

Epreuve d'Immunologie Fondamentale & Intégrée – mai 2010

D'après Leung et al. (2009) *J. Exp. Med.* 206:2121-2130.

Les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ (Tregs) sont un des types cellulaires principaux impliqués dans le contrôle des réponses inflammatoires excessives. Un déficit du facteur de transcription FOXP3 a été associé, chez l'homme et chez la souris, à un syndrome de lymphoprolifération et au développement de pathologies auto-immunes. On se limitera, dans cette étude, aux seules Tregs dites naturelles, c'est-à-dire dont la différenciation a lieu « naturellement » dans le thymus en parallèle de la différenciation des cellules T conventionnelles (Tconvs).

Dans cette étude, les auteurs s'intéressent aux règles de différenciation et de sélection des Tregs ; ils s'interrogent en particulier sur l'influence du TCR $\alpha\beta$ exprimé sur les thymocytes immatures dans leur différenciation en cellules Tregs ou Tconvs.

- Question 1.** *A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez les grandes étapes de la différenciation thymique des cellules T $\alpha\beta$ conventionnelles. Sur ce schéma, vous indiquerez clairement :*
- *à quels stades les molécules TCR α , TCR β , CD3, CD4, CD8 sont exprimées en surface*
 - *à quel(s) moment(s) les cellules subissent des processus de sélection.*

Dans cette étude, les auteurs vont comparer la sélection des thymocytes exprimant différents TCR $\alpha\beta$ transgéniques, initialement exprimés par des clones lymphocytaires T CD4⁺ conventionnels ou régulateurs. A chaque fois, les gènes codant les chaînes TCR α et TCR β de ces TCR sont clonés et utilisés pour établir une lignée de souris transgénique.

- Question 2.** *Par rapport aux règles de différenciation que vous avez rappelées en réponse à la Question 1, quelle devrait être la conséquence de l'introduction des transgènes TCR β et TCR α sur la différenciation thymique ? (5 lignes maximum)*

Les lignées de souris transgéniques suivantes ont été produites :

- La lignée A9-end exprime les transgènes TCR β et TCR α provenant d'un clone Tregs CD4⁺CD8⁻ exprimant un TCR V β 6⁺V α 2⁺. Chaque transgène est sous contrôle de son propre promoteur, promoteurs TCR β et TCR α , respectivement.
- La lignée A12-end exprime les transgènes TCR β et TCR α provenant d'un autre clone Tregs CD4⁺CD8⁻ exprimant un TCR V β 6⁺V α 2⁺, également sous contrôle des promoteurs TCR β et TCR α .
- La lignée A12-CD4 exprime les mêmes transgènes que la lignée A12-end, hormis que le gène TCR α est maintenant sous contrôle du promoteur CD4. Le gène TCR α de cette lignée s'exprimera alors à condition que la cellule exprime également CD4.
- La lignée 2P-CD4 exprime les transgènes TCR β et TCR α provenant d'un troisième clone Tregs CD4⁺CD8⁻ exprimant un TCR V β 6⁺V α 2⁺. Comme pour la lignée A12-CD4, le transgène TCR β est sous contrôle de son promoteur alors que le TCR α est sous contrôle du promoteur CD4.

Dans une première expérience, les auteurs comparent l'expression de V β 6, V α 2, CD4 et Foxp3 par les splénocytes des souris transgéniques A12-end et A9-end par rapport à celle observée chez les souris de type sauvage. Les résultats sont présentés sur la Figure 1.

