

Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)

UE BMC423 – Immunologie Fondamentale
Epreuve écrite – juin 2005

Durée de l'épreuve : 3 heures

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

Barème indicatif :

Exercice I noté sur 14 points

Exercice II noté sur 6 points

Exercice I (noté sur 14 points)

(D'après Carpino, N., *et al.* (2004) *Immunity* 20:37)

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la reconnaissance et l'élimination des agents pathogènes. La signalisation par le récepteur spécifique d'antigène des cellules T (TCR) contrôle l'intensité et la durée de la réponse lymphocytaire T. Les voies d'activation de la réponse lymphocytaire T sont soumises à plusieurs boucles de régulations positives et négatives qui visent à éviter une activation inappropriée de ces cellules.

Dans cette étude, les auteurs étudient la fonction de deux protéines homologues, Sts-1 et Sts-2, impliquées dans la régulation de l'activation lymphocytaire T. Dans une première expérience, les auteurs caractérisent l'expression de ces deux protéines dans différents organes par des expériences d'immunoprécipitation et de Western blot. Ces résultats sont présentés sur la **Figure 1**.



Figure 1

B : Dans le panneau de gauche, des lysats cellulaires de rate (spleen), muscle, cœur (heart), poumon (lung), rein (kidney), thymus, cerveau (brain) et foie (liver) ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps anti-Sts-2. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membranes de nitrocellulose, incubées avec le même anticorps anti-Sts-2 et révélées par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Dans le panneau de droite, des lysats cellulaires de moelle osseuse (bone marrow) ont été immunoprécipités (IP) à l'aide des anticorps anti-Sts-1 ou anti-Sts-2. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été analysées par Western blot comme précédemment à l'aide d'anticorps anti-Sts-1 ou anti-Sts-2, respectivement (blot).

C : Des lysats cellulaires de lymphocytes B ou T purifiés de rate (spleen) ont été immunoprécipités (IP) à l'aide des anticorps anti-Sts-1 ou anti-Sts-2. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été analysées par Western blot comme précédemment à l'aide d'anticorps anti-Sts-1 ou anti-Sts-2, respectivement (blot).

N.B. : Les anticorps anti-Sts-1 et anti-Sts-2 ont été obtenus après immunisation de lapins avec un peptide de 15 acides aminés correspondant à la portion C-terminale de chaque protéine.

Question 1. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le principe de la technique IP/Western mise en œuvre dans cette expérience.

Question 2. Comment expliquez-vous la présence d'immunoglobulines (Ig) en bas de chaque blot sur la Figure 1 ? (5 lignes maximum)

Question 3. Sachant que les auteurs ont montré par ailleurs que la protéine Sts-1 est exprimée dans tous les organes étudiés, que concluez-vous de cette expérience ? (5 lignes maximum)

Dans la suite de leurs travaux, les auteurs ont produits des souris déficientes pour les gènes Sts-1 (STS1^{-/-}) et Sts-2 (STS2^{-/-}) par la technique d'inactivation génique (KO). Par croisement des souris STS1^{-/-} et STS2^{-/-}, ils ont obtenu des souris « double KO », à la fois déficientes pour Sts1 et

Sts-2. Ils ont alors étudié le développement lymphocytaire chez ces souris double KO comme présenté sur la **Figure 2**.

