Tolérance & Régulations

I. Problème n°2 du sujet d'examen de juin 1997

1) On introduit dans des ovocytes fécondés de souris **C57BL/6** d'haplotype H-2^b deux transgènes contenant les gènes réarrangés codant respectivement pour la chaîne α et la chaîne β du TcR d'un clone T spécifique du peptide 257-264 de l'ovalbumine (**pOVA 257-264**) présenté par H-2 K^b. Ce TcR utilise les segments de gènes Vα2 et Vβ5. Les souris transgéniques ainsi obtenues sont croisées avec des souris de même haplotype, déficientes en β2 microglobuline ($\beta2m^{-/-}$). On obtient ainsi des souris **TcRtg β2m$^{+/-}$** et des souris **TcRtg β2m$^{-/-}$**. On réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-Vα2 et anti-Vβ5 couplés à des fluorochromes sur les thymocytes des différentes souris non transgéniques et transgéniques. Le résultat de cette expérience vous est présenté sur la **Figure 1** :

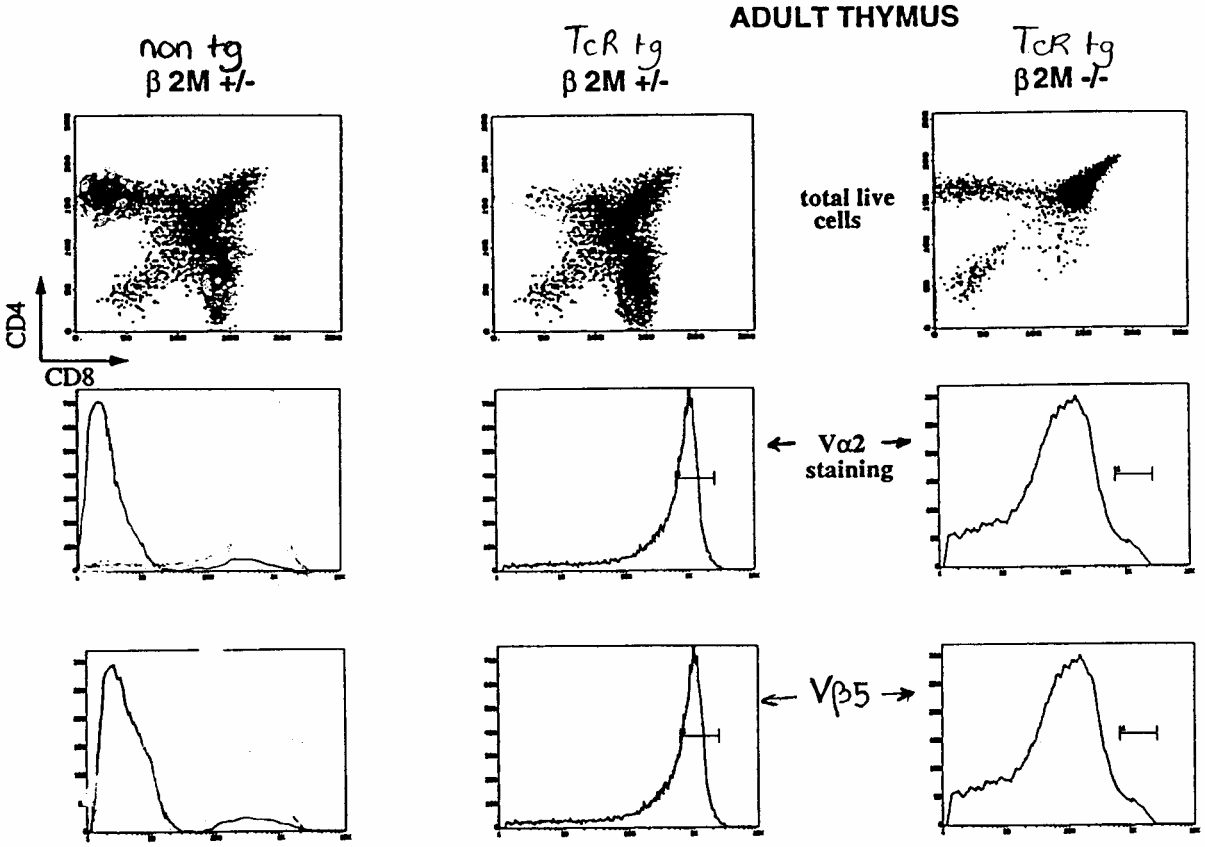


Figure 1 : Marquage des thymocytes de souris non transgéniques $\beta2m^{+/-}$ (non tg), TcRtg $\beta2m^{+/-}$ et TcRtg $\beta2m^{-/-}$ avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-Vα2 et anti-Vβ5.

