

SESSION 2008

SECOND CONCOURS
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

BIOLOGIE - BIOCHIMIE

Durée : 4 heures

L'usage de la calculatrice est interdit.

Consignes générales

Le sujet est composé de deux problèmes indépendants et de 21 pages au total.

Il est préférable, pour la cohérence de chaque problème, de répondre aux questions dans l'ordre indiqué. Néanmoins, on peut aborder pour le 1^{er} problème les parties 1, 2, 3, 4.1, 4.2, 4.3 et pour le 2^{ème} problème les parties 1, 2, 3, 4, 5, sans avoir répondu à toutes les questions des autres parties.

De plus, certaines questions posées au cours des problèmes, signalées par « question indépendante » peuvent être traitées indépendamment de tout le reste du sujet.

Vous devez rendre la page 12 à la fin de l'épreuve.

Il est rappelé aux candidats que la notation prendra en compte non seulement la clarté et la précision de leurs réponses, mais également la qualité de leur expression et de leur présentation.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Tournez la page S.V.P.

1^{er} problème.

Introduction

Les lymphocytes NK sont des cellules du système immunitaire qui participent à la défense innée d'un organisme contre les infections virales, bactériennes ou à pathogènes, ainsi que contre les cellules cancéreuses. Ces lymphocytes particuliers, ni B ni T, sont capables de détruire des cellules cibles par cytotoxicité (exocytose de vésicules contenant des substances qui induisent une lyse des cellules cibles, notamment en altérant leur membrane plasmique). Les cellules cibles sont identifiées comme anormales notamment parce qu'elles n'expriment pas, ou pas suffisamment, de molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I ou CMH-I.

La distinction entre cellules normales à tolérer et cellules anormales à détruire dépend en effet d'un équilibre entre des signalisations inhibitrices (qui bloquent le phénomène de cytotoxicité) et activatrices (qui le favorisent), initiées par différents types de récepteurs présents à la surface des lymphocytes NK. Les récepteurs inhibiteurs se lient à des molécules du CMH-I, à la surface de la cellule avec laquelle le lymphocyte NK est en interaction, et les récepteurs activateurs reconnaissent d'autres molécules dont la nature n'est pas encore bien connue. Suivant le niveau relatif des signalisations inhibitrices et activatrices qu'elle déclenche, une cellule sera tolérée ou détruite par le lymphocyte NK avec lequel elle interagit (Figure 1).

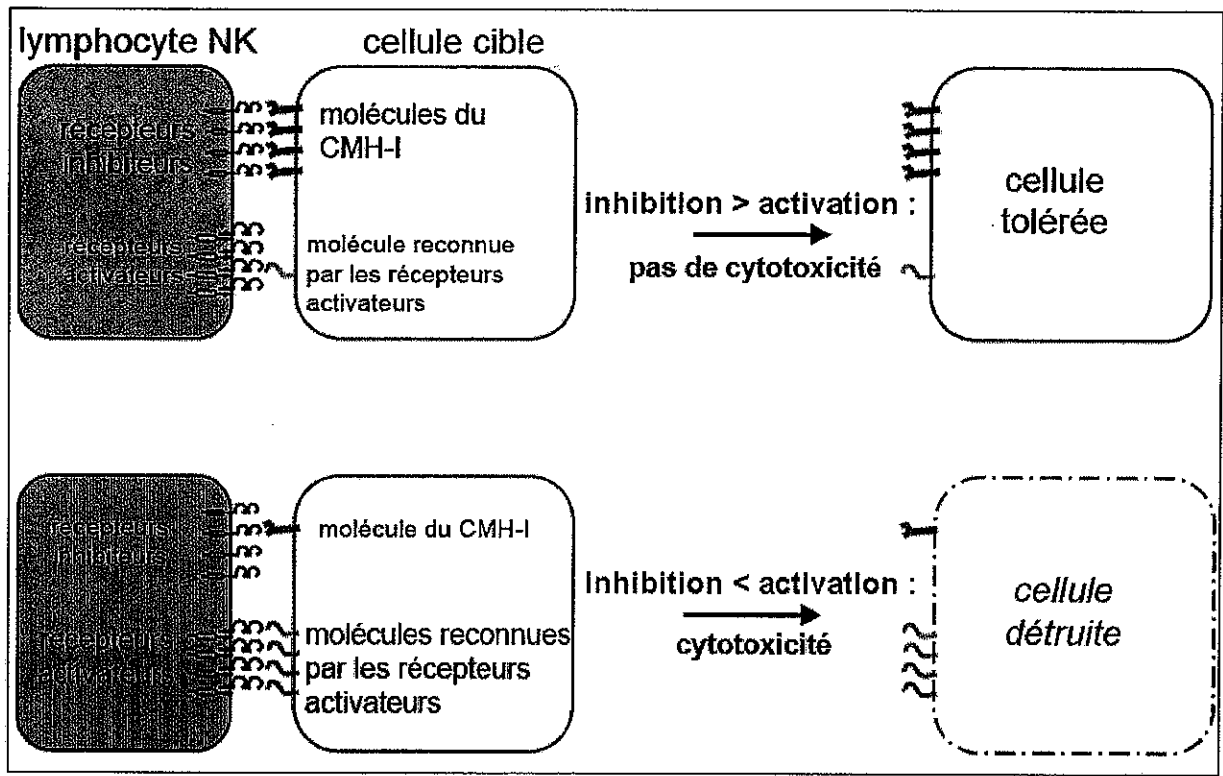


Figure 1 : Le sort des cellules cibles dépend des molécules qu'elles présentent aux lymphocytes NK. Schématiquement, en haut, quand les molécules du CMH-I, reconnues par les récepteurs inhibiteurs, sont plus nombreuses que les molécules reconnues par les récepteurs activateurs, le programme de cytotoxicité est bloqué et la cellule est tolérée. En bas, quand les molécules du CMH-I sont moins nombreuses que les molécules reconnues par les récepteurs activateurs, un programme de cytotoxicité se déclenche et la cellule cible est détruite par le lymphocyte NK. (D'après « Les tueuses de l'immunité innée », S. Ugolini et E. Vivier, 2003, Pour la Science).

D'un point de vue structural, les récepteurs inhibiteurs possèdent dans leur domaine intracellulaire une séquence particulière, l'ITIM (« immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif »), dont certains résidus sont phosphorylables par des kinases lors de la reconnaissance du ligand, le CMH-I. Rappelons qu'une kinase est une enzyme capable d'ajouter un groupement phosphate à une molécule. Ces phosphorylations déclenchent ensuite une cascade de signalisation inhibitrice, basée sur l'activation de phosphatases, qui a pour effet de bloquer la cytotoxicité.

À l'inverse, les récepteurs activateurs, dont un représentant se nomme KIR2DS2, sont dépourvus de domaine intracellulaire et donc d'ITIM. Une hypothèse est que ces récepteurs seraient associés à un corécepteur possédant un domaine intracellulaire avec un motif phosphorylable activateur, l'ITAM (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif »), capable d'activer des kinases, ce qui permettrait au couple « récepteur/corécepteur » de transduire un signal à l'intérieur de la cellule suite à la reconnaissance du ligand par le récepteur (Figure 2).

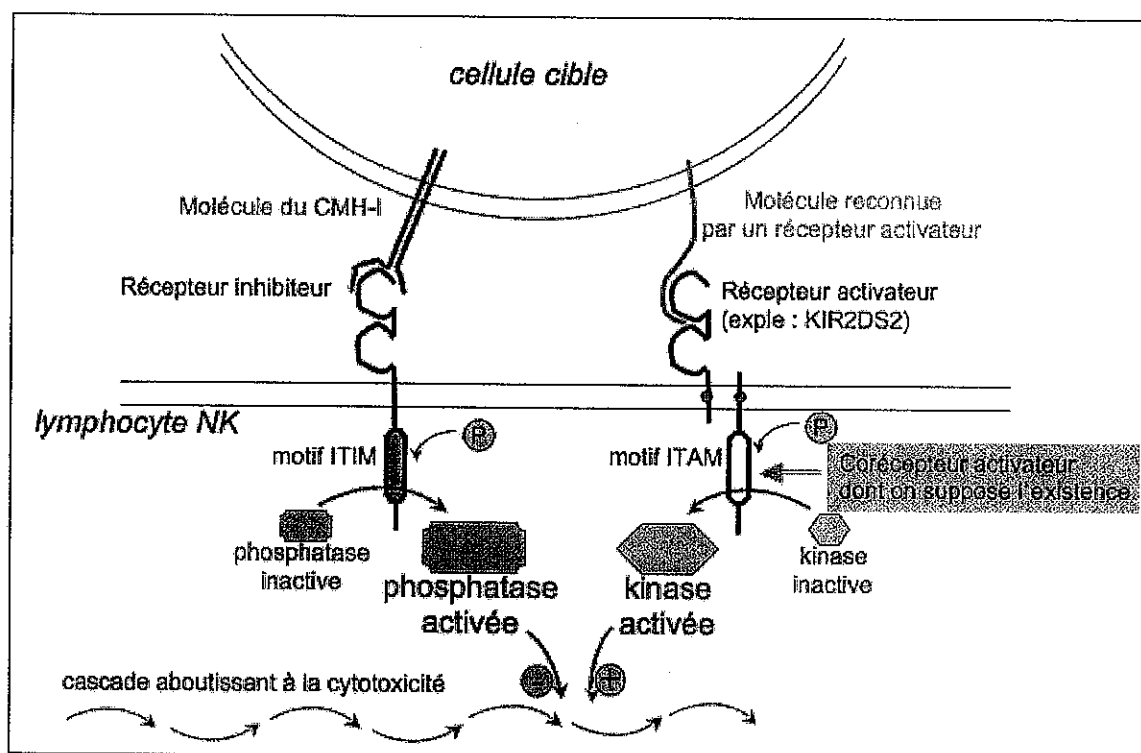


Figure 2 : voies de signalisation initiées au niveau des récepteurs inhibiteurs et activateurs des lymphocytes NK. Suite à la reconnaissance de molécules du CMH-I, les récepteurs inhibiteurs du lymphocyte NK sont phosphorylés sur le motif ITIM, ce qui aboutit à l'activation d'une phosphatase et tend à inhiber la cascade de cytotoxicité. A l'inverse, la reconnaissance d'un ligand (dont la nature n'est pas connue à ce jour) par le récepteur activateur KIR2DS2 entraînerait la phosphorylation d'un motif ITAM sur un corécepteur de KIR2DS2, puis l'activation d'une kinase qui renforcerait la cascade de cytotoxicité. (D'après « Les tueuses de l'immunité innée », S. Ugolini et E. Vivier, 2003, Pour la Science).

