

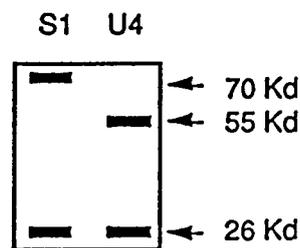
Reconnaisances

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) couplé 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

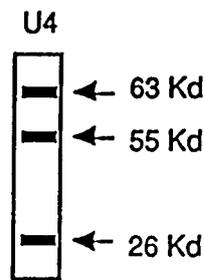
* Titre d'hémagglutination

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 myélomes tous d'origine BALB/c (Tableau 2).

Tableau 2

Hybridomes anti-T15	Inhibiteurs											
	a	T15	167	603	HPCM2	G1	G3	61	558	104	109	315
	b	κ,α	κ,α	κ,α	κ,μ	κ,γ1	κ,γ3	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		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

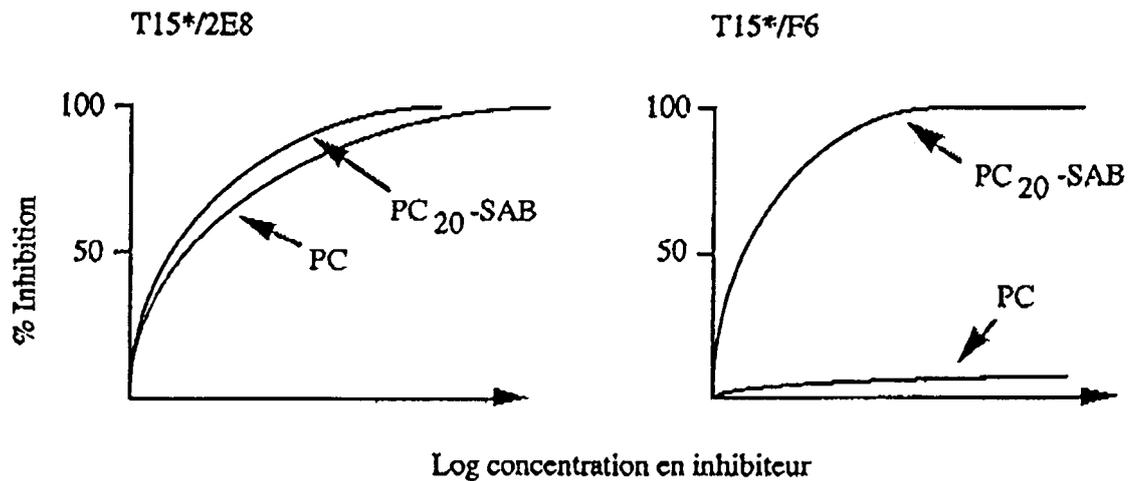
a: Nomenclature des inhibiteurs,
 b: Isotype des chaînes légère et lourde,
 c: Nature de l'antigène reconnu
 PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.
 + = inhibition, - = pas d'inhibition.

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



III.

Une lignée de souris mutantes est obtenue à partir de souris de la lignée consanguine B10.BR (H-2^k). L'impact de cette mutation sur le système immunitaire est recherché. Les souris B10.BR et mutantes sont immunisées contre l'ovalbumine (OVA). La production d'anticorps contre l'antigène est recherchée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

	Souris B10.BR	Souris mutante
Anticorps anti-OVA	++++	+

Question 1. Commenter.

Les cellules spléniques sont isolées à partir des deux types de souris. Grâce à un trieur de cellules, les cellules marquées avec un anticorps anti-IgM fluorescent sont séparées et utilisées dans les trois expériences décrites ci-dessous.

Expérience n°1 : Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps monoclonaux anti-I-A^k ou anti-I-E^k couplés à un fluorochrome et analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**.

Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine ³⁵S puis lysées. Le lysat est incubé en présence de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé. Les produits immunoprécipités sont ensuite chauffés à 95°C puis déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Après migration électrophorétique, le gel est séché et autoradiographié. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5**.

Expérience n°3 : Les cellules sont marquées à leur surface à l'aide de l'iode 125 puis lysées. La même expérience d'immunoprécipitation que ci-dessus est réalisée. Cependant, les échantillons immunoprécipités sont ou non chauffés à 95°C avant d'être déposés sur le gel. Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

Question 2. Interpréter ces expériences en indiquant notamment pourquoi les cellules IgM⁺ ont été sélectionnées.

