

Différenciation & Sélections

I.

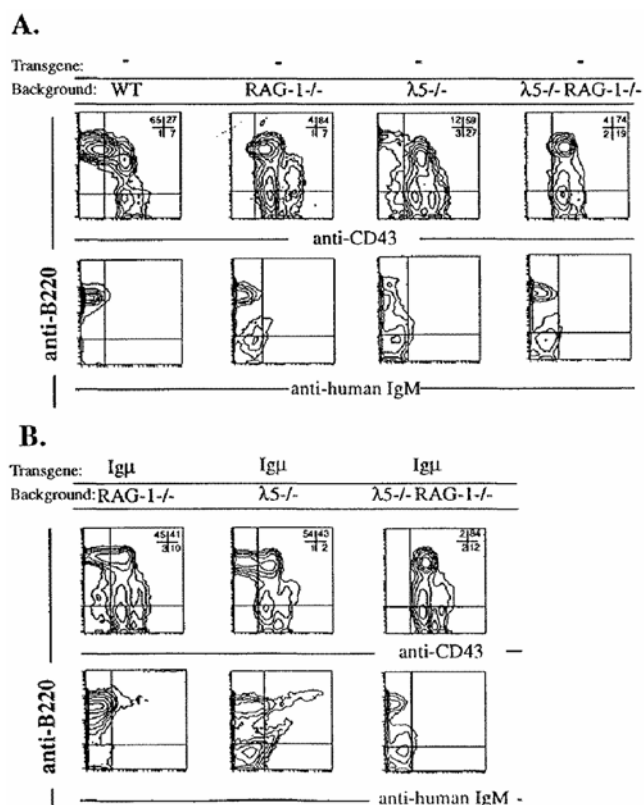
(d'après Papavasiliou, F. *et al.* (1996) *J.Exp.Med.* 184:2025)

Les auteurs de cette étude ont examiné le rôle de différents composants du récepteur pré-BCR dans le développement des cellules B. Ils ont introduit plusieurs transgènes d'immunoglobuline (Ig) dans des souris RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et double mutants (RAG^{-/-} λ5^{-/-}). Tous les transgènes sont des gènes réarrangés sous contrôle du promoteur VH et de l'enhancer IgH. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes :

Figure 1 : Analyse par FACS des cellules de la moelle osseuse de souris âgées de 6 à 8 semaines.

- A. Souris sauvages (WT) et mutantes (RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et double mutants RAG^{-/-} λ5^{-/-}).
 B. Souris chez lesquelles on a introduit un transgène codant la forme membranaire de la chaîne μ humaine (Igμ).

Les cellules ont été marquées par des anticorps anti-B220, anti-CD43 et anti-IgM humain (ne reconnaît que IgM humaine). Le pourcentage de lymphocytes présents dans chaque cadran est inscrit en haut et à droite pour les marquages B220/CD43.



- Question 1. Quel est l'effet de l'introduction du transgène Igμ dans les mutants RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et RAG^{-/-} λ5^{-/-} ?
- Question 2. Que suggèrent ces expériences quant aux éléments nécessaires à l'expression de la chaîne μ à la surface et quant à son effet sur le développement des cellules B ?
- Question 3. Donner les raisons qui ont conduit à l'utilisation des souris mutantes RAG^{-/-}, λ5^{-/-} et double mutants RAG^{-/-} λ5^{-/-}.
- Question 4. D'après les résultats présentés aux Figure 3 et Figure 4 que peut-on conclure quant au rôle des chaînes légères dans l'assemblage, le transport et la fonction du récepteur pré-B ?

Figure 2 : Analyse de l'expression intracellulaire du transgène Ig μ humain dans les cellules B220⁺CD43⁺ de la moelle.

Après marquage avec les anticorps anti-B220 et anti-CD43, les cellules des souris utilisées à la **Figure 1** ont été fixées, perméabilisées et marquées avec l'anticorps anti-IgM humain.

