

Université Pierre et Marie Curie – Paris 6
Module d'Immunologie Fondamentale (septembre 2001)

Durée de l'épreuve : 2 heures 30

D'après

- Lafaille, J. J., K. Nagashima, M. Katsuki, and S. Tonegawa (1994) *Cell* 78, 399-408.
- Van de Kerre, F., and S. Tonegawa (1998) *J.Exp.Med.* 188, 1875-1882.
- Olivares-Villagomez, D., Y. Wang, and J. J. Lafaille (1998) *J.Exp.Med.* 188, 1883-1894.

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune neurodégénérative lors de laquelle la myéline du système nerveux central subit l'attaque du système immunitaire ; les conséquences de cette attaque sont multiples et se manifestent notamment par une altération des fonctions locomotrices.

L'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) est un modèle animal de la sclérose en plaque. L'EAE est induite par des lymphocytes T CD4⁺ reconnaissant des peptides dérivés de protéines du système nerveux central telles que la MBP (*myelin basic protein*). La présence de ces lymphocytes T chez l'animal n'est cependant pas suffisante pour que la maladie se développe. On retrouve, en effet, des lymphocytes T autoréactifs dans des animaux normaux.

De plus, chez des souris transgéniques pour les chaînes α et β d'un TCR anti-MBP, on trouve effectivement des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de MBP de manière prédominante dans les organes lymphoïdes périphériques. Cette population est fonctionnelle et répond à l'autoantigène *in vivo* ou *in vitro*. En revanche, la survenue d'EAE est faible chez ces souris transgéniques.

Les expériences décrites ci-dessous ont pour but d'identifier les mécanismes intervenant dans l'EAE. Les auteurs ont utilisé les lignées de souris suivantes :

- **Lignée RAG-1 KO** : souris dont le gène RAG-1 a été invalidé ; ces souris sont de fonds génétique C57BL/6, d'haplotype CMH H-2^u et homozygotes pour la mutation RAG-1.
- **Lignée CD4 KO** : souris dont le gène CD4 a été invalidé ; ces souris sont de fonds génétique C57BL/6, d'haplotype CMH H-2^u et homozygotes pour la mutation CD4.
- **Lignée μ MT KO** : souris dont l'exon codant le domaine transmembranaire de la région constante μ d'immunoglobuline a été invalidé ; ces souris sont de fonds génétique C57BL/6, d'haplotype CMH H-2^u et homozygotes pour la mutation μ MT.

Question 1 : Quelles sont les conséquences des mutations introduites chez les souris RAG-1 KO, CD4 KO et μ MT KO ? (à présenter sous forme d'un tableau)

- **Lignée T/R+** : souris transgéniques pour les chaînes TCR α (V α 4) et TCR β (V β 8.2) d'un TCR anti-MBP ; ces souris sont de fonds génétique C57BL/6 et d'haplotype CMH H-2^u.
- **Lignée T/R-** : souris issues d'un croisement entre les souris transgéniques T/R+ et les souris RAG-1 KO ; ces souris sont de fonds génétique C57BL/6, d'haplotype CMH H-2^u, transgéniques pour le TCR anti-MBP et homozygotes pour la mutation RAG-1.

Question 2 : Quelles sont, à votre avis, les différences de répertoire au niveau des lymphocytes T entre les lignées T/R+ et T/R- ? (5 lignes maximum)

Dans une première expérience, on suit la survenue d'EAE au cours du temps chez des souris des lignées T/R+ et T/R-. Les résultats sont présentés sur la Figure 1.

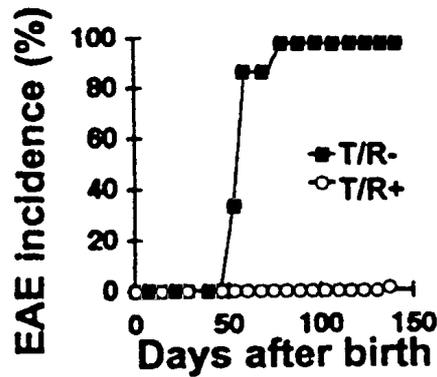


Figure 1 : Pourcentage d'animaux présentant des signes cliniques d'EAE chez les souris T/R- (■ ; n=9) et T/R+ (○ ; n=70).

Question 3 : Analysez et commentez ces résultats (5 lignes maximum)

Question 4 : Sachant que le nombre de lymphocytes T spécifiques de MBP est le même dans les souris T/R+ et T/R-, comment expliquez-vous la différence entre ces lignées, concernant la survenue d'EAE ? (5 lignes maximum)

Dans une deuxième expérience, des cellules de souris normales non transgéniques (Thy1.1) sont injectées à des souris de la lignée T/R- (Thy1.2). Thy1.1 et Thy1.2 sont deux variants alléliques de Thy1, un marqueur des lymphocytes T. On mesure alors la proportion de lymphocytes T du donneur au cours du temps. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.

