

Reconnaissances non-classiques

I.

(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 ?

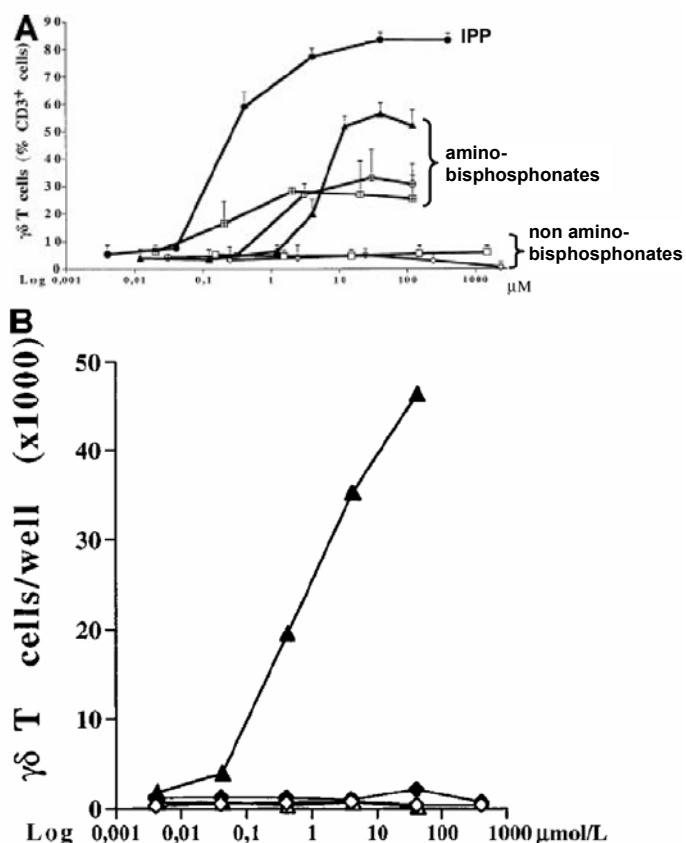
Question 2. Quelles sont les manifestations cliniques généralement observées chez ces patients ?

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 1**.

Figure 1

- 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 chlodronate (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.
 ◇ : chlodronate ; ◆ : chlodronate + IL-2 ;
 ▲ : pamidronate ; ▲ : pamidronate + IL-2.

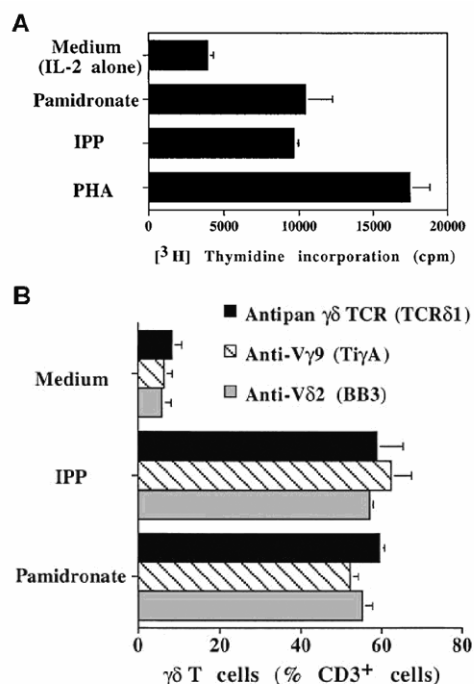


Question 3. *Interprétez les résultats de cette expérience. On notera qu'aucune autre population cellulaire parmi les PBMC ne prolifère dans les conditions de l'expérience. (8 lignes maximum)*

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 2**.

Figure 2

- 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.



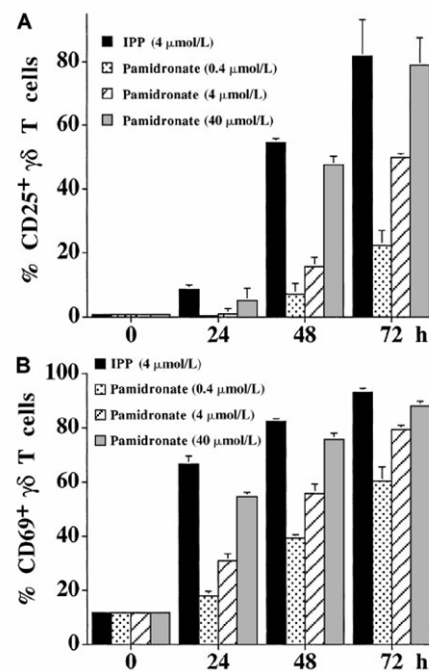
Question 4. Qu'apportent les résultats de cette expérience ? (5 lignes maximum)

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 3**.

