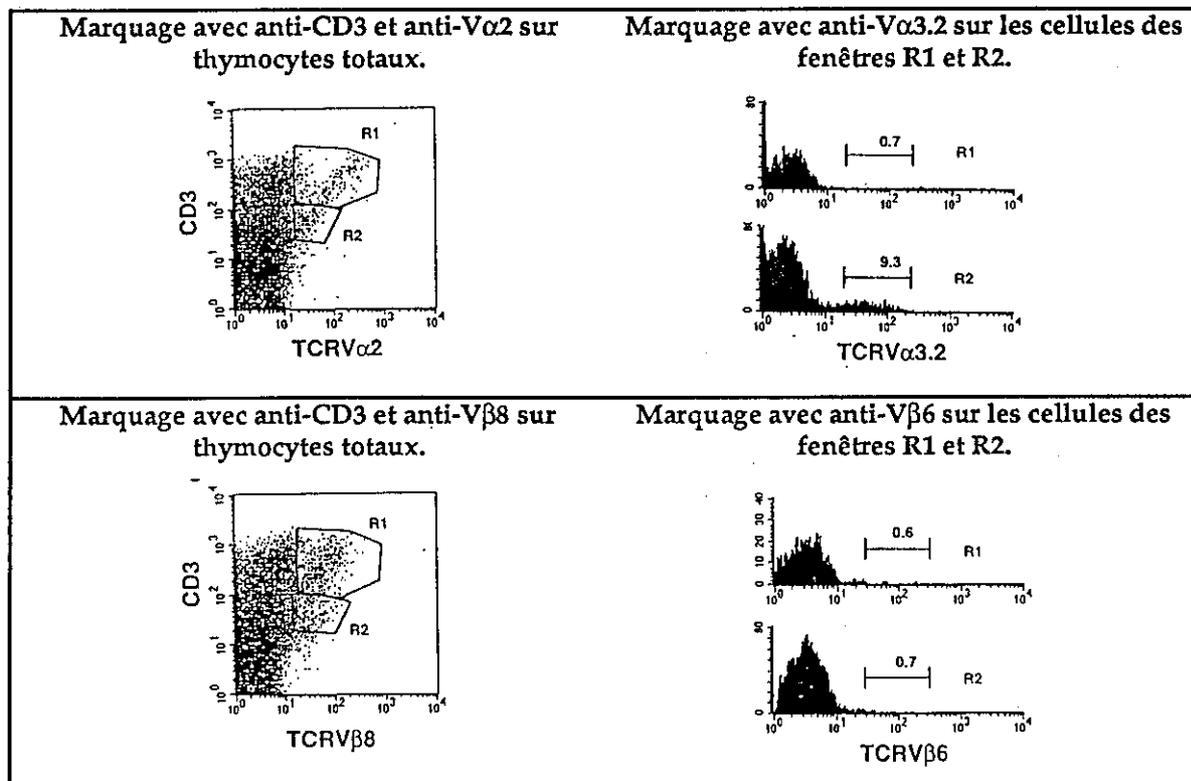


Examen d'Immunogénétique de Maîtrise Session de Septembre 1998

d'après R. Boyd et coll., The Journal of Immunology, 1998, 161:1718-1727.

On réalise un triple marquage sur des thymocytes extraits de souris normales avec des anticorps anti-CD3, anti-V α 3.2 et anti-V α 2 ou anti-CD3, anti-V β 8 et anti-V β 6 couplés à des fluorochromes. Le résultat de ce marquage est montré sur la figure 1.