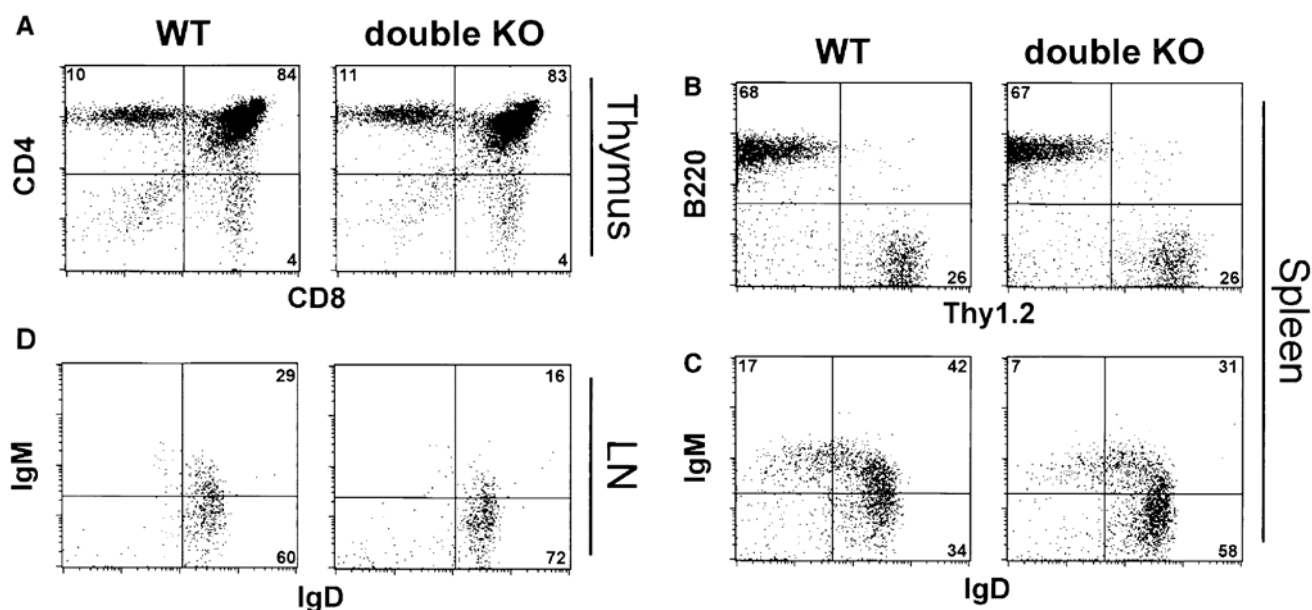


Figure 2

A : Les thymocytes de souris de type sauvage (WT) ou double KO (à la fois déficientes pour Sts-1 et Sts-2) ont été marqués avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes puis analysés en cytométrie de flux.

B : Les splénocytes (spleen) de souris WT ou double KO ont été marqués avec des anticorps anti-B220 et anti-Thy1.2 couplés à des fluorochromes puis analysés en cytométrie de flux.

C : Les splénocytes (spleen) de souris WT ou double KO ont été marqués avec des anticorps anti-IgM et anti-IgD couplés à des fluorochromes puis analysés en cytométrie de flux.

D : Les cellules de ganglion lymphatique (LN) de souris WT ou double KO ont été marquées avec des anticorps anti-IgM et anti-IgD couplés à des fluorochromes puis analysés en cytométrie de flux.

N.B. : Les chiffres indiqués dans les quadrants correspondent aux pourcentages de cellules marquées par les combinaisons d'anticorps correspondantes.

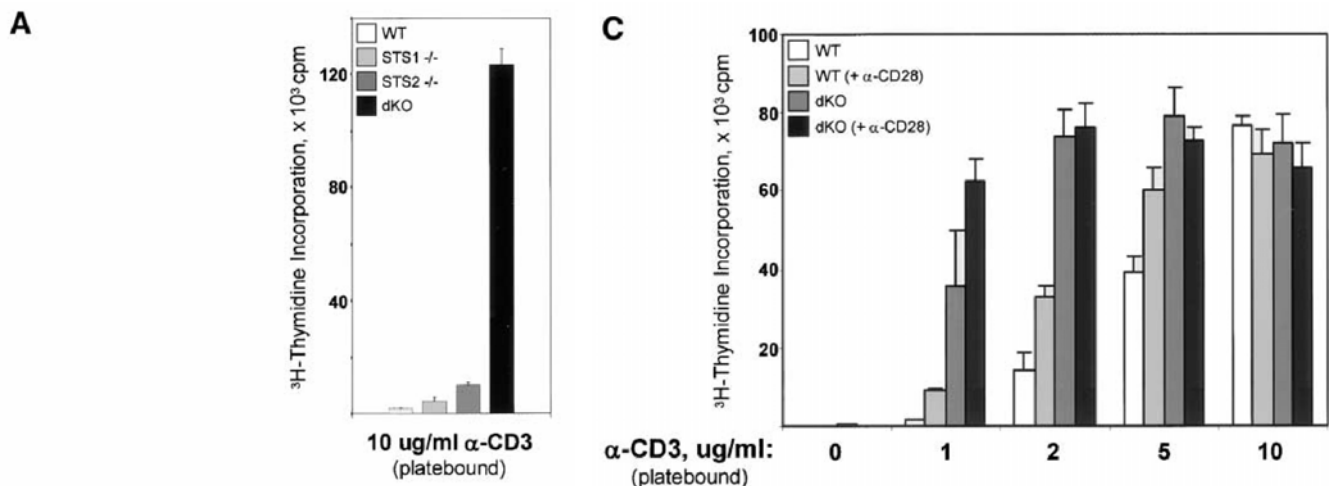
Question 4. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le principe de la lecture des résultats de doubles marquages présentés sur la Figure 2.