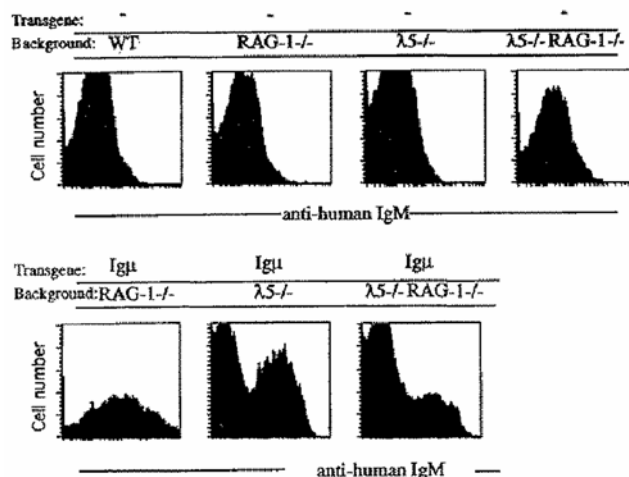


Figure 3 : Analyse du complexe pré-BCR par des expériences d'immunoprécipitation.

Des lignées de précurseurs B immortalisées par le virus d'Abelson ont été obtenues à partir de la moelle de souris de type sauvage (WT), mutantes (RAG-^{-/-}), (λ5-^{-/-}) et (RAG-^{-/-} λ5-^{-/-}) ainsi que de souris mutantes exprimant le transgène Ig μ humain : (m μ RAG-^{-/-}), (m μ λ5-^{-/-}) et (m μ RAG-^{-/-} λ5-^{-/-}). Les complexes Ig ont été immunoprécipités avec un immunosérum anti-IgM humain et analysés par la technique de Western blot. Les protéines ont été révélées avec des anticorps anti-IgM humain (hIgM); anti-Ig α (Ig α) et anti-Ig β (Ig β). s.f. : forme membranaire; c.f. : forme cytoplasmique. Après surexposition, on voit apparaître sur un blot une bande correspondant à la forme membranaire (s.f.) de la protéine Ig β dans la 1^{ère} piste (m μ λ5-^{-/-}).

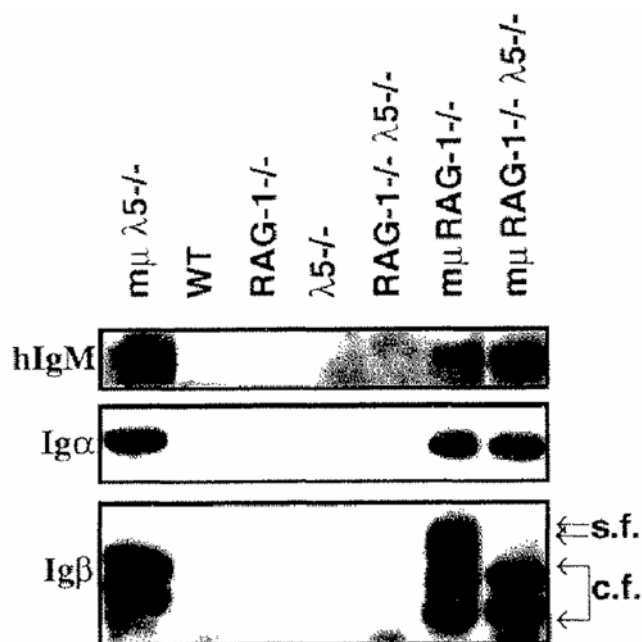
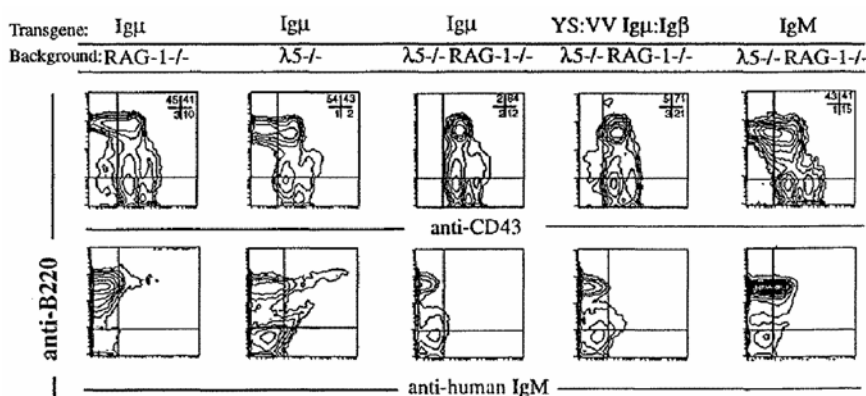


