

I- Les auteurs des travaux présentés ci-dessous souhaitent étudier le rôle éventuel de l'expression des chaînes d'immunoglobulines (Igs) sur le contrôle des réarrangements des gènes codant pour la chaîne lourde des Igs et sur le processus de différenciation de la lignée lymphoïde B.

Différentes constructions codant pour une chaîne lourde (H) sont utilisées pour obtenir des souris transgéniques comme indiqué dans la figure 1.

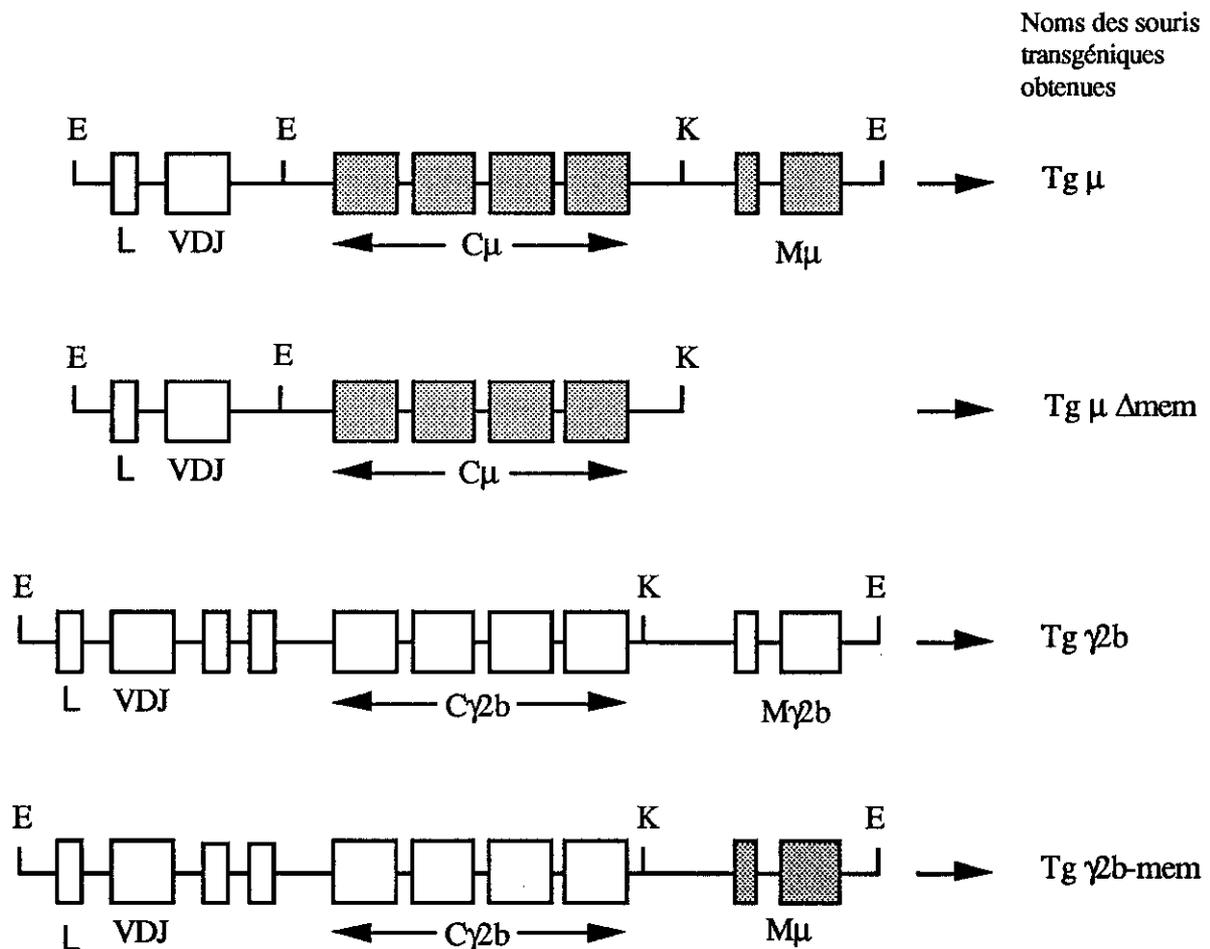


Figure 1 : Carte des transgènes. Chaque rectangle correspond à un exon (L = Leader; V= Variable; D = Diversité; J = Jonction; C = Constant; M = Membranaire). E=EcoRI, K=KpnI

