

11.01B

SESSION 2011

Filière BCPST

BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

Durée : 6 heures

L'usage des calculatrices est interdit

L'épreuve comporte **trois parties** abordant le thème des messagers intercellulaires chez les animaux. La première partie (partie A, page 3) est un exercice de synthèse. Les deux suivantes, partie B (pages 4 à 12) et partie C (pages 13 à 21) proposent l'analyse de documents qui explorent des mécanismes récemment découverts et originaux.

Il est conseillé de consacrer un temps identique (2 heures) à chacune des parties de l'épreuve.

Dans **chacune des parties** du devoir, il sera attaché une très grande importance à la rigueur ainsi qu'à la clarté des raisonnements et des illustrations.

L'usage des calculatrices électroniques n'est pas autorisé.

Partie A : Exercice de synthèse

Les messagers intercellulaires chez les animaux

A-1 Présentez de manière **rédigée**, illustrée par des **schémas** et par des **expériences**, les propriétés et le mode d'action d'un **messenger chimique intercellulaire** de votre choix.

A-2 Comparez, à l'aide d'un **tableau** organisé et synthétique, les propriétés et les modes d'action des **hormones** et des **neurotransmetteurs**. Le tableau s'étendra sur deux pages simples au maximum. La construction du tableau sera un élément essentiel de son évaluation.

Partie B

Au sein de tumeurs cérébrales humaines appelées gliomes, certaines cellules présentent à leur surface une forme mutée du récepteur au facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor). Dans la suite du texte, on notera respectivement **EGFR** (EGF Récepteur) et **EGFRmut** (EGFR muté) les versions sauvage et mutée du récepteur ; *EGFR* et *EGFRmut* (en italique) désigneront les gènes correspondants.

Au sein d'une même tumeur, 2 types de cellules ont été isolées, à partir desquelles on a pu établir 2 lignées cellulaires qui ne diffèrent qu'au niveau du locus du gène codant le récepteur à l'EGF :

- les cellules **U373** comportent les 2 allèles sauvages du gène *EGFR*,
- les cellules **U373mut** comportent un allèle *EGFR* sauvage et un allèle *EGFRmut*.

Ces cellules étant adhérentes, elles peuvent être cultivées sur une surface synthétique puis sont observées au microscope électronique à balayage (figure 1).

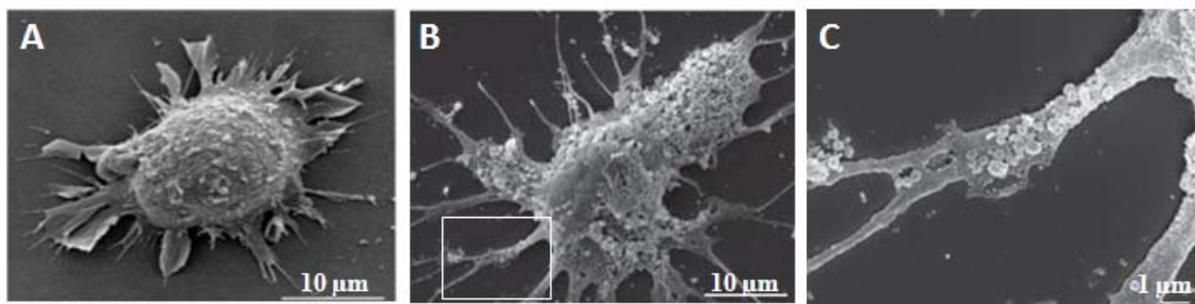


Figure 1: Observation au microscope électronique à balayage de cellules U373 (A) et U373mut (B et C). Le panneau C correspond à un agrandissement du cadre indiqué sur le panneau B. Les échelles sont indiquées sur chacune des images.

Question 1 : Décrivez et comparez les images obtenues.

Des cellules U373 ou U373mut sont cultivées pendant 2 jours, puis le milieu de culture est récupéré. Il est soumis à une centrifugation à faible vitesse de manière à retirer les éventuelles cellules qui auraient pu être décollées lors de sa collecte. Le surnageant est prélevé puis à nouveau centrifugé, mais à présent à très haute vitesse (ultracentrifugation). Le surnageant est éliminé et le culot, appelé « **culot d'ultracentrifugation** », est remis en suspension.

Des billes synthétiques chargées positivement sont ajoutées à une fraction du culot d'ultracentrifugation obtenu à partir de cellules U373mut. Une fraction de la suspension est observée au microscope électronique à balayage (figure 2-A). On appelle oncosomes les structures observées dans la figure 2-A. On nomme « **oncosomes-U373** » les oncosomes obtenus à partir de cellules U373 et « **oncosomes-U373mut** » ceux obtenus à partir de cellules U373mut.

En parallèle, la quantité totale de protéines présentes dans les culots d'ultracentrifugation de cellules U373 et U373mut est déterminée (figure 2-B).

Dans une autre expérience, les cellules U373 et U373mut sont cultivées dans un milieu de culture auquel est additionnée de la phosphatidyl-éthanolamine liée de manière covalente à une molécule fluorescente, la rhodamine (figure 2-C). La phosphatidyl-éthanolamine-rhodamine obtenue (notée PE-Rh) présente des propriétés de fluorescence identiques à celles de la rhodamine seule. Après 2 jours de culture en présence de PE-Rh, les oncosomes sont préparés comme précédemment et leur fluorescence est quantifiée (figure 2-D).

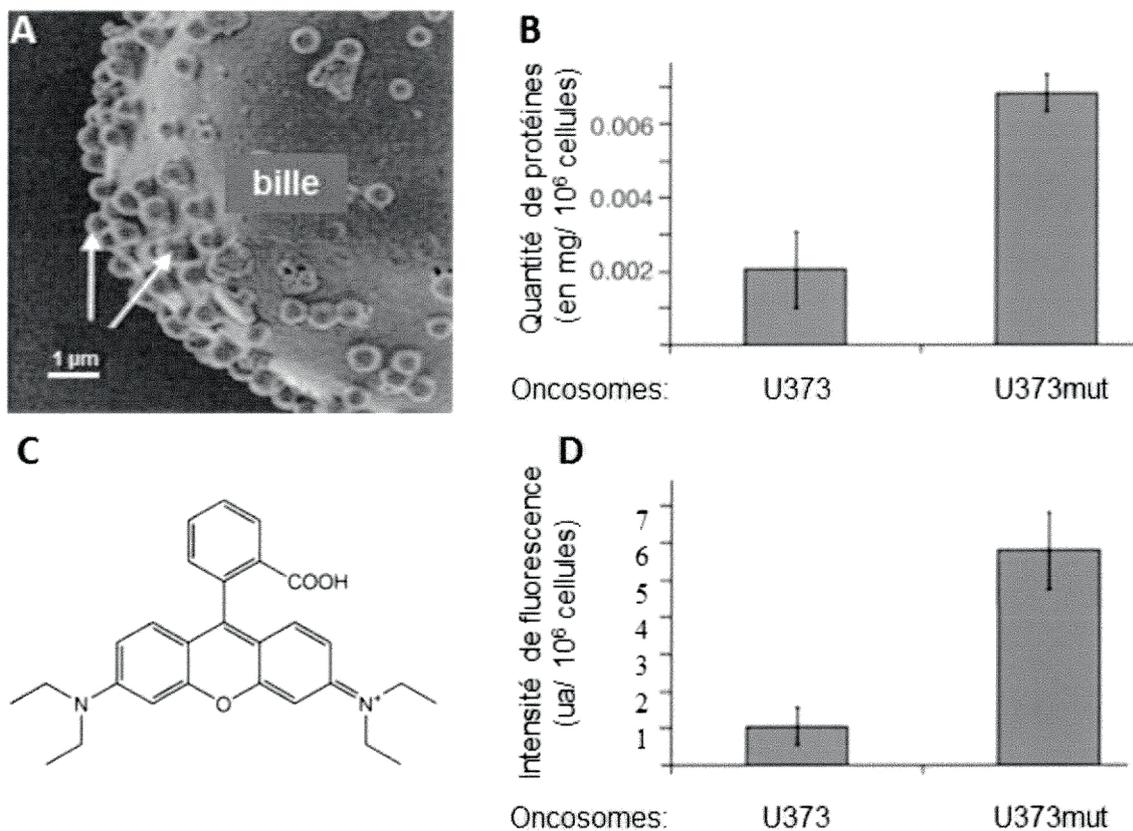


Figure 2: Caractérisation des culots d'ultracentrifugation obtenus à partir de cellules U373 et U373mut. Les données quantitatives correspondent aux moyennes des résultats obtenus lors de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. **A)** Observation au microscope électronique à balayage d'une bille incubée en présence de culot d'ultracentrifugation de cellules U373mut. L'échelle est indiquée. Les flèches indiquent les structures appelées « oncosomes-U373mut » mentionnées dans le texte. **B)** Quantités de protéines normalisées par rapport au nombre de cellules au moment de la collecte du milieu de culture. **C)** Structure de la rhodamine. **D)** Quantification de la fluorescence de la rhodamine dans les culots d'ultracentrifugation obtenus à partir de cellules cultivées en présence de PE-Rh. La fluorescence est exprimée en unités arbitraires (ua) rapportées au nombre de cellules au moment de la récolte du milieu de culture.