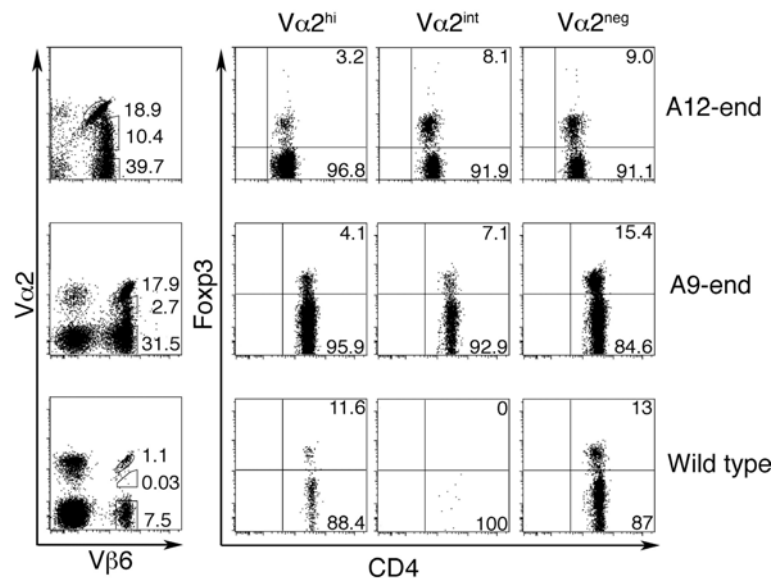


Figure 1 :

Les splénocytes de souris transgéniques A12-end et A9-end et de souris de type sauvage (Wild type) ont été analysés en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-Vβ6, anti-Vα2, anti-CD4 et anti-Foxp3 couplés à différents fluorochromes. Les cellules Vβ6⁺ exprimant différents niveaux de Vα2 (Vα2^{hi}, Vα2^{int}, Vα2^{neg}) ont été repérées (à gauche). Pour chacune de ces trois sous-populations, l'expression du marqueur Foxp3 est mesurée au sein des cellules CD4⁺ (à droite). Les nombres indiqués correspondent au pourcentage de chaque sous-population repérée par rapport à la totalité des cellules représentées dans le profil de cytométrie correspondant. Par exemple, on peut dire que 7,5% des splénocytes des souris de type sauvage sont Vβ6⁺Vα2⁻.

- Question 3.** Décrivez le protocole de cytométrie en flux qui a dû être mis en œuvre pour analyser l'expression de la molécule Foxp3 ? (3 lignes maximum)
- Question 4.** Pour chaque lignée de souris étudiée à la Figure 1, donnez une estimation de la proportion de splénocytes Vβ6⁺ en explicitant votre calcul ? (5 lignes maximum)
- Question 5.** Sur la seule base des données présentées à la Figure 1, estimez la proportion de cellules T exprimant Vα2 pour la lignée de type sauvage ? Quelle hypothèse raisonnable avez-vous faite pour effectuer ce calcul ? (5 lignes maximum)
- Question 6.** Décrivez soigneusement les résultats présentés sur la Figure 1 en commençant par les souris de type sauvage puis, par comparaison, en indiquant le comportement observé chez les souris transgéniques ? (15 lignes maximum)
- Question 7.** Quelle est votre hypothèse pour expliquer la présence de cellules T matures Vβ6⁺Vα2^{neg} et Vβ6⁺Vα2^{int} dans la rate des souris transgéniques ? (5 lignes maximum)
- Question 8.** Considérant l'origine des TCR transgéniques des souris A12-end et A9-end, pourquoi pensez-vous que les auteurs se sont étonnés des résultats présentés sur la Figure 1 ? (3 lignes maximum)

Dans une deuxième expérience, les auteurs croisent leurs souris transgéniques avec des souris déficientes pour la molécule RAG2 et obtiennent ainsi les lignées suivantes :

- A12-end RAG2⁻
- A12-CD4 RAG2⁻
- 2P-CD4 RAG2⁻

Ils étudient alors l'expression des molécules CD4, CD8, Vβ6, Vα2, CD25 et Foxp3 par les thymocytes des souris transgéniques A12-end RAG2⁻, A12-CD4 RAG2⁻ et 2P-CD4 RAG2⁻ par rapport à celle observée chez les souris de type sauvage. Les résultats sont présentés sur la Figure 2.

