

Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)

UE BMC423 – Immunologie Fondamentale
Epreuve écrite – juin 2006

Durée de l'épreuve : 2 heures

BMC423 - Immunologie Fondamentale

Epreuve écrite – juin 2006

(D'après Anderson, M. S., et al. (2005) *Immunity* 23:227)

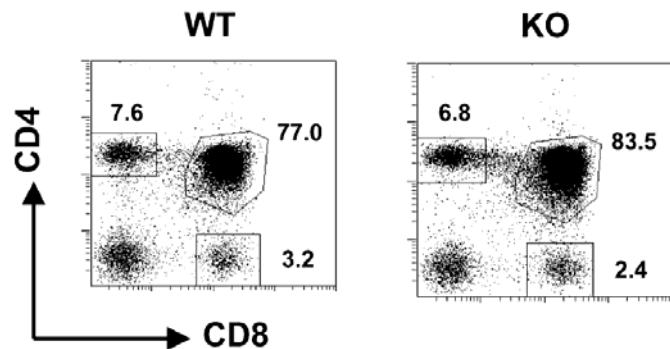
Dans cette étude, les auteurs s'intéressent au rôle de AIRE (*Auto-Immune Regulator*), produit d'un gène récemment identifié, agissant apparemment comme un facteur de transcription. AIRE est supposé intervenir dans le contrôle du développement de l'auto-immunité en induisant la transcription d'un nombre important de gènes codant des protéines, normalement spécifiques de tissus périphériques, au niveau des cellules épithéliales thymiques.

Dans un premier temps, les thymocytes de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour AIRE (KO) sont étudiés par cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats sont présentés sur la Figure 1.

Figure 1

Des thymocytes de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour AIRE (KO) ont été isolés, incubés en présence d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes puis analysés en cytométrie en flux. Les nombres indiqués correspondent aux pourcentages de thymocytes dans les sous-populations encadrées.

N.B. : On précise que le nombre total de thymocytes est comparable pour les deux lignées de souris.



- Question 1.** A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez les grandes lignes de la différenciation thymique.
- Question 2.** A votre avis, comment la fonction régulatrice de l'auto-immunité de AIRE, comme supposée dans l'introduction, peut-elle s'exercer ? [5 lignes maximum]
- Question 3.** Analysez les résultats présentés sur la Figure 1. Que concluez-vous ? [8 lignes maximum]

Dans les expériences présentées ci-dessous, les auteurs essayent de préciser la fonction de AIRE sur la sélection du répertoire lymphocytaire T. Dans une première expérience, le rôle de AIRE sur la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg) est étudié en comparant les populations lymphocytaires observées, dans différents organes, chez des souris déficientes pour AIRE (KO) ou chez des souris de type sauvage (WT). On rappelle ici que l'expression des marqueurs CD4 et CD25 a été démontrée à la surface de certaines cellules Treg, combinée à l'expression du facteur de transcription *Foxp3*. Les résultats sont présentés sur la Figure 2.

- Question 4.** Sachant que *Foxp3* est un facteur de transcription, rappelez, à l'aide d'un schéma uniquement, par quelle variante de la technique de cytométrie cette protéine peut être détectée ?
- Question 5.** Analysez les résultats de la Figure 2. [10 lignes maximum]

Question 6. En particulier, à l'aide d'un tableau uniquement, indiquez le phénotype et les caractéristiques fonctionnelles des quatre sous-populations mises en évidence sur ces diagrammes.

Question 7. Quelle(s) conclusion(s) pouvez-vous émettre quant aux conséquences de l'absence de AIRE chez les souris KO sur la différenciation des cellules Treg ? [5 lignes maximum]