Des expériences de coimmunoprécipitation renforcent cette hypothèse. Cette technique permet de détecter des interactions entre des protéines. Pour cela, on incube un lysat cellulaire avec des anticorps dirigés contre une protéine d'intérêt P1, et l'on purifie (« précipite ») ensuite l'anticorps et les protéines P1 qu'il a reconnues (si elles sont présentes dans le lysat) : c'est ce qu'on appelle l'« immunoprécipitation ». Si la lyse cellulaire a été réalisée dans des conditions « douces » de détergent, qui conservent des interactions protéine-protéine non covalentes, on va immunoprécipiter la protéine P1 accompagnée d'autres protéines (P2, P3...) avec lesquelles elle est en interaction dans le lysat. On dit alors que ces autres protéines ont été « coimmunoprécipitées » avec P1. En l'occurrence, dans des lysats de lymphocytes NK, quand on immunoprécipite le récepteur activateur KIR2DS2 on le trouve associé à une protéine d'une dizaine de kDa (« kilo dalton »), qui pourrait être le corécepteur, porteur d'ITAM, chargé de faire la signalisation intracellulaire.

Le but des expériences que vous allez analyser est d'identifier un gène candidat qui coderait le corécepteur de KIR2DS2.

Pour cela,

- 1- **on cherchera une séquence candidate,**
- 2- **on étudiera certaines particularités structurales de la protéine correspondante,**
- 3- **on testera si cette protéine peut interagir avec KIR2DS2,**
- 4- **on étudiera sa capacité à participer à une signalisation intracellulaire.**

Remarque : Signalons que la séparation des fonctions « reconnaissance du ligand » et « transduction du signal intracellulaire » existe pour d'autres récepteurs, comme le récepteur à l'antigène porté par les lymphocytes T, appelé aussi TCR (« T cell receptor »). Dans ce complexe, un couple de chaînes TCR alpha (α) et beta (β) avec de grands domaines extracellulaires mais pas de domaine intracellulaire reconnaît l'antigène, et 4 chaînes CD3 gamma, epsilon, delta et zeta (γ , ϵ , δ , ζ), avec de petits domaines extracellulaires et de grands domaines intracellulaires porteurs d'ITAMs sont chargées d'activer des voies de signalisation intracellulaire (Figure 3).

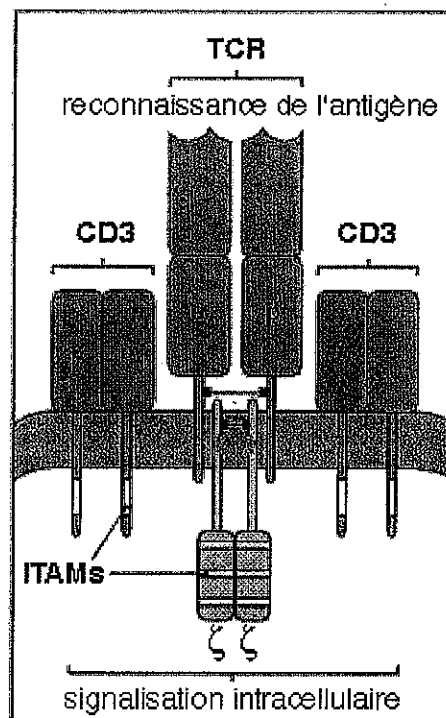


Figure 3 : Structure du TCR ou complexe récepteur à l'antigène des lymphocytes T. On distingue un module chargé de la reconnaissance du ligand, formé des chaînes TCR α et β , et un module chargé de la signalisation, formé des chaînes CD3 ϵ , γ , δ , ζ . La signalisation intracellulaire est initiée par la phosphorylation des ITAMs de ces corécepteurs (d'après Janeway, Immunobiology).

1 - Recherche d'une séquence codant potentiellement un corécepteur de KIR2DS2.

Afin d'identifier la séquence codant la protéine qui est potentiellement le corécepteur de KIR2DS2, on fait une recherche à l'aide d'outils informatiques : dans une banque de séquences humaines exprimées (c'est-à-dire existant sous la forme d'ARN messagers) par des cellules du système immunitaire, connues pour exprimer KIR2DS2, on recherche par alignement des séquences ressemblant aux chaînes CD3 du récepteur à l'antigène des récepteurs T (cf Figure 3). Notamment, on espère identifier ainsi de nouvelles séquences codant des protéines avec un domaine ITAM.

Cette recherche aboutit à l'identification d'un nouvel ADNc (ADN complémentaire) de 604 pb (paires de base), contenant une séquence codant pour un ITAM. L'étude de la structure primaire de cet ADNc indique qu'il contient une ORF (« open reading frame », cadre ouvert de lecture) de 339 nt (nucléotides). La protéine codée par cette séquence est baptisée KARAP/DAP12. Pour simplifier, nous l'appellerons DAP12 dans la suite du problème (Figure 4).

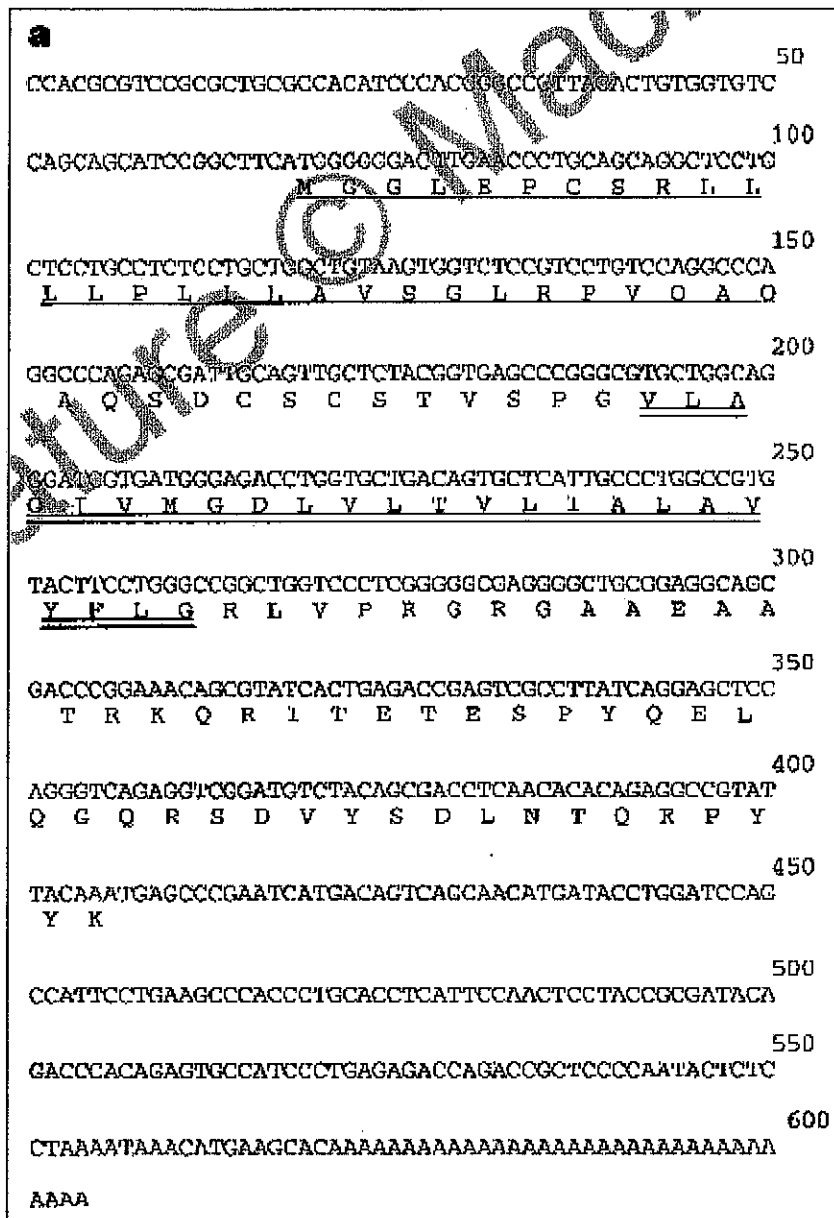


Figure 4 : Séquence nucléotidique de l'ADNc candidat, et séquence protéique correspondante (codant la protéine baptisée DAP12).