Figure 4 : Analyse par FACS des cellules de la moelle provenant de souris mutantes dans lesquelles on a introduit soit le transgène Ig μ comme précédemment, soit un transgène YS:VV Ig μ :Ig β codant pour une protéine chimérique Ig μ -Ig β , soit un transgène IgM codant pour une immunoglobuline complète (Ig μ /Ig κ).

Voir la légende de la figure 1 pour les détails expérimentaux. N.B. : après introduction des transgènes YS:VV Ig μ :Ig β et IgM, on observe la présence de chaîne μ transgénique dans le cytoplasme des précurseurs de la moelle.



Question 5. Donner un titre qui résume les points essentiels de ces expériences.

II.

(D'après Messaoudi *et al.* (2002) *Science* 298:1797)

Dans cette étude, les auteurs analysent la réponse lymphocytaire T contre le virus de l'Herpes (HVH-1) dans deux lignées de souris consanguines. Les auteurs ont montré au préalable que, chez ces souris la réponse est principalement dirigée contre un peptide particulier, le peptide HSV-8p, dérivé d'une protéine du virus, la glycoprotéine B.

Les lignées de souris étudiées sont les lignées C57BL/6 (B6), d'haplotype du CMH H2^b, et B6.C-H-2^{bm8} (bm8), d'haplotype du CMH H2^{bm8}. Ces deux lignées de souris sont génétiquement identiques hormis pour le gène codant la molécule de CMH de classe I H-2K. Les molécules H-2K^b et H-2K^{bm8} diffèrent de quatre acides aminés au niveau du site de fixation du peptide. Ces molécules sont par conséquent identiques pour ce qui est des régions de contact direct avec le TCR mais peuvent différer dans leur capacité à fixer et à présenter certains peptides ; elles peuvent donc différer dans leur capacité à induire les réponses T.

Question 6. A l'aide d'un schéma uniquement, rappelez le mode de reconnaissance de l'antigène par le TCR.

Dans une première expérience, la survie des souris B6 et bm8, infectées par des doses croissantes du virus HVH-1, a été observée (Figure 5A). Dans une seconde expérience, les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose donnée de HVH-1 et la survie des souris a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K (Figure 5B).