Question 1. Analysez ces résultats en comparant et en expliquant les proportions de cellules simple-positives $CD8^+$ dans les thymus des différentes souris.

2) On peut cultiver *in vitro* des lobes thymiques fœtaux. Ces cultures organotypiques de thymus fœtal (FTOC) permettent d'observer et de manipuler *in vitro* la maturation et la sélection des thymocytes. On réalise des cultures organotypiques de lobes thymiques fœtaux de souris **TcRtg**

β2m$^{+/-}$ et de souris **TcRtg β2m**$^{-/-}$**,** en ajoutant ou non à ces cultures le peptide pOVA. Après 7 jours de culture, les lobes sont récupérés et broyés pour en extraire les thymocytes. Un marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 est réalisé sur les thymocytes extraits de ces cultures organotypiques (**Figure 2**).

Les mêmes cultures sont réalisées en présence de concentrations différentes du peptide pOVA. On mesure les nombres de thymocytes $CD4^+CD8^+$ récupérés à l'issue des 7 jours de culture en fixant arbitrairement à 1 les nombres de cellules observés dans les cultures en absence de peptide ajouté (**Figure 3**).

Question 2. Analysez l'ensemble de ces résultats. A quel processus est due la diminution du nombre de cellules DP ? Explicitez en particulier ce qui se produit dans les lobes TcRtg β2m$^{-/-}$*.*

Figure 2 :

Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg β2m$^{+/-}$ (+/- lobes) et de souris TcRtg β2m$^{-/-}$ (-/- lobes) avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8.

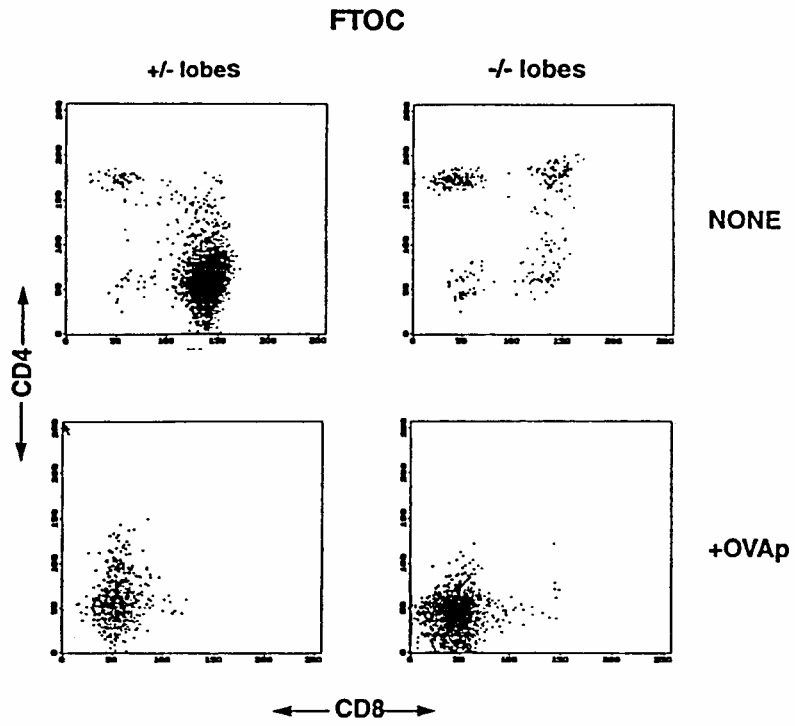
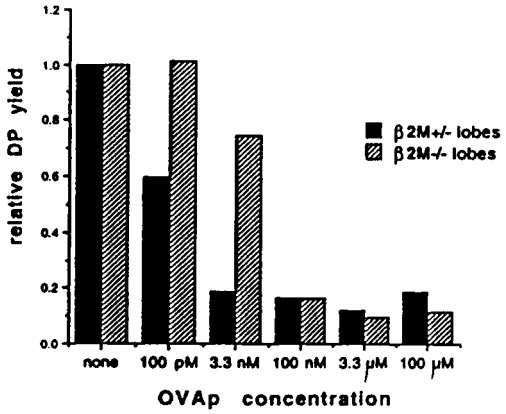


Figure 3 :

Nombre de cellules DP (CD4+CD8+) dans les lobes thymiques de souris TcRtg β2m$^{+/-}$ (β2m+/- lobes) et de souris TcRtg β2m$^{-/-}$ (β2m-/- lobes) cultivés en présence de concentrations croissantes de pOVA.