Tous les transgènes proviennent d'une souris d'haplotype allotypique Igh^a et sont introduits dans des souris d'haplotype allotypique Igh^b . Trois séries d'hybridomes B sont obtenus à partir de souris normales, $Tg\mu$ et $Tg\mu \Delta mem$. Une étude de la configuration génomique est réalisée par la technique de Southern (figure 2) à l'aide des sondes décrites sur la figure 3.

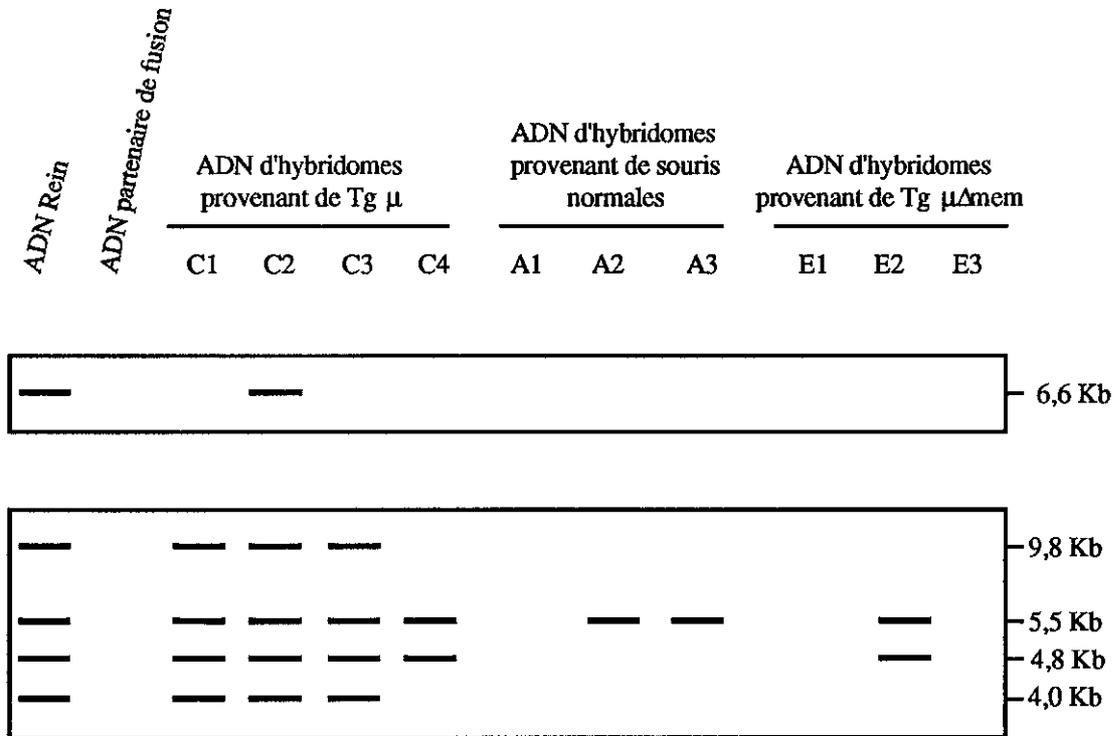


Figure 2 : Analyse de la configuration du locus Igh par la technique de Southern. Les ADN sont digérés par l'enzyme de restriction BamHI.