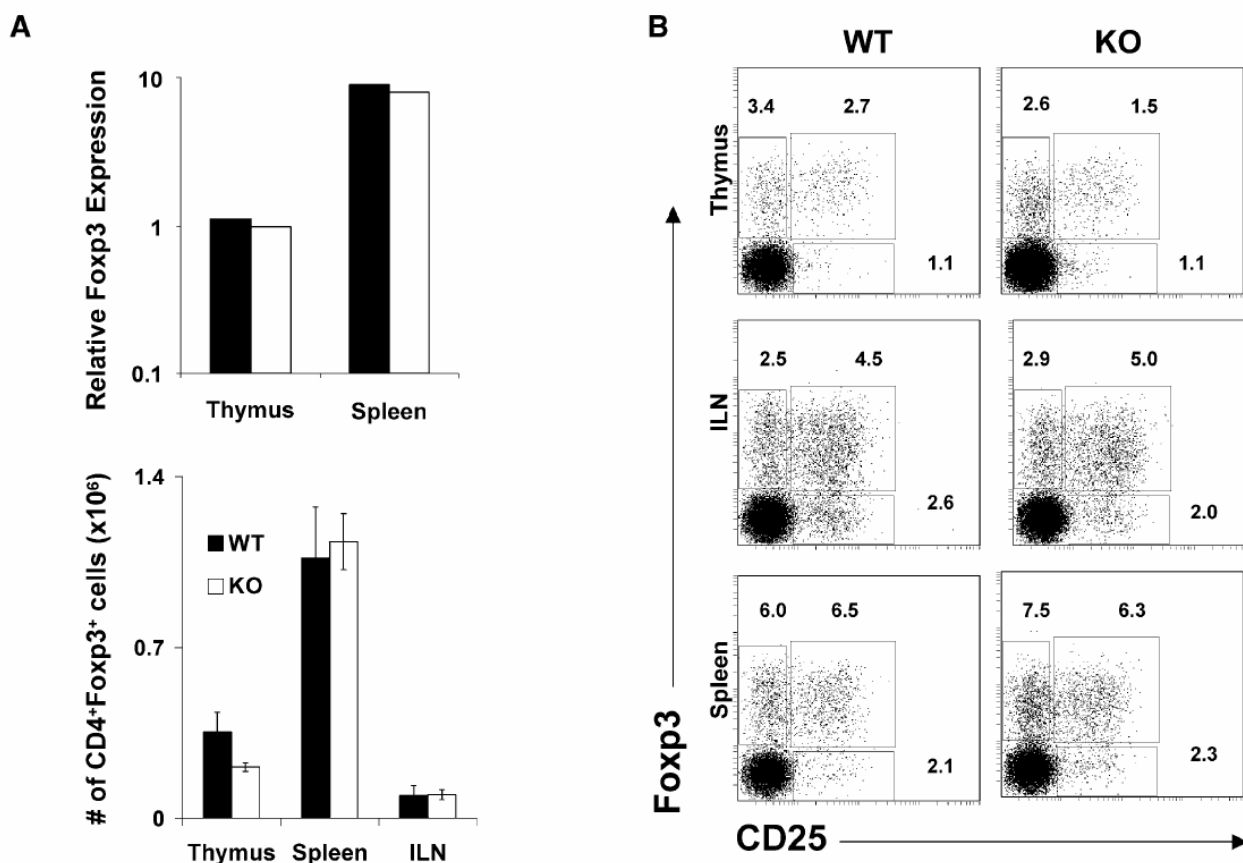


Figure 2

A :

Haut : Le taux de niveau d'expression du gène Foxp3 (Relative Foxp3 Expression) est évalué par RT-PCR dans le thymus et dans la rate (spleen) de souris déficientes pour AIRE (KO ; barres blanches) ou de type sauvage (WT ; barres noires).

Bas : Mesure du nombre de cellules CD4⁺ Foxp3⁺ dans le thymus, la rate (spleen) et les ganglions inguinaux (ILN) de souris déficientes pour AIRE (KO ; barres blanches) ou de type sauvage (WT ; barres noires).

B : Les cellules du thymus, des ganglions inguinaux (ILN) et de la rate (spleen) de souris déficientes pour AIRE (KO) ou de type sauvage (WT) ont été marquées avec les anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 et anti-Foxp3 couplés à des fluorochromes. Les cellules ainsi marquées sont analysées par cytométrie en flux. Les diagrammes présentés montrent l'expression de Foxp3 et CD25 au sein de la sous-population CD4⁺CD8⁻. Les nombres indiqués correspondent, pour chaque organe étudié, aux pourcentages de cellules CD4⁺CD8⁻ dans chaque fenêtre d'analyse.

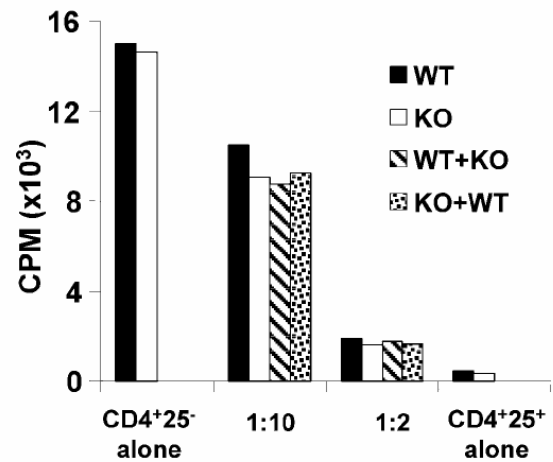
Dans l'expérience suivante, les auteurs testent la capacité des cellules Treg (CD4⁺CD25⁺) à proliférer par comparaison aux cellules T classiques (CD4⁺CD25⁻), également dénommée cellules T conventionnelles. Pour cela, ils incubent ces sous-populations, pures ou mélangées, avec des anticorps anti-CD3 en présence de cellules de rate irradiées et mesurent la prolifération par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

Figure 3

Des cellules $CD4^+CD25^-$ seules ou mélangées avec des cellules $CD4^+CD25^+$ en proportions 1:10 ou 1:2, ou des cellules $CD4^+CD25^-$ seules, provenant de souris de type sauvage (WT) ou déficientes pour AIRE (KO), ont été incubées en présence d'anticorps anti-CD3 et de cellules de rate irradiées. Leur prolifération a alors été mesurée par incorporation de thymidine tritiée.