Question 2 : Rappelez la structure de la phosphatidyl-éthanolamine ainsi que ses propriétés physico-chimiques. Précisez sa localisation subcellulaire dans les cellules animales.

Question 3 : Qu'est-ce qu'une molécule fluorescente ? Donnez un exemple de molécule naturelle fluorescente. D'après la structure de cette dernière, comment justifiez-vous les propriétés fluorescentes de la rhodamine ?

Question 4 : Analysez et interprétez les résultats présentés dans la figure 2. Quelle hypothèse pouvez-vous formuler quant à la nature biochimique des oncosomes ?

Deux lots équivalents de cellules U373 sont incubés pendant 24 heures, ou non, avec des oncosomes-U373mut. Les cellules sont récupérées puis lavées pour retirer les oncosomes en suspension. On les incube ensuite avec un anticorps lié covalamment à une molécule fluorescente et reconnaissant EGFRmut et pas EGFR. L'intensité de fluorescence associée à chaque cellule est quantifiée. En parallèle, on analyse par la même méthode le récepteur EGFRmut présent à la surface de cellules U373mut. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 1.

Intensité de fluorescence (u.a.)	<10	10 à 100	>100
Cellules U373	100	0	0
Cellules U373mut	0	5	95
Cellules U373 + oncosomes-U373mut	2	95	3

Tableau 1 : Analyse de l'intensité de fluorescence (exprimée en unités arbitraires u.a.) des cellules U373, U373mut ou U373 incubées en présence d'oncosomes-U373mut. Le tableau indique les pourcentages de cellules présentant une intensité de fluorescence comprise dans la gamme indiquée. Pour chaque type cellulaire, 10000 cellules ont été analysées.

Les ARN messagers (ARNm) sont purifiés à partir de cellules U373, de cellules U373mut et de cellules U373 incubées 24 heures avec différentes quantités d'oncosomes-U373mut. On amplifie spécifiquement les ARNm codant EGFRmut ou l'actine. Les produits d'amplification sont ensuite déposés dans un gel d'agarose, séparés par électrophorèse puis révélés *via* la fluorescence d'un marqueur des acides nucléiques (figure 3).

Cellules	U373			U373mut
Oncosomes -U373mut (μg de protéines)	0	100	200	-
1				
2				

Figure 3 : Analyse des produits d'amplification obtenus à partir de différents lots de cellules. Des nombres de cellules identiques ont été analysés dans les différentes conditions. Ligne 1 : amplification des ARNm du gène *EGFRmut*. Ligne 2 : amplification des ARNm du gène de l'actine.

Question 5 : Analysez et interprétez les résultats obtenus dans le tableau 1 et la figure 3. Concluez quant à la nature des macromolécules véhiculées par les oncosomes-U373mut.

Les protéines présentes dans les extraits cellulaires et dans les oncosomes de cellules U373 et U373mut sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane. On effectue alors des détections à l'aide d'anticorps reconnaissant respectivement les protéines EGFR (anticorps reconnaissant à la fois EGFR et EGFRmut), l'actine et la flotilline. La flotilline est une protéine que l'on retrouve fréquemment associée à la phosphatidyl-éthanolamine. Les anticorps sont couplés à une enzyme donnant des produits colorés en présence d'un substrat chromogène (figure 4).

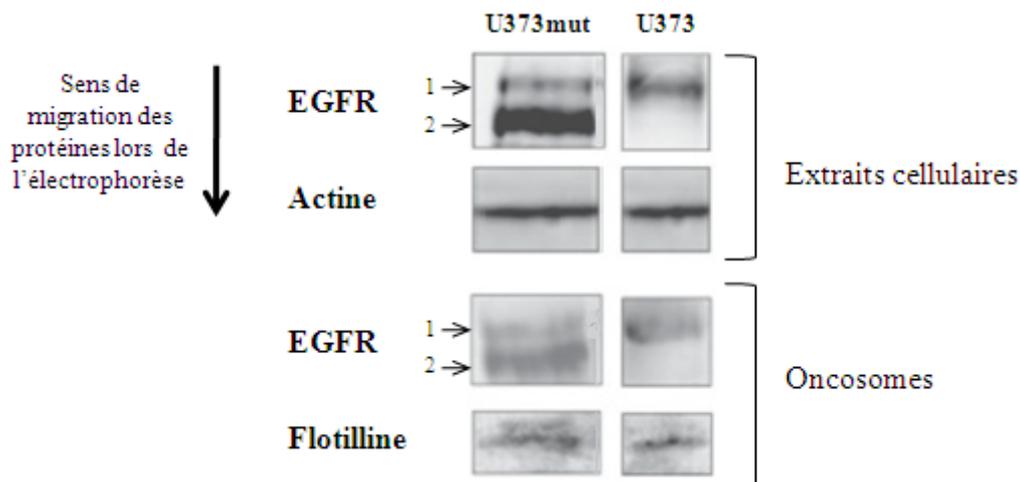


Figure 4 : Analyse par immunodétection sur membrane d'extraits cellulaires et d'oncosomes préparés à partir de cellules U373mut (à gauche) et U373 (à droite). La nature des protéines reconnues par les anticorps est précisée à gauche. Pour chaque extrait, des quantités totales de protéines identiques ont été analysées.

Question 6 : Identifiez la nature des formes du récepteur à l'EGF indiquées par les flèches 1 et 2. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler quant à la nature de la mutation présente dans le gène *EGFRmut* ? Que pouvez-vous conclure de l'analyse des oncosomes ?

Au sein de ces tumeurs cérébrales humaines, seul un très faible pourcentage de cellules tumorales comporte dans son génome le gène *EGFRmut*. Cependant, la protéine EGFRmut est présente à la surface d'un très fort pourcentage de cellules.

Question 7: A l'issue de l'ensemble des expériences présentées, expliquez à l'aide d'un schéma comment des cellules tumorales ne possédant pas le gène *EGFRmut* peuvent néanmoins présenter la protéine EGFRmut à leur surface.

Deux dérivés fluorescents de la phosphatidyl-éthanolamine sont préparés. Le premier contient de la rhodamine (PE-Rh). Le second, noté PE-NBD, contient du NBD, un fluorophore dont le spectre d'émission recouvre partiellement le spectre d'excitation de la rhodamine (figure 5-A). Ce recouvrement est à l'origine d'un phénomène de transfert de fluorescence, un phénomène qui ne peut se dérouler que lorsque les deux fluorophores sont en contact l'un avec l'autre. Lorsque le premier fluorophore (ici le NBD) est excité, il n'émet alors pas de photon mais transfère son énergie au second fluorophore (ici la rhodamine), qui se désactive en émettant un photon.

Des cellules U373mut sont incubées en présence de PE-NBD et de PE-Rh, puis les oncosomes sont purifiés comme précédemment et répartis en deux fractions équivalentes. La fraction 1 ne subit aucun traitement (fraction contrôle). Un détergent capable de solubiliser les bicouches lipidiques est ajouté à la fraction 2. La fluorescence à 530 nm et à 585 nm est quantifiée dans les 2 fractions après excitation à 470 nm (figure 5-B).