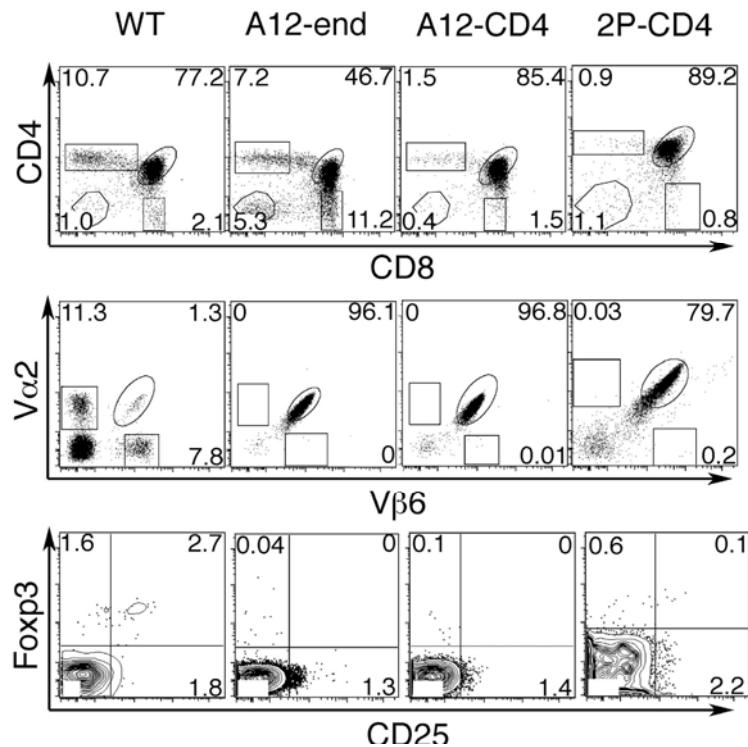


Figure 2 :

Les thymocytes de souris transgéniques A12-end, A12-CD4 ou 2P-CD4 et déficientes pour RAG2, et de souris de type sauvage (WT) ont été analysés en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-Vβ6, anti-Vα2, anti-CD25 et anti-Foxp3 couplés à différents fluorochromes. Les profils de la partie supérieure représentent l'expression de CD4 et CD8 parmi les thymocytes totaux pour les quatre lignées de souris étudiées. Les profils de la partie médiane représentent l'expression de Vβ6 et Vα2 parmi les thymocytes totaux. Les profils de la partie inférieure représentent l'expression de CD25 et Foxp3 parmi les thymocytes CD4⁺ CD8⁺ Vβ6⁺ Vα2⁺. Les nombres indiqués correspondent au pourcentage de chaque sous-population repérée par rapport à la totalité des cellules représentées dans le profil de cytométrie correspondant.

N.B. : Sur cette figure, les lignées transgéniques étudiées (indiquées A12-end, A12-CD4 et 2P-CD4) sont déficientes pour la molécule RAG2.

Question 9. A quel mécanisme la molécule RAG2 est-elle indispensable ? (3 lignes maximum)

Question 10. Quelles sont les conséquences de l'absence de la molécule RAG2 chez les souris transgéniques étudiées à la Figure 2 ? (3 lignes maximum)

Question 11. Décrivez soigneusement les résultats présentés sur la Figure 2 pour ce qui concerne les souris transgéniques A12-end RAG2⁻ par comparaison aux souris de type sauvage ? (10 lignes maximum)

- Question 12. Comment expliquez-vous la présence de cellules $CD8^+CD4^-$ chez les souris transgéniques A12-end $RAG2^-$ alors que le TCR transgénique d'origine est restreint par une molécule de CMH de classe II ? (5 lignes maximum)
- Question 13. Décrivez ensuite soigneusement les résultats présentés sur la Figure 2 pour ce qui concerne les souris transgéniques A12-CD4 $RAG2^-$ et 2P-CD4 $RAG2^-$? Qu'apportent ces nouveaux résultats ? (15 lignes maximum)
- Question 14. Sur la base des résultats obtenus à ce stade et vous rappelant que les TCR transgéniques des souris analysées jusqu'alors dérivent de clones Tregs, pensez-vous que seule la nature ou la spécificité du TCR exprimé sur un thymocyte immature suffise à différencier cette cellule en Tregs ou Tconv ? Justifiez votre réponse. (3 lignes maximum)

