

Examen d'Immunogénétique - Juin 1997

Problème 1

1°) Les souris C57BL/6 sont d'haplotype CMH H-2^b et sont IE⁻ à cause d'un défaut dans le gène IE α qui n'est pas exprimé dans cette lignée de souris. A partir de la lignée pure de souris C57BL/6 (ou B6), on construit deux lignées de souris transgéniques. La lignée B6E α^d exprime le transgène IE α^d sous le contrôle d'un élément du promoteur des molécules de classe II du CMH. La lignée B6CD11cE α^d exprime le transgène IE α^d sous le contrôle du promoteur de la molécule CD11c qui s'exprime normalement dans toutes les cellules dendritiques chez la souris. A l'aide d'anticorps anti-CD11c et anti-IE^d couplés à des fluorochromes, on réalise un marquage sur des coupes de thymus de ces différentes souris. Les résultats de ces marquages vous sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1: Marquage des coupes de thymus avec anti-CD11c

	souris C57BL/6	souris B6E α^d	souris B6CD11cE α^d
<u>cortex:</u>			
- ϕ épithéliales	-	-	-
<u>médulla:</u>			
- ϕ épithéliales	-	-	-
- ϕ dendritiques	+	+	+

Tableau 2: Marquage des coupes de thymus avec anti-IE

	souris C57BL/6	souris B6E α^d	souris B6CD11cE α^d
<u>cortex:</u>			
- ϕ épithéliales	-	+	-
<u>médulla:</u>			
- ϕ épithéliales	-	+	-
- ϕ dendritiques	-	+	+

-Quelles sont les molécules de classe II du CMH exprimées dans ces différentes souris?

-Commentez ces résultats.

2°) Dans certaines lignées de souris qui possèdent des molécules IE, les cellules T qui expriment les segments V β 5 et V β 11 du TcR sont éliminées dans le thymus. On analyse les cellules spléniques des différentes souris avec des anticorps anti-V β 5, anti-V β 11, anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats de ces marquages vous sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Pourcentage de cellules T spléniques exprimant V β 5 et V β 11 dans les souris C57BL/6, B6E α^d et B6CD11cE α^d .

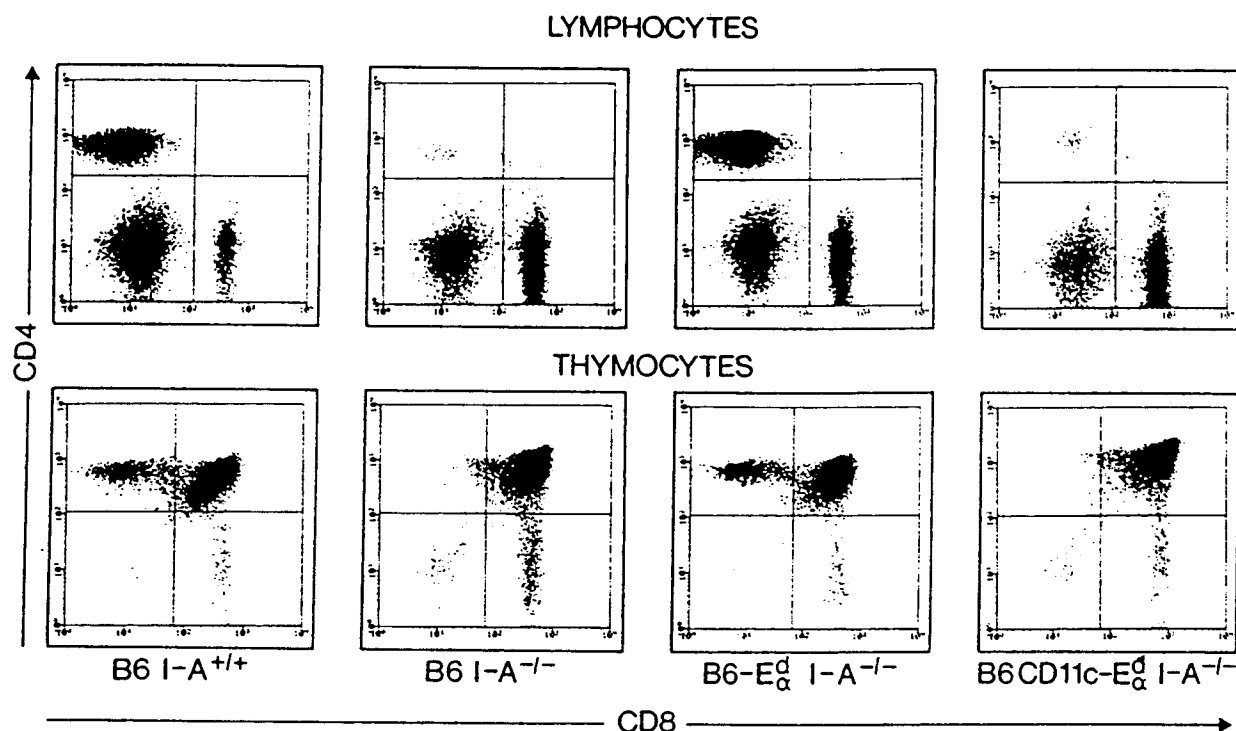
	souris C57BL/6	souris B6E α^d	souris B6CD11cE α^d
Au sein de la population CD4⁺:			
% de cellules V β 5 ⁺	4	0,6	0,7
% de cellules V β 11 ⁺	4	0,2	0,3
Au sein de la population CD8⁺:			
% de cellules V β 5 ⁺	15	1,1	1,3
% de cellules V β 11 ⁺	6	0,4	0,7