Question 8 : Analysez et interprétez les résultats de la figure 5-B.

Des cellules U373mut sont cultivées en présence de PE-NBD et de PE-Rh puis les oncosomes sont purifiés comme précédemment. Ils sont ajoutés à une culture de cellules U373. Après 1 heure d'incubation à 4°C, température qui fige les membranes, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées délicatement pour retirer les oncosomes restés en suspension. Une analyse au microscope permet de constater que des oncosomes sont présents à la surface des cellules (non montré).

Les cellules sont alors récupérées et divisées en deux lots équivalents ; le premier est maintenu à 4°C, l'autre est placé à 37°C pendant le temps indiqué. On mesure à différents temps l'intensité de la lumière émise à 585 nm après excitation à 470 nm (figure 5-C). L'incubation à 37°C n'altère pas les propriétés de fluorescence de la rhodamine.

Question 9 : Analysez et interprétez les courbes présentées dans la figure 5-C.

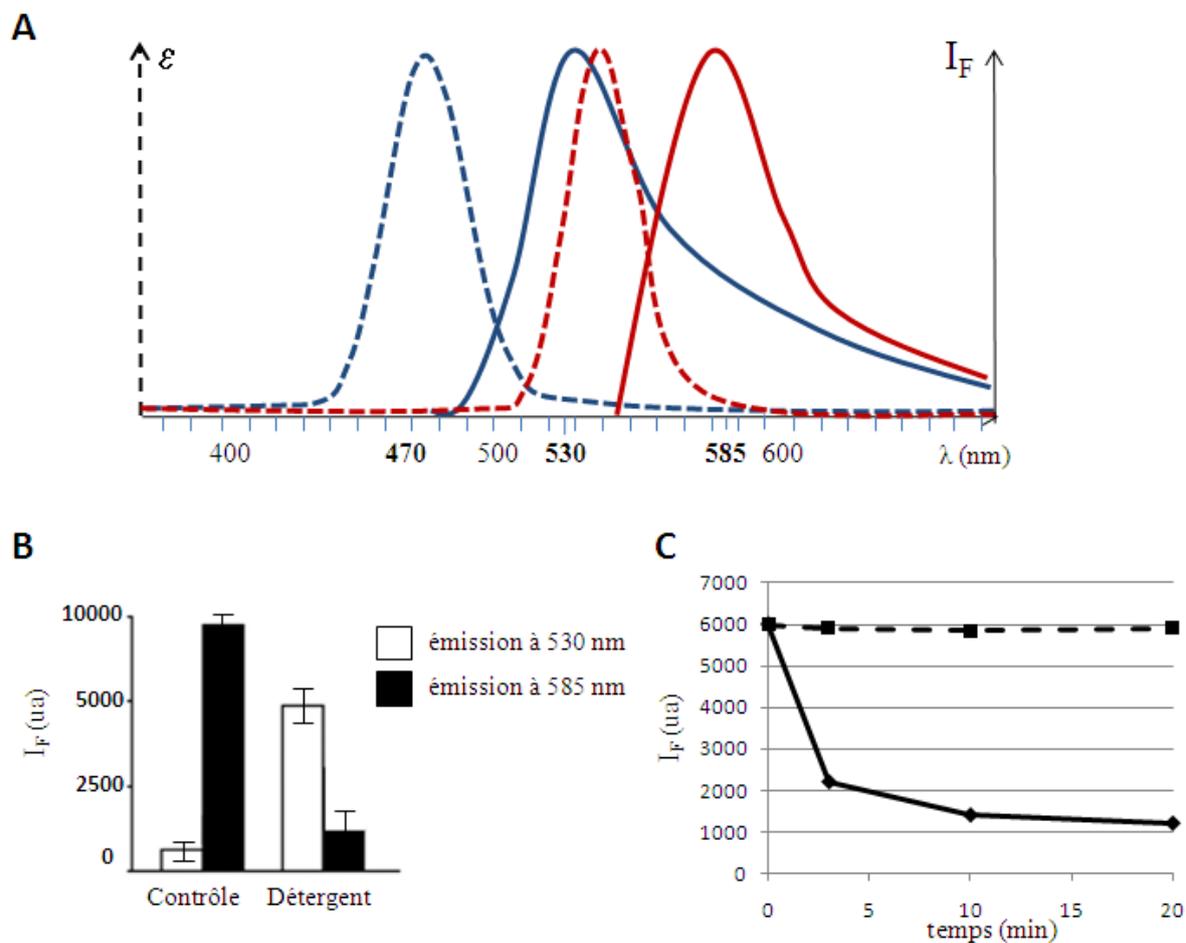


Figure 5 : **A**) Spectres d'absorption (en traits pointillés) et d'émission (en traits pleins) du NBD (en bleu) et de la rhodamine (en rouge). Les courbes en pointillés se rapportent à l'axe des ordonnées situé à gauche, qui correspond au coefficient d'extinction molaire (ϵ , exprimé en unités arbitraires). Les courbes en traits continus se rapportent à l'axe situé à droite, qui correspond à l'intensité d'émission de fluorescence (I_F , exprimée en unités arbitraires) obtenue après excitation du fluorophore à son maximum d'absorption. **B**) Mesure de l'intensité de fluorescence (I_F , exprimée en unités arbitraires, u.a.) des oncosomes à 530 nm et 585 nm, après excitation à 470 nm, en présence ou en l'absence de détergent. L'intensité de fluorescence moyenne obtenue à l'issue de trois expériences indépendantes est rapportée à un même nombre de cellules au moment de la collecte du surnageant de culture. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. **C**) Etude cinétique de l'intensité de fluorescence (I_F) à 585 nm après excitation à 470 nm de cellules U373 incubées en présence d'oncosomes marqués par la PE-NBD et la PE-Rh. Les cellules pré-incubées à 4°C avec les oncosomes sont placées à 37°C à t=0 (losanges, courbe en trait plein) ou maintenues à 4°C (carrés, courbe en pointillés).

Le développement d'une tumeur nécessite la dérégulation de gènes impliqués dans le contrôle de la survie, de la prolifération des cellules et de la migration des cellules. Elle implique également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse).

L'EGF est connu pour augmenter la vitesse de prolifération de différents types cellulaires. Il est également établi que sa fixation sur l'EGFR active une voie de transduction du signal, dite voie des MAP-kinases, impliquant des phosphorylations en cascade de protéines, dont celle de la protéine ERK.

On analyse des lysats cellulaires préparés à partir de cellules U373 incubées, dans différentes combinaisons, en présence d'oncosomes-U373, d'oncosomes-U373mut, d'EGF ou d'un inhibiteur de la voie des MAP-kinases (figure 6). Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane. Les formes phosphorylées et non phosphorylées de ERK sont révélées séparément à l'aide de deux anticorps distincts, spécifiques chacun d'une des deux formes de la protéine. Les anticorps sont couplés à une enzyme donnant des produits colorés en présence d'un substrat chromogène.

