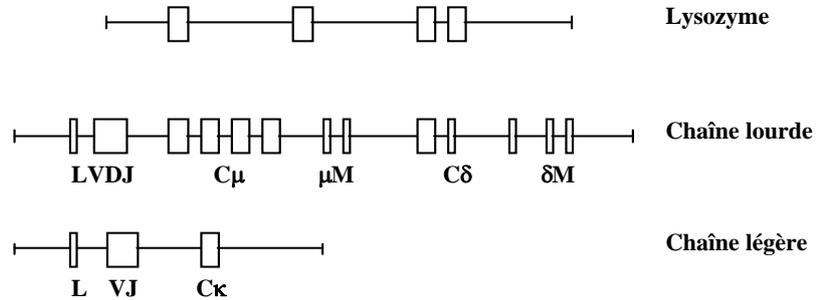


I.

(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 1** :

Figure 1



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**).

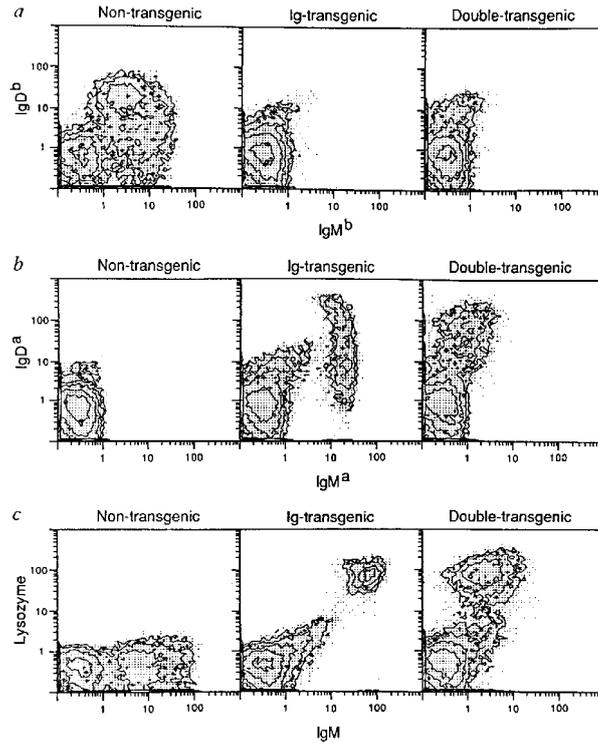
Question 1. Expliquer la différence de comportement entre les souris B6 et B6 x CBA ainsi que l'effet du transgène dans ces souris.

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 μ g/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 2



Question 2. Analyser les résultats présentés sur la **Figure 2** 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. 10⁵ cellules spléniques de souris non-immunisées normales ou transgéniques sont transférées avec 5.10⁶ 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		Antigène lysozyme-GRC	Titres anticorps anti-lysozyme
10 ⁵ cellules	5.10 ⁶ cellules "sensibilisées aux GRC"		
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 ?

II. Immunologie Intégrative

D'après Abramson et al. (2010) Cell 140, 123-135.

Les auteurs de cette étude s'intéressent aux interactions que le facteur de transcription Aire établit avec d'autres protéines et cherchent à déterminer si ces interactions sont critiques pour la fonction assurée par Aire dans le contrôle de la tolérance immunitaire.

Pour rappel, la protéine Aire induit l'expression ectopique d'une batterie d'antigènes du soi, normalement exprimés par les tissus périphériques, dans les cellules épithéliales corticales thymiques.

Question 1. Rappelez brièvement pourquoi l'expression de ces antigènes du soi dans le thymus est importante pour l'établissement de la tolérance immunitaire.

Question 2. Quelles sont les conséquences d'un défaut d'expression de Aire ?