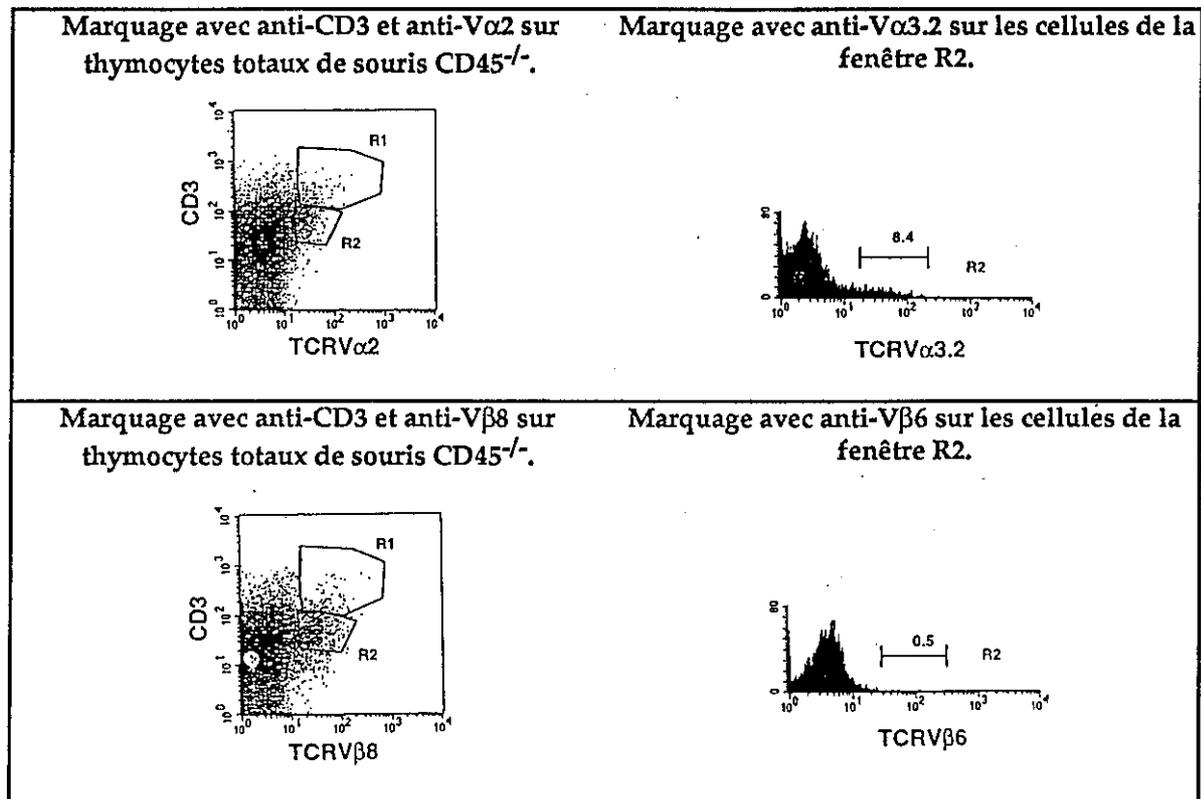
Figure 1



1°) A quelles populations cellulaires les fenêtres R1 et R2 correspondent-elles?
Commentez ce résultat.

La même expérience est réalisée sur des thymocytes de souris dans lesquelles le gène codant pour la molécule CD45 qui est une phosphatase membranaire a été inactivé par recombinaison homologue (souris CD45^{-/-}). Les résultats du marquage sont présentés sur la figure 2.

Figure 2



2°) Comparez les profils de fluorescence obtenus pour les souris normales et CD45^{-/-}.

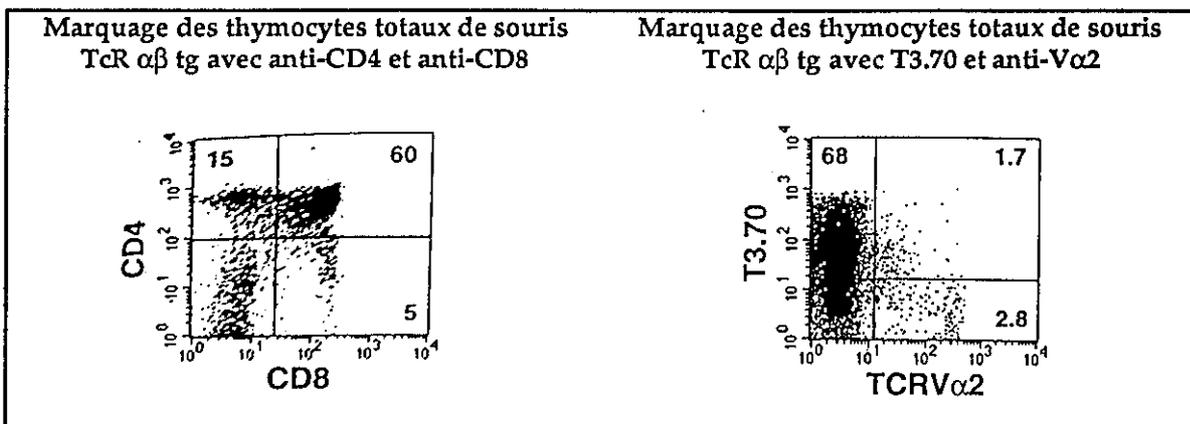
Quel est l'effet de la mutation de CD45 sur le développement des thymocytes?