Question 1 (question indépendante): qu'est-ce qui permet d'identifier le début et la fin d'une ORF dans une séquence d'ADNc? Ici, à quelles positions sont le début et la fin? Comment appelle-t-on les séquences avant et après l'ORF et quelle est leur fonction?

Question 2 : Sachant que l'ORF fait 339 nt, quelle taille et quel poids moléculaire peut-on prédire pour la protéine codée par cet ADNc?

2 - Analyse de la structure protéique de ce candidat.

2.1 - On a identifié, dans la séquence protéique correspondant à l'ORF, un peptide signal, souligné d'un trait, et un domaine transmembranaire, souligné de 2 traits (Figure 4).

Question 3 (question indépendante) : quelle est la fonction d'un peptide signal? A quel moment est-il potentiellement clivé?

Question 4 : quelles tailles font, en acides aminés, les domaines extracellulaire (avec ou sans le peptide signal), transmembranaire et intracellulaire de cette protéine ? Qu'est-ce que cela suggère quant à sa fonction ?

Question 5 : en vous aidant de l'alignement des séquences ITAM d'autres corécepteurs (Figure 5), repérez où se trouve la séquence ITAM de ce nouveau polypeptide (indiquez la position des acides aminés de début et de fin sur la feuille - à rendre - reproduisant la Figure 4, placée page 12).

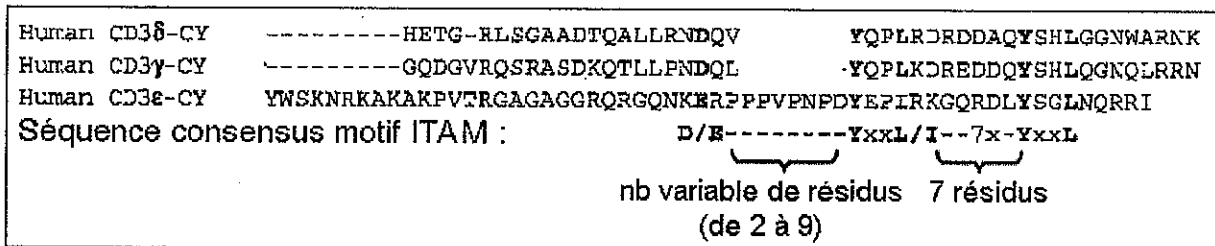


Figure 5 : Alignement des séquences de plusieurs corécepteurs contenant un ITAM (chaînes CD3- δ , γ , ϵ du récepteur à l'antigène des lymphocytes T ; NB : la chaîne CD3- ζ , qui contient trois ITAM, n'est pas représentée ici). La quatrième ligne représente la séquence consensus pour le motif ITAM.

2.2 - Par alignement de séquence, on identifie informatiquement un ADNc de souris avec une séquence proche de la séquence humaine précédemment étudiée (Figure 6).

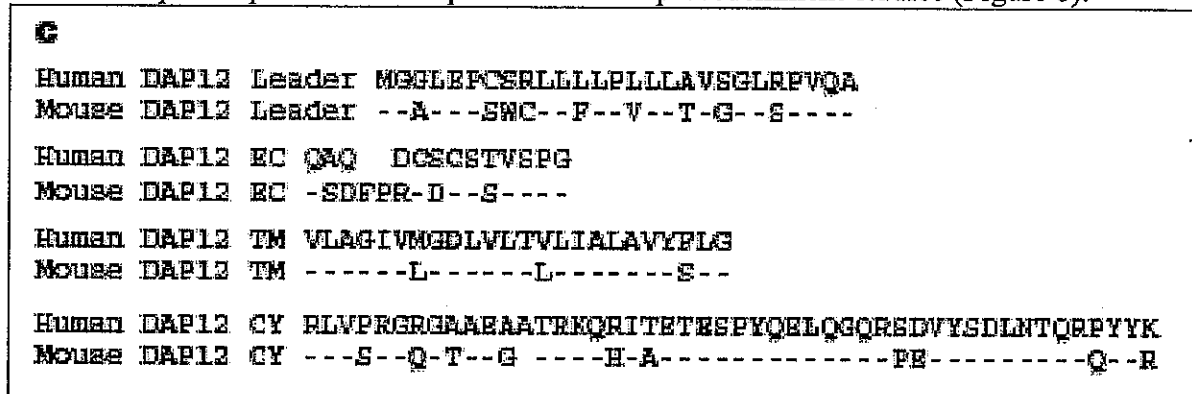


Figure 6 : Alignement des séquences de DAP12 chez l'Homme et la Souris, illustrant la conservation des acides aminés (un tiret indique que le résidu est le même chez les deux espèces).

Question 6 (question indépendante) : dans le domaine extracellulaire (EC), il y a deux résidus Cystéine (C) conservés, séparés par un acide aminé quelconque. Que vous évoque le motif C-X-C (X = acide aminé quelconque) ?

Question 7 (question indépendante) : dans le domaine transmembranaire (TM), il y a un résidu Aspartate (D) conservé. Représentez la structure (formule chimique) de l'aspartate. Quelle est la charge du radical de ce résidu ? Quel(s) résidu(s) fait(font) partie de la même sous-catégorie d'acides aminés ? Sachant que les récepteurs comme KIR2DS2 ont un acide aminé Lysine (K) ou Arginine (R) dans leur domaine TM, à quoi le résidu Aspartate de cette protéine peut-il « servir » ? Comment définiriez-vous le type d'association entre le récepteur (KIR2DS2 par exemple) et le corécepteur (cette protéine par exemple) ?

Question 8 (question indépendante) : dans le domaine intracellulaire/cytoplasmique (CY), on voit que le motif ITAM est très bien conservé, notamment ses résidus tyrosine (Y). Quelles modifications post-traductionnelles peuvent subir ces résidus ? Indiquez quelques autres acides aminés pouvant subir des modifications post-traductionnelles, éventuellement d'une autre nature.

3 – Recherche d'une interaction entre le candidat DAP12 et KIR2DS2

3.1 - Pour savoir si cette protéine nouvellement identifiée, DAP12, est capable d'interagir avec KIR2DS2, on transfecte des lymphocytes B qui n'expriment constitutivement ni KIR2DS2 ni DAP12 avec des plasmides contenant les séquences codant KIR2DS2 et DAP12, afin de leur faire exprimer ces protéines, ensemble ou séparément, de façon stable. Comme on ne dispose pas d'anticorps dirigé contre DAP12, on ajoute au bout de la séquence codant DAP12 une petite séquence particulière, de façon que la protéine produite soit fusionnée à une séquence protéique servant d'étiquette moléculaire (ou « FLAG »), contre laquelle il existe des anticorps spécifiques.

Question 9 (question indépendante) : si l'on veut que les anticorps anti-FLAG accèdent à l'étiquette sur des cellules vivantes, non perméabilisées, à quel endroit de la séquence de DAP12 faut-il placer l'étiquette ?

3.2 - On effectue sur ces cellules (transfectées ou non avec KIR2DS2 et/ou DAP12-FLAG) un marquage de surface à l'iode 125. Pour cela, on incube les cellules vivantes avec un réactif chimique contenant de l'iode radioactif (I^{125}). L'atome radioactif est transféré sur les acides aminés exposés à la surface des cellules. De cette manière, on marque radioactivement les protéines présentes à la surface des cellules. Après avoir été lavées afin d'éliminer l' I^{125} non incorporé, les cellules sont lysées dans un tampon conservant les interactions non covalentes au sein des complexes protéiques.

Question 10 : l'étiquette moléculaire « FLAG » est-elle utile à cette étape, pourquoi ?

3.3 - Ensuite, on immunoprécipite KIR2DS2 ou DAP12-FLAG grâce à des anticorps contre KIR2DS2 (α -KIR) ou contre l'étiquette moléculaire (α -FLAG), respectivement. Certaines immunoprécipitations sont également réalisées avec des anticorps, notés cIg (« control Immunoglobulins ») ne reconnaissant ni KIR2DS2 ni DAP12 ni aucune protéine des lymphocytes B. Les immunoprécipitats sont analysés par séparation sur des gels de polyacrylamide, en conditions réductrices ou non, suivie d'une détection de la radioactivité (Figure 7).