Jusqu'alors les mécanismes par lesquels Aire induit l'expression ectopique de ces antigènes du soi demeurent largement inconnus. Dans cette étude, les auteurs réalisent, dans un premier temps, des expériences d'immunoprécipitation de Aire dans des conditions qui permettent de coprécipiter les protéines partenaires de Aire (Figure 3A). Après SDS-PAGE, les bandes de protéines coprécipitées avec Aire sont excisées et analysées par spectrométrie de masse. L'analyse des séquences de peptides obtenues pour les bandes protéiques analysées permet alors d'identifier ces protéines (Figure 3B). Sur la base de ces informations, un réseau d'interactions protéiques autour de Aire est construit (Figure 3C).

Question 3. Analysez les résultats présentés sur la Figure 3A et sur le tableau de la Figure 3B.

Question 4. Que révèle le réseau construit sur la Figure 3C ?

Question 5. Proposez deux démarches expérimentales pour tester l'implication effective des différentes protéines mises en évidence sur la Figure 3 en association avec Aire dans la régulation de la tolérance immunitaire ?

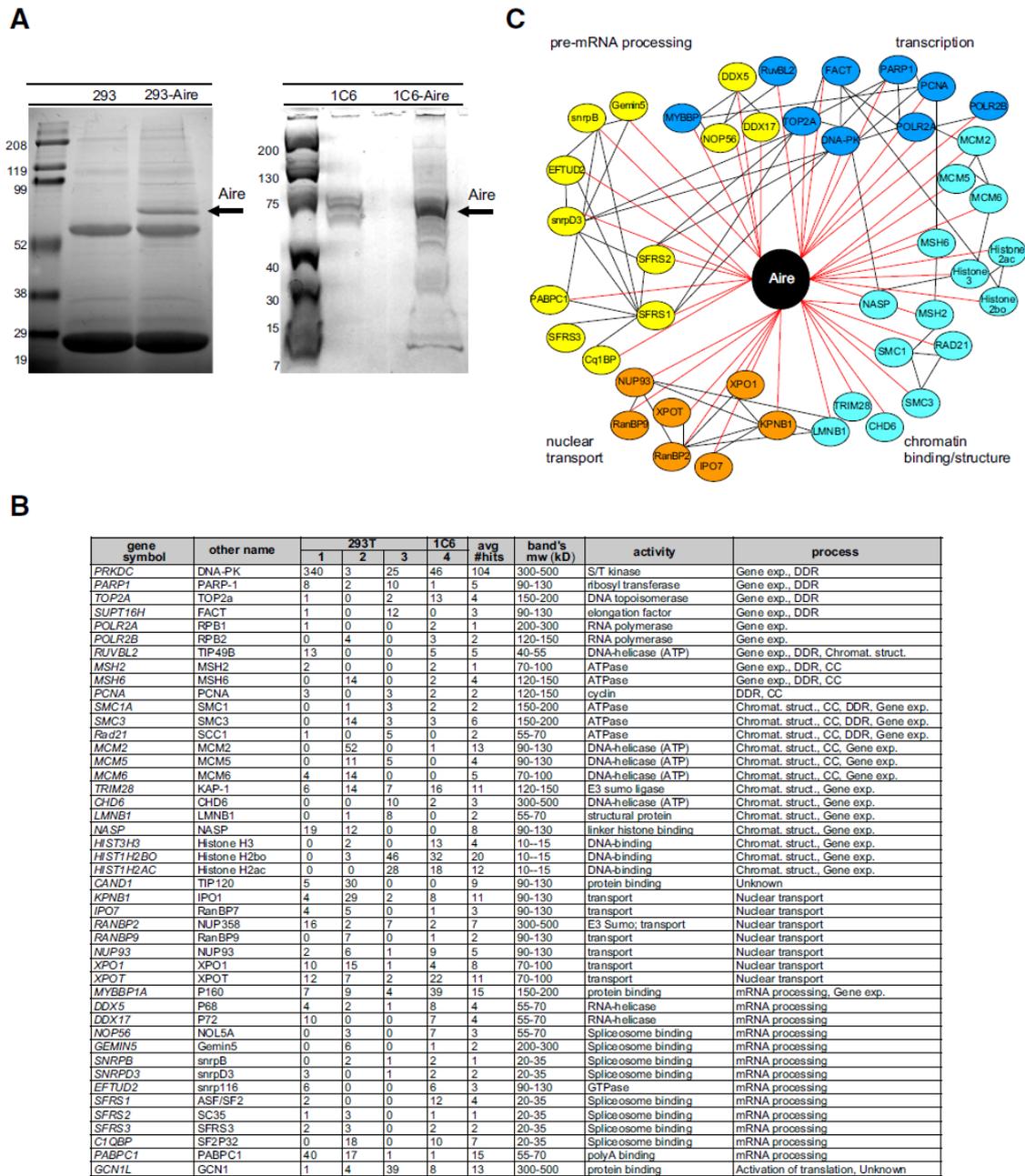


Figure 3 : (A) Des lysats nucléaires de cellules exprimant Aire (293-Aire & 1C6-Aire) ou de cellules contrôle n'exprimant pas Aire (293 & 1C6) ont été immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre Aire. Les complexes protéiques ont ensuite été élués, séparés sur gel SDS-PAGE et colorés. Des bandes protéiques d'intérêt ont été excisées pour être ensuite analysées par spectrométrie de masse. (B) Ce tableau présente la liste des protéines associées à Aire identifiées par spectrométrie de masse (colonnes *gene symbol* & *other name*). Le nombre de peptides uniques identifiés pour chaque protéine, dans chaque précipitation (283T-1/2/3 & 1C6-4), ainsi que la masse moléculaire approximative (*band's MW*) des bandes dans lesquelles ces protéines ont été identifiées, sont indiqués. Les colonnes (*activity* & *process*) indiquent la fonction ainsi que le processus biologique principal des protéines identifiées. (C) Le réseau d'interactions dans lequel Aire est impliquée est représenté sur la base des résultats précédents et après interrogation des bases de données d'interactions protéine-protéine. Les lignes rouges révèlent des protéines détectées au moins 2 fois (sur 4) en interaction avec Aire dans les expériences de précipitation. Les lignes noires indiquent des interactions connues entre protéines.

Dans une seconde expérience, les auteurs s'intéressent au niveau d'expression de différents antigènes du soi dans les cellules épithéliales corticales thymiques de souris de type sauvage, de souris déficientes pour la protéine Aire, de souris déficientes pour la protéine DNA-PK reconstituées avec des cellules de moelle osseuse de type sauvage, ou de souris déficientes pour la protéine RAG-1 également reconstituées avec des cellules de moelle osseuse de type sauvage. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.

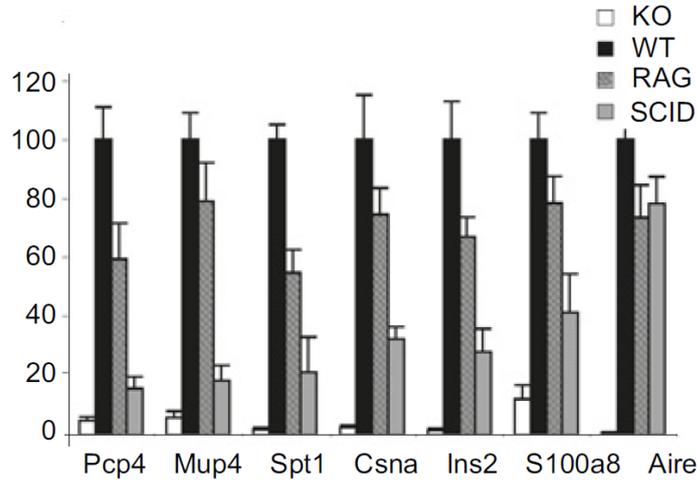


Figure 4 : L'expression de Aire ainsi que celle de six antigènes du soi (Pcp4, Mup4, Spt1, Csna, Ins2 & S100a8) est analysée par PCR quantitative à partir d'ARN extraits de cellules épithéliales corticales thymiques de souris de type sauvage (WT), ou déficientes pour Aire (KO), ou déficientes pour RAG-1 (RAG) ou DNA-PK (SCID) reconstituées avec des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage. Les résultats sont normalisés par rapport au niveau d'expression moyen pour chaque gène dans les souris WT (valeur 100).