Afin d'éviter les biais possibles d'une différenciation altérée dans un environnement transgénique, les auteurs choisissent ensuite une approche « davantage physiologique » en réalisant des injections intrathymiques de cellules de moelle osseuse de souris transgéniques à des souris de type sauvage (Figure 3). Dans cette expérience, les proportions et quantités de cellules Tregs transgéniques produites sont mesurées.

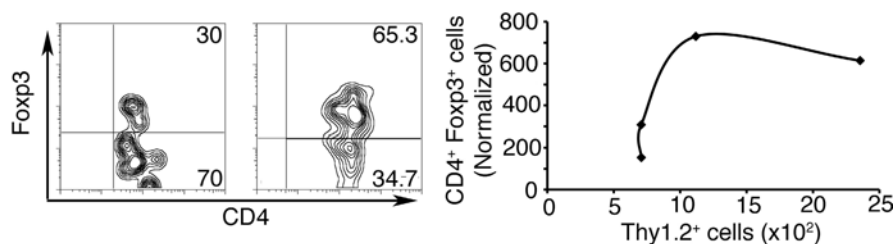


Figure 3 :

$5 \cdot 10^6$ de cellules de moelle osseuse de souris A12-end $Thy1.2^+$ ont été injectées dans le thymus de souris receveuses $Thy1.1^+$ de type sauvage âgées de 4 à 6 semaines. 14 jours après l'injection, les souris ont été sacrifiées et leurs thymocytes ont été analysés par cytométrie en flux. Deux profils représentatifs de l'expression de Foxp3 parmi les cellules $CD4^+ Thy1.2^+$ sont représentés à gauche. Le graphe de droite indique la quantité de cellules $CD4^+ Foxp3^+ Thy1.2^+$ récupérées en fonction de la quantité de cellules transgéniques $Thy1.2^+$ (en centaines) injectées aux souris receveuses.

- Question 15. Analysez soigneusement les résultats présentés sur la Figure 3 ? (8 lignes maximum)
- Question 16. Pouvez-vous réévaluer la réponse que vous avez donnée à la Question 14 ? En particulier, quelles sont les conditions favorables à la sélection des Tregs ? (5 lignes maximum)
- Question 17. Quelles expérimentations complémentaires pensez-vous nécessaires pour compléter la caractérisation des cellules T $CD4^+ Foxp3^+$ observées à la Figure 3 ? (5 lignes maximum)

Pour terminer, on pourrait envisager l'injection intrathymique de mélanges de cellules de moelle osseuse de souris transgéniques A9-end, A12-end et 2P-CD4, en plus des cellules de souris de type sauvage (on admettra que ces TCR transgéniques sont de spécificités différentes).

Question 18. Quel serait, d'après vous, le résultat de cette expérience ? Comment le pourcentage et la quantité de cellules Tregs transgéniques seraient-ils affectés ? (5 lignes maximum)

Epreuve d'Immunologie Fondamentale – juin 2009

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 invariantes (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 4**.

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 4 sert-il ? (3 lignes maximum)

Question 7. Comment, dans l'expérience présentée à la Figure 4A, 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 technique applicables à la mesure de l'IL-6 rapportée dans l'expérience présentée à la Figure 4C. (3 lignes maximum)

