

Université Pierre et Marie Curie – Paris 6

*UE BMC423 – Immunologie Fondamentale
Epreuve écrite – juin 2009, 1^{ère} session*

Durée de l'épreuve : 2 heures

BMC423 - Immunologie Fondamentale
Epreuve écrite – juin 2009, 1ère session

D'après Song et al. (2009) *J. Clin. Invest.* 119:1524-1536.

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle anti-tumoral des cellules NKT invariante (TCR V α 24-J α 18/V β 11) chez des patients atteints de neuroblastome. Il a en effet été montré que l'infiltration de ces cellules au site de la tumeur était associée à un pronostic favorable.

Question 1. *A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le mode de reconnaissance des cellules NKT par comparaison à celui des cellules T conventionnelles.*

Question 2. *A votre avis quel peut être le mode d'action anti-tumorale des cellules NKT ? (3 lignes maximum)*

Dans une première expérience, les auteurs observent que les cellules tumorales de neuroblastome n'expriment pas la molécule CD1d.

Question 3. *Par quelle technique les auteurs ont-ils pu faire cette observation ? (3 lignes maximum)*

Question 4. *Cette observation est-elle en accord avec votre réponse à la Question 2 ? (3 lignes maximum)*

Dans l'expérience qui suit, les auteurs mesurent le pourcentage de cellules d'une lignée de neuroblastome (cellules NB) en phase S du cycle cellulaire, en absence ou en présence de monocytes. Les résultats sont présentés sur la **Figure 1**.

Question 5. *Pourquoi les auteurs cherchent-ils à déterminer la proportion de cellules tumorales NB en phase S du cycle cellulaire ? (3 lignes maximum)*

Question 6. *A quoi le BrdU utilisé dans l'expérience présentée à la Figure 1 sert-il ? (3 lignes maximum)*

Question 7. *Comment, dans l'expérience présentée à la Figure 1A, les auteurs peuvent-ils mesurer spécifiquement l'état du cycle cellulaire des cellules tumorales NB lorsqu'elles sont mélangées avec des monocytes ? (3 lignes maximum)*

Question 8. *Citez trois techniques applicables à la mesure de l'IL-6 rapportée dans l'expérience présentée à la Figure 1C. (3 lignes maximum)*

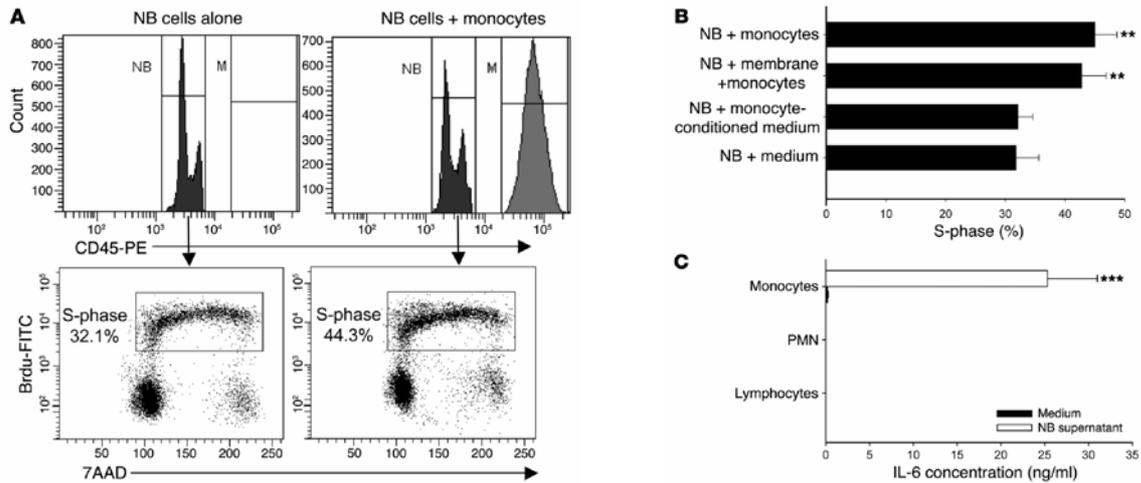


Figure 1 :

(A) Des cellules de la lignée de neuroblastome CHLA-255 (NB) ont été cultivées seules (« NB cells alone », à gauche) ou mélangées avec des monocytes (ratio 1:1 ; « NB cells + monocytes », à droite) pendant 24 heures. Pendant les 40 dernières minutes de culture, les cellules sont cultivées en présence de BrdU et, après fixation et perméabilisation, les cellules sont marquées avec un mélange d'anticorps anti-BrdU couplé au FITC (BrdU-FITC), de 7AAD, et d'un anticorps anti-CD45 couplé à la phycoérythrine (CD45-PE), puis analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes du haut représentent l'expression du marqueur CD45 à la surface des cellules en culture ; le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire (S-phase) parmi les cellules exprimant faiblement le marqueur CD45 est alors calculé en repérant les cellules BrdU⁺ (en bas). On ignorera ici le marquage 7AAD.

