

**EXERCICE I:**

Deux mécanismes de sélection des lymphocytes T semblent agir dans le thymus. Le premier aurait pour conséquence l'élimination des clones T autoréactifs. Le deuxième, positif celui-ci, sélectionnerait un répertoire T qui a la capacité de reconnaître les antigènes étrangers seulement lorsqu'ils sont associés aux propres antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-soi).

a) Dans le but d'étudier ces deux modes de sélection du répertoire des cellules T, une lignée de souris (d'haplotype H-2<sup>b</sup>) transgéniques pour la chaîne beta du récepteur T  $\alpha, \beta$  (TcR $\alpha, \beta$ ) a été construite. L'ADN utilisé pour obtenir ces souris transgéniques code pour la chaîne beta du récepteur à l'antigène d'un clone (B6.2.16) T cytotoxique, de phénotype CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, spécifique de l'antigène mineur d'histocompatibilité H-Y (antigène présent uniquement chez les mâles) associé à l'antigène H-2D<sup>b</sup>. Cette chaîne beta utilise la région V $\beta$ 8.2 qui est décelable au moyen de l'anticorps monoclonal F23.1. Le gène V $\beta$ 8.2 est délété dans la lignée originelle de souris qui a servi à établir les lignées transgéniques.

Dans une première expérience est étudié le pourcentage de cellules Thy1<sup>+</sup>, provenant d'animaux transgéniques et d'animaux témoins de la lignée originelle pouvant proliférer en présence de cellules de mâles d'haplotype H-2<sup>b</sup>. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°1:

Origine des cellules répondeuses			
	femelles H-2 <sup>b</sup> non transgéniques	femelles H-2 <sup>b</sup> transgéniques	mâles H-2 <sup>b</sup> transgéniques
cellules spléniques irradiées de mâles H-2 <sup>b</sup>	0%	> 50%	0%

↓  
H-Y présent chez le ♂

**Question:** Expliquez pourquoi les résultats présentés dans ce tableau sont en accord avec le premier type de sélection du répertoire T; sachant que la majorité des cellules T des souris transgéniques mâles ou femelles étudiée ici utilisent la région V $\beta$ 8.2 pour leur TcR $\beta$ .

b) La même expérience que celle présentée ci-dessus est de nouveau menée mais en utilisant cette fois-ci deux sous-populations de cellules Thy.1<sup>+</sup> qui sont: Thy.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et Thy.1<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°2:

	Origine des cellules répondeuses					
	femelles H-2 <sup>b</sup> non transgéniques		femelles H-2 <sup>b</sup> transgéniques		mâles H-2 <sup>b</sup> transgéniques	
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>
cellules spléniques irradiées de mâles H-2 <sup>b</sup>	0%	0%	> 50%	0%	0%	0%

↓  
Tc

**Question:** Quelles informations supplémentaires cette analyse apporte-t-elle par rapport à la précédente. Les résultats observés sont-ils en contradiction ou non avec le phénotype connu du clone B6.2.16 utilisé comme source d'ADN pour réaliser les transgéniques.

Remarque: Il est à noter que toutes les sous-populations de cellules T étudiées dans ce tableau 2 ont la capacité de proliférer en présence de Concanavalline A (ConA) de façon identique.

c) Les résultats obtenus ci-dessus dans le tableau n°2 ont amené les auteurs à comparer chez les souris transgéniques mâles et femelles et chez les mâles non transgéniques (mais issus de la même lignée que les transgéniques) l'expression des molécules CD4, CD8 et de la région V $\beta$ 8.2 à la surface des cellules Thy.1<sup>+</sup>. Cette analyse est réalisée par

cytofluorométrie à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD4, anti-CD8 et F23.1 anti-Vβ8.2 sur des cellules de ganglions périphériques et de thymus. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n°3 et exprimés en pourcentage de cellules positives pour chacun des anticorps monoclonaux dans la population T étudiée. L'intensité de fluorescence est précisée à l'aide de \* pour certains types cellulaires.

Tableau n°3:

		<sup>mâles</sup> femelles H-2 <sup>b</sup> non transgéniques	femelles H-2 <sup>b</sup> transgéniques	mâles H-2 <sup>b</sup> transgéniques	
TcRβ (F23.1) <sup>+</sup>	a	0%	83%	82,5%	G
	b	0%	>95%	>95%	T
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	a	49,4%*	51,8%*	6,4%*	G
	b	8,5%*	9,5%*	21,6%*	T
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	a	29,4%*	28%*	27%**	G
	b	3,3%*	19,3%*	6,3%**	T
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	a	7%	8%	54%	G
	b	6%	11%	61,2%	T
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	a	NC	NC	NC	G
	b	82,2%	60,2%	10%	T

\*: Cellules possédant une quantité normale de molécules CD4 ou CD8 à leur membrane.

\*\* : Cellules possédant une très faible quantité de molécules CD8 à leur membrane.

NC: Résultats non communiqués.

a : ganglions, b : thymus.