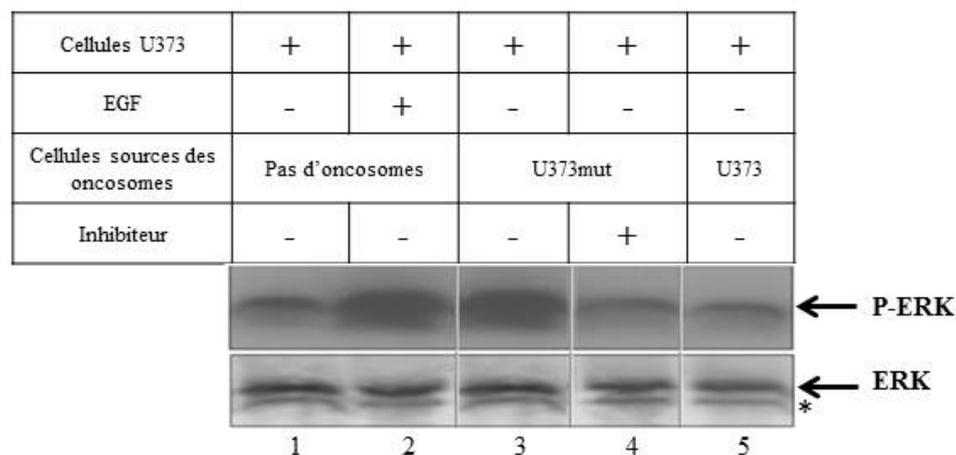


Figure 6: Analyse par immunodétection sur membrane de la protéine-kinase ERK dans des extraits cellulaires. Les cellules U373 sont incubées seules (piste 1), en présence d'EGF (piste 2), en présence d'oncosomes-U373mut (pistes 3 et 4) ou en présence d'oncosomes-U373 (piste 5), en l'absence (pistes 1, 2, 3 et 5) ou en présence (piste 4) de l'inhibiteur de la voie des MAP-kinases. Les extraits protéiques sont analysés à l'aide de deux anticorps, le premier reconnaissant spécifiquement P-ERK, la forme phosphorylée de ERK (repérée par une flèche à droite), le second reconnaissant spécifiquement la forme non phosphorylée de ERK (repérée par une flèche à droite). L'étoile indique une protéine révélée de manière non spécifique par l'anticorps. La même quantité de protéines totales a été déposée dans chaque piste.

Question 10 : Comment interprétez-vous la présence d'un signal révélé par l'anticorps anti-P-ERK dans la colonne 1 (cellules U373 incubées seules) ?

Question 11 : Analysez et interprétez la figure 6. Comment expliquez-vous, à partir de ces données, la capacité accrue de prolifération des cellules tumorales ?

On analyse la sécrétion par les cellules U373 du facteur angiogénique VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). La production de VEGF dans le milieu de culture est étudiée après incubation des cellules en présence d'oncosomes-U373 ou d'oncosomes-U373mut, et en présence ou en l'absence de l'inhibiteur de la voie des MAP-kinases précédemment utilisé (figure 7).

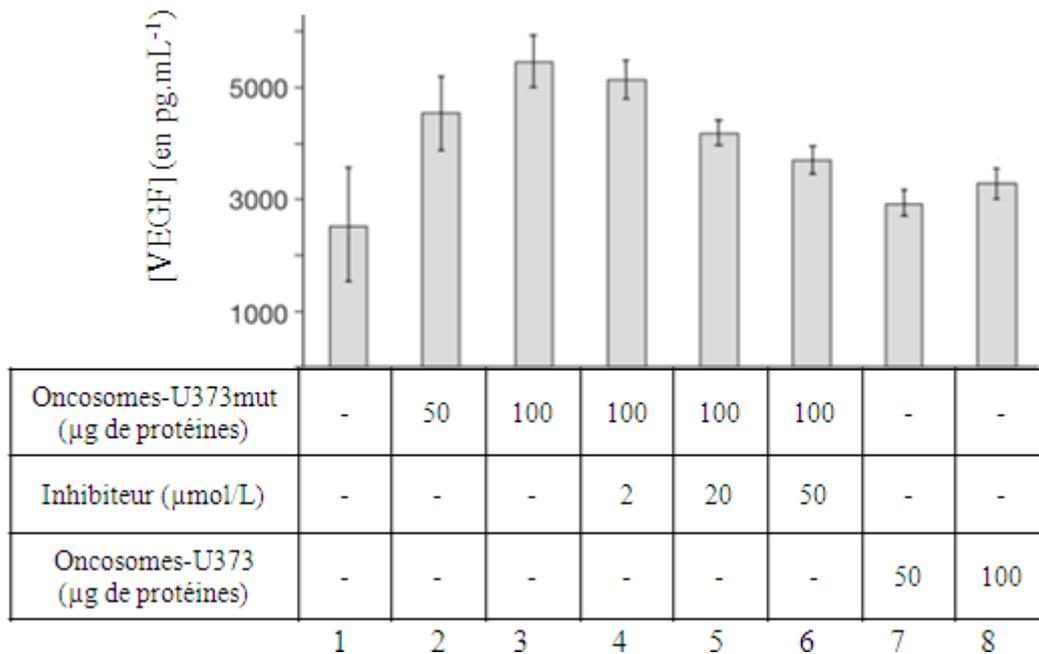


Figure 7: Analyse de la concentration en VEGF dans le milieu de culture de cellules U373 incubées seules (1), en présence d'oncosomes-U373mut (2-6) ou en présence d'oncosomes-U373 (7,8) et en l'absence (1-3,7,8) ou en présence (4-6) de l'inhibiteur de la voie des MAP-kinases. Les résultats présentés correspondent à la moyenne obtenue à l'issue de trois expériences indépendantes ; les barres d'erreur correspondent aux écarts-types.

Question 12 : Analysez et interprétez la figure 7.

Des cellules U373mut ou U373 sont incubées 2 heures à 37°C seules, en présence d'oncosomes-U373, ou en présence d'oncosomes-U373mut. Après 2 lavages destinés à retirer les oncosomes en suspension, des nombres identiques de cellules sont incluses et uniformément réparties dans un gel recouvert de milieu nutritif. Dans ce gel, toutes les cellules sont capables de survivre, de se diviser et de migrer lentement dans les trois directions de l'espace. Après 3 semaines d'incubation à 37°C, au cours desquelles le milieu de culture est régulièrement renouvelé, le nombre et la morphologie des colonies cellulaires sont analysés (figure 8).

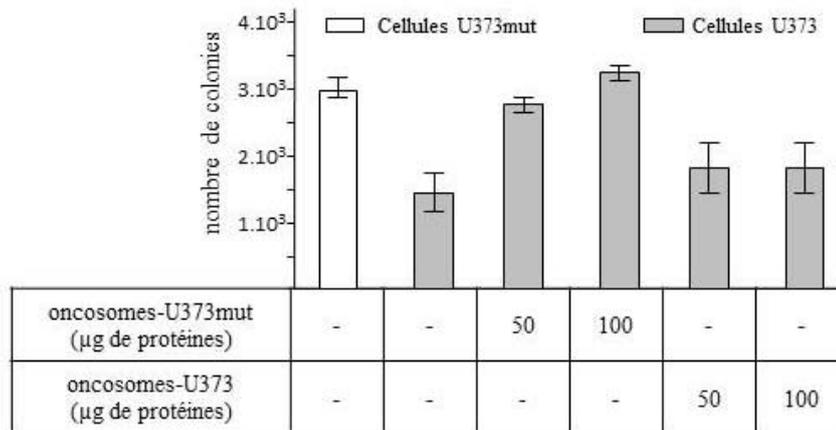
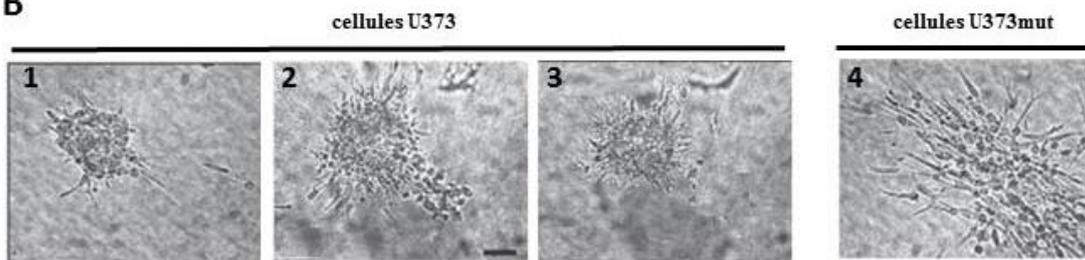
A**B**

Figure 8: Analyse des colonies cellulaires formées après trois semaines de culture en milieu gélifié. **A)** Dénombrement des colonies visibles à la loupe binoculaire de cellules U373mut et U373 pré-incubées avec des oncosomes-U373, avec des oncosomes-U373mut ou n'ayant subi aucun traitement. Les histogrammes présentent les valeurs moyennes obtenues à l'issue de 3 expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondant aux écarts-types. **B)** Observation au microscope à contraste de phase (grossissement x100) d'une colonie représentative de différentes conditions expérimentales : 1) Cellules U373. 2) Cellules U373 + oncosomes-U373mut. 3) Cellules U373 + oncosomes-U373. 4) Cellules U373mut.

