

Université Pierre et Marie Curie – Paris 6

*UE MV423 – Immunologie Fondamentale & Intégrée
Epreuve écrite – mai 2010, 1^{ère} session*

Durée de l'épreuve : 2 heures

MV423 - Immunologie Fondamentale & Intégrée
Epreuve écrite – mai 2010, 1ère session

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

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

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

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

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

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

Les lignées de souris transgéniques suivantes ont été produites :

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

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

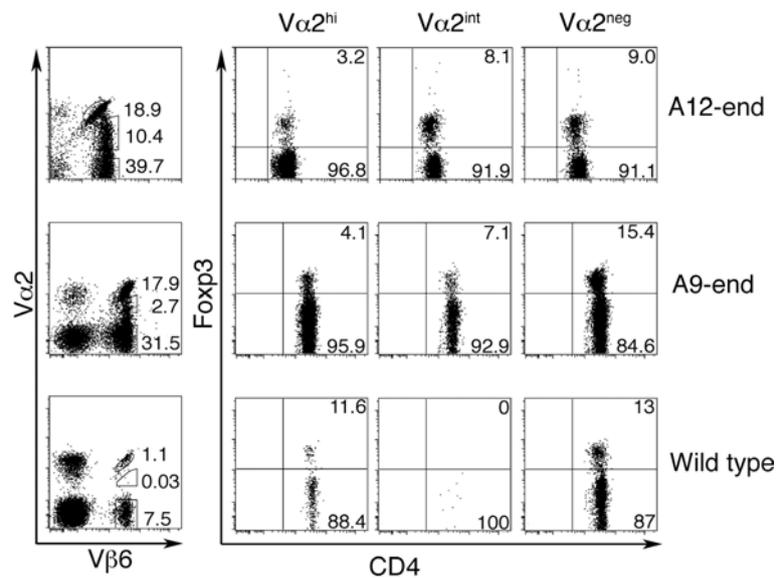


Figure 1 :

Les splénocytes de souris transgéniques A12-end et A9-end et de souris de type sauvage (Wild type) ont été analysés en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti- $V\beta 6$, anti- $V\alpha 2$, anti-CD4 et anti-Foxp3 couplés à différents fluorochromes. Les cellules $V\beta 6^+$ exprimant différents niveaux de $V\alpha 2$ ($V\alpha 2^{hi}$, $V\alpha 2^{int}$, $V\alpha 2^{neg}$) ont été repérées (à gauche). Pour chacune de ces trois sous-populations, l'expression du marqueur Foxp3 est mesurée au sein des cellules $CD4^+$ (à droite). Les nombres indiqués correspondent au pourcentage de chaque sous-population repérée par rapport à la totalité des cellules représentées dans le profil de cytométrie correspondant. Par exemple, on peut dire que 7,5% des splénocytes des souris de type sauvage sont $V\beta 6^+V\alpha 2^+$.

- Question 3.** *Décrivez le protocole de cytométrie en flux qui a dû être mis en œuvre pour analyser l'expression de la molécule Foxp3 ? (3 lignes maximum)*
- Question 4.** *Pour chaque lignée de souris étudiée à la Figure 1, donnez une estimation de la proportion de splénocytes $V\beta 6^+$ en explicitant votre calcul ? (5 lignes maximum)*
- Question 5.** *Sur la seule base des données présentées à la Figure 1, estimez la proportion de cellules T exprimant $V\alpha 2$ pour la lignée de type sauvage ? Quelle hypothèse raisonnable avez-vous faite pour effectuer ce calcul ? (5 lignes maximum)*
- Question 6.** *Décrivez soigneusement les résultats présentés sur la Figure 1 en commençant par les souris de type sauvage puis, par comparaison, en indiquant le comportement observé chez les souris transgéniques ? (15 lignes maximum)*
- Question 7.** *Quelle est votre hypothèse pour expliquer la présence de cellules T matures $V\beta 6^+V\alpha 2^{neg}$ et $V\beta 6^+V\alpha 2^{int}$ dans la rate des souris transgéniques ? (5 lignes maximum)*

Question 8. *Considérant l'origine des TCR transgéniques des souris A12-end et A9-end, pourquoi pensez-vous que les auteurs se sont étonnés des résultats présentés sur la Figure 1 ? (3 lignes maximum)*