-A quoi est liée la déletion des cellules T V β 5⁺ et V β 11⁺ lorsqu'elle a lieu?

-Expliquez ces résultats. Que pouvez-vous en conclure quant aux cellules capables de réaliser la sélection négative dans le thymus?

3°) Les souris C57BL/6, B6E α^d et B6CD11cE α^d ont été croisées avec des souris IA^{-/-}. On obtient ainsi des souris B6 IA^{-/-}, B6E α^d IA^{-/-} et B6CD11cE α^d IA^{-/-} qui n'expriment pas la molécule IA de classe II du CMH. On réalise une expérience de marquage en cytométrie de flux sur les splénocytes et les thymocytes de ces souris à l'aide d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 couplés à des fluorochromes. Les résultats sont présentés en figure 1.

Figure 1: Marquage des splénocytes et les thymocytes des souris C57BL/6 (B6), B6 IA^{-/-}, B6E α^d IA^{-/-} et B6CD11cE α^d IA^{-/-} avec anti-CD4 et anti-CD8.



-Analysez ces résultats en commentant l'influence des transgènes sur la proportion de cellules T CD4⁺ dans la rate et le thymus des différentes souris.

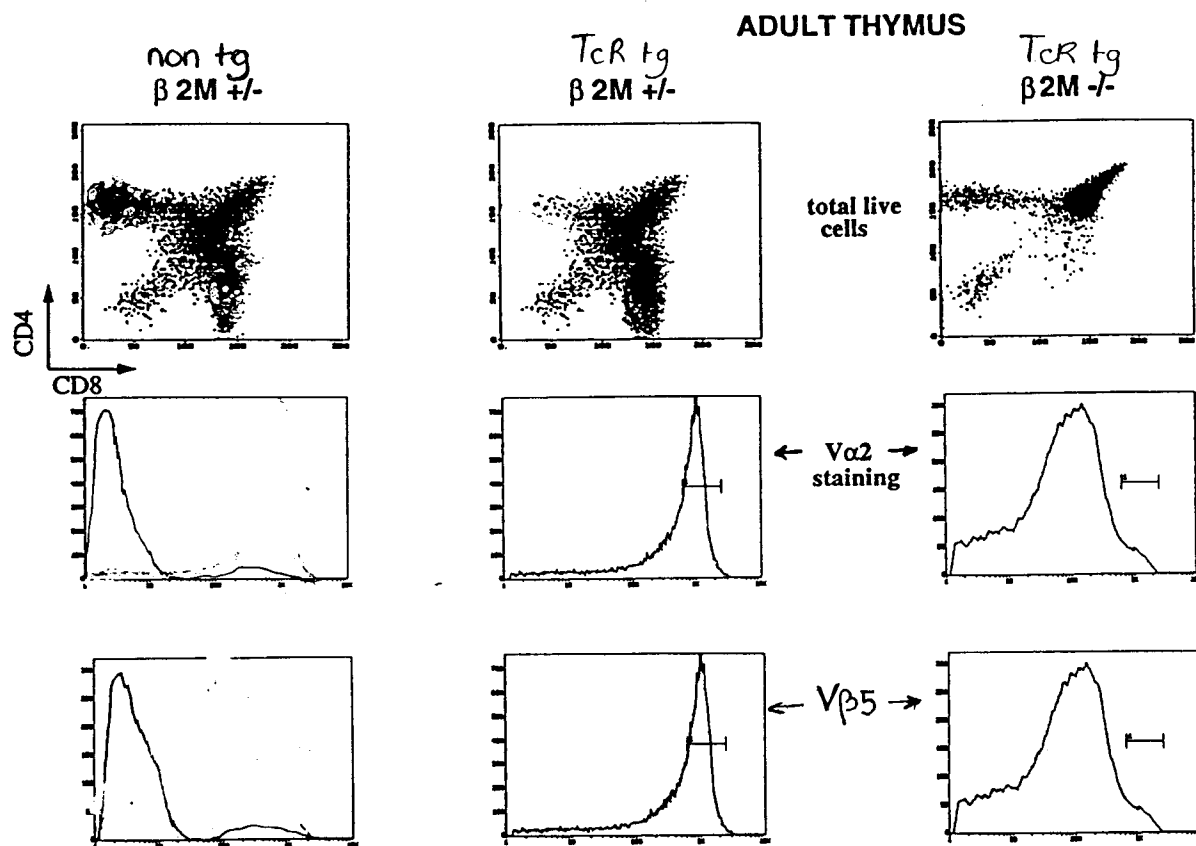
-Quelles informations concernant la sélection thymique pouvez-vous déduire de l'ensemble de ces expériences?