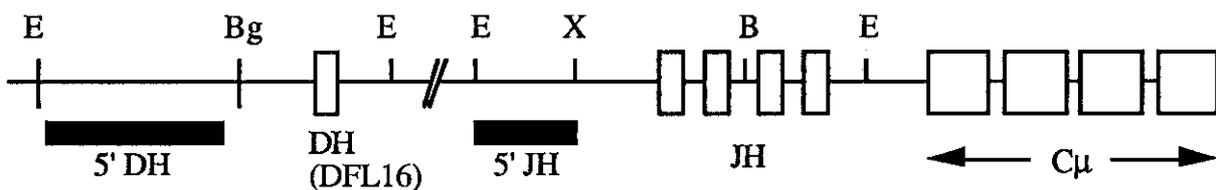


Figure 3 : Carte de restriction du locus Igh . Les rectangles noirs indiquent l'emplacement des sondes. E = EcoRI, Bg = BglII, X = XbaI, B = BamHI.

Question 1 : Donner une interprétation sur le nombre des bandes observées avec chaque sonde (2 pts).

Question 2 : Expliquer l'absence de bandes pour certaines pistes (2 pts).

Question 3 : Quel est, d'après vous, l'effet des transgènes sur les réarrangements et l'expression des gènes endogènes sachant que les hybridomes C1 et C2 d'une part, et C3 et C4 d'autre part, secrètent respectivement une IgM d'allotype a et une IgM d'allotype b et que les hybridomes de la série E secrètent simultanément des IgM d'allotypes a et b.(3 pts)

Par analyse cytofluorométrique, le pourcentage de cellules B est recherché parmi différentes souris transgéniques ou non, au sein de la population splénique.

Type de souris	Pourcentage de cellules marquées avec :				Nbre de splénocytes
	Anti- κ	Anti- μ^a	Anti- μ^b	anti- $\gamma 2b$	
Normale	56	0	54	3	51 x 10 ⁶
Tg μ	50	29	29	2	42 x 10 ⁶
Tg $\gamma 2b$	12	0	11	12	15 x 10 ⁶
Tg $\gamma 2b$ - μ mem	13	0	12	12	16 x 10 ⁶

Tableau I : Analyse des cellules de la rate des souris Tg.

Question 4 : Analyser les résultats présentés sur le Tableau I en comparant l'effet de l'expression des différents transgènes (2 pts).

Afin de préciser les rôles respectifs des transgènes μ et $\gamma 2b$ sur le développement des cellules B, les souris transgéniques Tg μ ou Tg $\gamma 2b$ sont croisées avec des souris présentant, à l'état homozygote ($\mu\mu$ -/-), une délétion des exons membranaires μ . Les cellules spléniques d'individus F2 sont analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont présentés sur la figure 4 où sont représentés des marquages par double fluorescence.