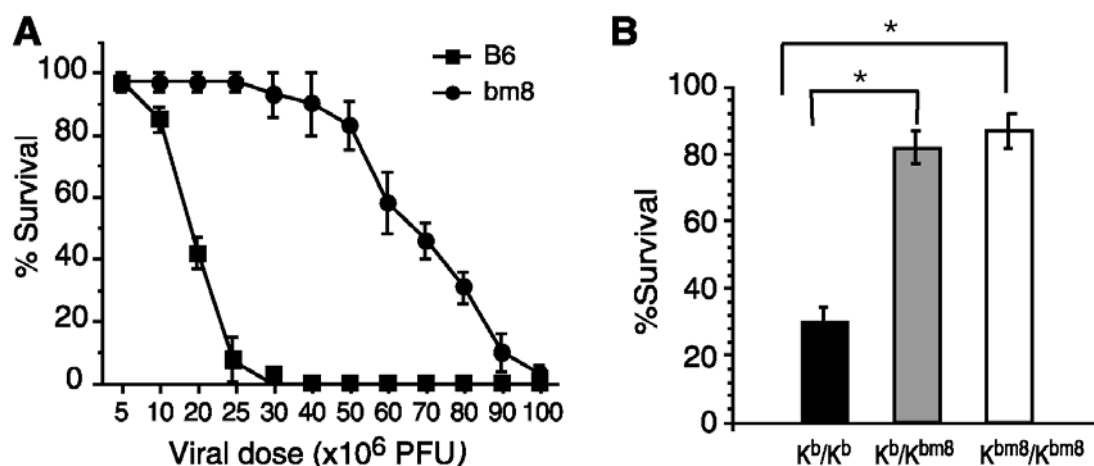


Figure 5 : (A) Les souris B6 et bm8 ont été infectées par des doses croissantes du virus HVH-1 (viral dose). La survie des souris (%survival) a été observée 100 jours après l'infection. (B) Les souris F2 issues du croisement entre elles de souris F1(B6 x bm8) ont été infectées avec une dose de 25.10⁶ pfu de HVH-1. La survie des souris, 100 jours après l'infection, a été observée en fonction du génotype de la molécule H-2K : K^b/K^b, K^b/K^{bm8} ou K^{bm8}/K^{bm8}. Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

Question 7. Analyser les résultats présentés sur la Figure 5. (10 lignes maximum)

Question 8. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous émettre pour rendre compte de ces observations ? (8 lignes maximum)

Dans la suite de leur étude, les auteurs analysent la survie des souris B6 ou bm8 déficientes en cellules T CD8 (Figure 6A) ou en cellules NK (Figure 6B) après infection avec une dose donnée de

HVH-1. Dans une autre expérience, la survie de souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8, après transfert, ou non, de cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 ou bm8, a été observée après infection avec une dose létale de HVH-1 (Figure 6C).

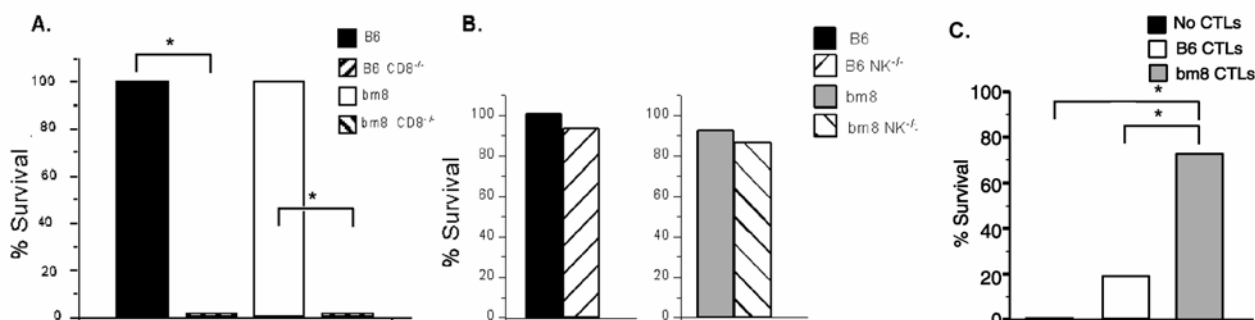


Figure 6 : (A) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules T CD8 (B6 CD8^{-/-} et bm8 CD8^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10^6 pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (B) Des souris B6 et bm8 déficientes en cellules NK (B6 NK^{-/-} et bm8 NK^{-/-}) ont été infectées par une dose de 5.10^6 pfu de HVH-1. La survie de ces souris a été observée, par comparaison à celle des souris témoins (B6 et bm8) infectées par la même dose de virus. (C) Des souris F1(B6 x bm8) déficientes en cellules T CD8 ont reçu, ou non (no CTLs), des cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p provenant de souris B6 (B6 CTLs) ou de souris bm8 (bm8 CTLs). Les différences significatives sont indiquées par les astérisques.