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 3

Des PBMC de donneurs sains ont été incubés en présence de 4 μ M d'IPP ou de 0,4, 4 et 40 μ M 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).

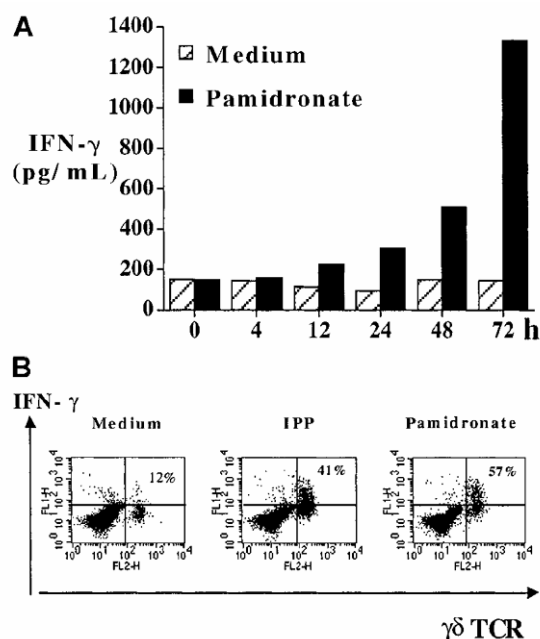


La production d'IFN γ par les cellules T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 4**.

Figure 4

Des PBMC ont été incubés en absence (Medium) ou en présence de 40 μ M d'IPP ou de 40 μ M 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 .



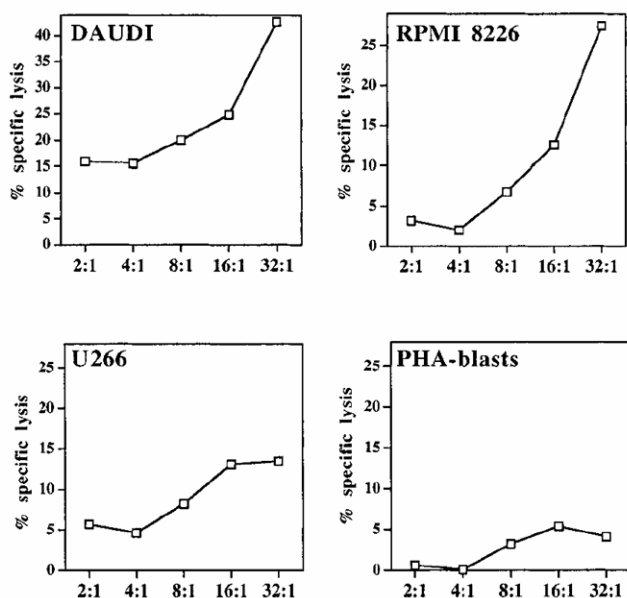
Question 6. Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 4B. (5 lignes maximum)

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 5.

Figure 5

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 1**.

Tableau 1 : 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 $\pm$ 28.4	.0345
Pamidronate (n = 24)	65.9 $\pm$ 38.4	.0002
Pamidronate (patients with activation of BM- $\gamma\delta$ T cells) (n = 14)	54.8 $\pm$ 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 $\alpha\beta$.*

II.

(D'après Yamada T. *et al.* (2004) *Blood* 172: 2401-2406)

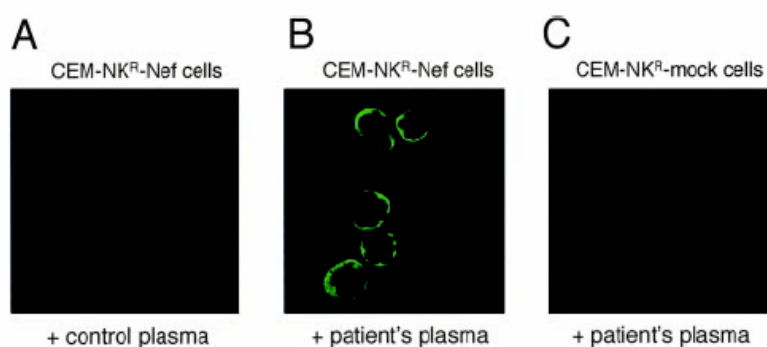
La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC « Ab-dependent cellular cytotoxicity ») et les activités cytotoxiques des lymphocytes T sont deux mécanismes qui jouent un rôle important dans la protection contre les infections virales. Dans le cas de l'infection par le VIH, l'ADCC peut inhiber la réplication virale et l'infection cellule à cellule en tuant les cellules infectées par le VIH avant la maturation des particules virales.