Remarque:

- Nombre de thymocytes chez les mâles transgéniques: 13x10<sup>6</sup>
- Nombre de thymocytes chez les femelles transgéniques: 105x10<sup>6</sup>
- Nombre de thymocytes chez les mâles non transgéniques: 100x10<sup>6</sup>

**Question:** L'analyse détaillée de ces résultats permet-elle de définir le stade de maturation des thymocytes où se fait l'acquisition de la tolérance aux antigènes H-Y chez le mâle?

Les résultats présentés dans ce dernier tableau peuvent-ils aider à définir le rôle des thymocytes corticaux CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dans la maturation des cellules T?

d) Le deuxième mode de sélection est étudié dans l'expérience suivante. Une autre lignée transgénique a été construite avec la chaîne beta et la chaîne alpha du clone T cytotoxique B6.2.16 spécifique de l'antigène H-Y (voir question a). Cependant, cette lignée est d'haplotype H-2<sup>d/b</sup> de manière qu'en la croisant soit avec une lignée H-2<sup>d/d</sup>, soit avec une lignée H-2<sup>b/b</sup>, on puisse sélectionner des souris transgéniques d'haplotypes différents: H-2<sup>b/b</sup>, H-2<sup>d/d</sup> et H-2<sup>d/b</sup>. Chez les souris transgéniques femelles, on observe dans le thymus (comme dans le Tableau 3) une forte augmentation de la population CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> chez les lignées transgéniques d'haplotype H-2<sup>b/b</sup> et H-2<sup>d/b</sup> mais non chez celles d'haplotype H-2<sup>d/d</sup>.

**Question:** Ces résultats sont-ils en accord avec l'hypothèse d'une interaction des molécules du CMH présentes sur l'épithélium thymique avec le récepteur T des thymocytes immatures (et ceci en absence de l'antigène spécifique H-Y dans le cas présent)? Cette interaction a pour but de déterminer le phénotype des cellules T matures qui reconnaissent les antigènes présentés par la molécule de CMH avec laquelle ils ont interagit dans le thymus.

Note: Les réponses à chaque question ne doivent pas excéder 10 lignes.

**EXERCICE II:**

a) On dispose d'une batterie d'anticorps monoclonaux anti-allotypiques dirigés soit contre la forme allélique Igh-1<sup>a</sup>, soit contre la forme Igh-1<sup>b</sup> de l'isotype IgG2a. Ces anticorps sont utilisés pour analyser les phénotypes IgG2a d'une population naturelle de souris sauvages. On remarque que certaines d'entre elles expriment à la fois des déterminants antigéniques Igh-1<sup>a</sup> et des déterminants Igh-1<sup>b</sup> comme l'indique le tableau suivant (les souris concernées sont désignées Groupe I et Groupe II selon leur phénotype; A, B, C et D sont des anticorps dirigés contre des épitopes différents de Igh-1<sup>a</sup>; E, F, G, H sont des anticorps dirigés contre des épitopes différents de Igh-1<sup>b</sup>).

		Réactions avec les anticorps							
		Anti-Igh-1 <sup>a</sup>				Anti-Igh-1 <sup>b</sup>			
		A	B	C	D	E	F	G	H
Souris du Groupe I		+	+	-	-	-	+	+	-
Souris du Groupe II		+	+	+	+	+	+	+	+

On voit que les souris du Groupe I ne possèdent qu'une partie des déterminants Igh-1<sup>a</sup> (phénotype que l'on désignera par x) et qu'une partie des déterminants Igh-1<sup>b</sup> (phénotype que l'on désignera par y) alors que les souris du Groupe II se comportent comme ayant les phénotypes a et b.

**Question:** Comment démontrer que les phénotypes x et y chez les souris du Groupe I et les phénotypes a et b chez les souris du Groupe II correspondent à l'existence de deux formes différentes des IgG2a (c'est à dire que les molécules IgG2a réagissant avec les anticorps anti-Igh-1<sup>a</sup> sont différentes des molécules IgG2a réagissant avec les anticorps anti-Igh-1<sup>b</sup>)?

(10 lignes maximum)

b) Par croisements successifs frère-soeur, on commence à isoler une lignée consanguine (lignée alpha) à partir d'un couple du Groupe I et une lignée consanguine (lignée beta) à partir d'un couple du Groupe II. A la douzième génération on analyse les phénotypes allotypiques de quelques individus de chacune des lignées et on s'aperçoit que les individus de la lignée alpha analysés sont de phénotype  $x^+ y^+$  et les individus de la lignée beta de phénotype  $a^+ b^+$ . On les croise alors avec des souris BALB/c (phénotype  $a^+ b^-$ ). L'analyse de 100 F1 pour chaque type de croisements donne les résultats suivants:

Phénotypes

F1 (BALB/c x alpha): 45  $a^+ b^-$  55  $a^+ y^+$

F1 (BALB/c x beta): 100  $a^+ b^+$

**Question:** Quelles conclusions pouvez-vous tirer sur l'organisation des gènes IgG2a dans les lignées alpha et beta?

Comment vérifier ces conclusions par d'autres méthodes?

(10 lignes maximum)