Question 9. Citer deux moyens par lesquels les auteurs ont pu obtenir des souris déficientes en cellules T CD8. (5 lignes maximum)

Question 10. Pour quelle raison les auteurs choisissent-ils d'étudier des souris déficientes en cellules T CD8 ou en cellules NK ? (5 lignes maximum)

Question 11. Analyser les résultats présentés sur la Figure 6. (15 lignes maximum)

Question 12. Ces résultats confirment-ils les hypothèses émises à la Question 8 ? (5 lignes maximum)

Dans une dernière expérience, les auteurs ont étudié le répertoire TCR β des cellules T CD8 de souris B6 ou bm8 infectées par le virus HVH-1 ou par un autre virus, le virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p chez les souris infectées par HVH-1 (Figure 7A) et parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide « Inf-ASN » chez les souris infectées par le virus Influenza (Figure 7B). On précise que, chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide « Inf-ASN » présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

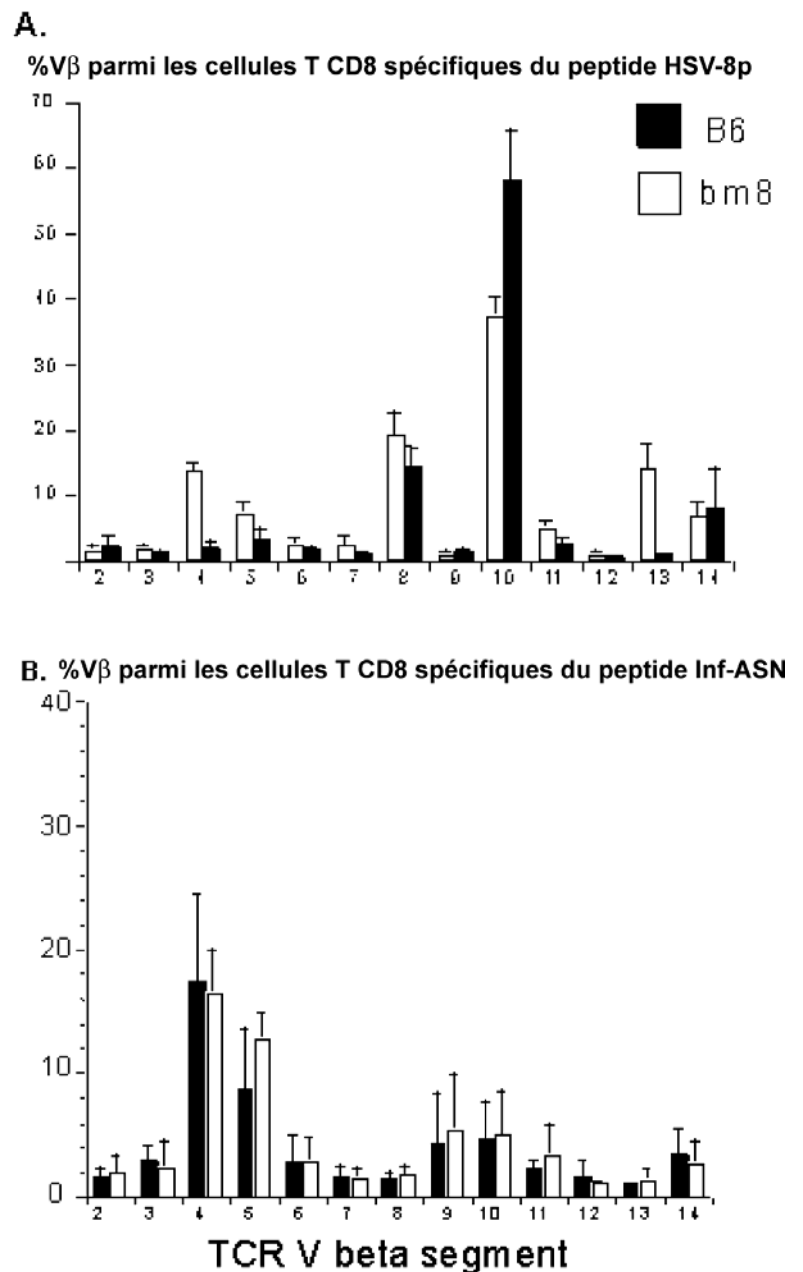


Figure 7 : (A) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par le virus HVH-1. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide HSV-8p. (B) Des souris B6 et bm8 ont été infectées par un virus Influenza. Le pourcentage d'expression des segments V β du TCR a été déterminé parmi les cellules T CD8 spécifiques du peptide Inf-ASN. N.B. : Chez les souris B6 et bm8, la réponse lymphocytaire T CD8 contre le virus Influenza est dirigée principalement contre le peptide Inf-ASN présenté par la molécule de CMH de classe I H-2D.