3) On réalise des expériences similaires en ajoutant, au lieu de pOVA, aux cultures organotypiques, deux autres peptides tous deux capables de se fixer sur K^b avec la même affinité que le peptide pOVA :

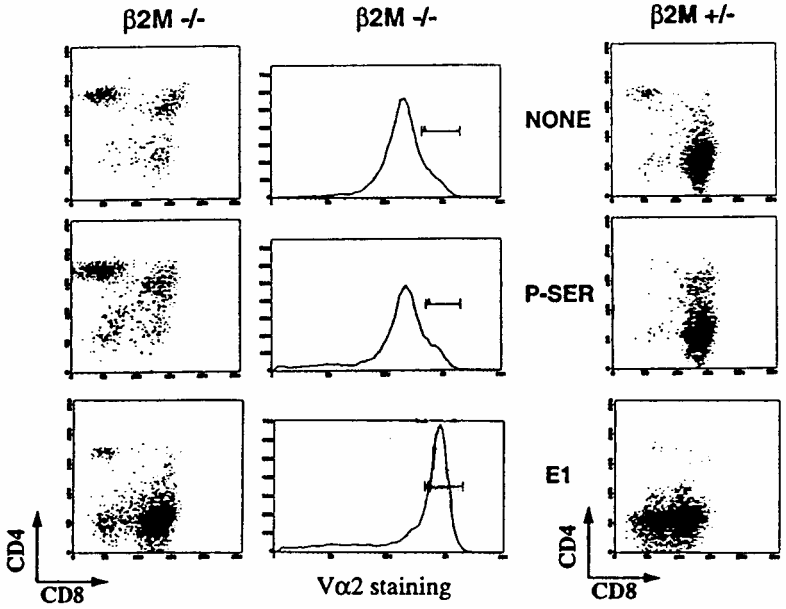
P-SER (S S Y S Y S S L) n'est jamais reconnu par le TcR transgénique.

E1 (E I I N F E K L) est un variant du peptide pOVA (S I I N F E K L).

Le résultat du marquage des thymocytes extraits des cultures organotypiques est montré à la **Figure 4** :

Figure 4 :

Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ (β2M +/-) et de souris TcRtg $\beta 2m^{-/-}$ (β2M -/-) cultivés en absence ou en présence de 20 μM de P-SER ou E1 avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-Vβ2.

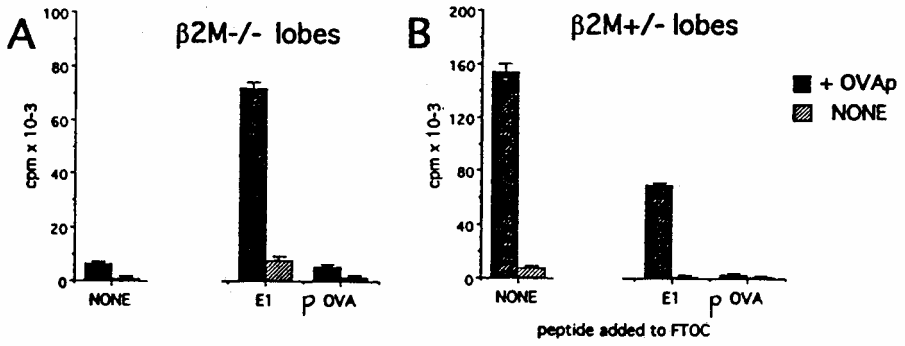


Question 3. Quels rôles jouent les peptides P-SER et E1 sur la sélection des cellules T exprimant le TcR transgénique dans les lobes des souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ et TcRtg $\beta 2m^{-/-}$?