Question 13 : Pourquoi obtient-on, dans ces conditions expérimentales, des colonies cellulaires ? De quoi dépend le nombre de colonies ? Analysez et interprétez les résultats présentés dans la figure 8.

Question 14 : Selon vous, quelles conséquences peuvent avoir les phénomènes analysés dans les questions 12 et 13 sur l'évolution de la tumeur *in vivo* ?

Question 15 : A partir de l'ensemble de vos interprétations, expliquez comment la présence de *EGFRmut* dans seulement un faible nombre de cellules confère à l'ensemble des cellules de la tumeur un phénotype tumoral et contribue à l'agressivité de ces tumeurs.

Question 16 : Expliquez en quoi ce mode de communication diffère des modes de communication intercellulaire classiquement décrits.

Partie C. Mode d'action original d'un messenger intercellulaire impliqué dans le contrôle du système immunitaire

Le système immunitaire est contrôlé par des cytokines qui peuvent inhiber ou stimuler les réponses immunitaires. Parmi celles-ci, l'interleukine 15 (notée **IL15** dans la suite de l'énoncé) est un messenger polypeptidique qui joue un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire. Deux localisations de l'IL15 sont décrites :

- localisation **extracellulaire** : correspond à la forme sécrétée de l'IL15, qui agit au niveau des cellules cibles (certains lymphocytes par exemple) *via* un récepteur membranaire appelé IL15R.
- localisation **intracellulaire** : correspond à une forme cytoplasmique et nucléaire, non sécrétée, présente dans certaines cellules du système immunitaire inné (macrophages et mastocytes).

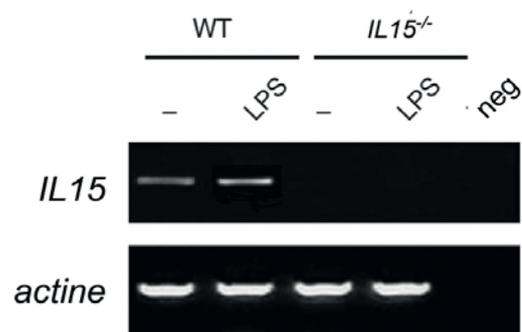
On dispose de trois lignées de souris. La première correspond à des souris sauvages (souris **WT**). La deuxième correspond à des souris dont les deux allèles du gène codant l'IL15 ont été invalidés (souris **IL15^{-/-}**). La troisième correspond à des souris déficientes pour le récepteur à l'IL15 (souris **IL15R^{-/-}**). A l'exception des *loci* cités, ces souris sont génétiquement identiques.

Le lipopolysaccharide (LPS), présent dans la paroi de certaines bactéries dont *Escherichia coli*, est un des signaux qui stimulent les mastocytes. Des mastocytes de souris sauvages et **IL15^{-/-}** sont cultivés pendant 24 heures en présence ou en l'absence de LPS. Ils sont récupérés, lysés, et leurs ARN polyadénylés sont purifiés.

Question 17 : Comment peut-on, selon vous, purifier des ARN polyadénylés ? Quel(s) type(s) d'ARN cherche-t-on ainsi à isoler ?

Après transcription inverse, une amplification enzymatique par PCR (polymerase chain reaction) est réalisée à l'aide d'un couple d'oligonucléotides spécifiques du gène de l'IL15 ou du gène de l'actine. Les produits d'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose. Les fragments d'ADN bicaténaire sont révélés *via* la fluorescence d'un agent intercalant de l'ADN (figure 9).

Figure 9 : Analyse des produits obtenus après transcription inverse puis amplification à partir de différentes sources d'ARN polyadénylés. Des nombres identiques de mastocytes de souris sauvages (WT) ou **IL15^{-/-}** sont analysés, après deux heures d'incubation en l'absence ou en présence de LPS. **Ligne supérieure** : amplification avec des oligonucléotides spécifiques du gène de l'IL15. **Ligne inférieure** : amplification avec des oligonucléotides spécifiques du gène codant l'actine. La piste « neg » présente le résultat de l'amplification contrôle en l'absence d'ARN polyadénylés.



Question 18 : Expliquez le principe de l'étape de transcription inverse. Analysez et interprétez les résultats obtenus.

Des mastocytes WT sont cultivés en l'absence ou en présence de LPS. Les suspensions cellulaires sont centrifugées de manière à faire sédimenter les cellules. Les surnageants sont collectés et les cellules, présentes dans le culot, sont lysées. Les quantités d'IL15 présentes dans les surnageants et dans les lysats cellulaires sont déterminées. Les résultats sont présentés dans la figure 10.

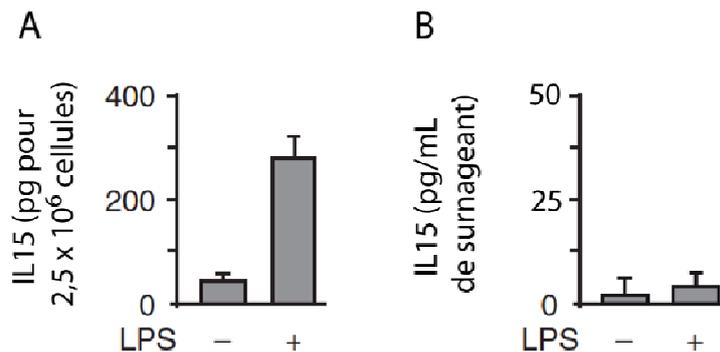


Figure 10 : Dosage de l'IL15 dans les lysats (A) ou les surnageants de culture (B) de mastocytes WT cultivés en l'absence (-) ou en présence (+) de LPS. Les histogrammes montrent la moyenne obtenue sur 3 expériences. Les barres d'erreurs indiquent les écarts-types.

Question 19 : Comment procéderiez-vous pour doser spécifiquement l'IL15 ?

Question 20 : Analysez et interprétez ces résultats.

Le **choc septique** est une grave complication, aboutissant fréquemment au décès, qui survient lorsqu'une infection bactérienne ne peut être limitée par le système immunitaire, notamment lors d'une infection viscérale massive (IVM). On analyse la survie de trois lots de souris, WT, *IL15^{-/-}* et *IL15R^{-/-}*, en l'absence de tout traitement ou suite à une IVM. Les résultats sont présentés dans les panneaux A et B de la figure 11 (page 15).

Chez des souris WT ou *IL15^{-/-}*, le liquide présent au niveau du site d'inflammation est prélevé une heure et trois heures après le début de l'IVM et on détermine sa concentration en bactéries (figure 11-C). Pour cela, une fraction aliquote du liquide prélevé, de volume V_1 défini (en mL), est diluée au $1/10^{\text{ème}}$ puis un volume V_2 de cette dilution est réparti à la surface d'un milieu de culture solide et, après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies formées sont comptées.

Question 21 : Donnez une équation permettant de calculer la concentration bactérienne dans le liquide physiologique.

Question 22 : Analysez et interprétez l'ensemble des résultats de la figure 11. Que peut-on proposer quant au(x) rôle(s) des formes intracellulaire et extracellulaire de l'IL15 ?