NB : On rappelle ici que les souris *scid* sont déficientes en DNA-PK. Ce déficit entraîne, entre autres, un défaut de différenciation des lymphocytes T dans le thymus du fait de l'implication de DNA-PK dans le processus de réarrangement V(D)J.

Question 6. Pourquoi les auteurs ont-ils choisi de reconstituer en parallèle des souris déficientes pour DNA-PK et RAG-1 ?

Question 7. Analysez les résultats présentés à la Figure 4.

L'impact global de DNA-PK sur l'expression des gènes sous contrôle de Aire est évalué par analyse de transcriptome comme présenté sur la Figure 5.

Question 8. Analysez les résultats présentés à la Figure 5.

Question 9. Pourquoi ces résultats permettent-ils d'impliquer la protéine DNA-PK comme partenaire de Aire dans la régulation de la tolérance immunitaire ?

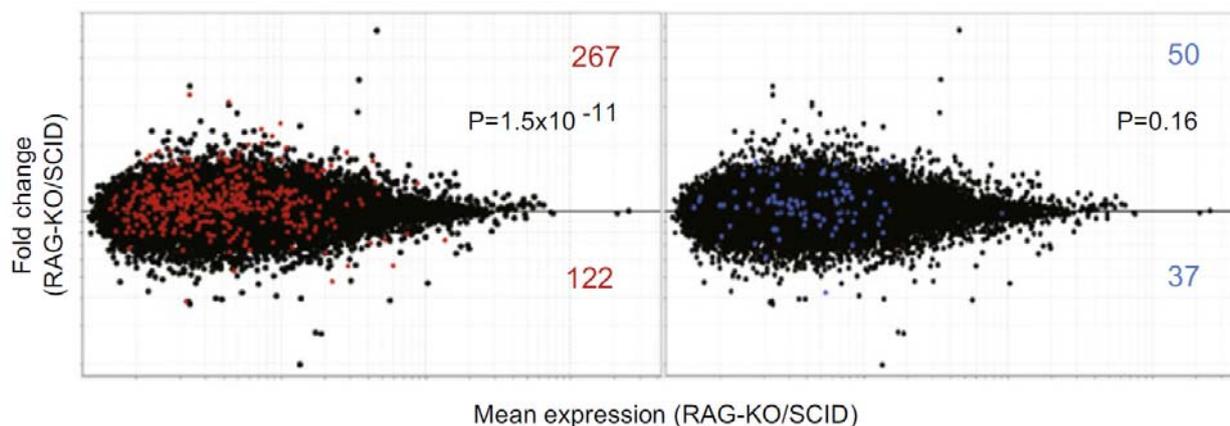


Figure 5 : L'ARN de cellules épithéliales corticales thymiques de souris de type sauvage (WT), ou déficientes pour Aire (Aire-KO), ou déficientes pour RAG-1 (RAG-KO) ou DNA-PK (SCID) reconstituées avec des cellules de moelle osseuse de souris de type sauvage, a été extrait pour une analyse de transcriptome. La figure représente, pour chaque gène analysé, la moyenne d'expression du gène entre les souris RAG-KO et SCID (Mean expression RAG-KO/SCID), en abscisses, et le ratio d'expression entre ces deux souris (Fold change RAG-KO/SCID), en ordonnées. Les points rouges (à gauche) ou bleus (à droite) indiquent les gènes sur- ou sous-exprimés (à gauche et à droite, respectivement) au moins 2 fois chez les souris WT par rapport aux souris Aire-KO. Dans chaque cadran, les nombres en haut et en bas indiquent le nombre de gènes sur- ou sous-exprimés chez les souris WT par rapport aux souris Aire-KO qui sont sur- ou sous-exprimés (en haut et en bas, respectivement) chez les souris RAG-KO par rapport aux souris SCID. Les valeurs P sont les p-value des tests χ^2 correspondants.