4) Les cellules extraites des cultures organotypiques sont mises en culture *in vitro* en présence de cellules EL4 (qui expriment K^b) irradiées en absence (**NONE**) ou en présence de 10 nM du peptide pOVA (+ **OVAp**). Après 48h, on ajoute de la thymidine tritiée aux cultures et on évalue l'incorporation de thymidine tritiée 8 heures après. Les résultats sont présentés à la **Figure 5** :

Figure 5 :

Réponse des thymocytes extraits des FTOC au peptide antigénique pOVA.



Question 4. Que pouvez-vous en conclure sur les aptitudes fonctionnelles des cellules T extraites des différents types de FTOC, et pourquoi ?

5) A partir des souris TcRtg β2m+, on dérive un clone T cytotoxique spécifique du peptide pOVA présenté par H-2 K^b. Ce clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement

marquées au ^{51}Cr, et des peptides pOVA, P-SER ou E1. La lyse des cellules EL4 est évaluée par mesure du ^{51}Cr relargué dans le surnageant après 4 heures de culture. Le résultat de cette expérience est présenté en **Figure 6**.

Le même clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement marquées au ^{51}Cr et préalablement chargées avec 2 pM de pOVA, et les peptides P-SER ou E1. La **Figure 7** montre le pourcentage d'inhibition de la lyse des cellules EL4 chargées en pOVA par les différents peptides.

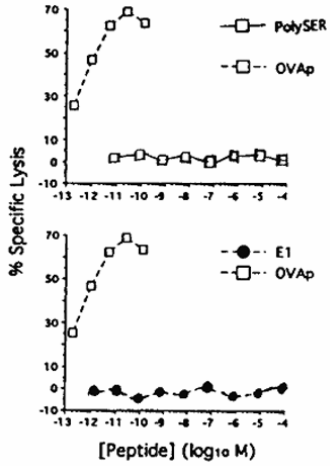


Figure 6

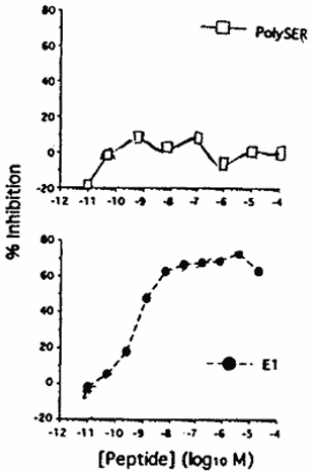


Figure 7

Question 5. Que peut-on en conclure sur les propriétés des peptides pOVA, P-SER et E1 ?

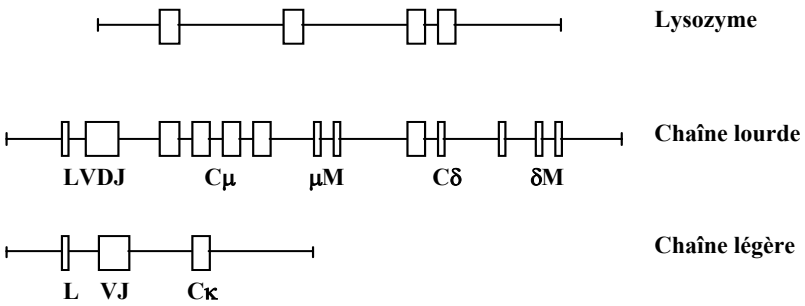
Question 6. Que suggère l'ensemble de ces résultats quant à la nature des peptides impliqués dans le processus de sélection positive dans le thymus ?

II.

(D'après Goodnow, C.C., *et al.* (1998) *Nature* 334:676 ; Adams, E., *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5687).

Trois types de souris transgéniques sont obtenus avec les transgènes présentés sur la **Figure 8** :

Figure 8



Les souris Lys-Tg possèdent le transgène lysozyme qui s'exprime de façon ubiquitaire dès le stade embryonnaire. Les souris Ig-Tg possèdent les transgènes codant les chaînes lourde et légère d'un anticorps anti-lysozyme. Les souris double-transgéniques (Dbl-Tg) possèdent l'ensemble des transgènes.

La réponse contre le lysozyme est étudiée dans des souris Lys-Tg, dans les lignées C57BL/6 (B6) ou C57BL/6 x CBA. Les souris sont immunisées avec le lysozyme seul ou le lysozyme couplé à des

globules rouges de cheval (GRC). Après immunisation, le titre anticorps anti-lysozyme est déterminé ainsi que la capacité des lymphocytes ganglionnaires à proliférer en présence de cellules présentatrices d'antigène et de lysozyme (**Tableau 1**).