Problème II

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 2.

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

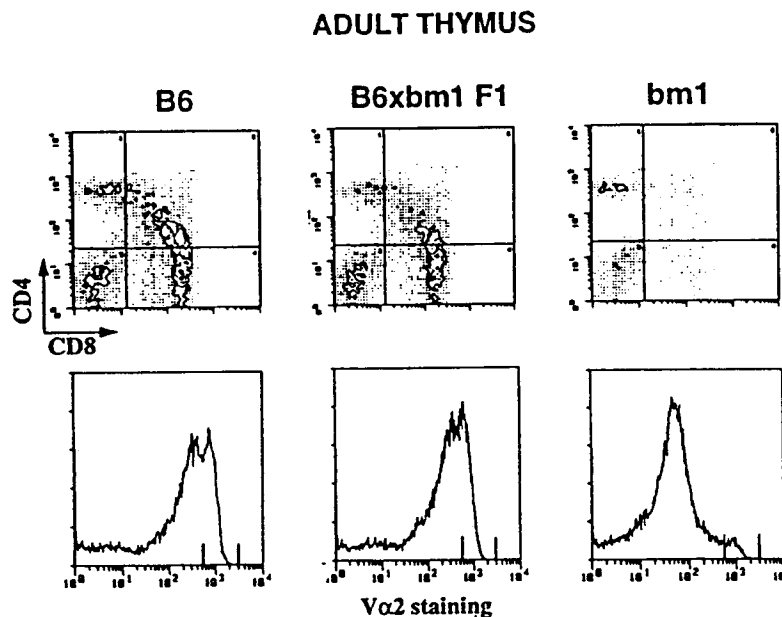


-Analysez ces résultats en comparant et en expliquant les proportions de cellules simple-positives CD8⁺ dans les thymus des différentes souris.

2°) Par croisement successifs avec des souris bm1 de d'haplotype CMH différent H-2^{bm1}, on obtient de nouvelles souris transgéniques pour le TcR appelées TcRtg bm1.

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 souris TcRtg B6, TcRtg (B6xbm1)F1et TcRtg bm1. Le résultat de cette expérience est montré en figure 3.