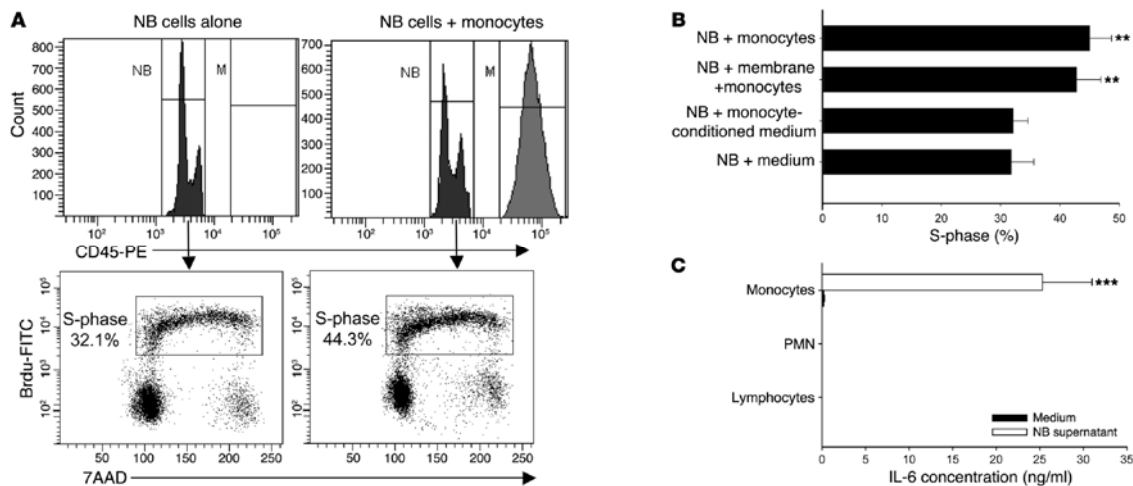


Figure 4 :

(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 ».

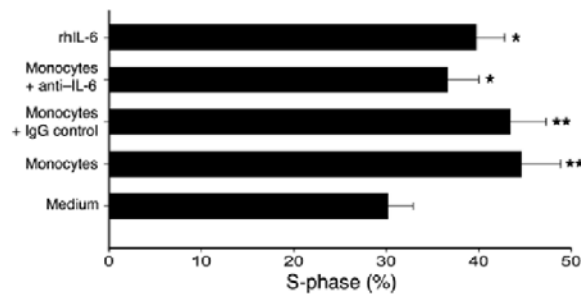
(C) Des monocytes, des polynucléaires (PMN) et des lymphocytes isolés du sang ont été cultivés pendant 24 heures en présence de milieu de culture provenant d'une culture de cellules NB (NB supernatant) ou de milieu seul (Medium). La concentration d'IL-6 dans le surnageant de culture est déterminée. Les 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 4. (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 5**.

Question 10. A quoi la condition « Monocytes + IgG control » utilisée dans l'expérience présentée à la Figure 5 sert-elle ? (3 lignes maximum)

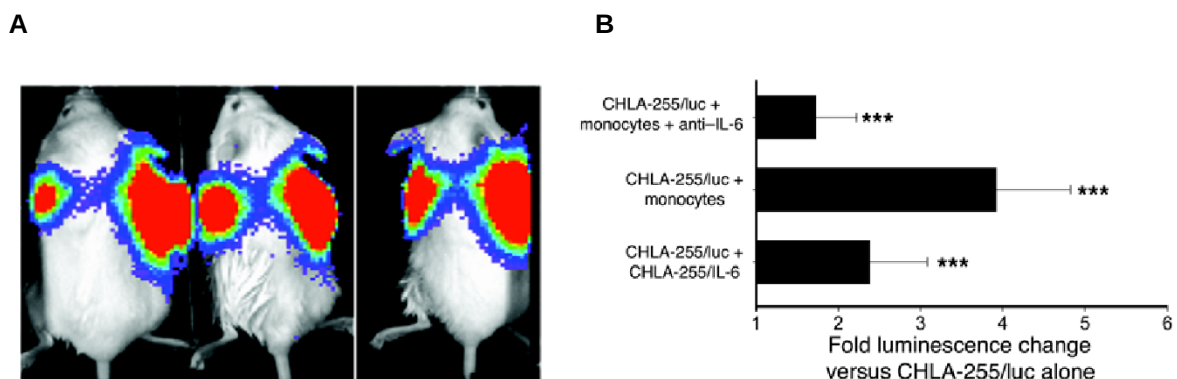
**Figure 5 :**

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 4A. 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 5. (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 6**.