On s'intéresse maintenant aux thymocytes de souris transgéniques de fond génétique H-2^d, possédant des transgènes codant pour les gènes réarrangés α et β codant pour un TcR spécifique du peptide mâle HY présenté par la molécule H-2D^b. Ces souris sont appelées TcR $\alpha\beta$ tg.

3°) Selon vous, comment s'opère la sélection des thymocytes exprimant le TcR transgénique dans ces souris H-2^dTcR $\alpha\beta$ tg?

Les thymocytes de ces souris sont marqués avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 ou anti-V α 2 et T3.70, qui reconnaît spécifiquement le produit d'expression du transgène α : V α 3J α 27. Le résultat de ce marquage est présenté en figure 3.

Figure 3.



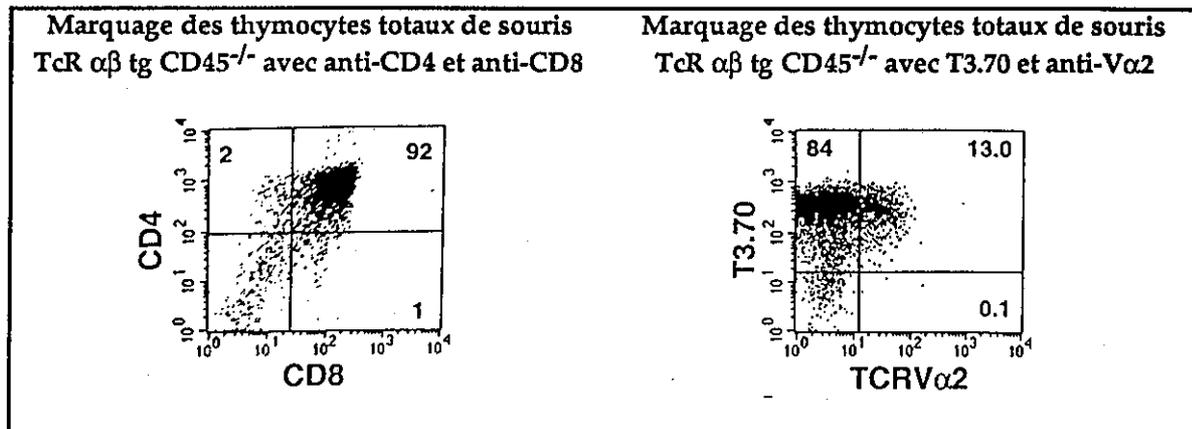
4°) 1-A quelles sous-populations correspondent les différents cadrans qui sont représentés? (les chiffres indiquent les pourcentages relatifs de chaque sous-population).

2-Commentez les pourcentages de cellules simple-positives CD4⁺ et CD8⁺ dans ces souris.

3-Que cette expérience met-elle en évidence quant au processus d'exclusion allélique?

Après croisement de ces souris double transgéniques TcR $\alpha\beta$ tg avec les souris CD45^{-/-} on obtient des souris double-transgéniques TcR $\alpha\beta$ tg CD45^{-/-}. La même expérience de marquage est réalisée sur les thymocytes extraits de ces souris. Le résultat du marquage est présenté en figure 4.