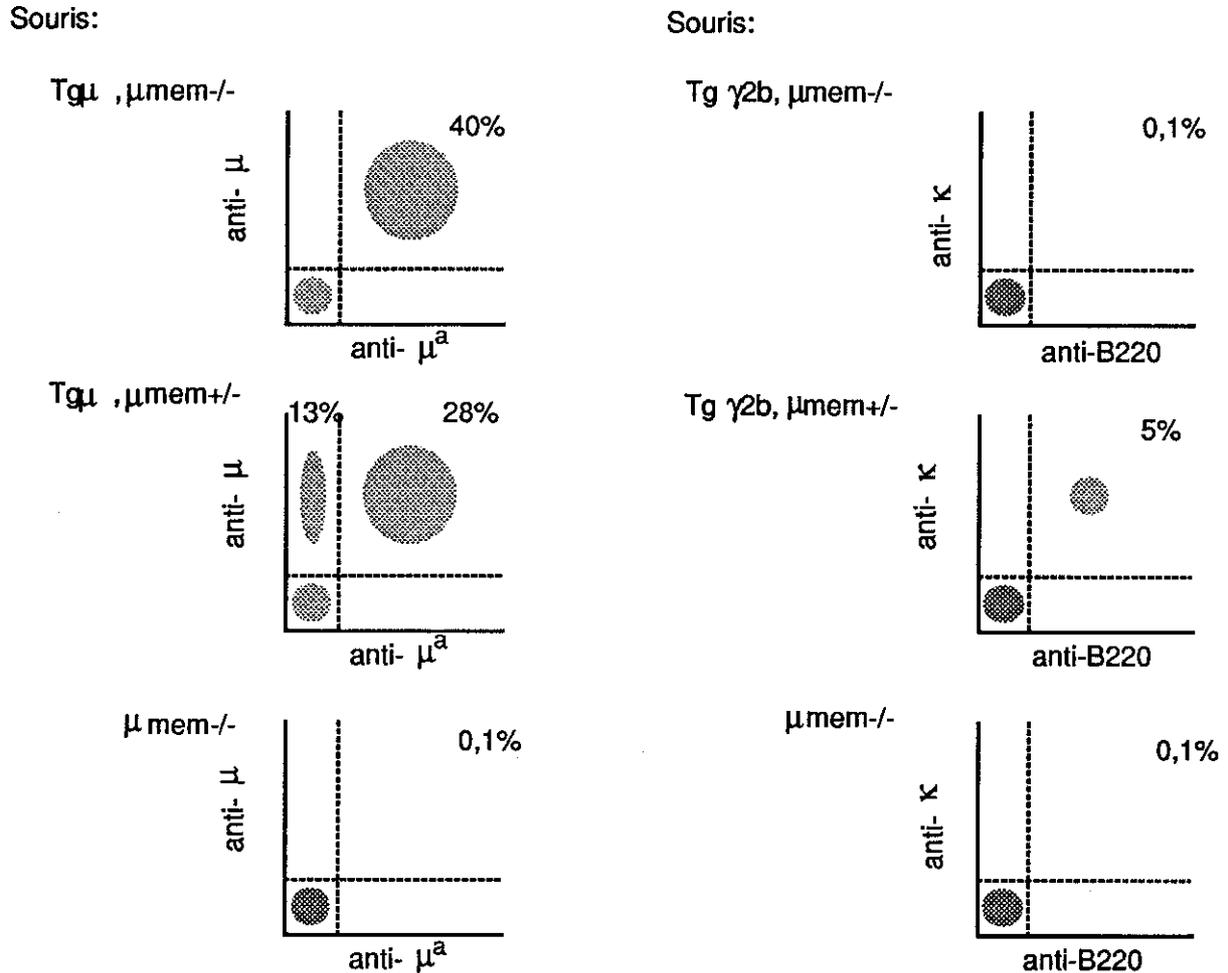


Figure 4 : Analyse cytométrique par double fluorescence des souris transgéniques présentant (-/-) ou non (+/-), à l'état homozygote, la délétion des exons membranaires μ . Les nombres indiquent les pourcentages de cellules dans le quadrant correspondant.