Question 5. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez les grandes lignes de la différenciation lymphocytaire B et T.

Question 6. Dans un tableau récapitulatif, résumez les résultats de la Figure 2.

Question 7. Que concluez-vous quant au rôle de Sts-1 et Sts-2 dans le développement lymphocytaire. (5 lignes maximum)

Dans une troisième expérience, les auteurs étudient la prolifération de thymocytes et de lymphocytes T périphériques en réponse à une stimulation par un anticorps anti-CD3, en présence ou non d'anticorps anti-CD28. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3**.

**Figure 3**

A : La prolifération de thymocytes de souris de type sauvage (WT), déficientes pour Sts-1 (STS1^{-/-}) ou pour Sts-2 (STS2^{-/-}), ou déficientes à la fois pour Sts-1 et Sts-2 (dKO), a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée après stimulation par un anticorps anti-CD3 immobilisé (platebound) à la concentration indiquée.

C : La prolifération de lymphocytes périphériques de souris WT ou dKO a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée après stimulation par des concentrations croissantes d'anticorps anti-CD3 immobilisé, en présence ou en absence d'anticorps anti-CD28.

N.B. : Les graphes indiquent les valeurs de radioactivité incorporée dans les cellules en cpm (coups par minute).

Question 8. A l'aide d'un schéma uniquement rappelez le principe de l'activation lymphocytaire T.

Question 9. A la lumière de votre réponse à la Question 8, justifiez le choix des anticorps utilisés à la Figure 3 pour l'activation des cellules T. (5 lignes maximum)

Question 10. Analysez les résultats présentés à la Figure 3. (8 lignes maximum)

Dans une quatrième expérience, les auteurs étudient, à l'aide de plusieurs techniques, la production de cytokines par des cellules de souris de type sauvage ou double KO après stimulation. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**.

Question 11. A l'aide d'un tableau récapitulatif uniquement, décrivez les différentes techniques de détection des cytokines mises en œuvre dans la Figure 4, en rappelant leur nom, leur principe ainsi que leurs avantages et inconvénients comparativement aux autres techniques utilisées.

Question 12. Analysez les résultats présentés à la Figure 4. (10 lignes maximum)