N.B. :

- WT+KO correspond au mélange de cellules $CD4^+CD25^-$ WT avec des cellules $CD4^+CD25^+$ KO ;
- KO+WT correspond au mélange de cellules $CD4^+CD25^+$ KO avec des cellules $CD4^+CD25^-$ WT



Question 8. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le principe d'une autre technique permettant de détecter la prolifération cellulaire.

Question 9. Pourquoi les cellules sont-elles incubées en présence d'anticorps anti-CD3 et de cellules de rate irradiées ? [5 lignes maximum]

Question 10. Après analyse des résultats de la Figure 3, que concluez-vous quant au potentiel des cellules testées ? [10 lignes maximum]

Dans une dernière expérience, les auteurs étudient le rôle de AIRE dans la sélection thymique. Pour cela, les souris transgéniques suivantes sont obtenues :

- OT-II⁺ Aire^{+/+} : souris transgénique pour les chaînes α et β d'un TCR spécifique d'un peptide dérivé de l'ovalbumine (OVA) présenté par la molécule de CMH I-A^b. Cette lignée de souris exprime AIRE.
- OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/+} : souris OT-II⁺ également transgénique pour le gène codant OVA sous promoteur de l'insuline. Cette lignée de souris exprime AIRE.
- Après croisements des souris OT-II⁺ RIP-OVA⁺ avec les souris déficientes pour AIRE, les souris OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/-} et OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{-/-} sont obtenues.

Pour chacune des quatre lignées, les thymocytes sont analysés en cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.

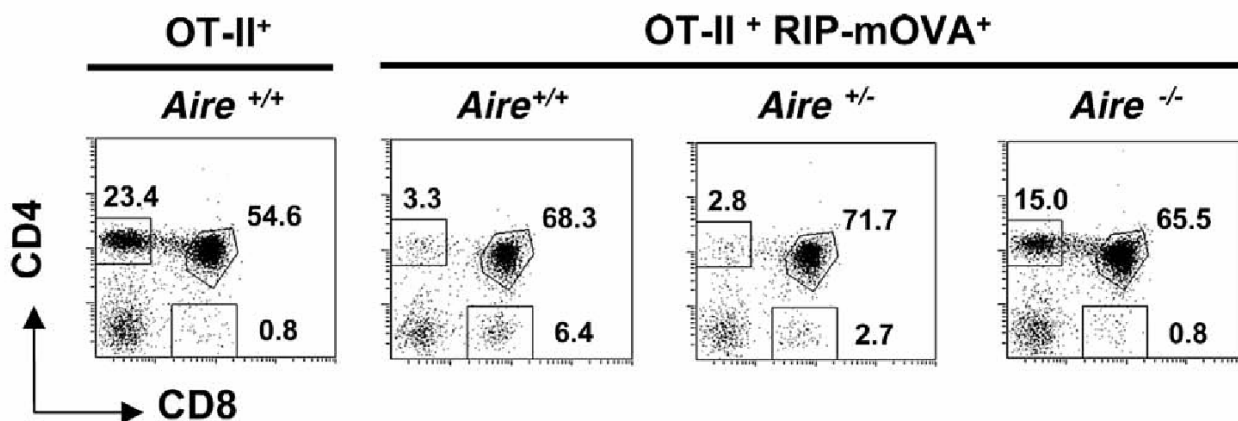


Figure 4

Les thymocytes de souris OT-II⁺ Aire^{+/+}, OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/+}, OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{+/-} et OT-II⁺ RIP-OVA⁺ Aire^{-/-} sont incubés avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes et analysés en cytométrie en flux. Les nombres correspondent aux pourcentages de thymocytes dans les sous-populations encadrées.

N.B. : OT-II est un transgène codant un TCR $\alpha\beta$ spécifique d'un peptide dérivé de l'ovalbumine (OVA) présenté par la molécule de CMH I-A^b. RIP-OVA est un transgène codant l'ovalbumine sous promoteur de l'insuline.

Question 11. *A priori dans quel tissu attend-on l'expression du transgène OVA ? [5 lignes maximum]*

Question 12. *Analysez soigneusement les résultats présentés à la Figure 4. [15 lignes maximum]*

Question 13. *Quelle(s) conclusion(s) tirez-vous de ces expériences concernant le rôle de AIRE ? [5 lignes maximum]*