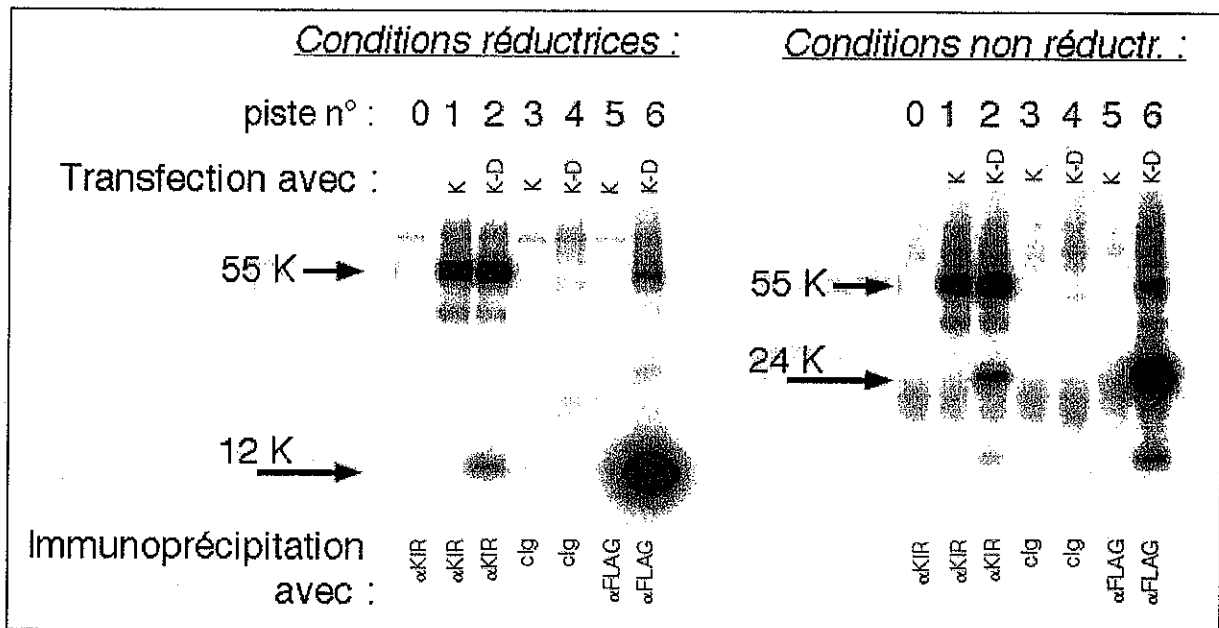


Figure 7 : Des cellules non transfectées (pistes 0) ou transfectées pour exprimer KIR2DS2 (noté K, pistes 1 à 6) et/ou DAP12-FLAG (noté D, pistes 2, 4, 6) sont marquées en surface à l'iode 125. Après lyse dans des conditions douces de détergent afin de conserver les interactions protéiques non covalentes, des immunoprécipitations sont réalisées avec des anticorps anti-KIR (α -KIR, pistes 0, 1, 2), anti-FLAG (α -FLAG, pistes 5 et 6), ou cIg (pistes 3 et 4). Les protéines immunoprécipitées sont analysées en conditions réductrices (à gauche) ou non (à droite), par migration sur des gels de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et l'iode radioactif incorporé aux protéines est détecté par l'application, sur la membrane, d'un film radiosensible.

Question 11 : pourquoi n'y a-t-il rien dans les 3^e et 4^e pistes ? quel est l'intérêt de faire des immunoprécipitations avec les anticorps cIg ?

Question 12 : expliquez à quoi correspond la bande à 55 kDa des pistes 1 et 2 de chaque gel.

Question 13 : dans le gel en conditions réductrices, expliquez à quoi correspond la bande à 12 kDa.

Question 14 : quelle expérience simple pourrait-on faire pour confirmer la nature de la protéine à 12 kDa ?

Question 15 : commentez la différence de l'importance relative des bandes à 12 et à 55 kDa entre les pistes 2 et 6 du gel en conditions réductrices.

Question 16 : quelle information supplémentaire le gel en conditions non réductrices apporte-t-il sur DAP12 (définissez au passage les notions de « conditions réductrices » et « non réductrices ») ?

Question 17 : d'après cette expérience, est-ce que DAP12 pourrait être le corécepteur de KIR2DS2 et pourquoi ?

4 - Est-ce que ce candidat, DAP12, prend part à des cascades de signalisation cellulaire ?

- Interaction possible avec des tyrosine kinases

4.1 - Lorsqu'un récepteur situé sur une cellule rencontre son ligand, ce récepteur ou des protéines qui lui sont liées peuvent être modifiés pour initier une cascade de signalisation intracellulaire qui conduira par exemple à des phénomènes d'exocytose, de migration cellulaire ou d'adhésion, et parfois aussi à l'expression de nouveaux gènes. Souvent, les modifications sont apportées par des enzymes appartenant à la famille des tyrosine kinases, qui ajoutent des groupements phosphate à des résidus tyrosine. Ces résidus phosphorylés constituent alors des sites d'ancrage pour recruter de nouvelles protéines, des adaptateurs ou d'autres enzymes (par exemple d'autres kinases).

Question 18 (question indépendante) : quelle différence faites-vous entre « adaptateur » et « enzyme » ?

4.2 - Il existe plusieurs familles de kinases. Dans le système immunitaire, la tyrosine kinase ZAP70 est souvent importante dans les cascades de signalisation. En particulier, on sait qu'elle joue un rôle clé dans la signalisation du récepteur à l'antigène des lymphocytes T, en étant recrutée par les motifs ITAM de la chaîne CD3zeta, une fois que ceux-ci ont été phosphorylés par une autre kinase appelée Lck.

Afin de déterminer si DAP12 pourrait faire intervenir la kinase ZAP70 dans une cascade de signalisation, on étudie si les deux protéines peuvent interagir (Figure 8).

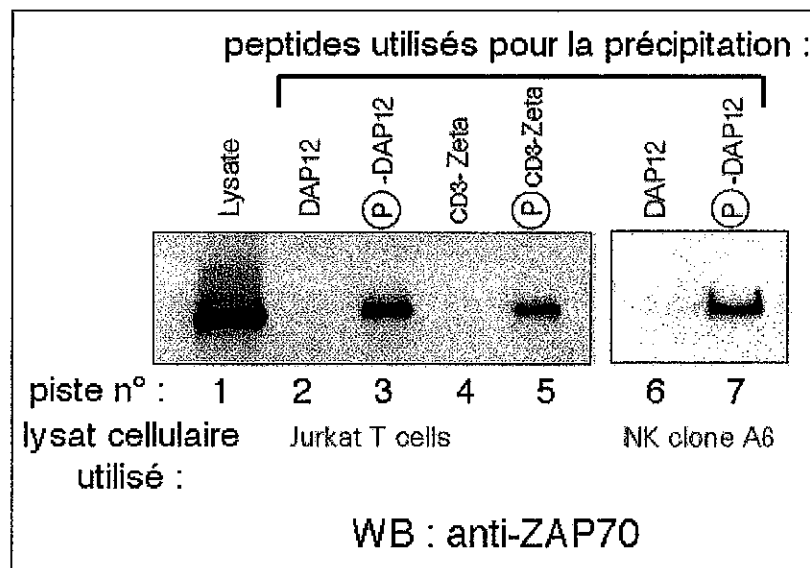


Figure 8 : des peptides correspondant à la séquence ITAM de DAP12, phosphorylés (= notation P dans un cercle, pistes 3 et 7) ou non (pistes 2 et 6), sont mélangés à du lysat de deux lignées cellulaires exprimant constitutivement ZAP70 (lignée de lymphocytes T appelée « Jurkat » -pistes 1 à 5-, et lignée de lymphocytes NK appelée « A6 » -pistes 6 et 7-). Les peptides sont fixés de manière covalente à une matrice, si bien qu'après lavage dans un tampon approprié, on récupère les peptides et ce qui a interagi avec eux. Les constituants de ce mélange sont séparés par migration sur gel de polyacrylamide, et un western-blot avec un anticorps dirigé contre ZAP70 est réalisé afin de déterminer si cette kinase s'est fixée à certains peptides. Un peptide correspondant à un ITAM de CD3zeta, phosphorylé (piste 5) ou non (piste 4), sert de référence, puisqu'on sait que ZAP70 peut interagir avec l'ITAM phosphorylé de CD3-zeta.

Question 19 : à quoi correspond la bande ? pourquoi a-t-on fait migrer du simple lysat de lymphocytes T dans la 1ère piste (NB : on aurait eu la même bande avec du lysat de lymphocytes NK) ?

Question 20 : d'après cette expérience, avec quoi interagit ZAP70 ? A votre avis, est-ce que ZAP70 est capable de phosphoryler DAP12 et pourquoi ? quelle serait sa place dans la cascade de signalisation initiée par le couple KIR2DS2/DAP12 ?

▪ **Modification de DAP12 suite à la stimulation de KIR2DS2**

4.3 - Expérimentalement, on peut mimer la stimulation d'un récepteur par son ligand en utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes de la partie extracellulaire du récepteur. Ce genre de stimulation, qui peut être beaucoup plus efficace que la liaison du ligand naturel, est appelé « cross-linking ».

Question 21 (question indépendante) : dessinez un anticorps. Avec combien de molécules cibles peut-il interagir ? En quoi cela peut-il être plus efficace pour initier une cascade de signalisation que la liaison du ligand naturel, en particulier si c'est un ligand soluble ?

4.4 - On utilise de nouveau des lignées de lymphocytes B transfectés, exprimant de façon stable KIR2DS2 et/ou DAP12-FLAG. Ces lignées sont stimulées par « cross-linking » de KIR2DS2 avec l'anticorps anti-KIR. On utilise aussi en comparaison des anticorps cIg qui ne reconnaissent rien de particulier sur ces cellules. Après stimulation, les cellules sont lysées, DAP12-FLAG est immunoprécipité, et ces immunoprécipitations sont analysées par migration sur gel en conditions réductrices. Ensuite, on détecte par western-blot avec un anticorps dirigé contre le motif « PhosphoTyrosine » l'apparition de protéines présentant des phosphorylations sur des résidus tyrosine (Figure 9).