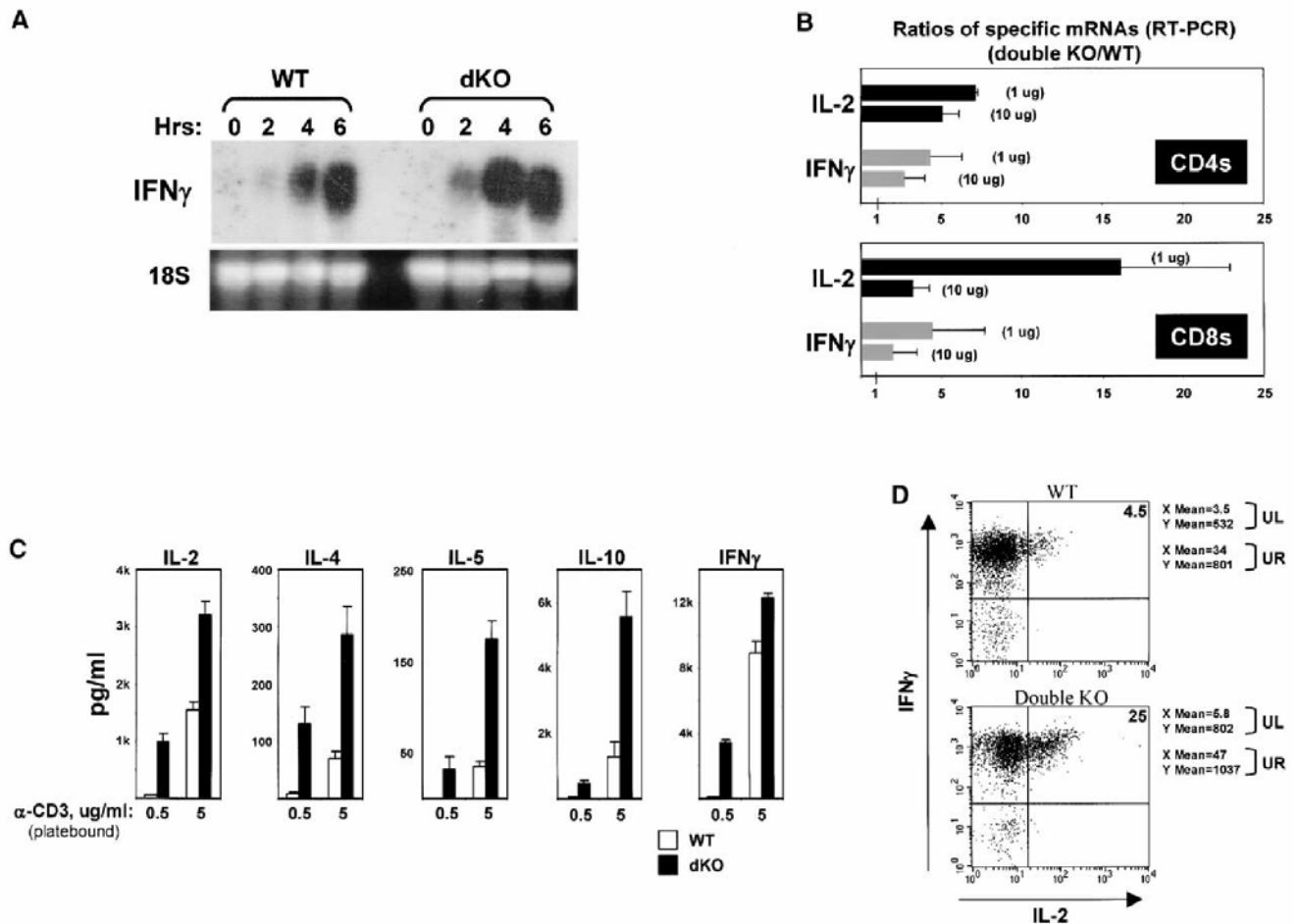


Figure 4

A : Des cellules de rate ont été stimulées *in vitro* pendant les temps indiqués avec un anticorps anti-CD3 puis analysées pour leur production d'IFN γ .

B : Des cellules T de rate triées, CD4 $^{+}$ (CD4s) ou CD8 $^{+}$ (CD8s), ont été activées *in vitro* pendant 4 heures avec les concentrations indiquées d'anticorps anti-CD3 (en μ g/mL) puis analysées pour leur production d'IL-2 et d'IFN γ .

C : Des cellules T de rate ont été stimulées *in vitro* pendant 48 h avec les concentrations indiquées d'anticorps anti-CD3 (en μ g/mL) puis analysées pour leur production d'IL-2, d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IFN γ .

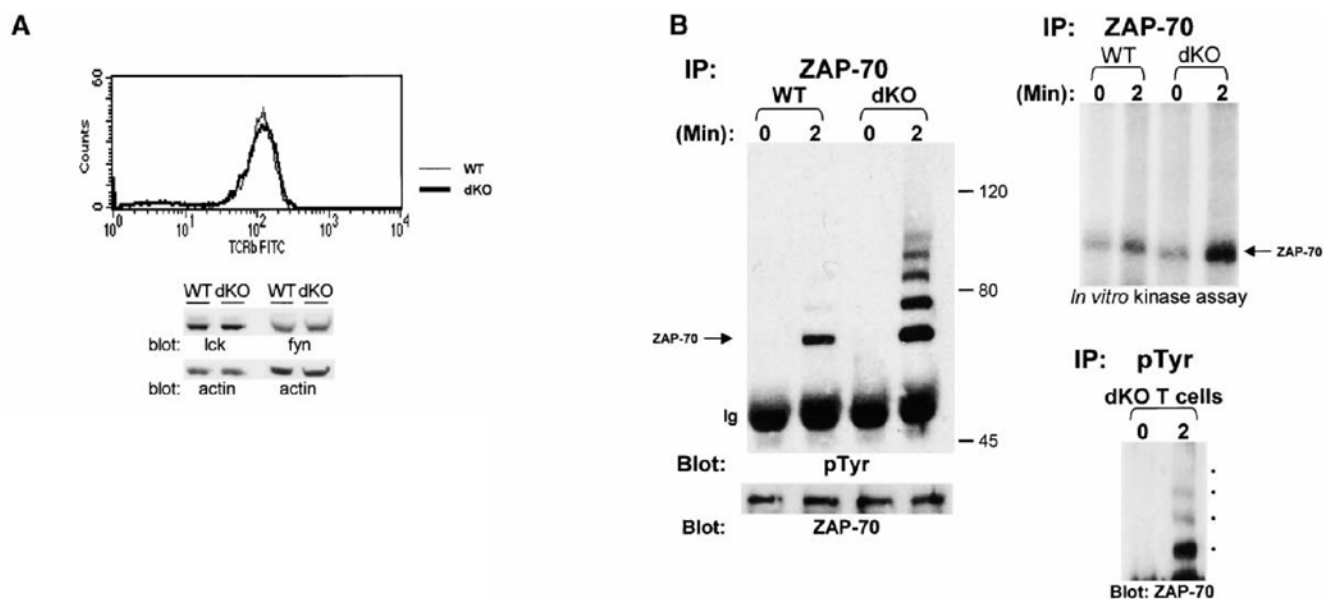
D : Des lignées cellulaires CD8 $^{+}$ issues des souris WT ou dKO spécifiques d'un peptide donné ont été stimulées *in vitro* pendant 5 heures en présence de ce peptide puis analysées pour leur production d'IL-2 et d'IFN γ (UL= haut gauche ; UR = haut droit).