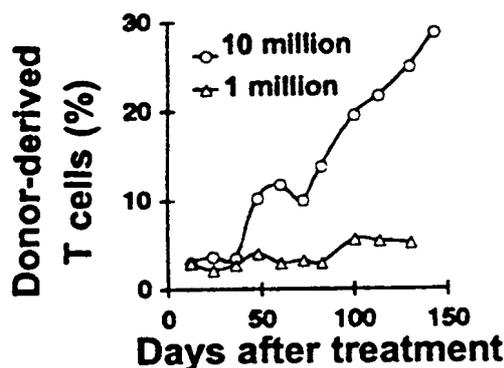


Figure 2 : 10^7 (○ ; n=3) ou 10^6 (△ ; n=3) splénocytes totaux de souris normales (Thy1.1) ont été transférés par voie intraveineuse à des souris T/R- (Thy1.2) âgées de 3 semaines. La présence de cellules du donneur a été suivie sur des échantillons de sang prélevés tous les 12 jours environ, pendant 150 jours. Les données représentent le pourcentage des lymphocytes T du donneur (moyenne de chaque groupe).

Question 5 : Sachant que l'on dispose d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes, expliquez, à l'aide d'un schéma, comment vous pourriez obtenir les résultats présentés dans la Figure 2.

Afin de mieux caractériser le répertoire des lymphocytes T provenant du donneur, on détermine, chez des souris T/R- ayant reçu 10^7 splénocytes de souris normales, le pourcentage d'expression des différentes régions V β au sein de la population T Thy1.1⁺. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

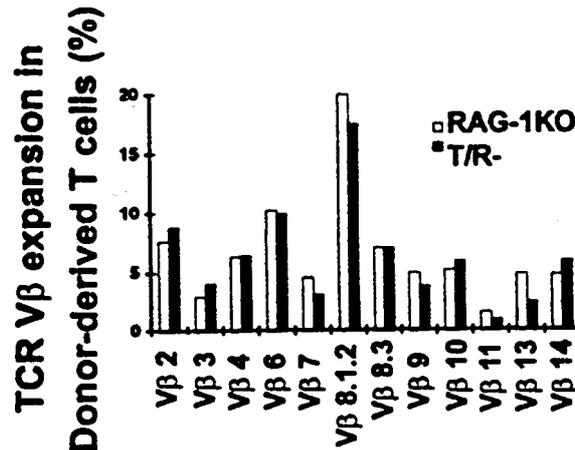


Figure 3 : L'expression TCR V β parmi les cellules d'origine du donneur (Thy1.1⁺) a été déterminée 150 jours après le transfert de 10^7 splénocytes totaux de souris normales dans des souris T/R- (barres noires) ou dans des souris RAG-1 KO (barres blanches).

Question 6 : Analysez et commentez ces résultats (5 lignes maximum)

Dans l'expérience suivante, on suit la survenue d'EAE chez des souris T/R- ayant reçu 10^7 ou 10^6 splénocytes de souris normales (Figure 4).

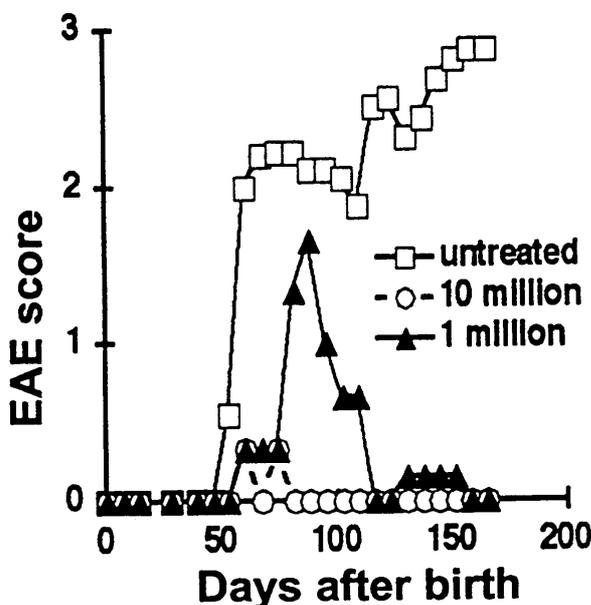


Figure 4 : 10^7 (○ ; n=3) ou 10^6 (▲ ; n=3) splénocytes totaux de souris normales (Thy1.1) ont été transférés par voie intraveineuse à des souris T/R- (Thy1.2) âgées de 3 semaines. Les souris témoins (untreated) n'ont pas reçu de cellules du donneur (□ ; n=9). Le score d'EAE moyen est déterminé pour chaque groupe de souris pendant 150 jours. Un score d'EAE de 1 correspond à une queue flasque ; 2 à une paralysie partielle des pattes arrière ; 3 à une paralysie totale des pattes arrière ; 4 à une paralysie partielle des pattes avant.