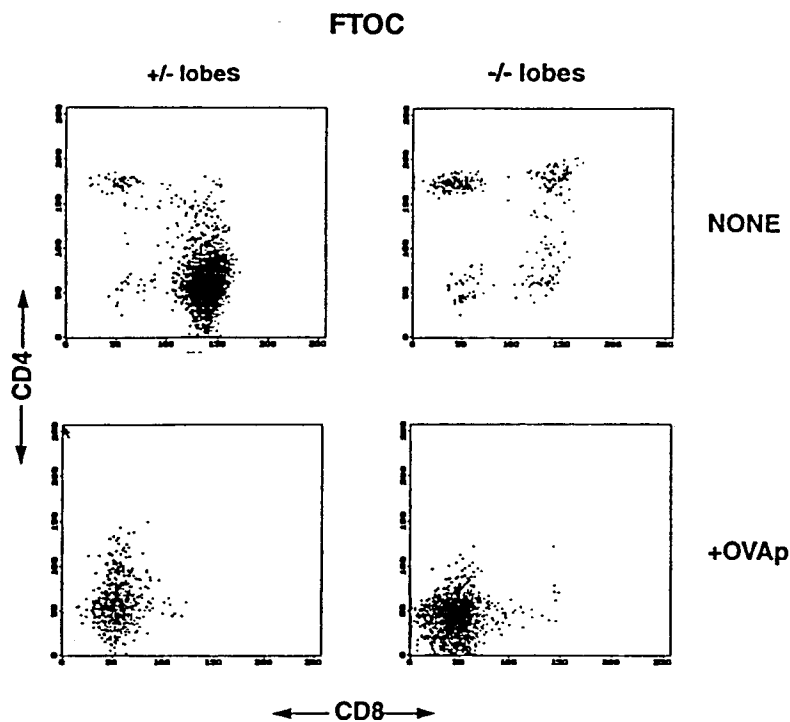
Figure 3: Marquage des thymocytes de souris TcR tg B6, TcRtg (B6xbm1)F1 et TcRtg bm1 avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-V α 2.



-Comparez les profils obtenus dans les thymocytes des différentes souris. Expliquez ce résultat.

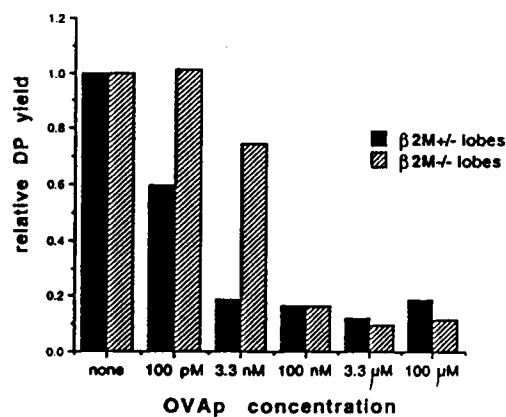
3°) On peut cultiver *in vitro* des lobes thymiques fœtaux. Ces cultures organotypiques de thymus fœtal (FTOC) permettent d'observer et de manipuler *in vitro* la maturation et la sélection des thymocytes. On réalise des cultures organotypiques de lobes thymiques fœtaux de souris TcRtg β 2m^{+/-} et 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 4).

Figure 4: Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg β 2m^{+/-} (+/- lobes) et de souris TcRtg β 2m^{-/-} (-/- lobes) avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8.



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 5)

Figure 5: Nombre de cellules DP (CD4⁺CD8⁺) dans les lobes thymiques de souris TcRtg β 2m^{+/-} (β 2m +/- lobes) et de souris TcRtg β 2m^{-/-} (β 2m -/- lobes) cultivés en présence de concentrations croissantes de pOVA.



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

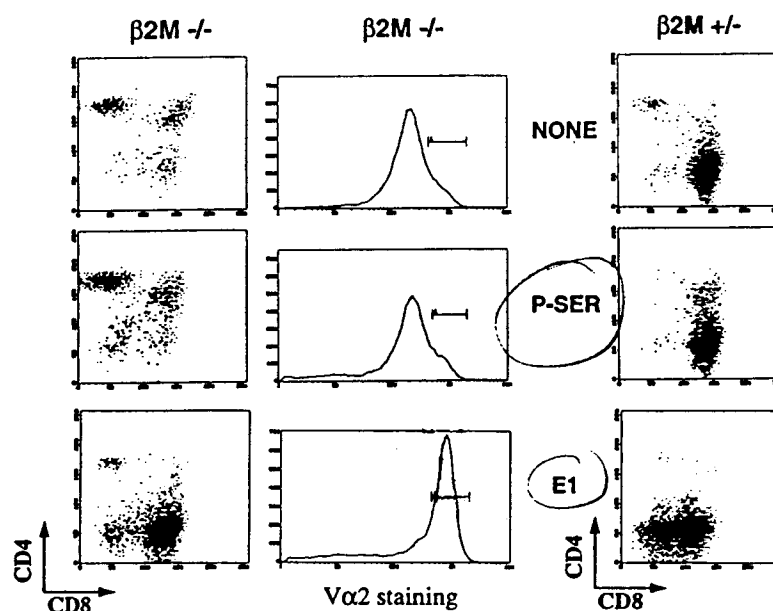
4°) On réalise des expériences similaires en ajoutant, au lieu de pOVA, aux cultures organotypiques, deux autres peptides tous deux capables de se fixer sur K^b avec la même affinité que le peptide pOVA:

P-SER: S S Y S Y S 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 en figure 6.