N.B. : On compare à chaque fois la réponse obtenue à partir de cellules de souris de type sauvage (WT) ou déficientes à la fois pour Sts-1 et Sts-2 (dKO ou double KO). Les explications descriptives des différentes techniques mises œuvrées ont volontairement été omises (cf. Question 11).

Dans une cinquième expérience, les auteurs étudient le niveau d'expression, l'état d'activation et l'activité kinase de différentes molécules impliquées dans la cascade d'activation des cellules T via le TCR. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5**.

Question 13. Analysez les résultats présentés à la Figure 5. (8 lignes maximum)

Question 14. Que conclure quant à la nature des bandes présentes pour la souris dKO et dont le poids moléculaire est supérieur à celui de ZAP-70 sur la Figure 5B ? (5 lignes maximum)

**Figure 5**

A :

(en haut) L'expression de surface du TCR sur des cellules T spléniques a été mesurée par cytométrie de flux après marquage avec un anticorps anti-TCR. Les profils correspondent à des cellules T sur la base de l'expression du marqueur Thy1.

(en bas) Le niveau d'expression des protéines tyrosine kinases Ick et fyn impliquées dans les événements précoces de l'activation T a été mesuré par Western blot à partir de lysats cellulaires de rate et révélation avec les anticorps indiqués (blot). L'actine est ici utilisée comme contrôle.

B : Etude de l'expression de la protéine ZAP-70 dans des cellules de rate stimulées avec un anticorps anti-CD3 au temps indiqués par immunoprécipitation (IP) suivie d'un Western blot (Blot).

(à gauche) Immunoprécipitation avec un anticorps anti-ZAP-70 et révélation avec un anticorps anti-pTyr spécifique des tyrosines phosphorylées ou anti-ZAP-70.

(en haut à droite) Immunoprécipitation avec un anticorps anti-ZAP-70 et révélation de l'activité kinase (*in vitro* kinase assay).

(en bas à droite) Immunoprécipitation avec un anticorps anti-pTyr et révélation avec un anticorps anti-ZAP-70.

N.B. : On compare à chaque fois les résultats obtenus à partir de cellules de souris de type sauvage (WT) ou déficientes à la fois pour Sts-1 et Sts-2 (dKO).

Question 15. A l'aide d'un tableau synthétique, résumez les résultats observés chez les souris déficientes à la fois pour Sts-1 et Sts-2.

Question 16. A votre avis, quelles peuvent être les conséquences de la déficience de ces protéines sur le fonctionnement du système immunitaire ? (5 lignes maximum)

Exercice II (noté sur 6 points)

(D'après Kobayashi, K.S., *et al.* (2005) *Science* 307:731)

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle de Nod2, une molécule appartenant à une famille de récepteurs de l'immunité innée nouvellement identifiée. Pour cela, une lignée de souris déficiente pour Nod2 (Nod2^{-/-}) a été produite par invalidation et les auteurs étudient les conséquences de l'absence de Nod2 sur le développement et le fonctionnement du système immunitaire en situation physiologique et pathologique.