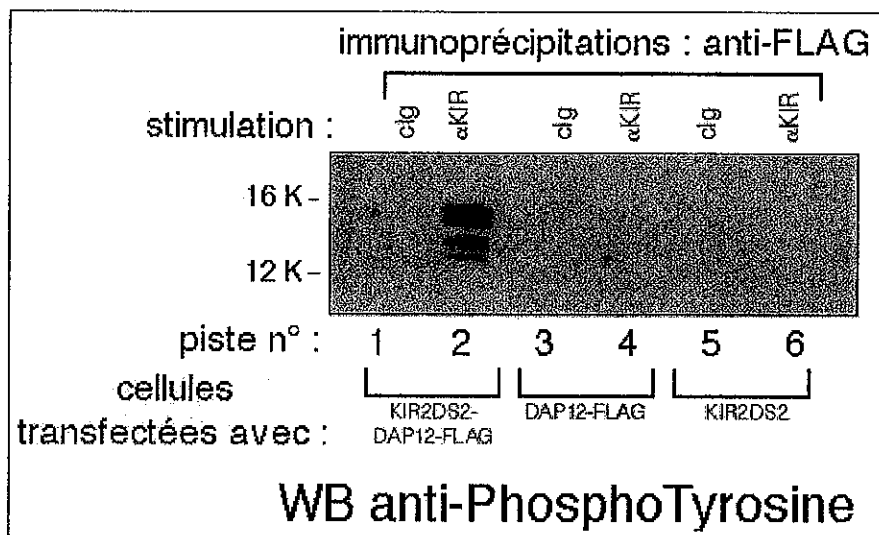


Figure 9 : Des cellules exprimant de manière stable KIR2DS2 (pistes 1, 2, 5, 6) et/ou DAP12-FLAG (pistes 1 à 4) sont stimulées par cross-linking avec des anticorps anti-KIR (α KIR, pistes 2, 4, 6) ou cIg (pistes 1, 3, 5). Après lyse dans des conditions conservant les interactions protéiques non covalentes, les protéines DAP12-FLAG sont immunoprécipitées, et les immunoprécipitations sont analysées par migration sur gel en conditions réductrices, puis western-blot avec un anticorps anti-résidu PhosphoTyrosine. Remarque : seule la partie de la membrane contenant les protéines entre 10 et 20 KDa environ est représentée ici.

Question 22 : représentez ce qu'on aurait obtenu en faisant, à partir du même gel, un western-blot contre KIR2DS2, et un western-blot contre l'étiquette FLAG (Représentez les bandes entre 10 et 60 KDa).

Question 23 : quel est le poids moléculaire apparent des bandes visibles après stimulation avec l'anticorps anti-KIR (piste 2) ? A quoi correspondent ces bandes et pourquoi y en a-t-il plusieurs ? Pourquoi n'y a-t-il aucun signal dans les pistes 4 et 6 ?

5 – Synthèse.

Question 24 : faites un schéma, distinguant éventuellement plusieurs étapes, afin d'illustrer le mode d'action du couple KIR2DS2/DAP12, de la reconnaissance du ligand aux conséquences pour la cellule. Ce schéma devra faire apparaître les différents acteurs étudiés dans ce problème : KIR2DS2 et ses ligands, DAP12, ZAP70...

Feuille à rendre pour répondre à la question 5 du premier problème.

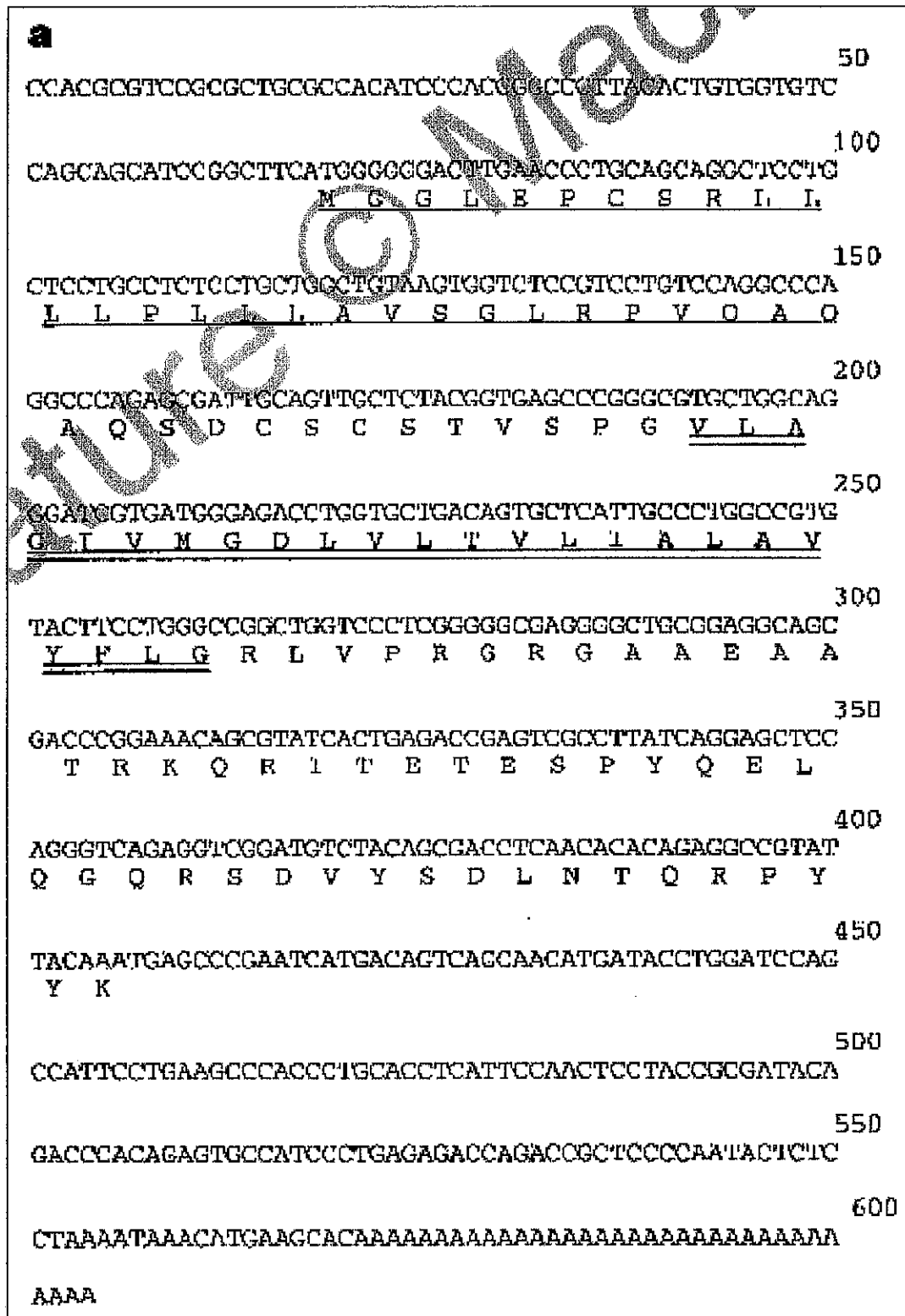


Figure 4 : Séquence nucléotidique de l'ADNc candidat, et séquence protéique correspondante (codant la protéine baptisée DAP12).

2^{ème} problème.

Introduction

En réponse à une infection dans un tissu, les leucocytes (lymphocytes, monocytes...) peuvent quitter la circulation pour rejoindre le site où se développe l'inflammation. Ce déplacement nécessite leur adhésion aux parois des vaisseaux par interaction avec des molécules présentes sur les cellules endothéliales qui tapissent ces vaisseaux, puis leur migration à travers la paroi vasculaire ou « transmigration ». Ces deux étapes (adhésion et migration) mettent en jeu des intégrines exprimées par les leucocytes (Figure 1).

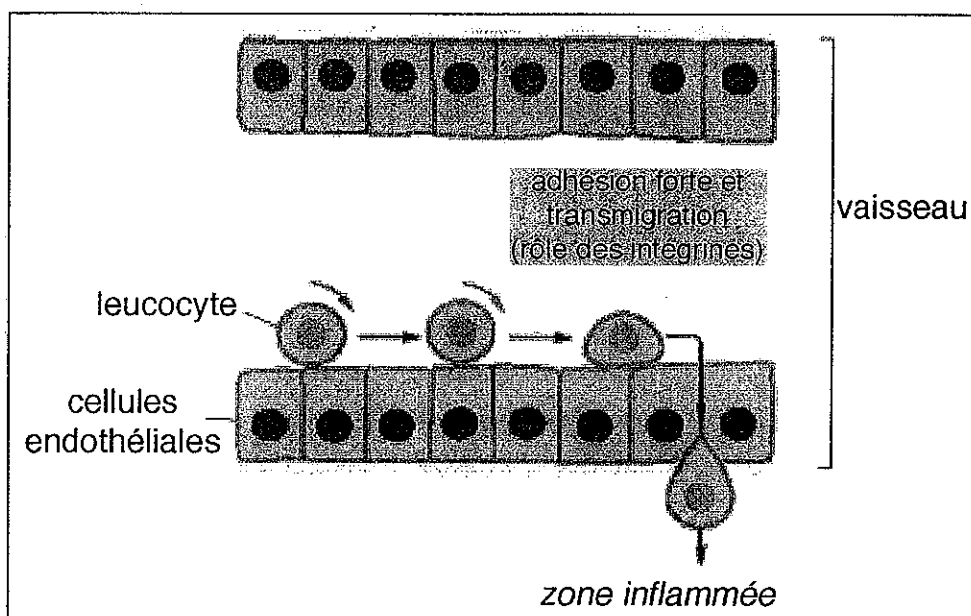


Figure 1 : En cas d'inflammation dans un tissu, les leucocytes peuvent quitter la circulation afin de rejoindre la zone inflammée. L'adhésion aux cellules endothéliales constituant la paroi des vaisseaux et la migration à travers cette paroi mettent en jeu des intégrines exprimées par les leucocytes.