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

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

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

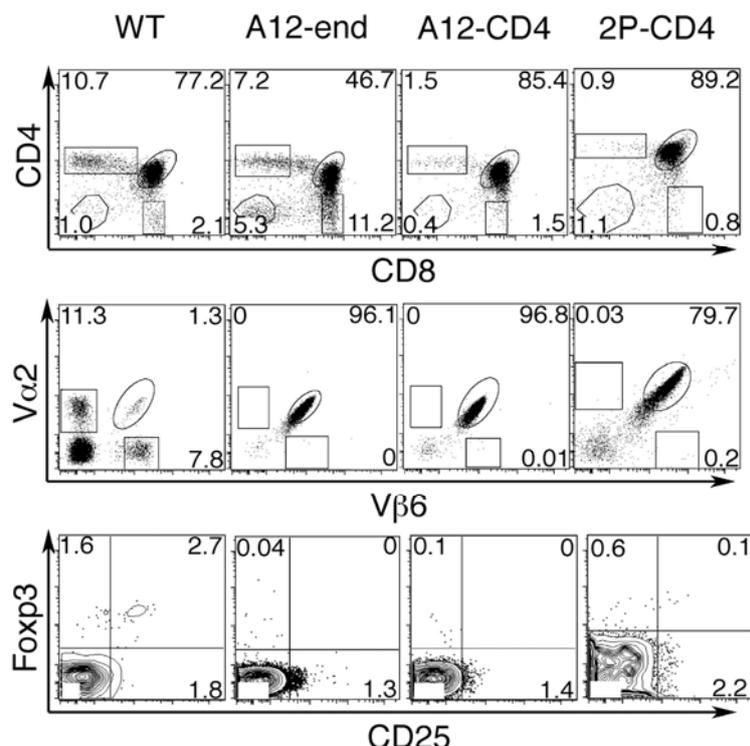


Figure 2 :

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

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

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

- Question 10. Quelles sont les conséquences de l'absence de la molécule RAG2 chez les souris transgéniques étudiées à la Figure 2 ? (3 lignes maximum)
- Question 11. Décrivez soigneusement les résultats présentés sur la Figure 2 pour ce qui concerne les souris transgéniques A12-end RAG2⁻ par comparaison aux souris de type sauvage ? (10 lignes maximum)
- Question 12. Comment expliquez-vous la présence de cellules CD8⁺CD4⁻ chez les souris transgéniques A12-end RAG2⁻ alors que le TCR transgénique d'origine est restreint par une molécule de CMH de classe II ? (5 lignes maximum)
- Question 13. Décrivez ensuite soigneusement les résultats présentés sur la Figure 2 pour ce qui concerne les souris transgéniques A12-CD4 RAG2⁻ et 2P-CD4 RAG2⁻ ? Qu'apportent ces nouveaux résultats ? (15 lignes maximum)
- Question 14. Sur la base des résultats obtenus à ce stade et vous rappelant que les TCR transgéniques des souris analysées jusqu'alors dérivent de clones Tregs, pensez-vous que seule la nature ou la spécificité du TCR exprimé sur un thymocyte immature suffise à différencier cette cellule en Tregs ou Tconvs ? Justifiez votre réponse. (3 lignes maximum)

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

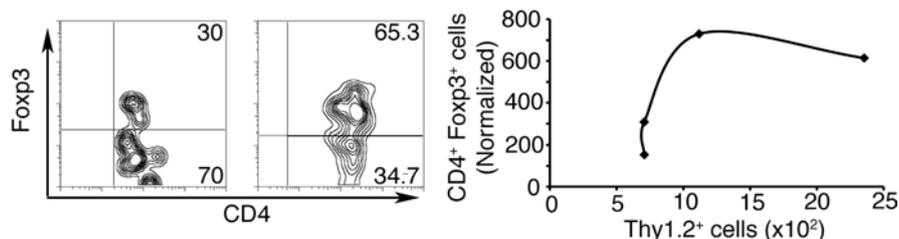


Figure 3 :

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

- Question 15. Analysez soigneusement les résultats présentés sur la Figure 3 ? (8 lignes maximum)
- Question 16. Pouvez-vous réévaluer la réponse que vous avez donnée à la Question 14 ? En particulier, quelles sont les conditions favorables à la sélection des Tregs ? (5 lignes maximum)

Question 17. Quelles expérimentations complémentaires pensez-vous nécessaires pour compléter la caractérisation des cellules T CD4⁺ Foxp3⁺ observées à la Figure 3 ? (5 lignes maximum)

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

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