Question 17. *Rappelez, à l'aide d'un tableau synthétique, les différents types et le rôle des récepteurs de l'immunité innée.*

Dans une première expérience, les auteurs étudient la réponse *in vitro* et *in vivo* de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2^{-/-}) après stimulation par différentes molécules mettant en jeu des récepteurs de l'immunité innée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

Question 18. *Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 6. (15 lignes maximum)*

Question 19. *Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous avancer pour rendre compte de ces résultats quant au rôle de Nod2 ? (5 lignes maximum)*

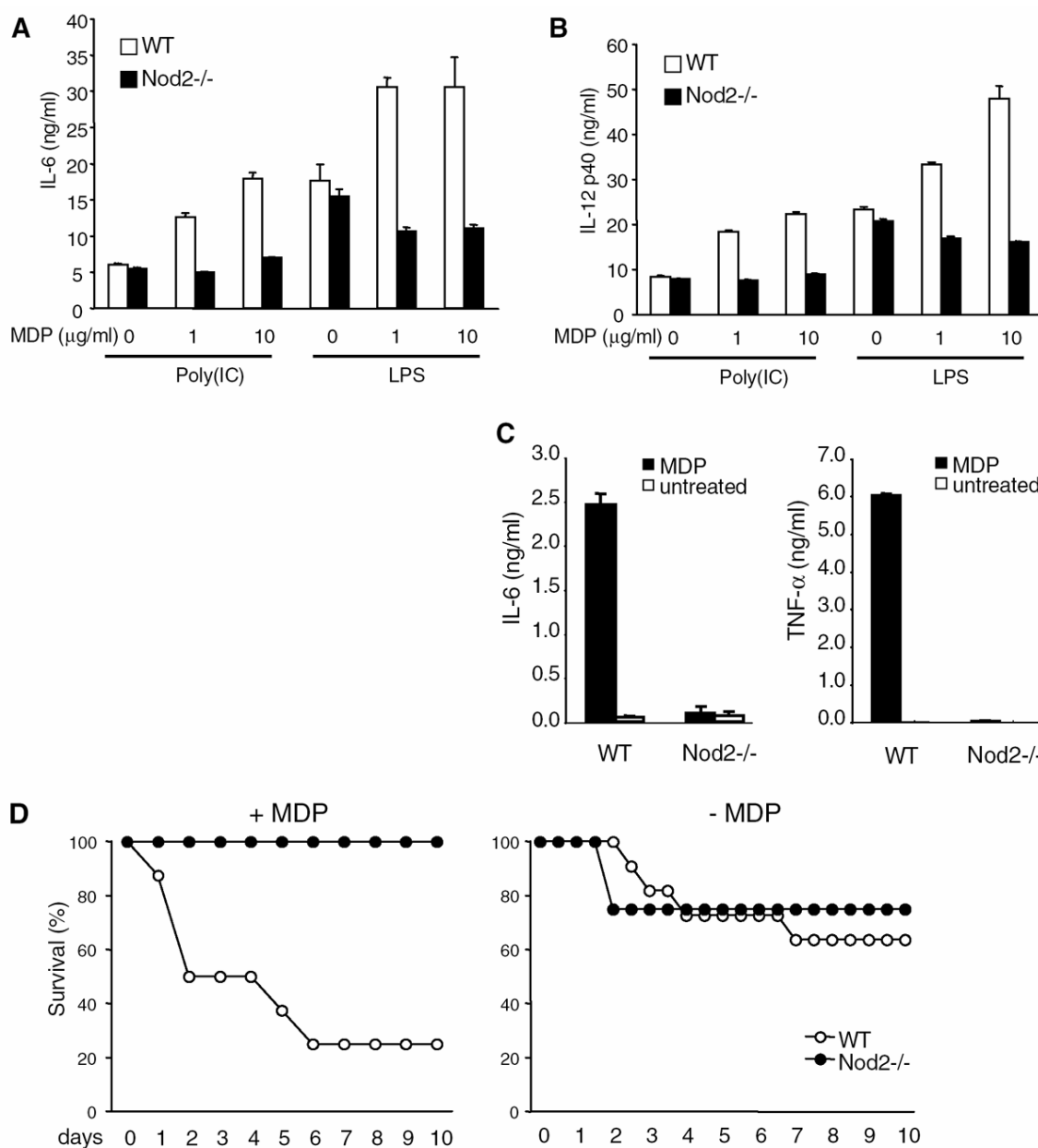
Dans une deuxième expérience, les auteurs étudient la réponse anticorps spécifique suite à une immunisation avec la sérum albumine humaine (HSA) chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2^{-/-}) en présence ou en absence de MDP. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