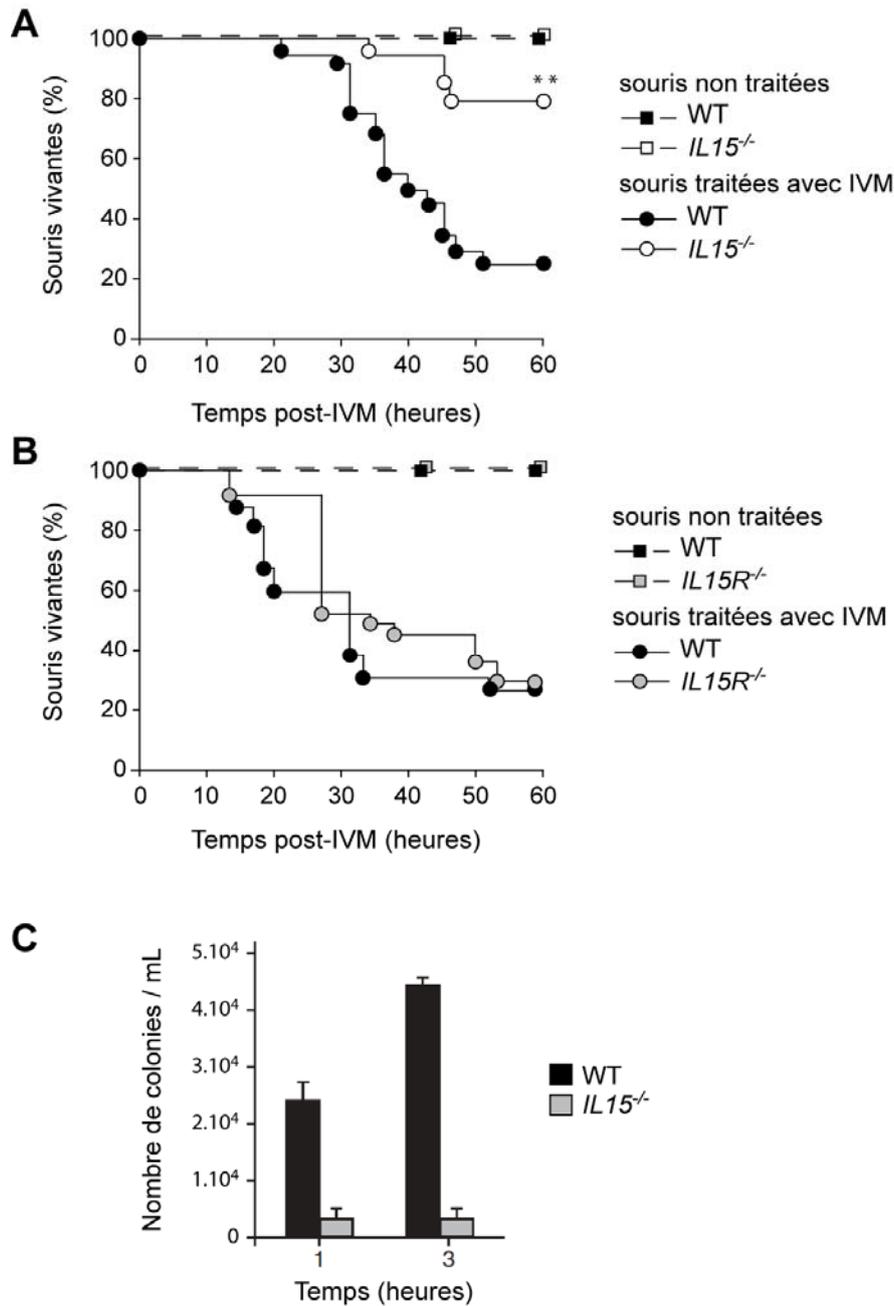


Figure 11 : Analyse de la survie de différents lots de souris, non traitées ou traitées avec infection viscérale massive (IVM). **A**) Comparaison de souris sauvages (WT) et *IL15^{-/-}*. Le symbole ** indique que la survie des souris diffère significativement entre les souris WT et *IL15^{-/-}* traitées par IVM. **B**) Comparaison de souris sauvages (WT) et *IL15R^{-/-}*. **C**) Détermination de la concentration en bactéries au niveau du site d'inflammation, une à trois heures après le début de l'IVM, chez des souris sauvages (WT) et *IL15^{-/-}*. Les histogrammes montrent la moyenne obtenue à l'issue de 3 expériences. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type des mesures.

Des souris *Mast^{-/-}*, présentant un défaut génétique conduisant à l'absence totale de mastocytes, sont à présent utilisées. La survie de ces souris après IVM est comparée à celle de souris sauvages selon le même protocole que précédemment. Les résultats sont présentés dans la figure 12-A. Dans une seconde expérience, on injecte à des souris *Mast^{-/-}*, par voie

intraveineuse, des mastocytes purifiés à partir de souris WT ou *IL15*^{-/-}, puis on analyse comme précédemment leur survie (figure 12-B).

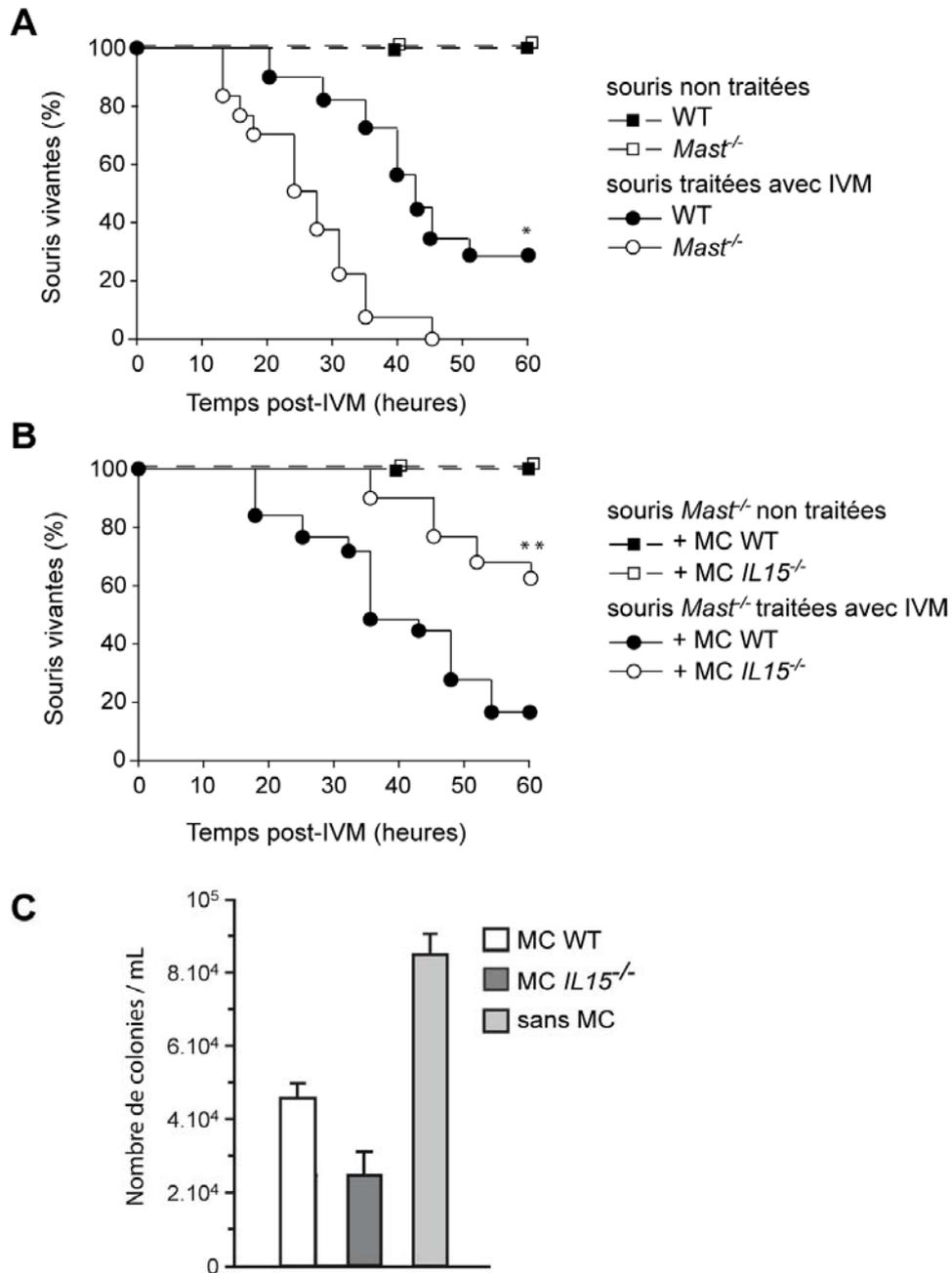


Figure 12: Etude de souris dépourvues de mastocytes (souris Mast^{-/-}). **A)** Comparaison de la survie après IVM de souris sauvages (WT) et Mast^{-/-}. **B)** Analyse de la survie après IVM de souris Mast^{-/-} après injection de mastocytes purifiés à partir de souris sauvages (MC WT) ou de souris IL15^{-/-} (MC IL15^{-/-}). Le symbole * indique que la survie des souris diffère significativement après IVM entre les souris ayant reçu les MC-WT et celles ayant reçu les MC-IL15^{-/-}. **C)** Evolution *in vitro* de la concentration en *Esherichia coli* vivantes, en présence ou en l'absence de mastocytes (MC) purifiés à partir de souris sauvages (MC-WT) ou de souris IL15^{-/-} (MC IL15^{-/-}). Les histogrammes montrent la moyenne obtenue sur 5 expériences. Les barres d'erreurs indiquent les écarts-types.

