

**Université Pierre et Marie Curie – Paris 6**  
**Module d'Immunogénétique (septembre 2000)**

**Durée de l'épreuve : 2 heures**

D'après Kuchroo *et al.* (1992) *J. Immunol.*, 148:3776-3782  
Kuchroo *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:4371-4382  
Waldner *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:3412-3417

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune neurodégénérative lors de laquelle la myéline du système nerveux central (CNS) subit l'attaque du système immunitaire ; les conséquences de cette attaque sont multiples et se manifestent notamment par une altération des fonctions locomotrices.

L'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) est un modèle animal de la sclérose en plaques et peut être induite au laboratoire après immunisation avec la MBP (*myelin basic protein*) ou la PLP (*myelin proteolipid protein*) ou des peptides dérivés de ces deux protéines.

On s'intéresse ici à la réponse lymphocytaire T contre le peptide PLP-139-151 encéphalitogène<sup>1</sup> chez la souris SJL (H-2<sup>s</sup>). Ce peptide, dérivé de la PLP, possède une bonne affinité pour la molécule du CMH de classe II I-A<sup>s</sup>.

Dans l'expérience qui suit, six clones T (P1, P2, P3, P4, P5 et P6) ont été établis à partir de cellules provenant de souris SJL immunisées avec le peptide PLP-139-151. Leur spécificité antigénique est testée et comparée à celle d'un clone spécifique d'un autre peptide ; les résultats sont donnés dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Spécificité antigénique des clones T P1 à P6**

Ag testé	Clone :	Incorporation de thymidine tritiée (cpm x 10 <sup>-3</sup> ) dans les clones T <sup>a</sup>						
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	SKF1.9
PLP		5,8	4,5	10,0	121,2	3,0	4,9	0,4
PLP 139-151		55,9	143,8	192,8	256,0	272,3	149,4	0,7
PLP 103-116		1,4	0,8	1,2	1,9	0,5	1,1	nd <sup>b</sup>
MBP		1,5	0,7	0,5	1,2	0,8	0,5	nd
KLH		0,8	1,0	0,6	0,7	0,9	0,7	22,1
Aucun		1,1	0,6	0,7	1,3	0,9	0,4	0,4

<sup>a</sup> 5.10<sup>4</sup> cellules du clone T ont été cultivées en présence de 5.10<sup>5</sup> cellules de rate syngéniques irradiées et d'antigène (Ag : 30µg/ml) pendant 72h ; 1 µCi de thymidine tritiée a été ajouté pendant les dernières 16h de culture. Les données présentées correspondent à la moyenne de trois répétitions. Les écarts-types ne dépassent pas 20%.

<sup>b</sup> non déterminé

- Question 1 :**
- Analysez et commentez ces résultats
  - Quelle est la spécificité du clone SKF1.9 ?
  - Comment expliquer les différences entre les clones P1 à P6 ?

---

<sup>1</sup> C'est-à-dire capable de causer une encéphalite auto-immune après immunisation.

Une analyse phénotypique révèle que les clones T P1 à P6 expriment tous à leur surface un TCR $\alpha\beta$ , les molécules CD3 et CD4 mais pas CD8.

**Question 2 : Sachant que l'on dispose d'anticorps monoclonaux anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-TCR C $\alpha$ , et anti-TCR C $\delta$ , décrivez succinctement un protocole expérimental permettant de mettre en évidence ce dernier résultat.**

On teste à nouveau la capacité d'activation des clones P1 à P6 par le peptide PLP-139-151 en présence de différents anticorps monoclonaux. Les résultats sont présentés sur le Tableau 2.

**Tableau 2 : Capacité d'activation des clones T P1 à P6 en présence d'anticorps monoclonaux**

PLP <sup>a</sup> 139-151	Anticorps	Incorporation de thymidine tritiée (cpm x 10 <sup>-3</sup> ) dans les clones T <sup>b</sup>					
		P1	P2	P3	P4	P5	P6
-	-	0,4	0,7	0,9	1,6	0,5	0,5
+	-	4,8	5,7	30,7	35,7	12,5	75,3
+	anti-CD4	0,3	12,3	0,5	0,5	4,8	46,5
+	anti-CD8	4,1	5,9	23,9	28,3	nd <sup>c</sup>	80,0
+	anti-IA <sup>s</sup>	0,9	2,0	9,6	0,8	0,9	34,0
+	anti-IA <sup>b</sup>	3,5	5,3	27,9	33,3	15,8	87,3

<sup>a</sup> "+" et "-" indiquent la présence ou l'absence d'antigène PLP-139-151, respectivement.

<sup>b</sup> 5.10<sup>4</sup> cellules du clone T ont été cultivées en présence de 5.10<sup>5</sup> cellules de rate syngéniques irradiées et d'antigène (30 $\mu$ g/ml) pendant 72h ; 1  $\mu$ Ci de thymidine tritiée a été ajouté pendant les dernières 16h de culture. Les données présentées correspondent à la moyenne de trois répétitions. Les écarts-types ne dépassent pas 20%.