Figure 4 : Fluorescence des cellules spléniques IgM⁺.

Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'autofluorescence des cellules.

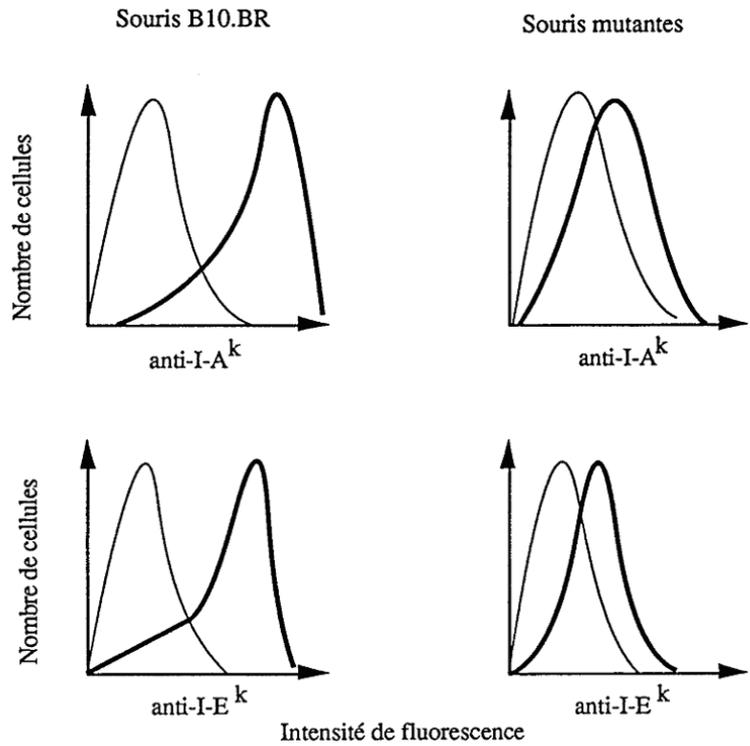


Figure 5 :

Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

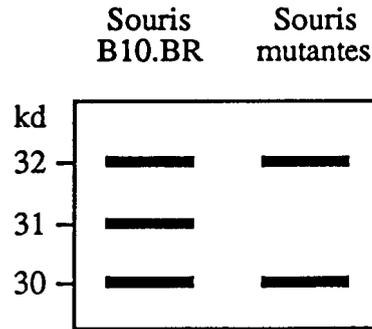
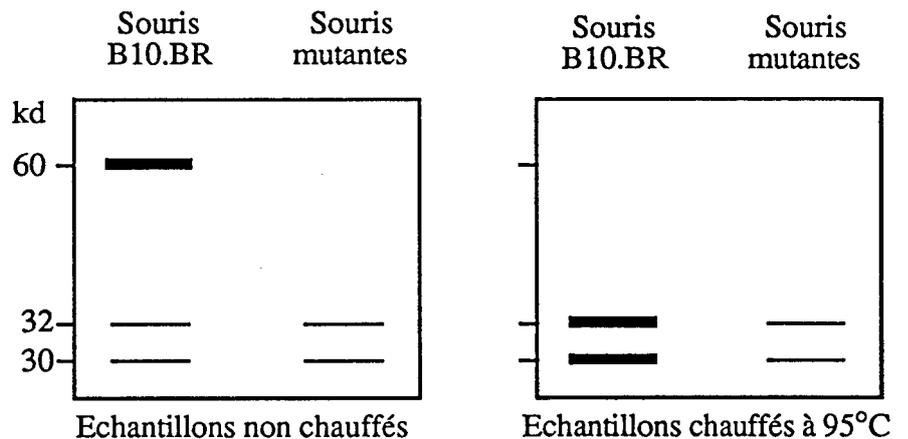


Figure 6 :

Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.