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

[Ce problème ne sera pas traité en séance de TD mais le corrigé est disponible en ligne]

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 V α 2 et V β 5. Les souris transgéniques ainsi obtenues sont croisées avec des souris de même haplotype, déficientes en β 2 microglobuline (β 2m^{-/-}). On obtient ainsi des souris **TcRtg β 2m^{+/-}** et des souris **TcRtg β 2m^{-/-}**. On réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V α 2 et anti-V β 5 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 6** :

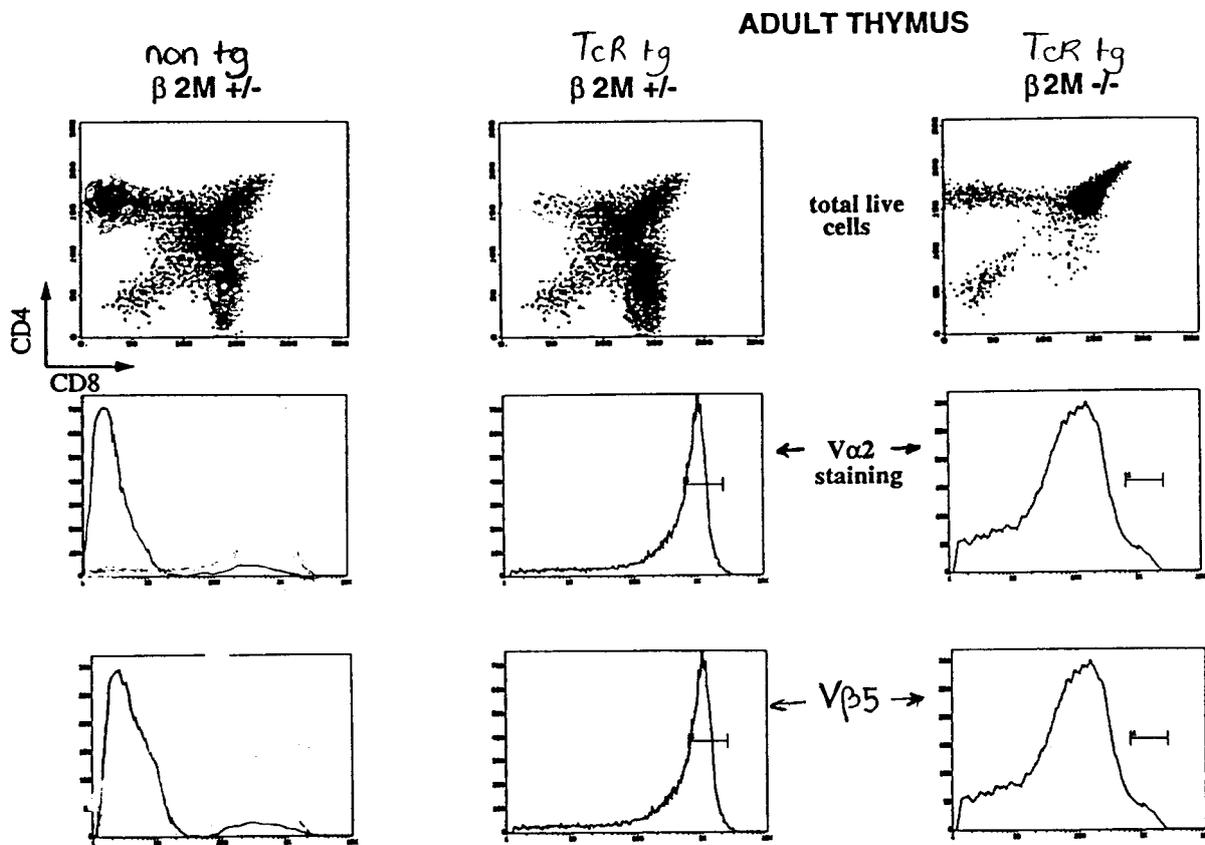


Figure 6 : Marquage des thymocytes de souris non transgéniques β 2m^{+/-} (non tg), TcRtg β 2m^{+/-} et TcRtg β 2m^{-/-} avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-V α 2 et anti-V β 5.