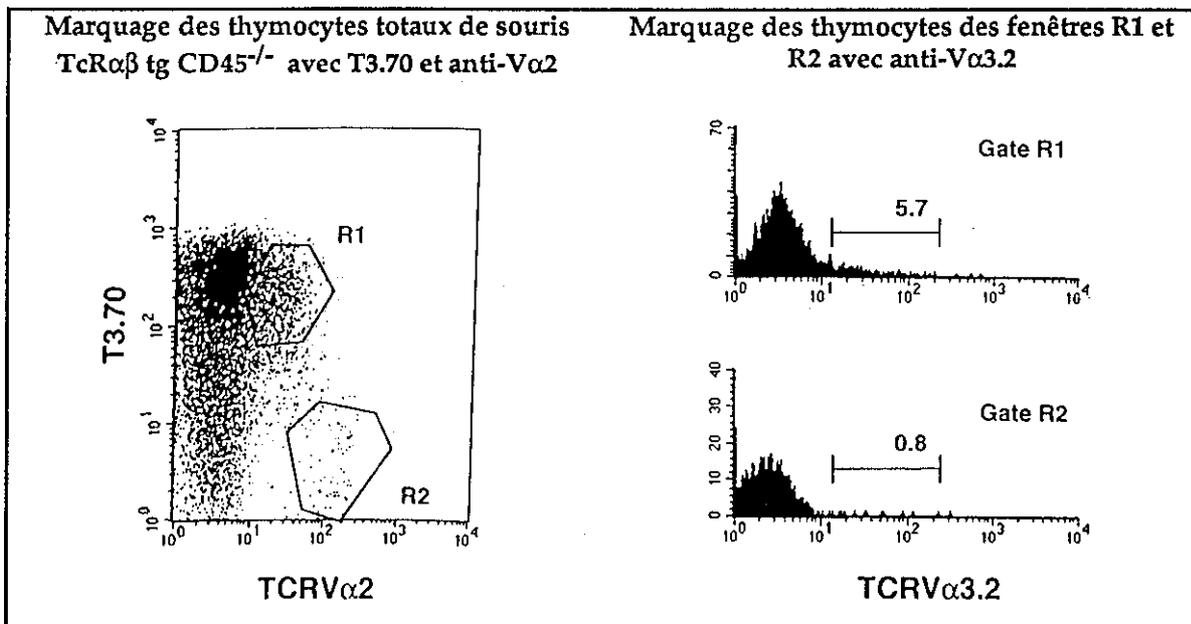
Figure 4



5°) Comparez les profils de marquage obtenus dans les souris TcR $\alpha\beta$ tg et TcR $\alpha\beta$ tg CD45^{-/-}. Que peut-on en conclure?

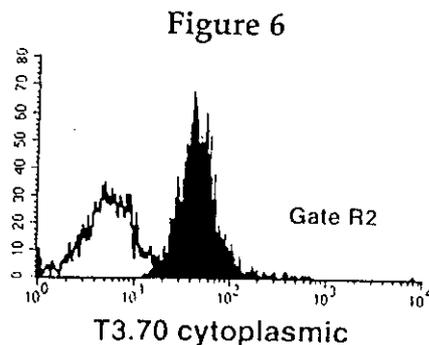
Un triple marquage est réalisé sur les thymocytes de la souris TcR $\alpha\beta$ tg CD45^{-/-} avec les anticorps anti-V α 2, anti-V α 3.2 et T3.70. La figure 5 vous montre les résultats de ce marquage.

Figure 5



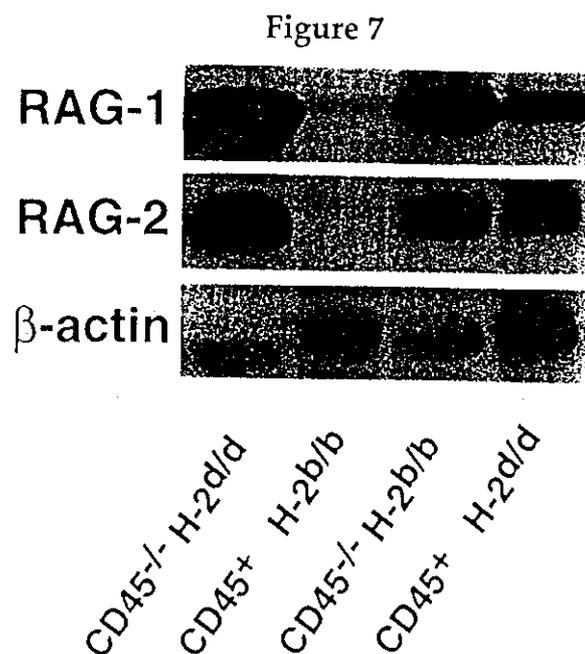
6°) Quelles sont les caractéristiques des cellules des fenêtres R1 et R2?

La figure 6 vous montre le résultat d'un marquage intracellulaire des cellules de la fenêtre R2 avec l'anticorps T3.70.