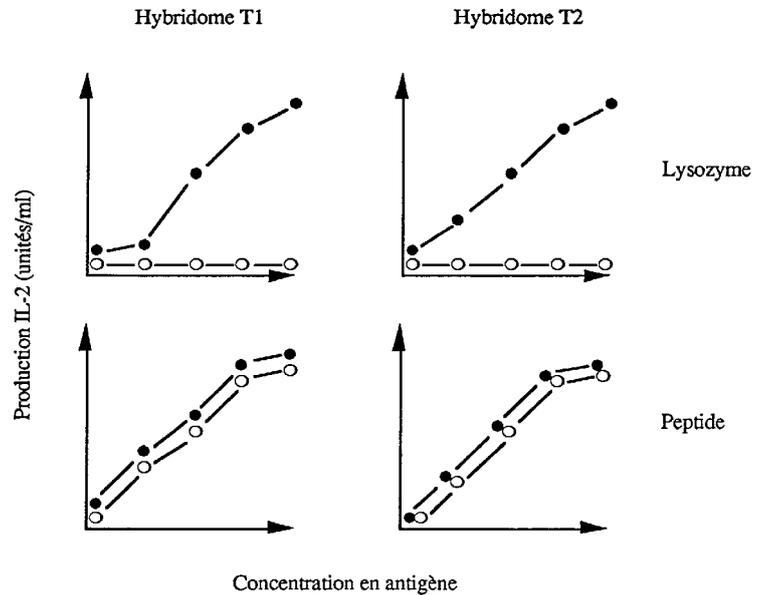
Deux hybridomes T (T1 et T2) obtenus contre le lysozyme de poulet sont testés pour leur capacité à produire de l'interleukine 2 (IL-2) en réponse à l'antigène. Celui-ci est présenté par des cellules spléniques provenant des deux types de souris. Les hybridomes T1 et T2 reconnaissent respectivement les peptides L46-61 et L112-129 présentés dans un contexte I-A^k. Les résultats sont résumés sur la **Figure 7**.

Question 3. Décrire succinctement un test permettant de mesurer la production d'IL-2.

Question 4. Quelles informations supplémentaires les résultats de la Figure 7 apportent-ils ?

Figure 7 :

IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).

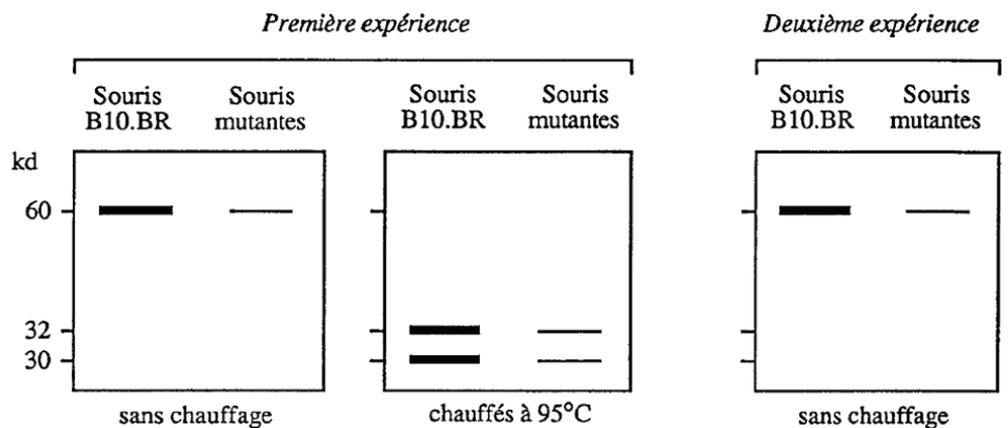


Afin de mieux comprendre l'observation ci-dessus, les expériences suivantes sont réalisées (Figure 8) :

- Dans une première expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont marquées à leur surface à l'iode 125 et lysées. Avant immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé, les lysats sont incubés en présence du peptide L46-61. Les échantillons sont ensuite chauffés ou non comme précédemment et déposés sur gel de polyacrylamide.
- Dans la seconde expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont incubées en présence du peptide L46-61 marqué à l'iode 125 puis lysées. Une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k est effectuée. L'échantillon immunoprécipité est déposé sur le gel de polyacrylamide sans chauffage.

Figure 8 :

Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A^k.



Question 5. Interpréter ces résultats en les corrélant avec ceux des expériences précédentes.