Enfin, des mastocytes purifiés à partir de souris sauvages ou de souris *IL15^{-/-}* sont cultivés pendant deux heures *in vitro* en présence de bactéries *Escherichia coli*. A l'issue de cette culture, la suspension cellulaire est centrifugée à basse vitesse de manière à sédimenter les mastocytes mais pas les bactéries. Une fraction aliquote du surnageant est prélevée, répartie à la surface d'un milieu de culture solide et, après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies formées sont comptées (figure 12-C).

Question 23 : Que cherche-t-on à mettre en évidence par l'approche utilisée dans la figure 12-C ?

Question 24 : Analysez et interprétez l'ensemble des résultats de la figure 12.

Question 25 : Par quel(s) mécanisme(s) les mastocytes pourraient-ils exercer l'effet mis en évidence ?

Question 26 : Proposez un schéma bilan permettant de comparer la réponse immunitaire induite par une IVM dans les souris WT et *IL15^{-/-}*.

Dans les expériences suivantes, trois inhibiteurs compétitifs de protéases sont utilisés :

- la chymostatine, qui inhibe les protéases à sérine active ;
- la leupeptine, qui inhibe les protéases à cystéine active ;
- la pepstatine, qui inhibe les protéases acides.

Ces inhibiteurs sont incapables de pénétrer et d'exercer leur effet dans le cytosol des cellules ou leurs compartiments intracellulaires.

Des mastocytes de souris sauvages ou de souris *IL15^{-/-}* sont incubés durant une heure en présence d'un inhibiteur de protéases, puis des bactéries *Escherichia coli* sont ajoutées au milieu en nombre constant. Après deux nouvelles heures d'incubation, le nombre de bactéries vivantes dans le milieu de culture est déterminé par la même méthode que précédemment (*cf.* question 25). Des lots identiques de mastocytes sauvages et *IL15^{-/-}* sont comparés et soumis séparément à l'action des trois inhibiteurs décrits précédemment. Les résultats sont présentés par la figure 13.

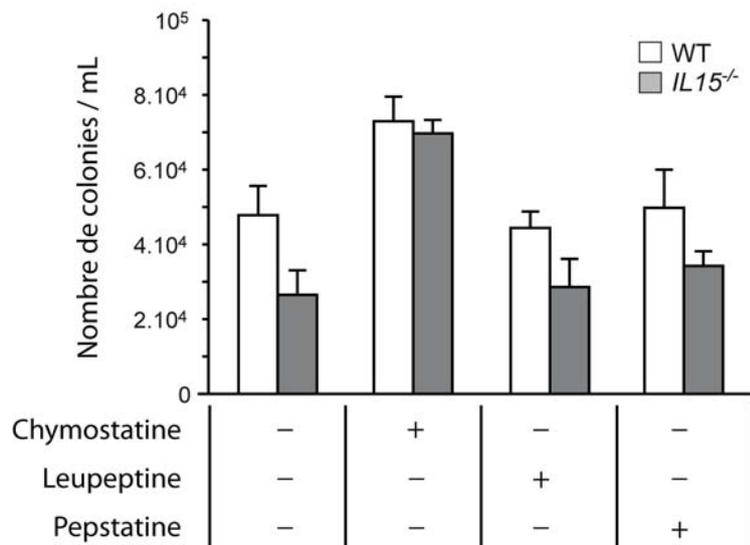


Figure 13 : Analyse de la survie bactérienne *in vitro* en présence de mastocytes de souris sauvages (WT) ou de souris IL15^{-/-} en l'absence (-) ou en présence (+) de différents inhibiteurs de protéases. Les histogrammes montrent la moyenne obtenue sur 3 expériences. Les barres d'erreurs indiquent les écarts-types.

Question 27 : Que signifie le terme « inhibiteur compétitif » ? Analysez et interprétez cette expérience. Quelle conclusion pouvez-vous en tirer ?

Plusieurs activités protéolytiques sont associées aux mastocytes et contribuent aux défenses anti-bactériennes. Chez la souris, les mastocytes synthétisent notamment 5 isoformes de chymases, une famille de protéases. Les différentes chymases appelées MCP-1, MCP-2, MCP-4, MCP-5 et MCP-9 sont codées par les gènes *Mcp1*, *Mcp2*, *Mcp4*, *Mcp5* et *Mcp9* respectivement.

L'activité des chymases est mesurée dans des lysats cellulaires de mastocytes de souris sauvages ou de souris IL15^{-/-}, stimulés par du LPS avant leur lyse. Elle est comparée à l'activité carboxypeptidase A, une exoprotéase ubiquitaire qui hydrolyse la dernière liaison peptidique de protéines comportant un résidu C-terminal aromatique. Pour chaque protéase analysée, les lysats (préparés à partir de nombres de cellules identiques dans les différents essais) sont incubés en présence d'un substrat spécifique en concentration saturante et, à différents temps, une fraction aliquote est prélevée et les produits d'hydrolyse sont quantifiés (figure 14).

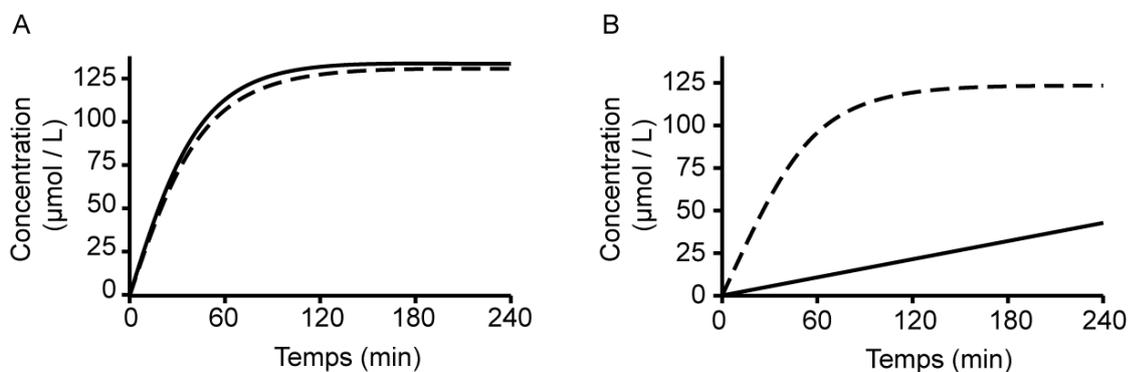


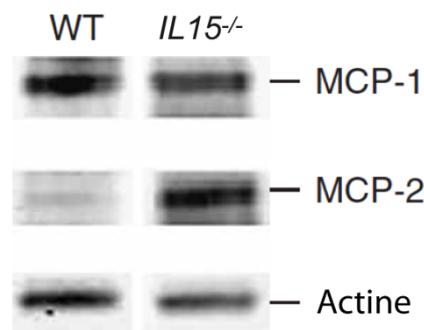
Figure 14 : Etude des activités carboxypeptidases A (panneau A) et chymases (panneau B) dans des extraits cellulaires de mastocytes de souris sauvages (lignes continues) et de souris IL15^{-/-} (traits

pointillés) stimulés par du LPS. Les concentrations mesurées sont celles des produits de réaction d'hydrolyse d'un substrat spécifique de la carboxypeptidase (A) ou des chymases (B).