Question 20. *Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 7. (10 lignes maximum)*

Dans une dernière expérience, les auteurs mesurent la charge bactérienne chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2^{-/-}) après injection de *Listeria monocytogenes* par voies intraveineuse, intrapéritonéale ou intragastrique. Les résultats sont présentés sur la **Figure 8**.

Question 21. *Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 8. (10 lignes maximum)*

Question 22. *Que concluez-vous quant au rôle de Nod2 dans la protection contre des pathogènes bactériens ? (5 lignes maximum)*

**Figure 6**

A & B : Mesure de la production par ELISA d'IL-6 et d'IL-12 par des macrophages de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2^{-/-}) après stimulation *in vitro* pendant 24 h par du Poly(IC) ou du LPS en présence de concentrations croissantes de MDP (muramyl dipeptide).

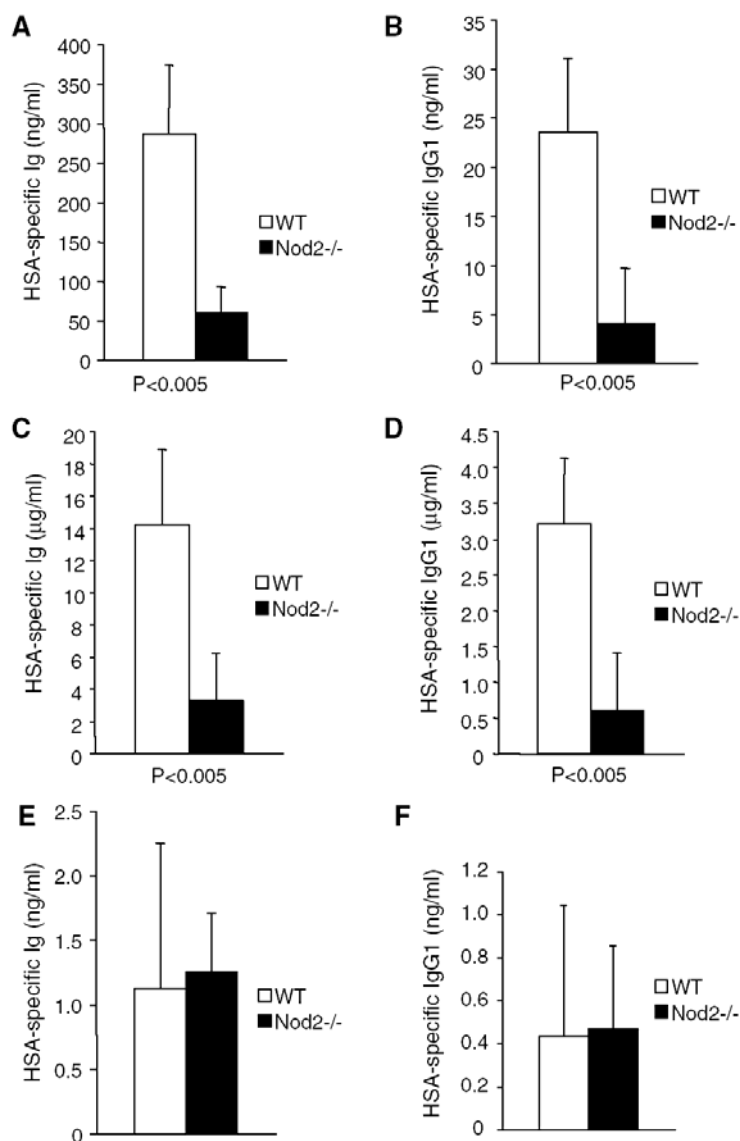
C : Mesure de la production par ELISA d'IL-6 et de TNF-α par des macrophages de souris WT ou Nod2^{-/-} après stimulation *in vitro* pendant 20 h en présence ou en absence de MDP.