**Figure 6 :**

(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 6. (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 7.

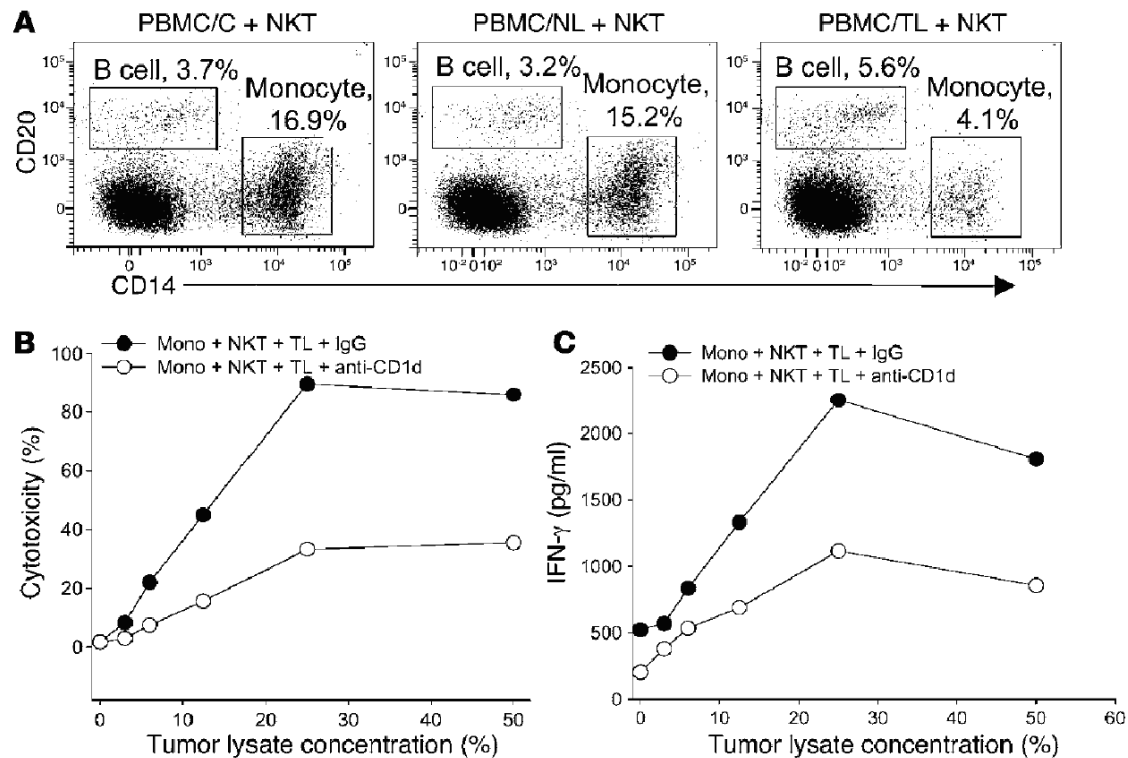


Figure 7 :

(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 7. (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 8).

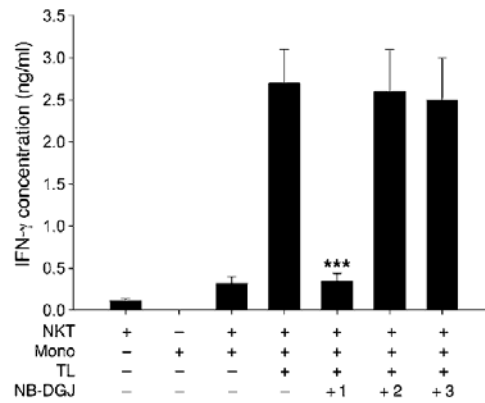


Figure 8 :

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 8. (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.