Question 6. Proposer un schéma simple rendant compte du défaut de présentation de l'antigène par les cellules de la souris mutante.

IV.

(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 ?

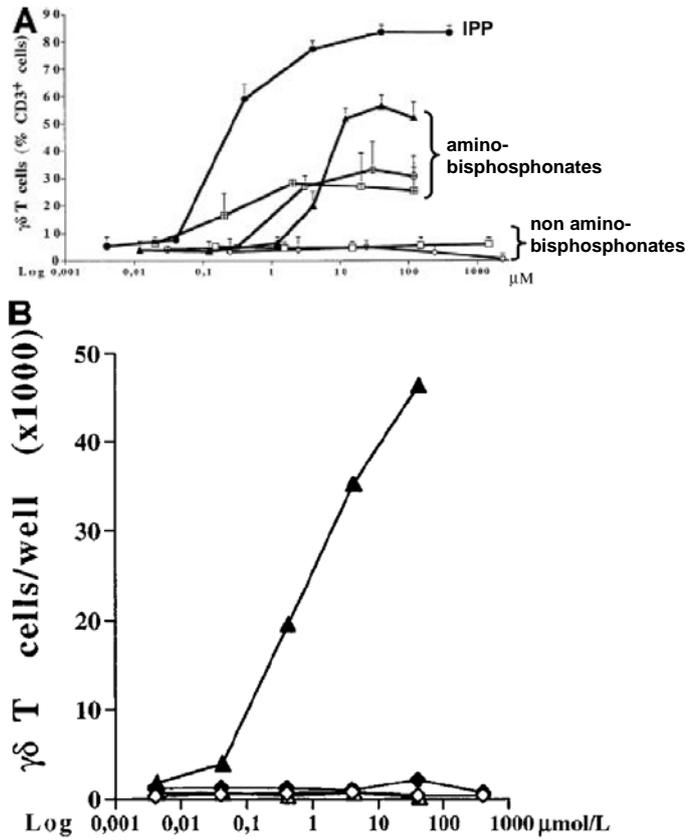
Les bisphosphonates sont un traitement de choix pour les maladies qui impliquent une résorption osseuse excessive ; ils ont été notamment montrés efficaces dans la prévention de l'ostéolyse chez des patients atteints de myélome multiple. Les bisphosphonates sont des analogues synthétiques de pyrophosphates 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 9**.

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)

Figure 9

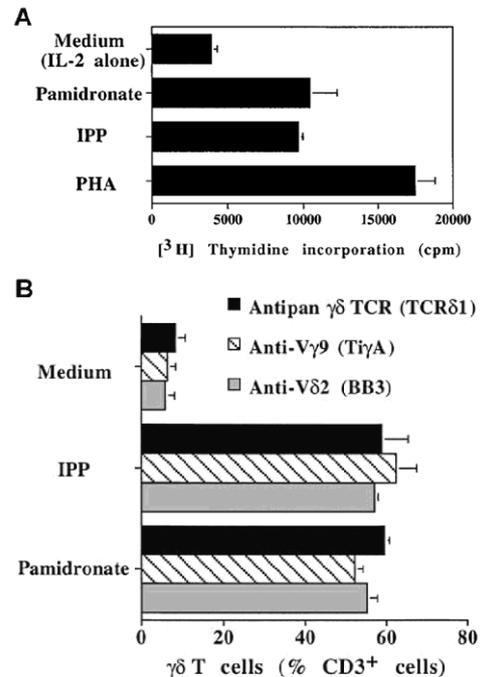
- A. Des PBMC de donneurs sains ont été incubés avec des concentrations croissantes de différents bisphosphonates en présence d'IL-2. Après 7 jours de culture, le pourcentage de cellules T $\gamma\delta$ parmi les cellules CD3⁺ a été mesuré en cytométrie de flux par double marquage avec des anticorps 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.



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 10**.

Figure 10

- 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.