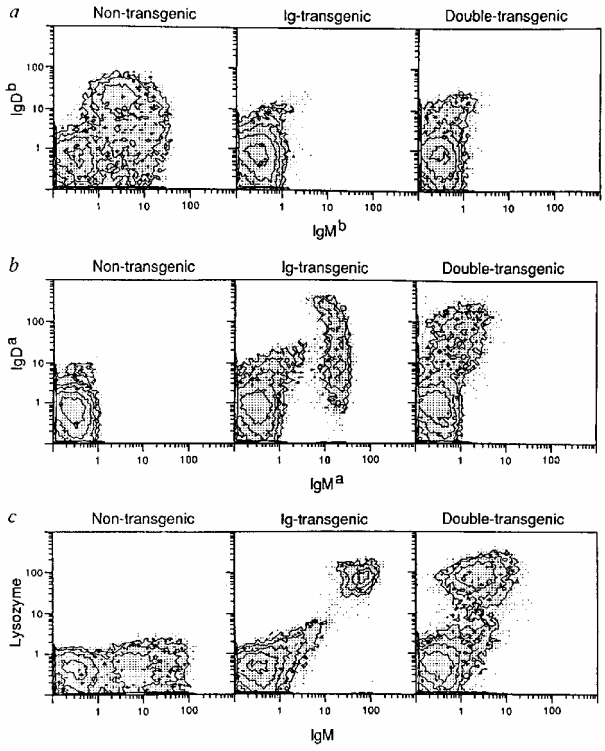
Question 1. Expliquer la différence de comportement entre les souris B6 et B6 x CBA ainsi que l'effet du transgène dans ces souris.

L'expression des transgènes d'immunoglobuline est étudiée dans les souris Ig-Tg ou Dbl-Tg par immunofluorescence sachant que les transgènes proviennent d'un hybridome issu de BALB/c (Igh^a) et que les souris B6 sont d'haplotype Igh^b.

Souris immunisées	Antigène immunisant	Titre anticorps en μg/ml	Incorporation thymidine (cpm)
B6	Lysozyme	<1	2 000
	Lysozyme-GRC	1 000	4 000
B6 Lys-Tg	Lysozyme	<1	2 200
	Lysozyme-GRC	<1	1 800
B6 x CBA	Lysozyme	1 200	40 000
	Lysozyme-GRC	1 500	48 000
B6 x CBA Lys-Tg	Lysozyme	<1	1 800
	Lysozyme-GRC	<1	1 900

Tableau 1

Figure 9



*Question 2. Analyser les résultats présentés sur la **Figure 9** qui illustre les analyses de fluorescence des cellules spléniques provenant de souris B6, transgéniques ou non.*

La sécrétion spontanée d'IgM^a ainsi que le nombre de plages de lyse anti-lysozyme sont évalués dans les souris Ig-Tg et Dbl-Tg (**Tableau 2**).

Souris	IgM^a (μg/ml)	Nombre de plages de lyse anti-lysozyme par rate
B6 Ig-Tg	40	9 450
B6 Dbl-Tg	2	<100

Tableau 2

Question 3. Ces résultats sont-ils en accord avec l'analyse d'immunofluorescence présentée à la Question 2 ? Expliquer.

Des expériences de transfert de cellules sont effectuées dans des souris receveurs B6 irradiés. 10^5 cellules spléniques de souris non-immunisées normales ou transgéniques sont transférées avec 5.10^6 cellules spléniques de souris B6 ayant été immunisées contre des globules rouges de cheval. Après immunisation avec du lysozyme-GRC, le titre sérique anti-lysozyme est déterminé dans les souris receveurs (**Tableau 3**).

Cellules transférées			
10^5 cellules	5.10^6 cellules "sensibilisées aux GRC"	Antigène lysozyme-GRC	Titres anticorps anti-lysozyme
B6	B6	-	<1
B6 Ig-Tg	B6	-	<1
B6 Dbl-Tg	B6	-	<1
B6	B6	+	<1
B6 Ig-Tg	B6	+	40
B6 Dbl-Tg	B6	+	<1

Tableau 3

Question 4. Quelle est la nature des cellules lymphocytaires impliquées dans la non-réponse au lysozyme des souris double-transgéniques ?