La protéine virale Nef est une protéine accessoire impliquée dans la pathogenèse de l'infection à VIH. Cette protéine peut être exprimée à la surface des cellules infectées. Les auteurs de cette étude ont montré qu'un peptide de Nef, très conservé et exprimé à la surface de cellules infectées, pouvait servir d'épitope pour une réponse anticorps. De plus, il a été montré que le taux plasmatique d'anticorps dirigés contre ce peptide chez les patients infectés est corrélé avec la progression de la maladie.

Pour élucider les mécanismes de cette corrélation, les auteurs ont réalisé les expériences suivantes :

Des cellules CEM-NK^R exprimant la protéine virale Nef (CEM-NK^R-Nef cells) ont été incubées avec du plasma provenant d'un donneur sain (control plasma) ou d'un donneur (patient's plasma) infecté par le VIH (donneur LTNP 5). Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-Ig humaine couplé à la fluorescéine. Les cellules ont été analysées en microscopie confocale (**Figure 6**).

Figure 6 :



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Des cellules CEM-NK^R-Nef préalablement marquées au Cr⁵¹ ont été incubées pendant 30 min à 37°C en présence de plasma provenant des patients LTNP 2, 5 et 6 (« Long-Term Non Progressors », qui sont des patients infectés par le VIH chez lesquels la maladie évolue lentement), ou en présence de plasma provenant de donneurs sains. Ces sérums ont été préalablement chauffés pendant 30 min à 56°C.

Des PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) provenant de donneurs sains ou de patients infectés par le VIH (dont les caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 2**) ont ensuite été ajoutés aux cellules CEM-NK^R-Nef, pendant 4 heures, à 37°C.

L'émission de rayons γ dans les surnageants a ensuite été comptée avec un compteur gamma et les résultats de lyse spécifique des cellules sont déterminés (**Figure 7**).

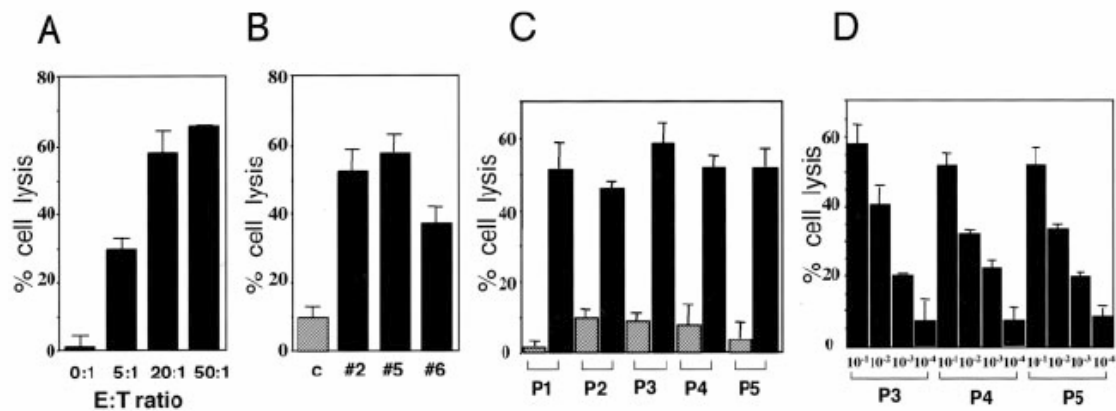
Tableau 2

Table I. Patient profiles

Patient	Age	Sex	CD4 ⁺ Count (cells/ μ l)	CD8 ⁺ Count (cells/ μ l)	NK Cell Count (cells/ μ l)	% NK Cell in FBMC	HIV RNA (copies/ml) ^a	Antiretroviral Drugs ^b
P1	37	M	754	996	155	8.0	<400	d4T + 3TC + NFV
P2	32	M	63	214	20	3.7	770	d4T + 3TC + NFV
P3	45	M	204	620	220	12.6	<400	AZT + ddC + IDV
P4	37	M	638	1034	102	5.7	<400	d4T + 3TC + NFV
P5	35	M	372	877	73	5.0	2200	AZT + ddC + IDV

^a Amplicor HIV monitor test (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ).