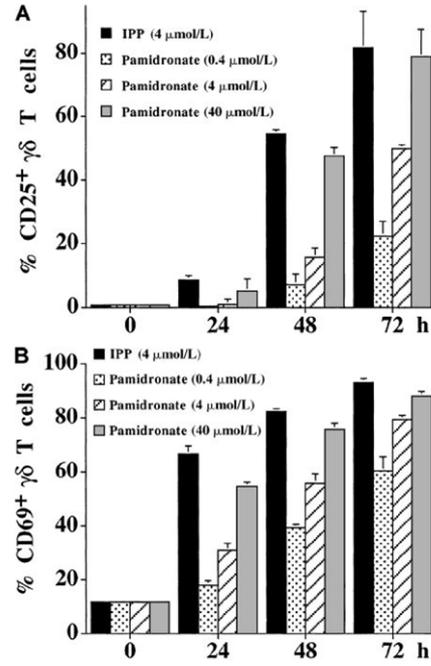
Question 4. Qu'apportent les résultats de cette expérience ?

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 11**.

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.

Figure 11

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).

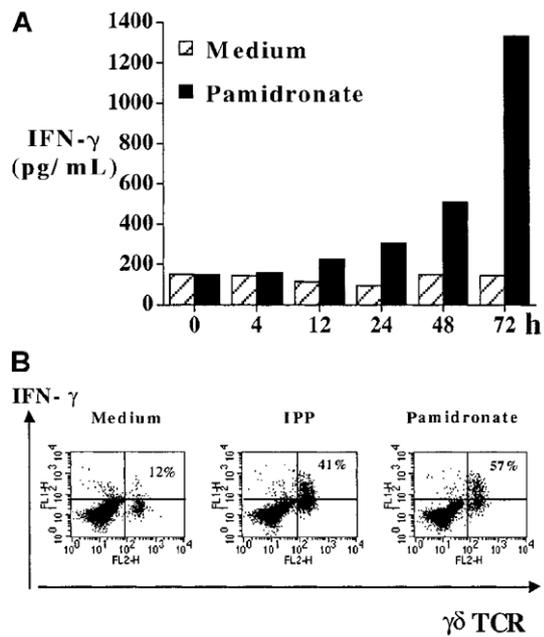


La production d'IFN γ par les cellules T $\gamma\delta$ activées par le pamidronate est ensuite mesurée par ELISA ou cytométrie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 12**.

Figure 12

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 .



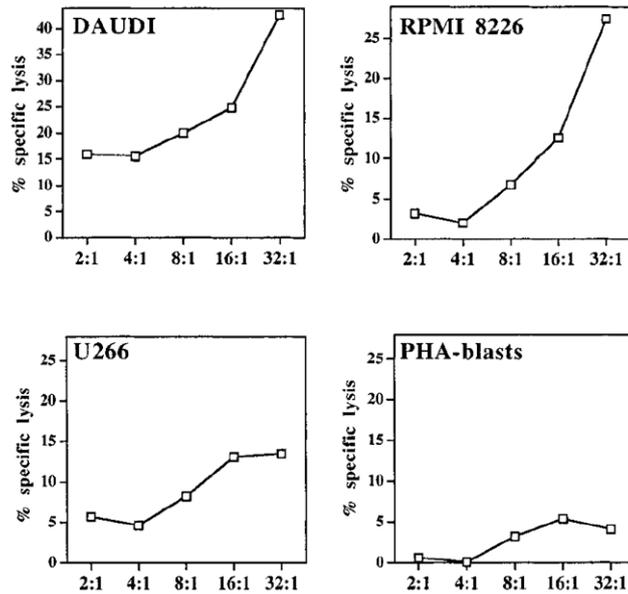
Question 6. Expliquez comment le double marquage a été réalisé dans l'expérience présentée à la Figure 12B.

Question 7. Analysez ces résultats.

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 13**.

Figure 13

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.

Question 9. A l'aide d'un tableau comparatif vous indiquerez en quoi la reconnaissance des lymphocytes T $\gamma\delta$ diffère de celle des lymphocytes T $\alpha\beta$.

V. Les récepteurs Nod

(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 1. 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 différents stimulus mettant en jeu certains récepteurs de l'immunité innée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 14**.