Question 5. 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 β 2m^{+/-}** et de souris **TcRtg β 2m^{-/-}**, 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 7**).

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 8).

Question 6. 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 7 :

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.

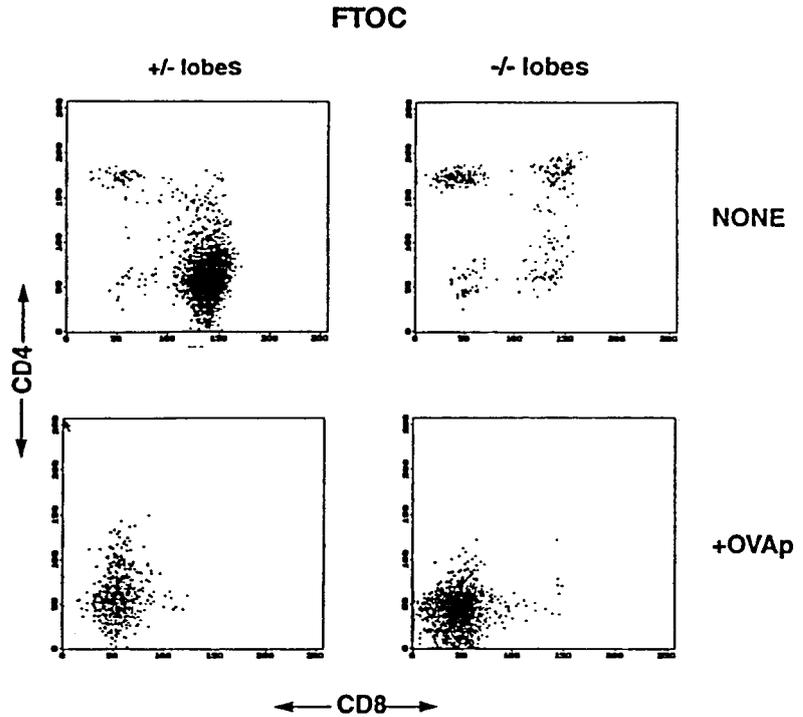
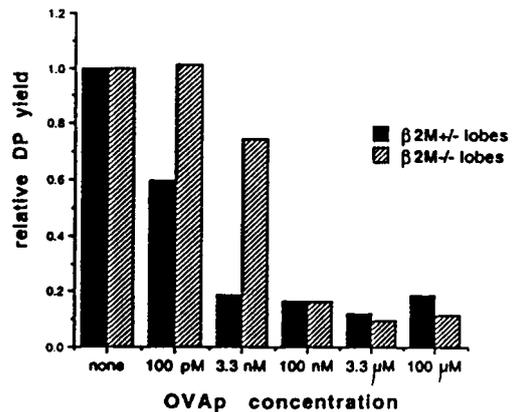


Figure 8 :

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 :

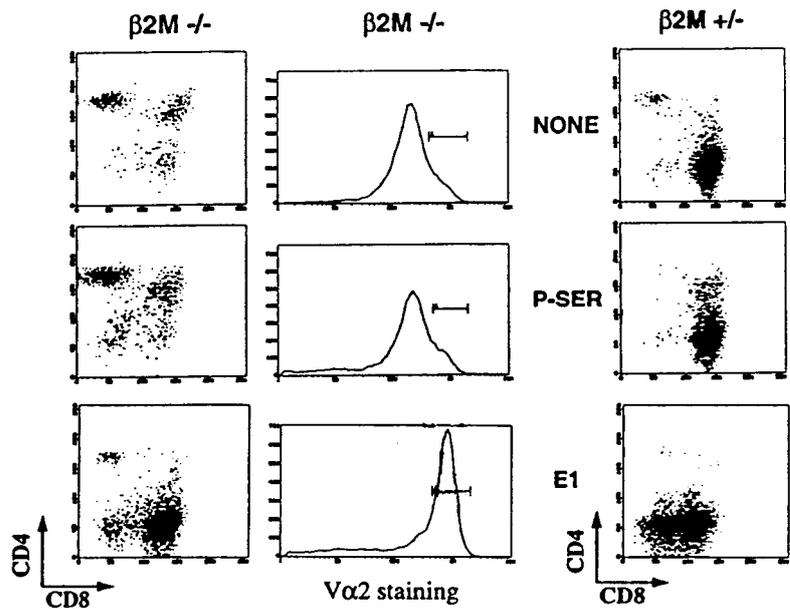
P-SER (S S Y S Y S S L) n'est jamais reconnu par le TcR transgénique.