^b AZT, zidovudine; d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; ddC, zalcitabine; NFV, nelfinavir; IDV, indinavir.

**Figure 7 :**

Les pourcentages de lyse spécifique sont calculés : $100 \times (\text{comptage échantillon} - \text{comptage relarguage spontané}) / (\text{comptage maximum} - \text{comptage relarguage spontané})$. A. Lyse spécifique en présence de différents ratios de PBMC provenant de donneurs sains, en présence de plasma du patient LTNP 5. B. Lyse spécifique en présence de PBMC provenant de donneurs sains (ratio 20:1) en présence de plasma de patient sain (c) ou de plasma des patients LTNP 2, 5 et 6. C. Lyse spécifique en présence de PBMC de 5 patients (P1-5) (ratio 20:1) en présence de plasma de donneur sain (colonnes hachurées) ou en présence de plasma du patient LTNP 5 (colonnes noires). D. Idem C, mais avec des dilutions sériées (10^{-1} - 10^{-4}) du plasma du patient LTNP 5.

Question 2. D'après le Tableau 2 quelles corrélations pouvez-vous observer entre les différentes données pour les patients 1 à 5?

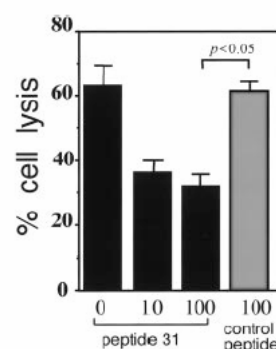
Question 3. Que permettent de mettre en évidence les expériences présentées dans la Figure 7 ?

Question 4. Quelles conclusions tirez-vous de ces expériences ?

Dans l'expérience suivante, les auteurs ont incubé des cellules CEM-NK^R-Nef marquées au Cr⁵¹, des PBMC du patient 3 et du plasma du patient LTNP 5, en présence du peptide synthétique 31. On précise que le peptide 31 est reconnu par les anticorps anti-Nef. Les résultats de lyse spécifiques ont été déterminés (**Figure 8**).

Figure 8 :

Lyse spécifique en présence de PBMC du patient 3 (ratio 20:1), de plasma du patient LTNP 5 et du peptide 31 (0 à 100 µg/ml, colonnes noires) ou d'un peptide contrôle (100 µg/ml colonne hachurée).



Question 5. Que pouvez-vous conclure de cette expérience ?

Des PBMC de 41 patients infectés par le VIH et de 16 donneurs sains ont été analysés par cytométrie de flux. Les nombres de cellules NK (CD3⁻, CD19⁻, CD16⁺, CD56⁺) et le pourcentage de cellules NK exprimant la perforine ont été déterminés (**Figure 9**).

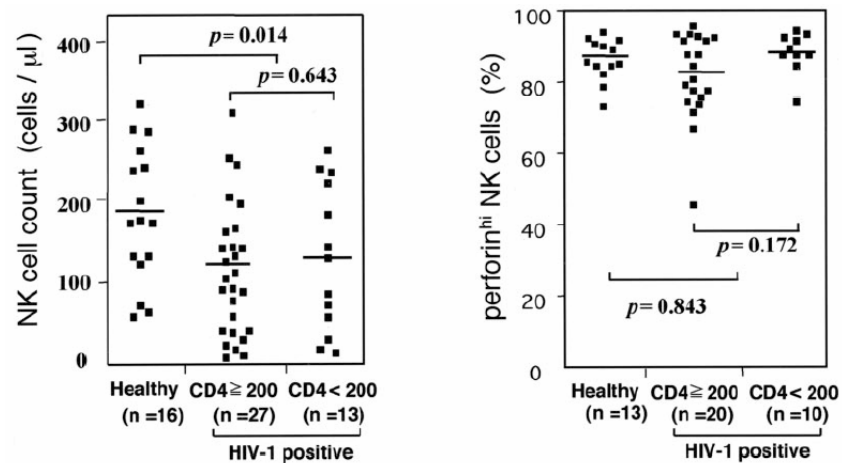


Figure 9 :

A. Nombre de cellules NK parmi les PBMC de donneurs sains et les PBMC de patients infectés par le VIH, ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4⁺ par μ l de sang. B. Pourcentages de cellules NK exprimant la perforine parmi les PBMC de donneurs sains et de patients infectés par le VIH ayant plus ou moins de 200 cellules T CD4⁺ par μ l de sang.

Question 6. Que pouvez-vous conclure du rôle des cellules NK ?