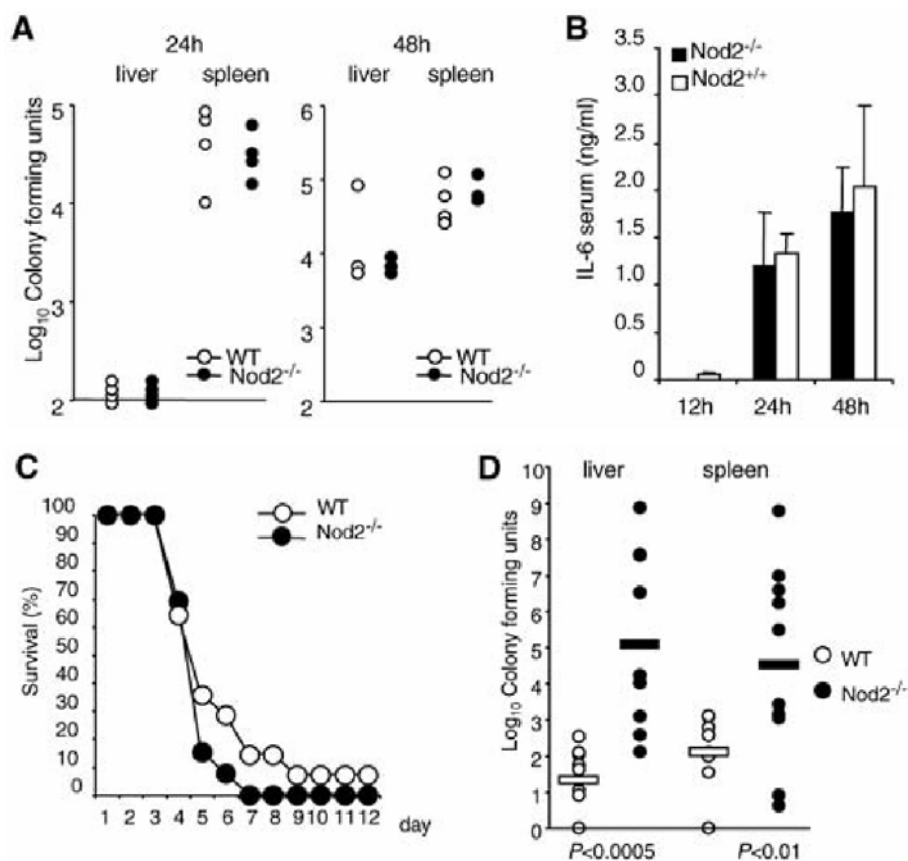
D : Courbes de survie (survival) de souris WT ou Nod2^{-/-} au cours du temps en jours (days) après injection de LPS en présence (+ MDP) ou en absence (- MDP) de MDP.

Figure 7

La réponse anticorps sérique spécifique de HSA, globale (A, C & E) et IgG1 (B, D & F), a été mesurée par ELISA chez des souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2^{-/-}) deux semaines après immunisation avec la sérum albumine humaine (HSA) en présence de MDP (A & B) et après un rappel trois semaines après la première immunisation (C & D). En E & F, la réponse anticorps anti-HSA a été mesurée deux semaines après immunisation avec HSA en présence de R-848, un ligand synthétique de TLR7.

N.B. : Les valeurs « $P < 0.005$ » indiquent des différences statistiquement significatives entre les deux lignées de souris pour les paramètres considérés.



**Figure 8**

A : La charge bactérienne (colony forming unit) de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour Nod2 (Nod2^{-/-}) est mesurée dans le foie (liver) et dans la rate (spleen) 24h et 48h après infection par *Listeria monocytogenes* par voie intraveineuse.

B : La production d'IL-6 est mesurée par ELISA dans le sérum de souris WT (Nod2^{+/+}) ou Nod2^{-/-} 12h, 24h et 48h après infection par *L. monocytogenes* par voie intraveineuse.

C : La survie (survival) de souris WT ou Nod2^{-/-} est mesurée au cours du temps en jours (day) après infection par *L. monocytogenes* par voie intrapéritonéale.

D : La charge bactérienne (colony forming unit) de souris WT ou Nod2^{-/-} est mesurée dans le foie (liver) et dans la rate (spleen) 72h après infection par *L. monocytogenes* par voie intragastrique. Les valeurs « $P < 0.0005$ » et « $P < 0.01$ » indiquent des différences statistiquement significatives entre les deux lignées de souris pour les paramètres considérés.