Les intégrines sont des protéines présentes dans la membrane plasmique sous la forme de dimères formés d'une chaîne alpha (α) et d'une chaîne beta (β). Elles jouent un rôle dans l'adhésion intercellulaire et à la matrice extracellulaire. Leur capacité d'adhésion est régulable, entre autres par la liaison de cations divalents dans la partie extracellulaire et par la phosphorylation de la partie intracellulaire par la protéine kinase C (Figure 2).

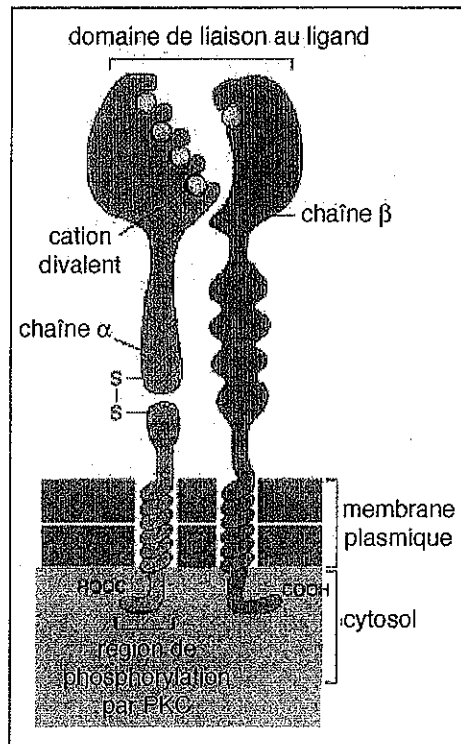


Figure 2 : Structure des intégrines.

Comme les chaînes alpha et beta ont plusieurs isoformes, il existe plusieurs dizaines d'intégrines différentes $\alpha_i\beta_j$. Celles, exprimées par les leucocytes, qui jouent un rôle dans l'extravasation (littéralement « sortie des vaisseaux »), interagissent avec des protéines exprimées à la surface des cellules endothéliales, ou des protéines de la matrice extracellulaire. On a notamment caractérisé le rôle de :

- l'intégrine LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) : elle interagit avec ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 ») sur les cellules endothéliales.
- l'intégrine Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) : elle interagit avec ICAM-1 sur les cellules endothéliales et avec le fibrinogène (FBG) dans la matrice extracellulaire.
- l'intégrine VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) : elle interagit avec VCAM-1 (« vascular cell adhesion molecule-1 ») sur les cellules endothéliales et avec la fibronectine (FN) dans la matrice extracellulaire.

Question 1 : faites un schéma résumant les interactions énumérées ci-dessus.

La région des vaisseaux où peut avoir lieu la sortie des leucocytes est ciblée notamment grâce à l'augmentation locale, au voisinage d'une zone d'inflammation, de l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux.

Question 2 (question indépendante) : comment le niveau d'expression d'une protéine à la surface d'une cellule peut-il augmenter suite à un stimulus ? Proposez plusieurs mécanismes, avec les ordres de grandeur de temps.

Le staphylocoque doré ou *S. aureus* est un pathogène très virulent qui peut infecter la peau, ainsi que des tissus plus internes s'il passe la barrière cutané-muqueuse. On a remarqué que les blessures infectées par *S. aureus* cicatrisent particulièrement lentement, ce qui suggère que pour l'organisme, c'est un pathogène difficile à combattre et à éliminer.

Cependant, on sait encore peu de choses des mécanismes qui permettent à ce pathogène d'échapper aux défenses de son hôte.

S. aureus adhère à des cellules ou à des substrats non cellulaires grâce à des adhésines exprimées à sa surface, ainsi que grâce à d'autres protéines qui sont sécrétées mais qui peuvent réadhérer secondairement à la surface bactérienne. C'est le cas par exemple de la protéine Eap (« Extracellular adherence protein »).

Le but des expériences que vous allez analyser est d'étudier si en cas d'infection par *S. aureus*, le système de défense de l'hôte - en particulier le recrutement des leucocytes au site d'infection et d'inflammation - pourrait être perturbé par Eap et ses propriétés adhésives.

1- effet de Eap sur l'adhésion des leucocytes à différents substrats.

Dans l'expérience qui suit, on utilise une lignée de monocytes appelée U937 (les monocytes sont une sous-catégorie de leucocytes). On teste l'effet de Eap sur l'adhésion des monocytes U937 à différentes molécules (Figure 3).

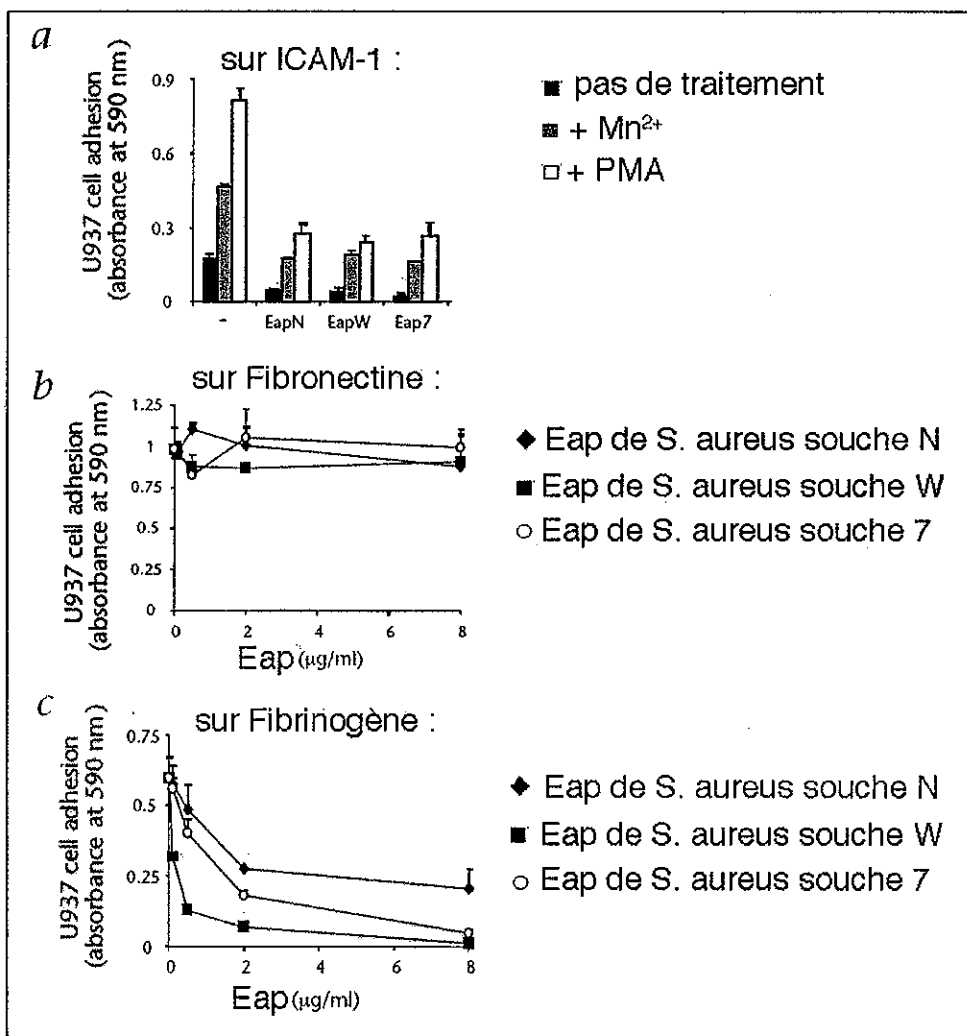


Figure 3 : Dans des puits dont le fond est recouvert de protéines purifiées (a : ICAM-1, b : fibronectine, c : fibrinogène), on dépose des monocytes U937, en mélange ou non avec des protéines Eap (des Eap provenant de 3 souches différentes de *S. aureus* sont testés en parallèle : N, W, 7). Les U937, qui poussent normalement en suspension, sédimentent et adhèrent éventuellement au substrat (ICAM-1, fibronectine ou fibrinogène) qui recouvre les puits. Après 60 minutes d'incubation à 37°C,

les puits sont lavés pour retirer les monocytes qui n'ont pas adhéré, et les noyaux de ceux qui sont restés au fond sont colorés au cristal violet. Ce colorant est ensuite extrait et l'intensité de la coloration correspondant à chaque puits est mesurée par absorbance à 590 nm : plus il y a de monocytes qui ont adhéré, plus il y a de colorant fixé dans les puits, donc plus l'absorption est élevée.

a : une seule dose d'Eap est testée (5 µg/ml). On compare l'effet des Eap des différentes souches sur l'adhésion des monocytes U937 dans différentes conditions : basales (pas de prétraitement des U937), ou après un prétraitement au Mn²⁺ ou au PMA, un ester de phorbol activateur de la protéine kinase C. b et c : les U937 ont été prétraités avec du PMA. On teste plusieurs doses de chaque Eap.

Question 3 : d'après la partie a de cette figure, quel effet ont le Mn²⁺ et le PMA sur l'adhésion des monocytes U937 à ICAM-1 ?