Question 7 : Les résultats des expériences de transfert vous permettent-ils d'étayer votre interprétation faite à la Question 4 ? (5 lignes maximum)

Afin de préciser la ou les population(s) lymphocytaire(s) impliquée(s) dans la protection des souris T/R- par le transfert adoptif de cellules spléniques de souris normales, les auteurs ont transféré dans ces souris des splénocytes totaux de souris CD4 KO ou μ MT KO (fonds génétique C57BL/6, CMH H-2^u). Les résultats sont présentés dans le Tableau ci-dessous.

Traitement ^a	n	Souris sans EAE ^b	Score max. d'EAE	Guérison totale ^c	Score final d'EAE ^d	Nombre de cellules CD8 ⁺ ^e	Nombre de cellules $\gamma\delta$ ⁺ ^e
3.10 ⁶ CD4 KO	7	0/7	2,4 ± 1,4	1/7	1,5 ± 1,7	nd	nd
2.10 ⁶ CD4 KO	5	0/5	2,4 ± 0,5	0/5	1,9 ± 0,5	0,2	0,03
3.10 ⁶ μ MT KO	3	2/3	0,7 ± 1,2	0/1	0,2 ± 0,3	nd	nd
2.10 ⁶ μ MT KO	5	2/5	0,8 ± 0,8	2/3	0,2 ± 0,3	0,4	0,02
PBS	4	0/4	2,8 ± 1,6	0/4	2,5 ± 1,7	nd	nd

Des souris T/R- (âgées de moins de 31 jours) ont reçu des splénocytes de souris CD4 KO ou μ MT KO en nombres variables ou du PBS. Les souris ont été suivies pendant 140 jours pour la survenue d'EAE. Le score d'EAE est déterminé comme expliqué à la Figure 4.

^a Les nombres indiqués correspondent aux nombres de cellules CD8⁺ injectées.

^b Nombre de souris n'ayant pas présenté de signe d'EAE pendant la période d'observation.

^c Nombre de souris ayant complètement guéri pendant la période d'observation.

^d Score moyen d'EAE à la fin de la période d'observation.

^e Nombre de cellules ($\times 10^{-6}$) CD8⁺ ou $\gamma\delta$ ⁺ du donneur à la fin de la période d'observation (nd : non déterminé).

Question 8 : Analysez et commentez ces résultats (5 lignes maximum)

Question 9 : Quelle(s) population(s) lymphocytaire(s) pensez-vous être responsable(s) de la protection contre la survenue d'EAE ? (5 lignes maximum)

Question 10 : Quelle(s) expérience(s) supplémentaire(s) réaliseriez-vous afin de confirmer vos hypothèses ? (5 lignes maximum)

Afin de déterminer le rôle des TCR α et β non transgéniques (endogènes) dans la prévention de l'EAE chez les souris de la lignée T/R+, ces souris sont croisées avec des souris μ MT KO, β 2m KO (déficiences en chaîne β 2-microglobuline), TCR- δ KO (invalidées pour le gène codant C δ) et TCR α/β KO (invalidées pour les gènes codant C α et C β). Des souris transgéniques pour le TCR anti-MBP mais déficientes soit en chaînes TCR α endogènes (T α^- , β^+), soit en chaînes TCR β endogènes (T α^+ , β^-), soit en chaînes TCR α et TCR β endogènes (T α^- , β^-) ont ainsi été obtenues.

La survenue d'EAE a été relevée pendant 4 mois et comparée à celle des souris transgéniques pour le TCR anti-MBP exprimant les TCR α et TCR β endogènes (T α^+ , β^+). Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Souris T/R+ anti-MBP croisées avec	Souris présentant des signes d'EAE
T α^{-} , β^{-}	16/16
T α^{-} , β^{+}	19/20
T α^{+} , β^{-}	15/21
T α^{+} , β^{+}	0/32
TCR- δ KO	0/26
μ MT KO	0/18
β 2m KO	1/19

Question 11 : Analysez et commentez ces résultats (5 lignes maximum)

Question 12 : A partir de ces données et de celles des transferts adoptifs précédemment décrits (y compris celui que vous auriez suggéré dans votre réponse à la Question 10), quelle(s) conclusion(s) pouvez-vous formuler quant à la population lymphocytaire régulatrice qui prévient l'EAE dans les souris T/R+ ? (5 lignes maximum)

Question 13 : Quelle est l'importance relative des chaînes TCR α et TCR β endogènes dans la protection contre l'EAE ? (5 lignes maximum)

Question 14 : Suggérez une explication et un mode d'action des lymphocytes T régulateurs. (5 lignes maximum)