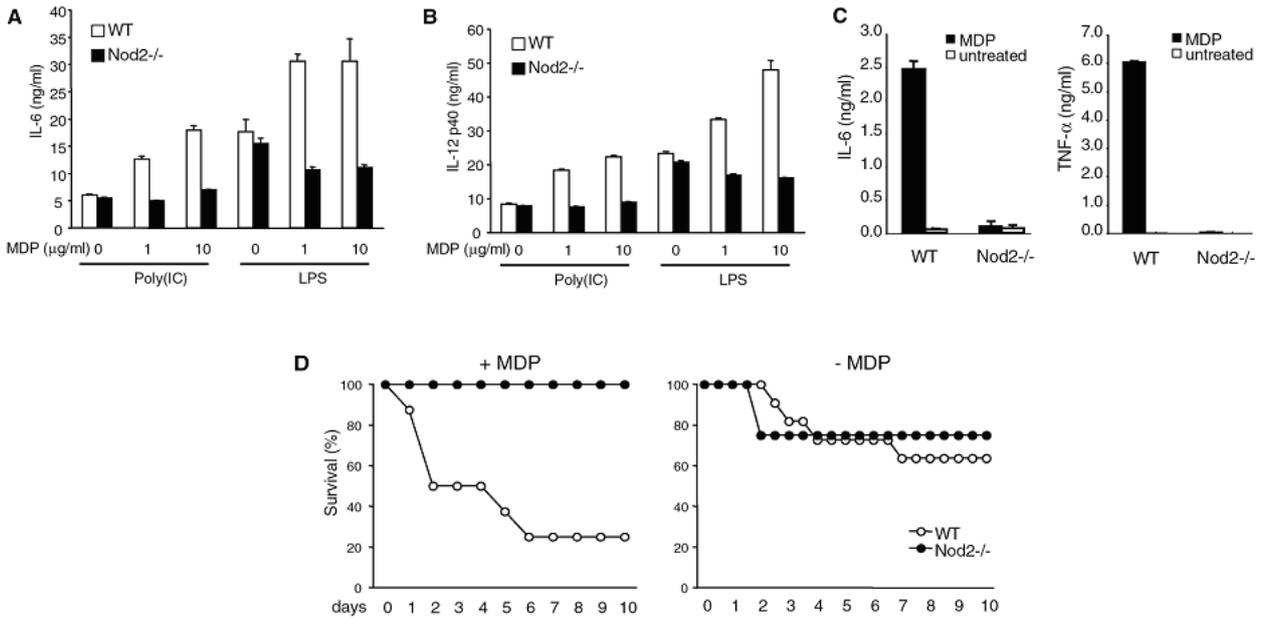


Figure 14

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(I:C) 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.

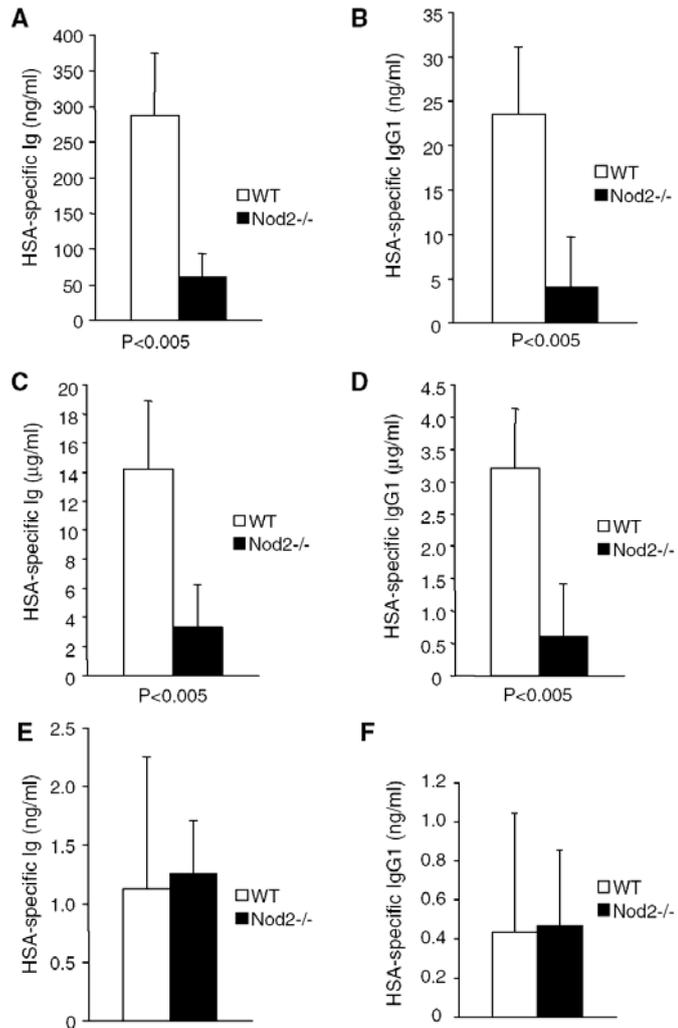
D : Courbes de survie de souris WT ou Nod2^{-/-} après injection de LPS en présence ou en absence de MDP.