(B) Le pourcentage de cellules NB en phase S a été mesuré comme en (A) après culture comme indiqué sur l'axe y : « NB + monocytes », cellules NB cultivées en présence de monocytes ; « NB + membrane + monocytes », cellules NB et monocytes cultivés dans deux chambres de culture séparées par une membrane perméable mais empêchant tout contact cellulaire ; « NB + monocyte-conditioned medium », cellules NB cultivées dans du milieu de culture provenant d'une culture de monocytes ; « NB + medium », cellules NB cultivées en milieu seul. Les résultats indiqués sont la moyenne \pm écart-type de quatre expériences. ** indique une différence statistiquement significative par rapport à la condition « NB + medium ».

(C) Des monocytes, des polynucléaires (PMN) et des lymphocytes isolés du sang ont été cultivés pendant 24 heures en présence de milieu de culture provenant d'une culture de cellules NB (NB supernatant) ou de milieu seul (Medium). La concentration d'IL-6 dans le surnageant de culture est déterminée. Les résultats indiqués sont la moyenne \pm écart-type de huit expériences effectuées avec du sang d'individus sains différents. *** indique une différence statistiquement significative par rapport à la condition « Medium ».

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

Question 9. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 1. (15 lignes maximum)

Les auteurs évaluent ensuite l'importance de l'IL-6 produite par les monocytes pour leur action sur les cellules NB. Pour cela, ils mesurent à nouveau le pourcentage de cellules NB en phase S en présence d'IL-6, de monocytes seuls ou en présence d'anticorps anti-IL-6. Les résultats sont présentés sur la **Figure 2**.

Question 10. A quoi la condition « Monocytes + IgG control » utilisée dans l'expérience présentée à la Figure 2 sert-elle ? (3 lignes maximum)

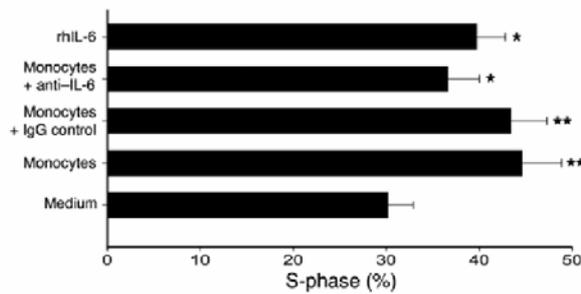


Figure 2 :

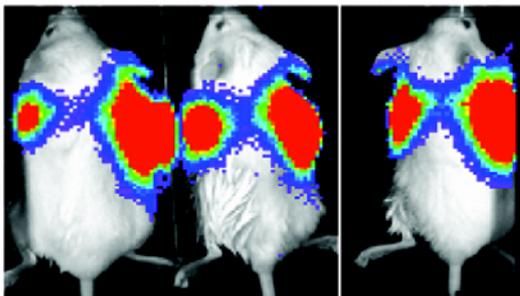
Les cellules de neuroblastome CHLA-255 (NB) ont été cultivées seules (Medium), en présence d'IL-6 (rhIL6), en présence de monocytes seuls (Monocytes), en présence de monocytes et d'anticorps contrôle (Monocytes + IgG control) ou en présence de monocytes et d'anticorps anti-IL-6 humaine (Monocytes + anti-IL-6). La proportion de cellules NB en phase S a été déterminée comme décrit à la Figure 1A. Les résultats indiqués sont la moyenne \pm écart-type de trois expériences. */** indiquent une différence statistiquement significative par rapport à la condition « Medium ».

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

Question 11. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 2. (8 lignes maximum)

Le rôle de l'IL-6 est maintenant étudié dans un modèle *in vivo* en implantant, sous la peau de souris immunodéficientes, des cellules tumorales de neuroblastome transduites pour le gène codant la Luciférase en présence de monocytes, avec ou sans anticorps anti-IL-6. La mesure de la bioluminescence par imagerie *in vivo* permet de suivre la croissance de la tumeur. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3**.