7°) Que peut-on en conclure quant au nombre et la localisation des chaînes α exprimées par les thymocytes de ces souris au cours de leur développement intrathymique? Que suggère ce résultat quant au processus d'exclusion allélique de la chaîne α ?

L'expression des gènes RAG1 et RAG2 dans les thymocytes de souris H2^{d/d} ou H-2^{b/b} et de souris est analysée par Northern Blot. Le résultat de l'autoradiographie est montré en figure 7.



8°) *A quoi l'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 semble-t-elle corrélée?*

La souris P14 tg est une souris double transgénique possédant les transgènes codant pour les chaînes α et β d'un TcR spécifique d'un peptide du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) présenté par la molécule H-2K^b. Le transgène α utilise le segment de gène V α 2. Il a été établi que dans les souris P14 tg H-2^{b/b}, les thymocytes exprimant le TcR transgénique sont sélectionnés positivement par des complexes peptide p33- H-2K^b, p33 étant un peptide du soi. La souris TAP1^{-/-} est une souris dans laquelle le gène codant pour le transporteur TAP localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique a été inactivé par recombinaison homologue. Les cellules de ces souris n'expriment pratiquement pas de molécules de classe I du CMH à leur surface. Par croisements successifs, on obtient des souris P14 tg TAP1^{-/-}.

9°) *A votre avis, comment se déroule la sélection des thymocytes exprimant le TcR transgénique P14 dans de telles souris?*

La figure 8A montre le résultat d'un double marquage avec des anticorps anti-V α 2 et anti-V α 11 couplés à des fluorochromes sur les thymocytes extraits des souris P14 tg TAP1^{-/-}. Les cellules de la fenêtre R1 sont purifiées par triage électronique, puis sont mises en culture pendant 5 jours en présence de cellules stromales thymiques d'haplotype H-2^b ou H-2^k et de 10 nM de peptide p33. A l'issue de cette culture, les thymocytes sont récupérés et soumis à une expérience de double marquage avec les anticorps anti-V α 2 et anti-V α 11. Le résultat de cette expérience est montré en figure 8B.

Figure 8A

Marquage avant tri et après tri des thymocytes de souris transgénique P14 tg TAP1^{-/-} avec des anticorps anti-V α 2 et anti-V α 11

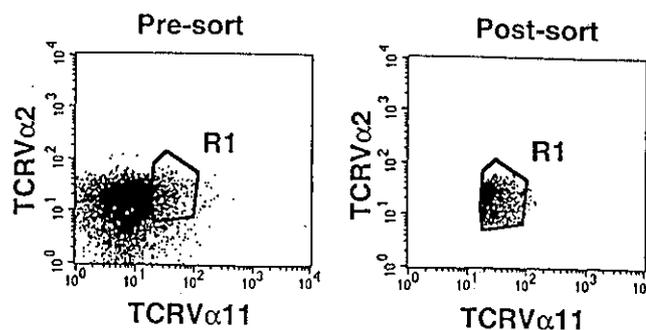
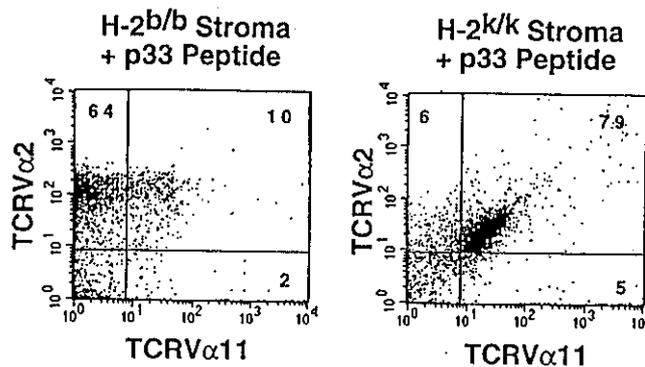


Figure 8B

Marquage des thymocytes de souris transgénique P14 tg après culture en présence de cellules stromales + peptide p33



10°) *Que peut-on conclure de cette expérience quant à l'évolution des cellules de la fenêtre R1 en fonction des différents microenvironnements?*

11°) *Résumez à l'aide d'un schéma l'ensemble des informations apportées par ces expériences concernant les relations entre les processus d'exclusion allélique au locus α du TcR, au locus β du TcR, et de sélection des thymocytes.*