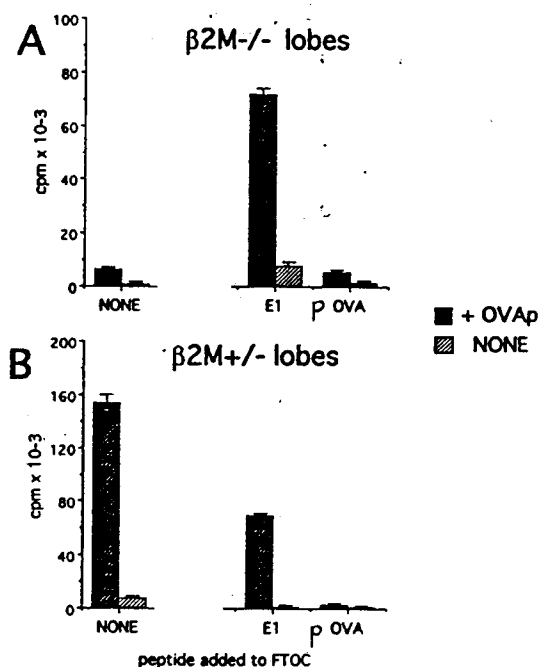
Figure 6: Marquage des thymocytes extraits des FTOC de souris TcRtg $\beta 2 m^{+/-}$ ($\beta 2 M^{+/-}$) et de souris TcRtg $\beta 2 m^{-/-}$ ($\beta 2 M^{-/-}$) cultivés en absence ou en présence de 20 μM de P-SER ou E1 avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-V $\alpha 2$.



-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 $\beta 2 m^{+/-}$ et TcRtg $\beta 2 m^{-/-}$?

5°) 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 en figure 7.

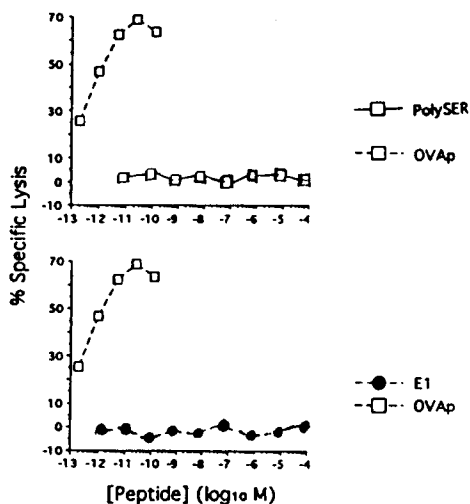
Figure 7: Réponse des thymocytes extraits des FTOC au peptide antigénique pOVA.



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

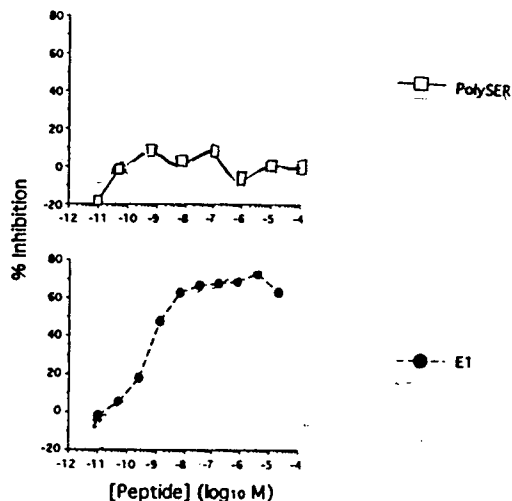
6°) A partir des souris TcRtg $\beta 2m^+$, on dérive un clone T cytotoxique spécifique du peptide pOVA présenté par H-2 K^b . Ce clone T est mis en culture en présence de cellules EL4 préalablement marquées au ^{51}Cr , et des peptides pOVA, P-SER ou E1. La lyse des cellules EL4 est évaluée par mesure du ^{51}Cr relargué dans le surnageant après 4 heures de culture. Le résultat de cette expérience est présenté en figure 8.

Figure 8



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 9 montre le pourcentage d'inhibition de la lyse des cellules EL4 chargées en pOVA par les différents peptides.

Figure 9



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

-Que suggèrent l'ensemble de ces résultats quant à la nature des peptides impliqués dans le processus de sélection positive dans le thymus?