A



B

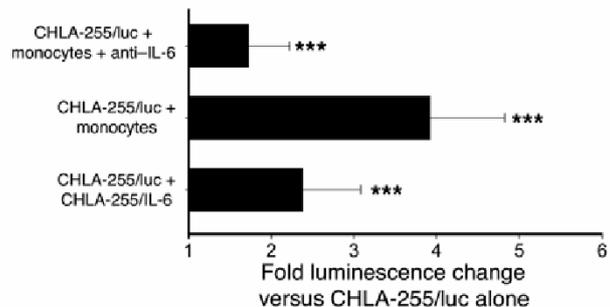


Figure 3 :

(A) Des cellules de neuroblastome CHLA-255 transduites avec le gène codant la Luciférase (CHLA-255/luc) ont été injectées seules ou mélangées à des monocytes, respectivement dans les flancs droit et gauche de souris immunodéficientes. Les images de bioluminescence pour trois souris représentatives ont été acquises 28 jours après l'implantation des cellules tumorales. L'intensité de bioluminescence observée est proportionnelle à la taille de la tumeur.

(B) Le groupe de souris recevant, dans le flanc droit, des cellules CHLA-255/luc en présence de monocytes (CHLA-255/luc + monocytes), comme indiqué en (A), a été comparé à deux autres groupes expérimentaux : un groupe de souris (CHLA-255/luc + monocytes + anti-IL-6) recevant, en plus de la même injection de cellules CHLA-255/luc + monocytes dans le flanc droit, un traitement avec un anticorps anti-IL-6 humaine ; un groupe de souris (CHLA-255/luc + CHLA-255/IL-6) recevant, dans le flanc droit, un mélange de cellules CHLA-255/luc et de cellules CHLA-255 transduites avec le gène codant l'IL-6 humaine. Dans chaque cas, la croissance de la tumeur implantée dans le flanc droit des souris est rapportée à la croissance de la tumeur CHLA-255/luc seule implantée dans le flanc gauche (CHLA-255/luc alone). Les résultats (Fold luminescence change versus CHLA-255/luc alone) sont la moyenne \pm écart-type pour deux expériences. *** indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules CHLA-255/luc seules (flanc gauche).

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

Question 12. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 3. (8 lignes maximum)

Question 13. Ces résultats confirment-ils vos conclusions précédentes ? (3 lignes maximum)

Dans l'expérience suivante, les auteurs étudient l'action des cellules NKT sur les cellules du sang périphérique en culture, en présence ou non de lysat de cellules tumorales comme indiqué sur la Figure 4.