Question 4 : toujours d'après la partie a, quel est l'effet de l'addition des protéines Eap sur l'adhésion des monocytes U937 à ICAM-1 ? cet effet est-il dépendant du prétraitement subi par les monocytes (rien, Mn²⁺ ou PMA) ?

Question 5 : quel est l'effet de l'addition des protéines Eap sur l'adhésion des cellules à la fibronectine (partie b de la figure) ? au fibrinogène (partie c) ?

Question 6 : quel est l'intérêt d'avoir prétraité les monocytes U937 avec du PMA dans les tests d'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène (parties b et c) ?

Question 7 : d'après ces expériences, quelles interactions sont sensibles à Eap ? à quelles molécules pourrait se lier cette protéine ?

2 - Etude de l'effet direct de Eap sur différentes interactions intégrine/ligand, in vitro.

Il se peut que Eap interfère directement avec une liaison entre les intégrines et leurs ligands, mais il est aussi possible qu'Eap agisse indirectement en bloquant par exemple une molécule tierce qui régulerait les interactions intégrine/ligand.

Pour déterminer si l'action d'Eap sur la liaison intégrine/ligand est directe, on réalise des expériences de liaison *in vitro* à partir de molécules purifiées (Figure 4).

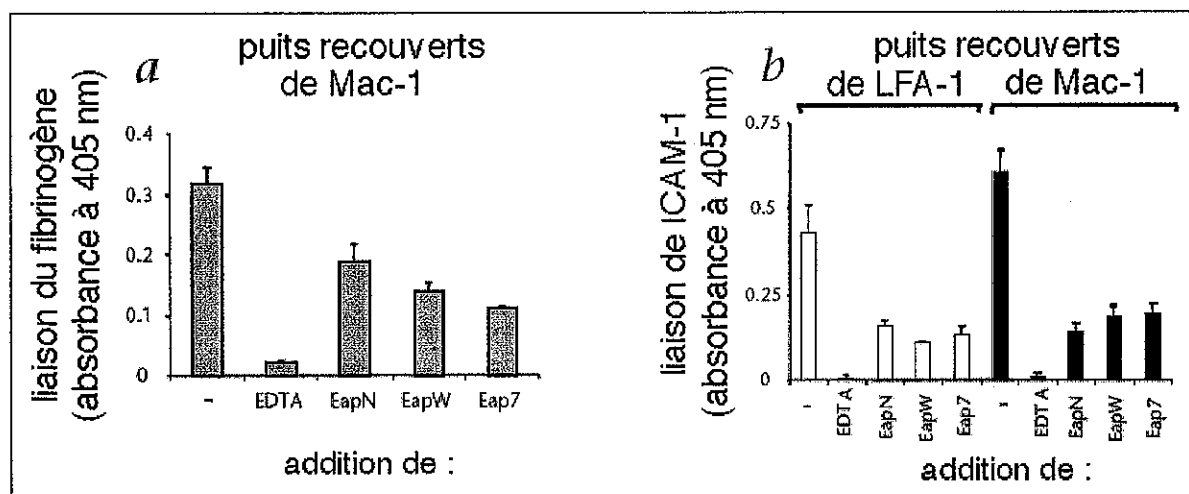


Figure 4 : Dans des puits dont le fond est recouvert de protéines purifiées (a, b droite : Mac-1 ; b gauche : LFA-1), on dépose une solution contenant du fibrinogène (a) ou de l'ICAM-1 (b), purs (condition notée « - »), ou avec de l'EDTA, un chélateur de cations divalents (condition notée « EDTA »), ou en mélange avec des protéines Eap purifiées provenant de différentes souches de *S.*

aureus (conditions notées « EapN, W ou 7 »). Après 2h d'incubation à 22°C, les puits sont lavés pour éliminer les protéines non liées, et les protéines (a : fibrinogène, b : ICAM-1) fixées au fond du puits sont détectées par un marquage avec un anticorps primaire dirigé contre le fibrinogène (a) ou ICAM-1 (b), puis un anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (« horse radish peroxidase »). Pour finir, on ajoute sur les puits un substrat de la HRP dont le produit de réaction est coloré. On lit alors l'absorption dans chaque puits, à 405 nm, ce qui donne une mesure de la quantité de fibrinogène ou d'ICAM-1 restée fixée au fond.

Question 8 (question indépendante) : quelle est la couleur d'une solution détectable à 405 nm ?

Question 9 (question indépendante) : de quelle technique classique est inspiré ce protocole ? quelle est la différence notable ?

Question 10 : quel est l'effet de Eap sur ces différentes interactions intégrine/ligand ? Toutes les interactions sont-elles affectées de la même manière ?

Question 11 : que se passe-t-il quand on rajoute de l'EDTA ? pourquoi ? à quoi sert ce test ?

Question 12 : pouvez-vous conclure sur l'effet direct ou indirect de Eap ? de quel genre d'effet inhibiteur s'agit-il ?

3 - Identification des molécules auxquelles se lie Eap.

D'autres expériences de liaison *in vitro* sont réalisées afin de préciser sur quelles molécules agit Eap. Cette fois, on teste directement l'adhésion d'Eap aux différentes molécules étudiées précédemment : Mac-1, LFA-1, ICAM-1, FN (fibronectine), FBG (fibrinogène) (Figure 5).

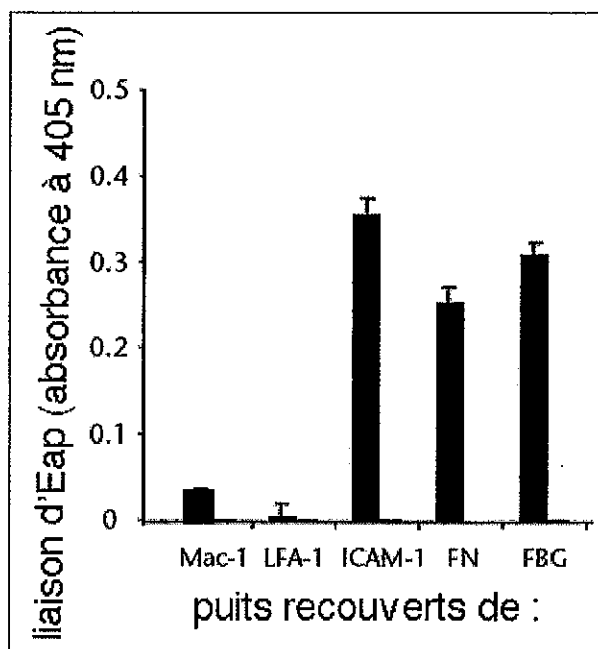


Figure 5 : on dépose une solution de Eap (provenant de la souche 7 de *S. aureus*) dans des puits recouverts de Mac-1, de LFA-1, d'ICAM-1, de FN ou de FBG purifiés. La quantité de Eap fixée après 2h est déterminée par la même méthode que dans la Figure 2, sauf que cette fois l'anticorps primaire reconnaît Eap.

Question 13 : d'après cette figure, à quelle(s) protéine(s) et/ou cellule(s) peut se lier Eap ?

4 - Etude du rôle de Eap dans l'adhésion des bactéries à un substrat.

Comme Eap est sécrété, mais aussi partiellement refixé à la surface bactérienne, on veut tester si l'interaction de cette protéine avec les protéines identifiées ci-dessus est réellement importante pour l'adhésion des bactéries à un substrat et/ou des cellules, une étape nécessaire à l'infection. Pour cela, on étudie l'adhésion à différentes molécules d'une souche mutante de *S. aureus* qui n'exprime pas Eap (Figure 6).

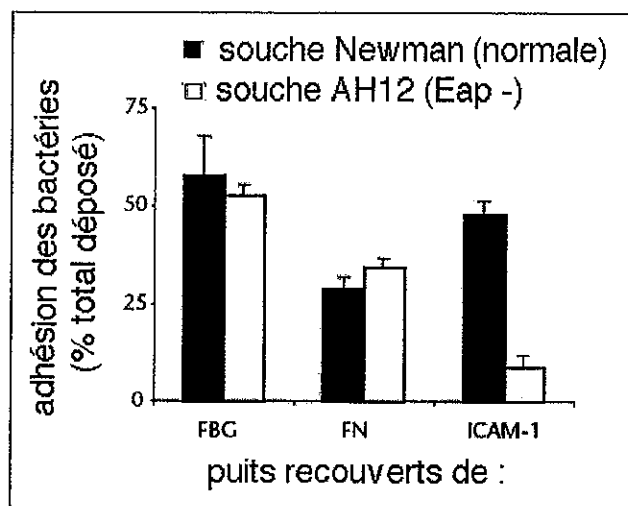


Figure 6 : Dans cette expérience, des bactéries vivantes, normales (souche Newman) ou déficientes pour Eap (souche AH12), sont marquées avec un colorant vital fluorescent avant d'être déposées dans des puits recouverts de FBG, FN ou ICAM-1. Après 1h d'incubation à 37°C, les puits sont lavés et la quantité de bactéries restées fixées est mesurée grâce à la fluorescence de chaque puits. Les résultats sont exprimés en « % du total déposé », c'est-à-dire en % de la valeur maximale de fluorescence, obtenue si toutes les bactéries déposées avaient adhéré. En pratique, on prend comme valeur maximale la fluorescence lue dans un puits non lavé, contenant donc toutes les bactéries déposées initialement.

Question 14 : d'après cette expérience, que concluez-vous quant au rôle de Eap dans l'adhésion des bactéries à un substrat et/ou des cellules ?

5 - Etude *in vivo* de l'effet de Eap sur le recrutement des leucocytes vers un site d'inflammation.

