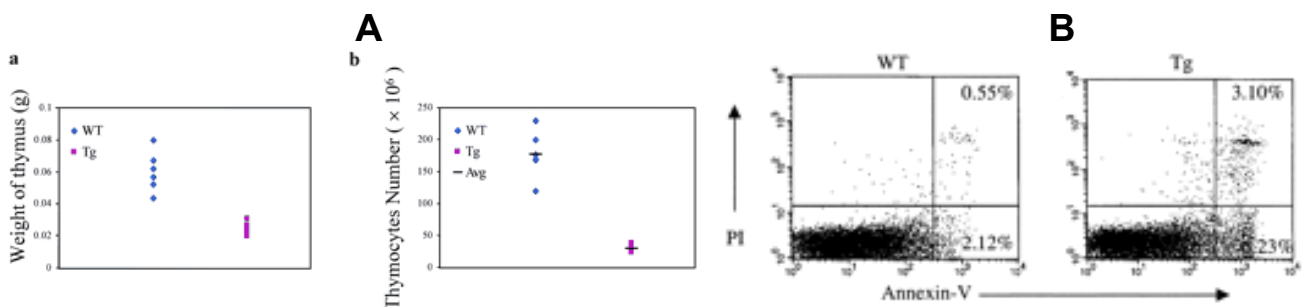
Question 6. Interprétez les résultats présentés dans la **Figure 12**. Quelle est la fonction de LIGHT mise ici en évidence ?

3^{ème} partie

Des souris transgéniques, exprimant la protéine LIGHT sous le contrôle d'un promoteur lck et d'un enhancer CD2 (permettant une forte expression de LIGHT dans les thymocytes), ont été établies. Les poids et taille des thymus des souris transgéniques (Tg) ont été comparés à ceux des souris de type sauvage (WT) (**Figure 13A**).

Ayant observé chez les souris Tg une diminution de 50% du nombre de thymocytes $CD4^+CD8^+$ (par comparaison avec les souris WT), on a réalisé une expérience de marquage avec l'annexine V et l'iodure de propidium (PI) sur les thymocytes $CD4^+CD8^+$ des souris WT et Tg (**Figure 13B**).

Figure 13



Question 7. Que pensez vous de ces expériences ?

4^{ème} partie

Afin d'étudier les fonctions *in vivo* de la protéine LIGHT, des souris déficientes pour LIGHT (LIGHT^{-/-}) ont été établies. Chez ces souris déficientes, on a constaté que :

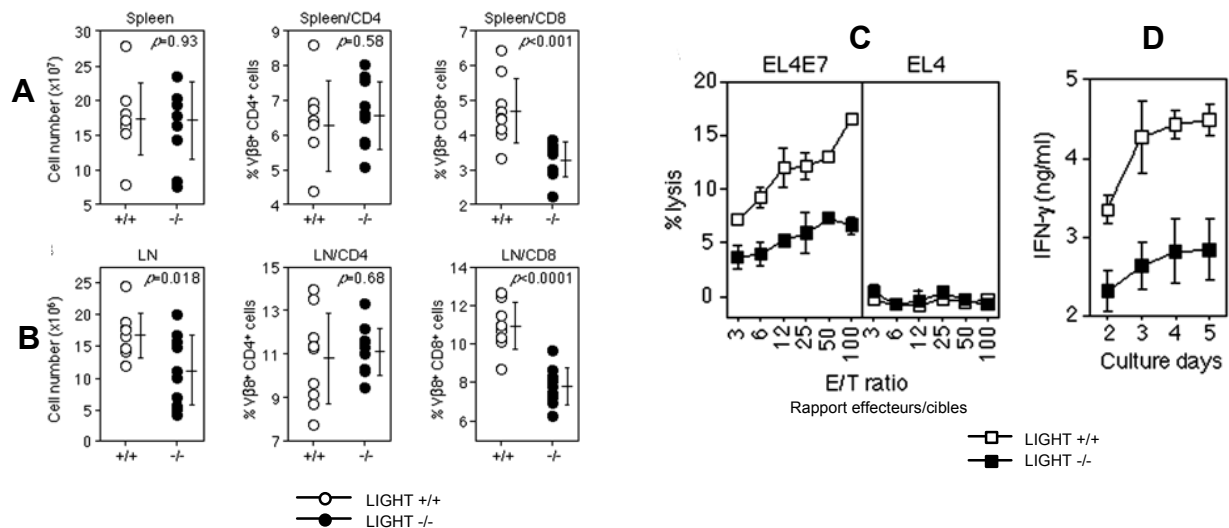
- 1) Les tissus lymphoïdes sont normaux (thymus, rate, ganglions et plaques de Peyer)
- 2) La micro-architecture des organes lymphoïdes secondaires est normale
- 3) La capacité des cellules dendritiques à stimuler la prolifération des lymphocytes T est normale et la production d'IFN- γ par ces lymphocytes T est comparable à celle des souris WT

- Le superantigène SEB (entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*) induit une forte expansion puis une déplétion des cellules T $V\beta 8^+ CD4^+$ et $CD8^+$ de façon dépendante du CMH de classe II. Le

superantigène SEB a été injecté à des souris de type sauvage (LIGHT^{+/+}) ou déficientes (LIGHT^{-/-}). Après 3 jours, les nombres de cellules totales et les pourcentages de cellules V β 8⁺ ont été déterminés dans les rates (spleen) (**Figure 14A**) et les ganglions (LN) (**Figure 14B**).

- Le peptide E7 (dérivé de la protéine E7 du papillomavirus-16 et présenté par la molécule H-2D^b) a été injecté par voie sous cutanée en présence d'adjuvant à des souris LIGHT^{+/+} ou LIGHT^{-/-}. Après 7 jours, les cellules des ganglions drainants ont été incubées *in vitro* avec des cellules irradiées de la lignée EL4E7 (cellules de lymphome EL4 exprimant E7) pendant 5 jours. Les activités cytotoxiques ont alors été mesurées en utilisant comme cellules cibles, les cellules EL4E7 ou les cellules EL4 (**Figure 14C**). La production d'IFN- γ dans les surnageants de culture a été quantifiée au cours du temps (**Figure 14D**).

Figure 14



Question 8. Quelles conclusions pouvez-vous tirer de ces expériences ?

Question 9. A votre avis, pourquoi n'obtient-on pas les mêmes résultats *in vitro* et chez les souris LIGHT^{-/-} ? Emettez des hypothèses permettant d'expliquer ces différences.