Question 13. A l'aide d'un schéma uniquement, résumez le mécanisme de génération de la diversité des anticorps et TCR.

Question 14. Analysez les résultats présentés sur la Figure 7. (8 lignes maximum)

Question 15. Sur la base de ces derniers résultats, comment interprétez-vous la différence de susceptibilité à l'infection par le virus HVH-1 chez les souris B6 et bm8 ? (8 lignes maximum)

III.

(D'après Grandjean, I., et al. (2003) *J.Exp.Med.* 198:1089)

Le clone T CD4⁺ *Marylin* a été établi chez une souris de CMH H-2^bxH-2^k. Ce clone est dirigé contre un peptide de l'antigène H-Y exclusivement exprimé chez la souris mâle et présenté par la molécule I-A^b. Les chaînes TCRβ et TCRα du clone *Marylin* ont été clonées pour produire des souris transgéniques (Tg) pour le TCR *Marylin*, de fonds génétique C57BL/6 (B6) et d'haplotype H-2^b ou H-2^k. Les souris *Marylin* TCR Tg H-2^b (ou H-2^k) ainsi obtenues ont alors été croisées avec des souris RAG-2^{-/-} H-2^b (ou H-2^k) de fonds B6 afin d'obtenir les souris *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^b (ou H-2^k).

Grâce à ces souris et aux lignées supplémentaires de souris B6 RAG-2^{-/-} H-2Aβ^{b-} et B6 RAG-2^{-/-} β2m⁻, on a également pu obtenir les lignées de souris *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^{b-} ou H-2^kβ2m⁻ ou H-2^{b/k} ou H-2Aβ^bx^b ou H-2Aβ^bx^k, toutes de fonds génétique B6.

Question 16. A l'aide d'un schéma de croisements uniquement, expliquer comment ces dernières lignées de souris ont été obtenues :

- *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^{b-}
- *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^kβ2m⁻
- *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2^{b/k}
- *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^bx^b
- *Marylin* TCR Tg RAG-2^{-/-} H-2Aβ^bx^k

Question 17. Rappelez l'effet de la mutation RAG-2^{-/-}. (5 lignes maximum)