Comme nous l'avons dit dans l'introduction, la migration des leucocytes de la circulation vers un site d'inflammation tissulaire dépend de l'interaction de leurs intégrines avec les protéines exprimées par les cellules endothéliales des vaisseaux au voisinage de la zone d'inflammation.

5.1 - Grâce aux expériences utilisant des protéines purifiées, on a montré que Eap pouvait perturber certaines interactions impliquant les leucocytes. On souhaite maintenant tester si, dans un contexte physiologique, Eap peut effectivement interférer avec le recrutement des leucocytes sur les sites d'inflammation.

Pour cela, on induit expérimentalement une inflammation du péritoine (membrane tapissant la paroi de l'abdomen et ses viscères) par injection intrapéritonéale (c'est-à-dire directement dans l'abdomen) d'un produit nocif, le thioglycollate. Cela provoque normalement une extravasation de leucocytes de la circulation vers le péritoine. On induit cette inflammation chez des souris prétraitées de différentes manières : injection intraveineuse d'une solution saline tamponnée et isotonique, le PBS (« phosphate buffer saline », contrôle

négatif : cela ne doit pas gêner le recrutement des leucocytes), ou d'une solution de Eap, ou d'une solution d'anticorps bloquants anti-LFA-1 ou anti-Mac-1. Une ou quatre heures après l'injection de la substance inflammatoire, on prélève le liquide intrapéritonéal et l'on compte les leucocytes présents (Figure 7).

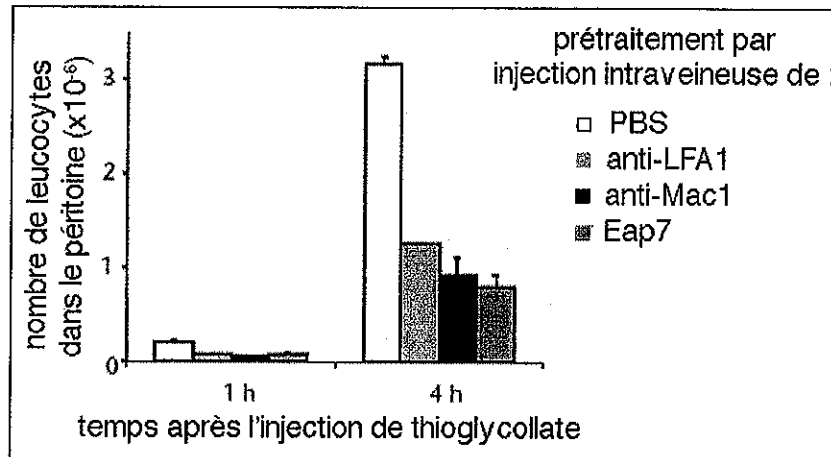


Figure 7 : Des souris prétraitées par une injection intraveineuse de PBS (contrôle négatif), d'anticorps bloquants contre LFA1 ou Mac1, ou de Eap de la souche 7, subissent 30 minutes plus tard une injection intrapéritonéale de thioglycollate, ce qui provoque une inflammation caractérisée par un recrutement de leucocytes. Une ou quatre heures après cette injection, le liquide intrapéritonéal est prélevé et l'on compte le nombre de leucocytes qu'il contient.

Question 15 : combien de temps faut-il aux leucocytes pour atteindre le site d'inflammation ?

Question 16 : quel est l'effet d'une injection intraveineuse préliminaire de Eap par rapport à l'injection de PBS ? Même question pour l'injection des anticorps bloquants ?

Question 17 : faites un schéma pour illustrer le mode d'action des différents anticorps bloquants et de Eap.

5.2 - Dans les dernières expériences, on teste le rôle de Eap dans le recrutement de leucocytes suite à une véritable infection par *S. aureus*, en comparant l'inflammation induite par l'injection intrapéritonéale de la souche Newman, normale, ou la souche AH12, déficiente pour Eap (Figure 8).

NB : dans des expériences complémentaires de celles de la Figure 7, non illustrées ici, on a observé que la protéine Eap, injectée en intrapéritonéal, a le même effet sur le recrutement des leucocytes que quand elle est injectée en intraveineuse (ceci est probablement dû à des propriétés de cette protéine qui lui permettent d'être rapidement transportée du péritoine vers les vaisseaux).

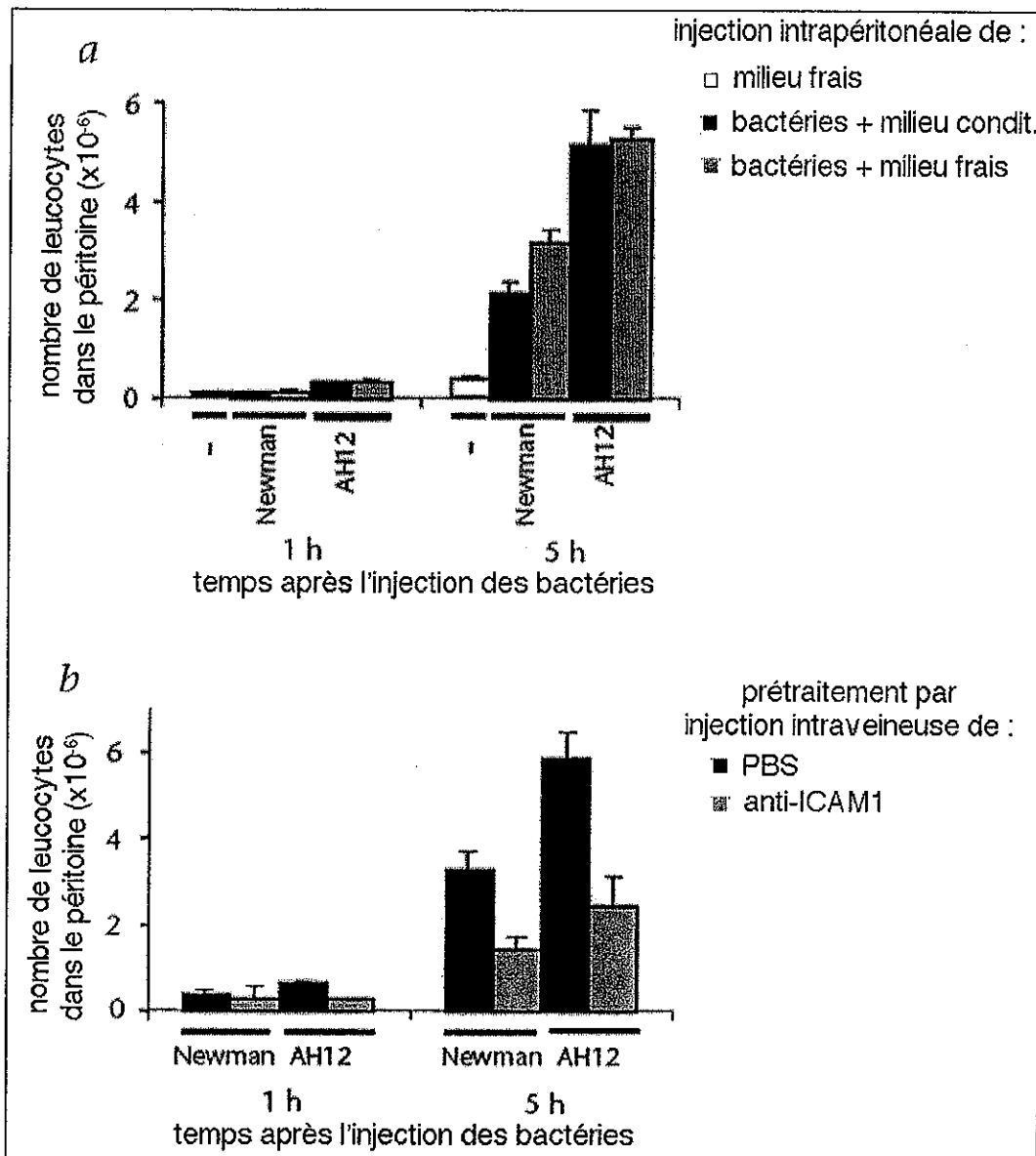


Figure 8 : (a) Des bactéries *S. aureus* des souches Newman ou AH12 sont injectées dans le péritoine des souris, en suspension dans du milieu « conditionné », c'est-à-dire dans lequel elles ont été cultivées depuis 15 heures (en noir), ou bien dans du milieu de culture « frais » (en gris). En contrôle négatif, on utilise du milieu de culture frais, seul (en blanc). Les leucocytes ayant envahi le péritoine sont comptabilisés une ou cinq heures après l'injection des bactéries. (b) dans cette expérience, 30 minutes avant l'injection des bactéries dans le péritoine, les souris reçoivent une injection intraveineuse de PBS (en noir) ou d'anticorps anti-ICAM-1 (en gris).

Question 18 : quelle souche permet le meilleur recrutement de leucocytes ? Proposez une explication.

Question 19 : que se passe-t-il quand le milieu de culture conditionné est remplacé par du milieu frais ? Proposez une explication.

Question 20 : commentez l'effet de l'anti-ICAM-1. A quoi sert ce dernier test ?

6 – Conclusion

Question 21 : quelles fonctions de Eap ont été mises en évidence au cours des différentes expériences ?

Question 22 : au vu de ces résultats, pensez-vous que des produits dérivés de Eap puissent avoir un intérêt thérapeutique ? si oui, dans quel(s) cas, et si non, pourquoi ?