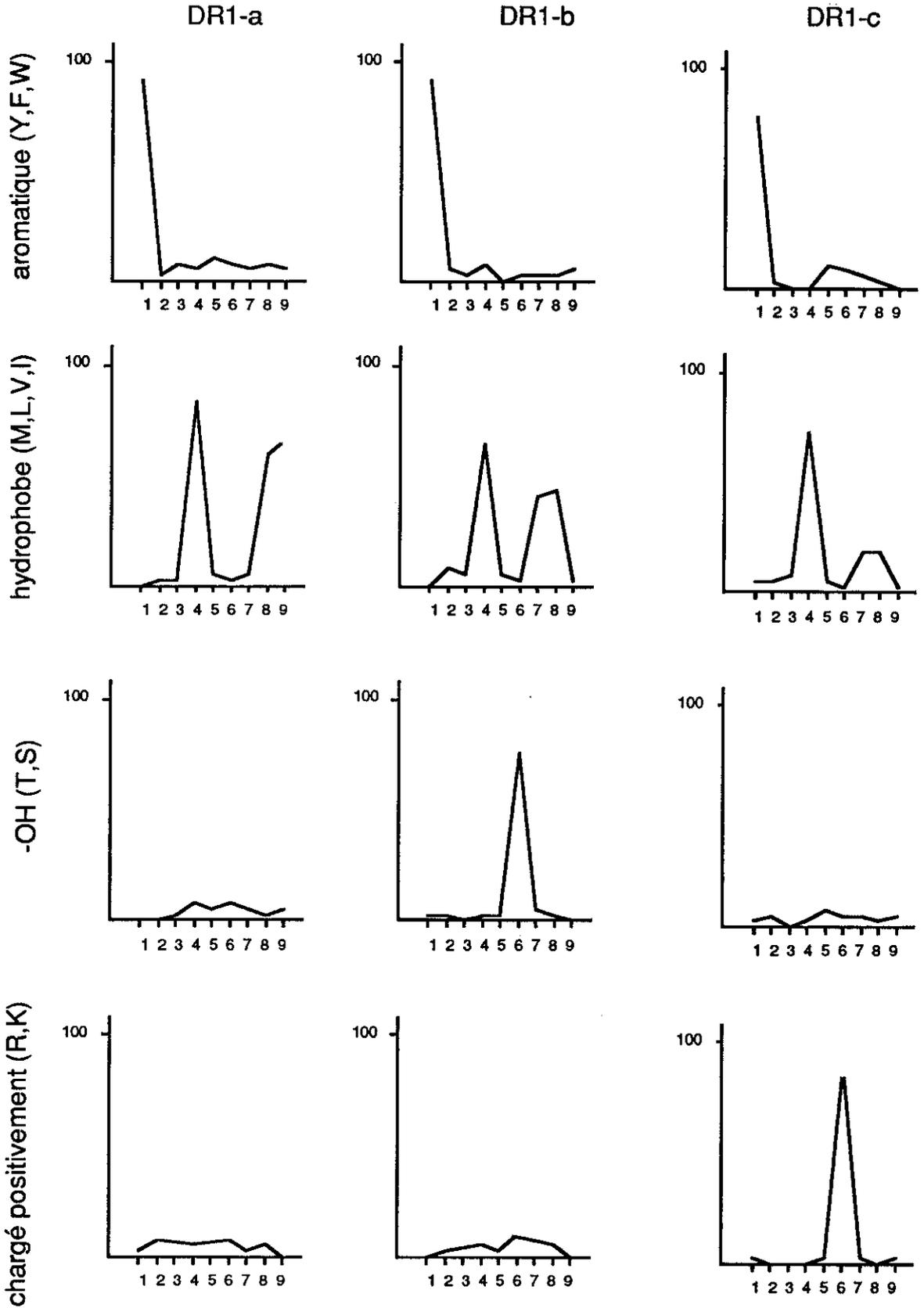
Question 5 : Analyser les résultats présentés sur la figure 5 (2 pts).

Question 6 : Imaginer une (des) hypothèse(s) permettant d'expliquer que seul le transgène μ permet d'obtenir des cellules B dans les souris $\mu m^{-/-}$ (3 pts).

II- Une banque de nonapeptides dont la séquence est aléatoire, est réalisée afin de sélectionner les peptides pouvant se combiner à trois molécules DR1 différentes (DR1-a, DR1-b et DR1-c) codées par le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Par chromatographie d'affinité, l'ensemble des peptides associés à chaque molécule DR1 est isolé. Leur composition en acides aminés est ensuite déterminée. En définissant arbitrairement la position 1 comme étant le premier résidu aromatique rencontré à partir de l'extrémité NH₂-terminale, les séquences sont alignées et les caractéristiques physicochimiques sont représentées en fonction de leur position comme il est montré sur la figure suivante.