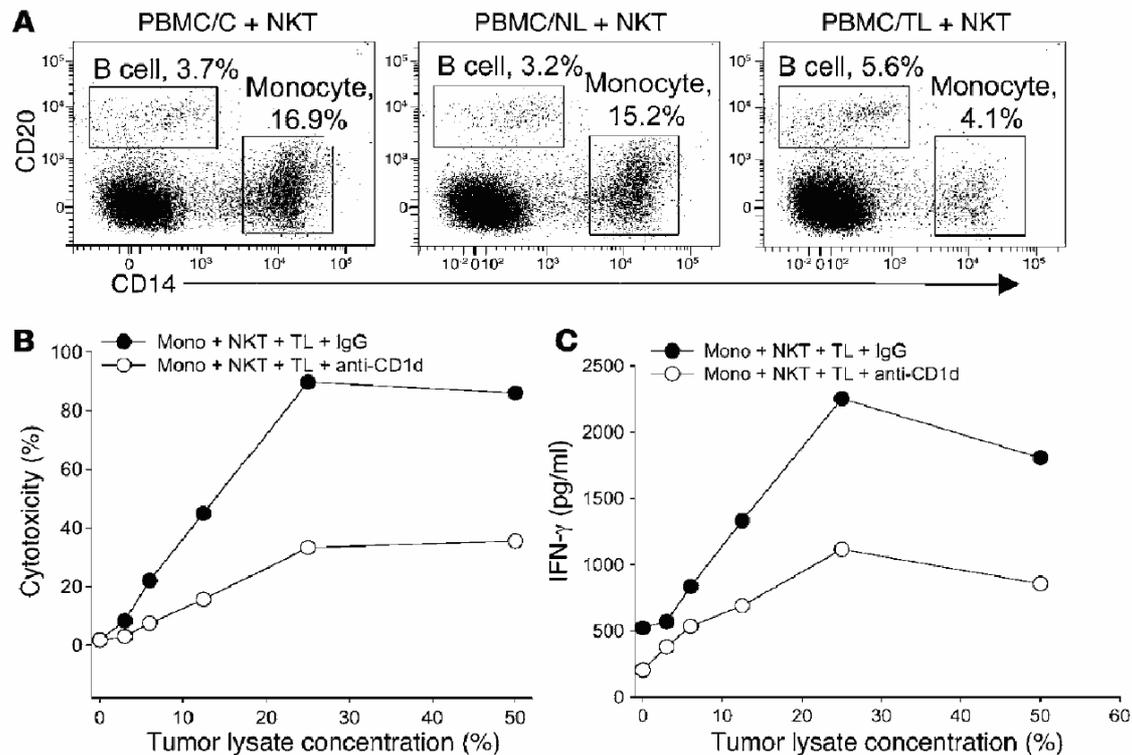


Figure 4 :

(A) Des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été cultivées avec du milieu de culture seul (PBMC/C), ou en présence de lysat cellulaire de PBMC normales (PBMC/NL) ou de lysat de cellules tumorales NB (PBMC/TL). Après une nuit en culture, les cellules ont été incubées pendant quatre heures en présence de cellules NKT (ratio 5:1 effecteurs/cibles), puis analysées en cytométrie en flux après marquage avec les anticorps anti-CD14 (monocytes) et anti-CD20 (lymphocytes B).

(B & C) La cytotoxicité des cellules NKT vis-à-vis des monocytes (B) et la production d'IFN- γ par les cellules NKT (C) ont été mesurées après que les monocytes ont été préincubés avec des concentrations croissantes de lysat de cellules tumorales en présence d'anticorps anti-CD1d bloquant (Mono + NKT + TL + anti-CD1d) ou en présence d'un anticorps contrôle (Mono + NKT + TL + IgG).

N.B. : Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

Question 14. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 4. (15 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs précisent les conditions nécessaires à l'activation des cellules NKT en présence de N-butyl-déoxygalactonojirimycine, un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase, une enzyme nécessaire à la première étape de biosynthèse des glycosphingolipides (Figure 5).

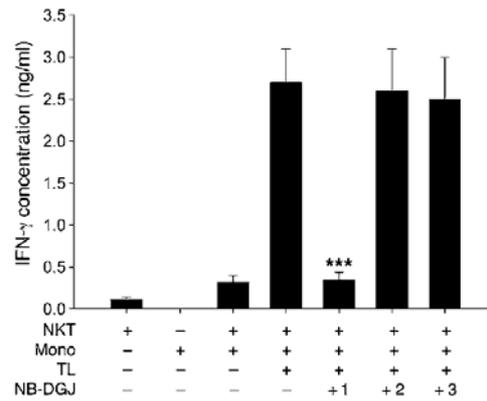


Figure 5 :

Les cellules NKT ont été incubées, en présence ou non de monocytes (Mono) préalablement préincubés ou non avec du lysat de cellules tumorales (TL). Par ailleurs, de la N-butyl-déoxygalactonojirimycine (NB-DGJ) a été ajoutée aux cellules tumorales en culture pendant 24h avant la préparation du lysat cellulaire TL (+1), pendant la culture sur la nuit des monocytes en présence du lysat de cellules tumorales (+2), ou pendant la coculture des cellules NKT avec les monocytes préincubés avec le lysat de cellules tumorales (+3). Pour chaque condition expérimentale, la production d'IFN- γ a été mesurée dans le surnageant de culture. Les résultats présentés sont la moyenne \pm écart-type de trois expériences. *** indique une réduction statistiquement significative de la production d'IFN- γ par rapport à la condition « NKT + Mono + TL ».

N.B. : La NB-DGJ est un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase, une enzyme nécessaire à la première étape de biosynthèse des glycosphingolipides. Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont d'origine humaine.

Question 15. Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 5. (10 lignes maximum)

Question 16. A l'aide d'un schéma uniquement, résumez les résultats obtenus dans l'ensemble de cette étude concernant le mode d'action des monocytes et des cellules NKT dans le contrôle de la croissance tumorale.