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 (muramyl dipeptide). Les résultats sont présentés sur la **Figure 15**.

Figure 15

La réponse anticorps sérique totale (A, C & E) et IgG1 (B, D & F) spécifique de HSA 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.



Question 2. Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 15.

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 16.

Question 3. Analysez soigneusement des résultats présentés à la Figure 16.

Question 4. Que concluez-vous quant au rôle de Nod2 dans la protection contre des pathogènes bactériens.

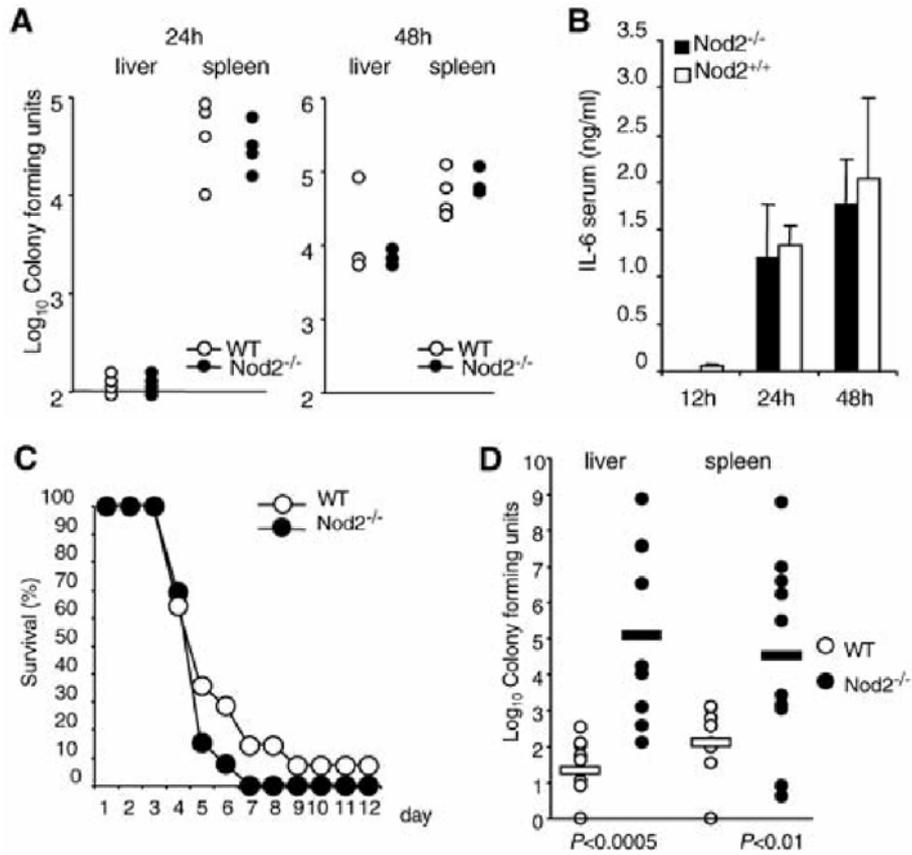


Figure 16

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 dans le sérum de souris WT (Nod^{+/+}) ou Nod2^{-/-} 12h, 24h et 48h après infection par *L. monocytogenes* par voie intraveineuse.

C : La survie de souris WT ou Nod2^{-/-} est mesurée 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 *Listeria monocytogenes* par voie intragastrique.

N.B. : Les valeurs « P < 0.0005 » et « P < 0.01 » indiquent des différences statistiquement significatives entre les deux lignées de souris pour les paramètres considérés.