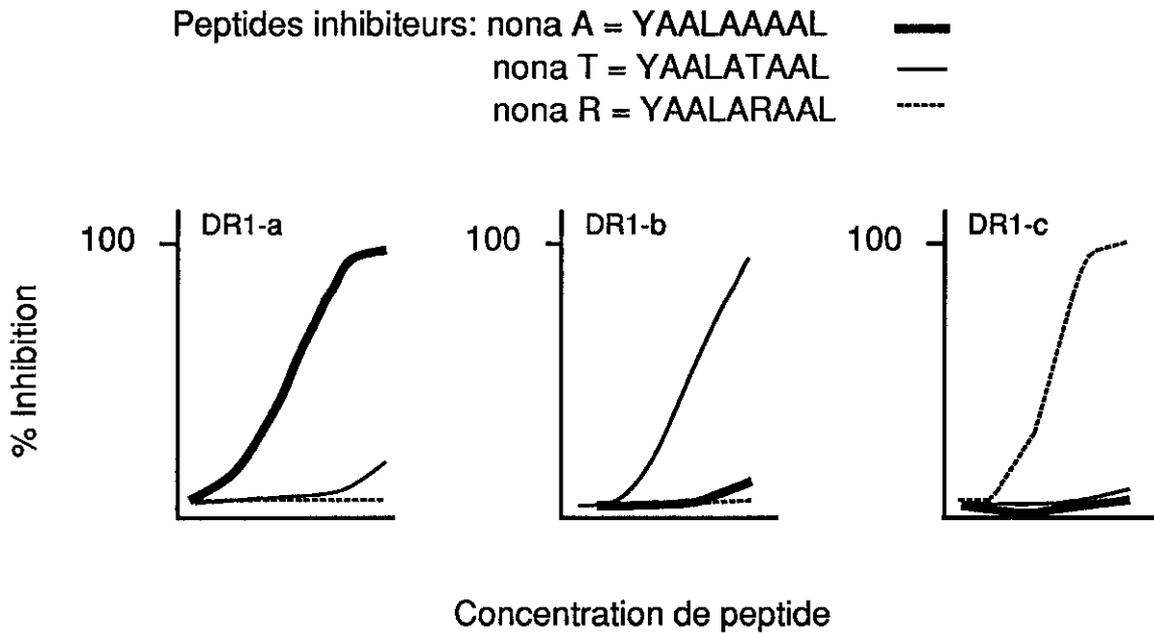
Peptides isolés sur:

% des séquences présentant un acide aminé ayant un groupe:



Position relative

D'autre part, sachant que DR1-a est capable de présenter le peptide 830-843 de la toxine tétanique (TT) et que DR1-b et DR1-c présentent le peptide 307-319 de l'hémagglutinine du virus de l'influenza (HA), des expériences de compétition sont réalisées afin d'inhiber la fixation des peptides antigéniques marqués à l'iode 125 sur la molécule DR1 correspondante. Ces fixations sont inhibées par trois nonapeptides qui ne diffèrent que par une substitution en position 6. Les résultats sont présentés sur la figure suivante.



Enfin, la capacité de stimuler les clones T (A et B) en présence de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) irradiées et de peptides est analysée par incorporation de thymidine tritiée (tableau suivant).

Clones T	CPA	Peptides ajoutés					Incorporation de thymidine (cpm)
		TT 830-843	HA 307-319	Nona A	Nona T	Nona R	
Clone 1	DR1-a	+	-	-	-	-	20000
"	"	-	+	-	-	-	100
"	"	-	-	+	-	-	100
"	"	-	-	-	+	-	100
"	"	-	-	-	-	+	100
"	"	+	-	+	-	-	100
"	"	+	-	-	+	-	22000
"	"	+	-	-	-	+	21000
Clone 2	DR1-b	+	-	-	-	-	100
"	"	-	+	-	-	-	22000
"	"	-	-	+	-	-	100
"	"	-	-	-	+	-	100
"	"	-	-	-	-	+	100
"	"	-	+	+	-	-	21000
"	"	-	+	-	+	-	100
"	"	-	+	-	-	+	22000

Question: Après avoir succinctement analysé les résultats (environ 5 lignes par expérience), proposer un schéma résumant l'interaction entre le clone 2 et la cellule DR1-b+ présentant le peptide HA 307-319 en intégrant les données de l'ensemble des expériences décrites ci-dessus (6 pts).

Remarque: A=Ala, F=Phe, I=Ile, K=Lys, L=Leu, M=Met, R=Arg, S=Ser, T=Thr, V=Val, W=Trp, Y=Tyr.