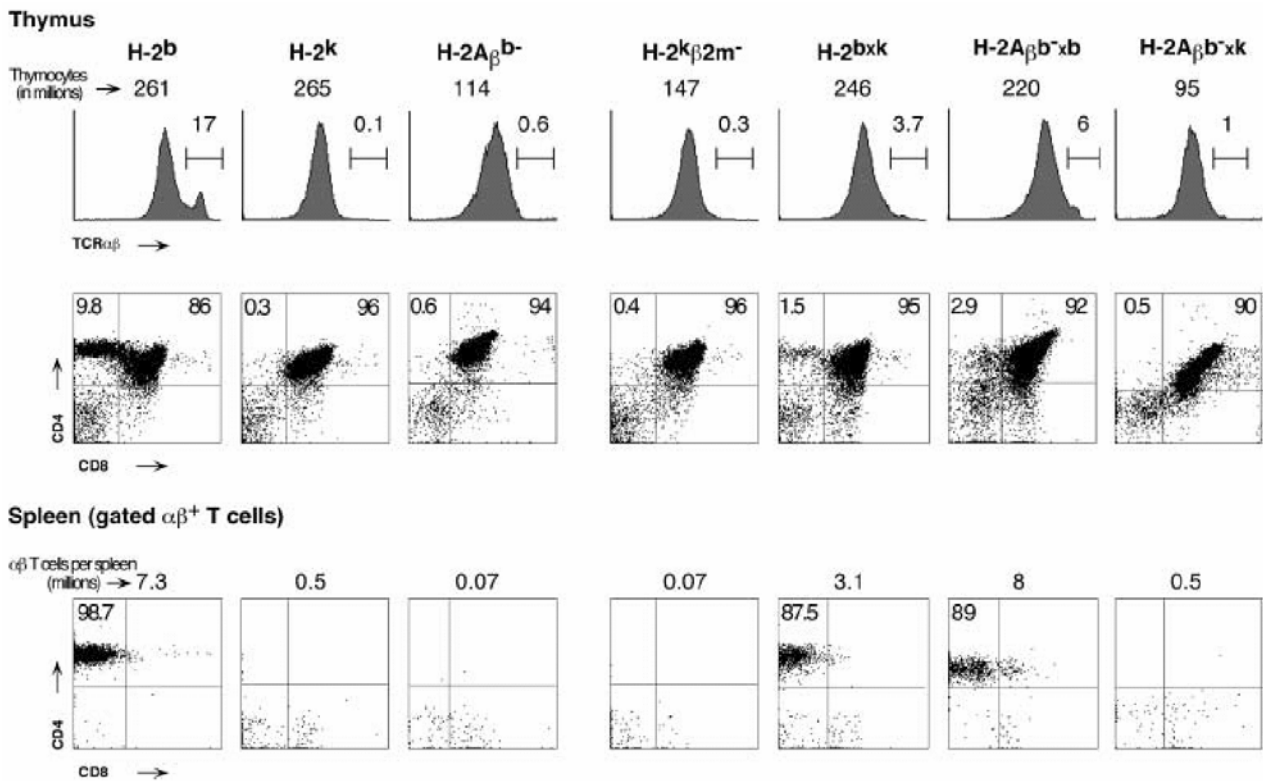
Le développement lymphocytaire T a été étudié chez des souris femelles de ces différentes lignées de souris, dans le thymus et la rate, par cytométrie en flux avec les anticorps anti-TCRβ, anti-CD4 et anti-CD8 (**Figure 8**).

Question 18. A l'aide d'un tableau comparatif (cf. modèle ci-dessous), vous résumerez et analyserez ces résultats en précisant, pour chaque lignée,

- quelles molécules du CMH sont exprimées
- quelle cellularité est observée dans le thymus et dans la rate
- quelles populations sont absentes ou présentes
- comment ces observations cadrent avec vos connaissances du développement lymphocytaire T

Question 19. A la fin de ce tableau comparatif, vous terminerez votre analyse en indiquant quelle(s) population(s) supplémentaire(s) vous attendriez-vous à observer

- si l'on injectait l'antigène H-Y dans le thymus des souris nouveaux-nés
- ou si les souris ne portaient pas la mutation RAG-2^{-/-}

**Figure 8**

Le développement lymphocytaire T a été étudié chez des souris femelles des différentes lignées de souris *Marylin* TCR Tg. Le génotype du CMH des lignées étudiées est indiqué en haut de chaque colonne. Les thymocytes et splénocytes ont été analysés par cytométrie en flux avec les anticorps anti-TCR β (TCR $\alpha\beta$), anti-CD4 et anti-CD8. Pour les splénocytes, l'analyse ne montre que les cellules TCR $\alpha\beta^{+}$. Pour chaque organe étudié, le nombre total de cellules est indiqué (en millions). Les nombres inscrits dans les quadrants des profils correspondent à la proportion de cellules du phénotype correspondant.

N.B. : On rappelle que toutes les souris sont ici déficientes pour RAG-2.

Modèle de tableau pour la réponse aux **Question 18** et **Question 19** :

	H-2 ^b	H-2 ^k	H-2A β ^{b-}	H-2 ^k β 2m ⁻	H-2 ^b α k	H-2A β ^{b-xb}	H-2A β ^{b-xk}
Expression CMH I							
Expression CMH II							
Cellularité thymus							
Cellularité rate							
Populations thymus							
Populations rate							
Interprétation développement T							
Prédiction injection thymique antigène H-Y							
Prédiction RAG2+							