Question 28 : A partir des graphiques fournis, calculez la vitesse initiale d'hydrolyse pour chaque catégorie d'enzyme dans le cas de mastocytes de souris sauvage ou *IL15*^{-/-}. Analysez et interprétez les résultats.

Des mastocytes de souris sauvages et de souris *IL15*^{-/-} sont stimulés par du LPS puis lysés. Les protéines sont extraites, soumises à une migration électrophorétique en conditions dénaturantes puis transférées sur une membrane. La membrane est incubée en présence d'anticorps de souris reconnaissant spécifiquement soit la protéine MCP-1, soit la protéine MCP-2, soit l'actine. Les anticorps sont couplés à une enzyme donnant des produits colorés en présence de substrat chromogène. Les résultats sont présentés par la figure 15.

Figure 15 : Immunodétection de deux isoformes de chymases (MCP-1 et MCP-2, comme indiqué sur la droite) et de l'actine dans des lysats de mastocytes de souris sauvages (WT) et de souris *IL15*^{-/-} stimulés par du LPS. Des quantités totales de protéines identiques sont analysées dans chacune des pistes.



Question 29 : Analysez et interprétez les résultats. Formulez plusieurs hypothèses permettant d'expliquer le phénomène observé chez les mastocytes *IL15*^{-/-}.

Les mastocytes issus de souris sauvages ou de souris *IL15*^{-/-} sont lysés et leurs ARN polyadénylés sont purifiés. Après transcription inverse, des amplifications enzymatiques par PCR (polymerase chain reaction) sont réalisées à l'aide de couples d'oligonucléotides spécifiques respectivement des gènes *Mcp1*, *Mcp2*, *Mcp4*, *Mcp5* et *Mcp9* et du gène de la glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*), un gène exprimé de manière constante dans toutes les cellules. Les produits d'amplification sont ensuite quantifiés ; les résultats sont présentés dans la figure 16.

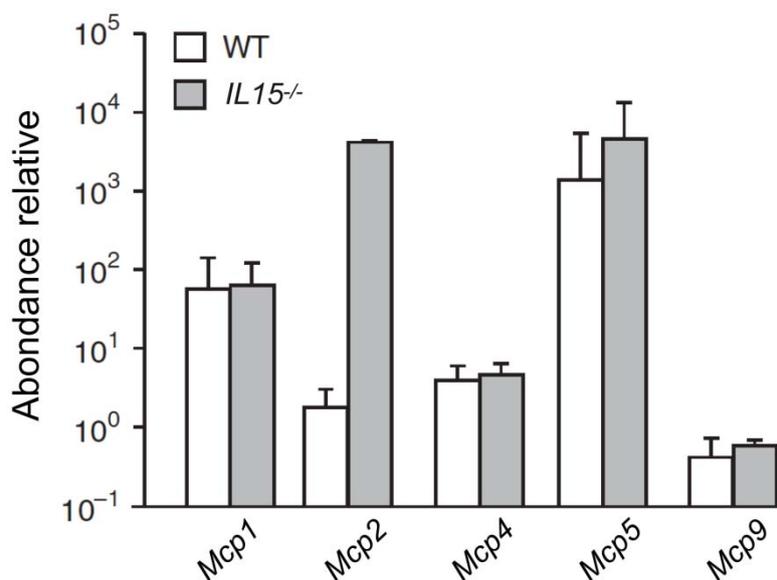


Figure 16 : Analyse de mastocytes de souris sauvages (WT) ou de souris IL15^{-/-} par transcription inverse suivie d'amplification par PCR. Des couples d'oligonucléotides spécifiques des gènes *Mcp1*, *Mcp2*, *Mcp4*, *Mcp5* et *Mcp9* ont été utilisés, comme indiqué en dessous de chaque paire de barres. Les produits d'amplification ont été quantifiés et normalisés par rapport à l'abondance du produit d'amplification obtenu à l'aide d'un couple d'oligonucléotides spécifique du gène de la GAPDH.

Question 30 : Analysez et interprétez les résultats obtenus. Quelle(s) hypothèse(s) proposez-vous quant au(x) mécanisme(s) impliqué(s) ?

Trois vecteurs plasmidiques sont construits et purifiés. Le premier (noté V1) porte la séquence codante de la lactamase en aval du promoteur du gène *Mcp2*. Le deuxième (noté V2) comporte la séquence codante du gène de l'IL15 sous contrôle d'un promoteur fort et constitutif. Le troisième (noté V3) est le vecteur vide correspondant au vecteur recombinant V2. Ces différents vecteurs sont introduits par transfection dans des mastocytes en culture, en différentes combinaisons. Après 24 heures de culture, les cellules, en nombres identiques pour les différents essais, sont récupérées et lysées. L'activité du gène rapporteur lactamase est alors quantifiée. Les résultats sont présentés sur la figure 17.

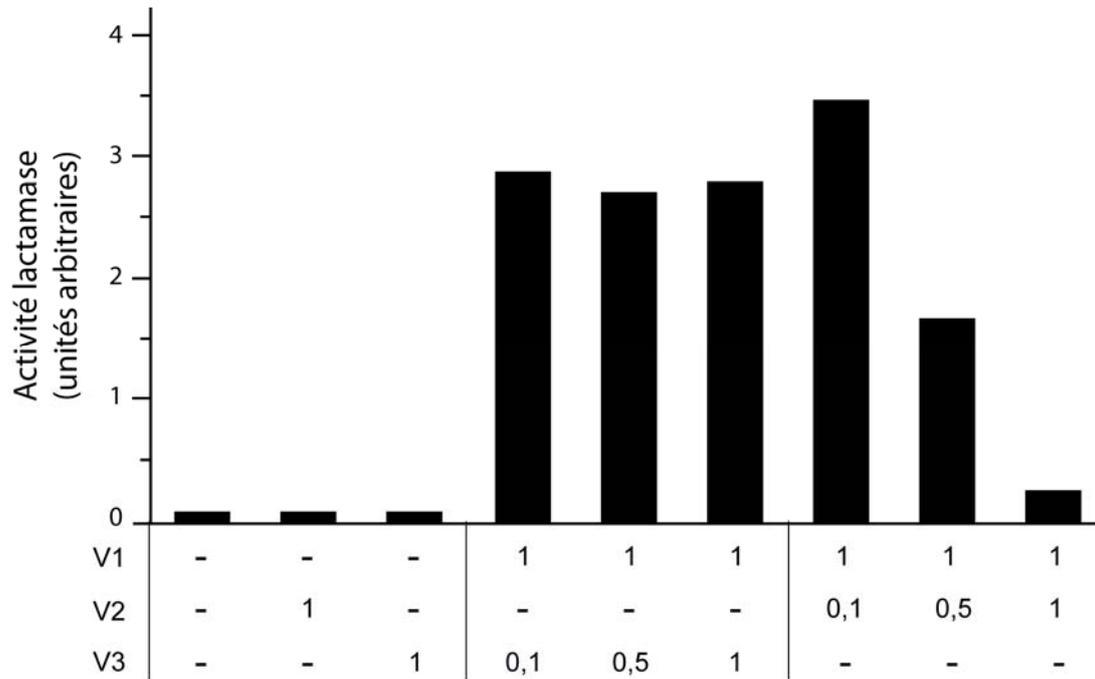


Figure 17 : Mesure des activités lactamase dans des extraits cellulaires de mastocytes transfectés par différentes combinaisons de vecteurs V1, V2 et V3 (voir le texte pour les détails). Un nombre identique de cellules est analysé dans chaque essai. Un signe « - » indique une absence du vecteur lors de la transfection ; les nombres indiquent les quantités de vecteurs (en μg) utilisés lors de la transfection. Les activités sont exprimées en unités arbitraires.

Question 31 : Analysez et interprétez les résultats.

Question 32 : Proposez un schéma récapitulatif intégrant l'ensemble des données présentées et qui explique par quels mécanismes l'IL15 contrôle l'activité bactéricide des mastocytes.

Question 33 : L'IL15 étant classiquement décrite comme un messenger intercellulaire, expliquez en quoi le processus analysé lors de la présente étude est surprenant.