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 9** :

Figure 9 :

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

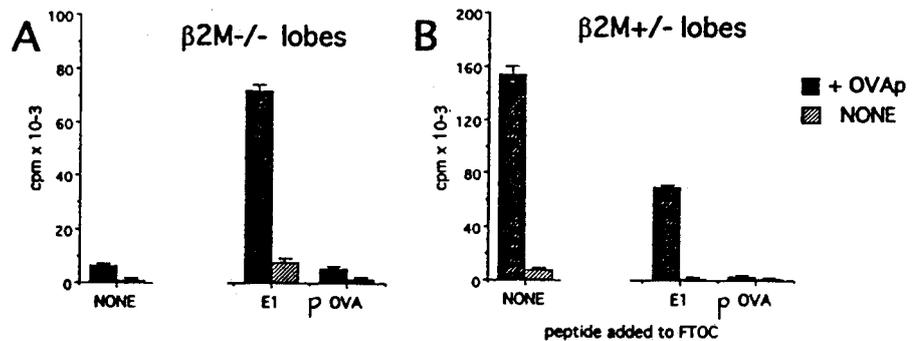


Question 7. Quels rôles jouent les peptides P-SER et E1 sur la sélection des cellules T exprimant le TcR transgénique dans les lobes des souris TcRtg $\beta 2m^{+/-}$ et TcRtg $\beta 2m^{-/-}$?

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 10** :

Figure 10 :

Réponse des thymocytes extraits des FTOC au peptide antigénique pOVA.



Question 8. 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 $\beta 2m^{+}$, 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 ⁵¹Cr, et des peptides pOVA, P-SER ou E1. La lyse des cellules EL4 est évaluée par mesure du ⁵¹Cr relargué dans le surnageant après 4 heures de culture. Le résultat de cette expérience est présenté en **Figure 11**.

Le même clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement marquées au ⁵¹Cr et préalablement chargées avec 2 pM de pOVA, et les peptides P-SER ou E1. La **Figure 12** montre le pourcentage d'inhibition de la lyse des cellules EL4 chargées en pOVA par les différents peptides.

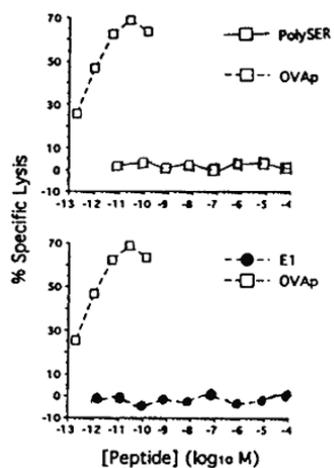


Figure 11

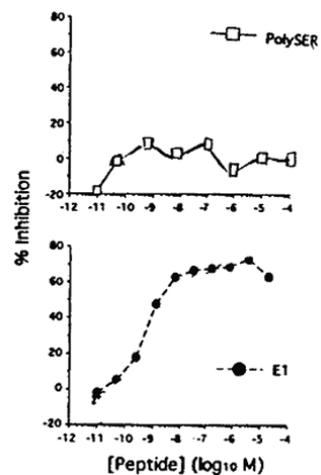


Figure 12

Question 9. Que peut-on en conclure sur les propriétés des peptides pOVA, P-SER et E1 ?

Question 10. Que suggère l'ensemble de ces résultats quant à la nature des peptides impliqués dans le processus de sélection positive dans le thymus ?