<sup>c</sup> non déterminé

**Question 3 : Analysez et commentez ces résultats (on notera que la souris SJL n'exprime pas la molécule I-E du CMH de classe II)**

On teste ensuite les conséquences de l'injection de cellules des clones T caractérisés précédemment à des souris naïves syngéniques relativement à la survenue d'EAE. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Capacité d'induction de l'EAE après injection des clones T P1 à P6<sup>a</sup>**

Clone	nb de souris présentant des signes cliniques d'EAE	Jour moyen de survenue des signes cliniques
P1	3/5	11
P3	5/8	10
P6	1/5	14
P4	0/12	-
P2	0/9	-

<sup>a</sup> Après trois jours de stimulation *in vitro* avec le peptide PLP-139-151, 4 à 6.10<sup>6</sup> cellules du clones sont injectées par voie intraveineuse à des souris naïves SJL.

**Question 4 :** - Analysez et commentez ces résultats.

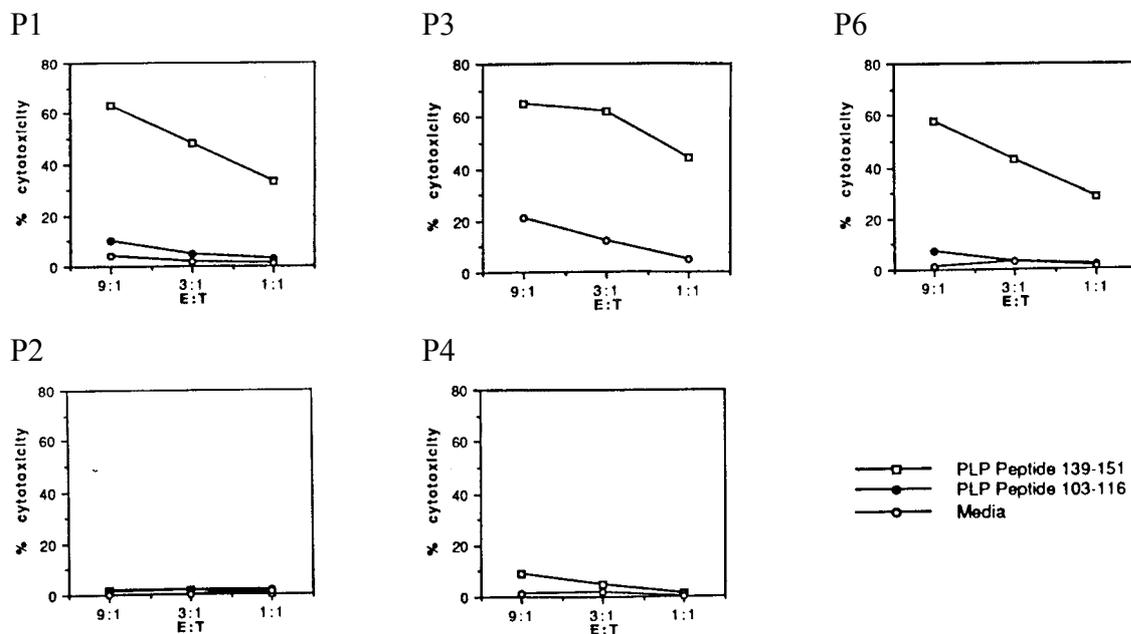
- Quel(s) mécanisme(s), sans les détailler, peut-on envisager pour expliquer l'effet de l'injection des cellules des clones P1, P3 et P6 ?

- Qu'en est-il des clones P4 et P2 ?

L'activité cytolytique *in vitro* des clones P1 à P6 est maintenant déterminée en incubant des cellules de chaque clone avec des cellules cibles I-A<sup>S+</sup>. Les cellules cibles ont été préincubées avec le peptide PLP-139-151 ou PLP-103-116, puis marquées au Cr<sup>51</sup>. Les résultats sont présentés dans la Figure 1.

**Question 5 :** Rappelez brièvement le principe du test utilisé.

**Figure 1 :** Activité cytolytique *in vitro* des clones P1 à P6



$10^4$  cellules cibles marquées (*Target*), préincubées en présence du peptide PLP-139-151 ou PLP-103-116 ou de milieu seul (media), sont incubées avec différents ratio de cellules de clone T (*Effector*) comme indiqué par le rapport (E:T). L'activité cytolytique est exprimée en pourcentage de lyse spécifique : % cytotoxicity = [(cpm de l'échantillon - cpm de relargage non-spécifique)/(cpm du relargage total - cpm de relargage non-spécifique)] x 100. Le relargage non-spécifique est mesuré lorsque les cellules sont incubées dans du milieu seul ; le relargage total est mesuré après lyse des cellules cibles par le détergent Nonidet P-40 1%.

**Question 6 :** - Analysez et commentez ces résultats.

- Ces nouveaux résultats vous permettent-ils d'étayer l'une de vos hypothèses précédentes ?

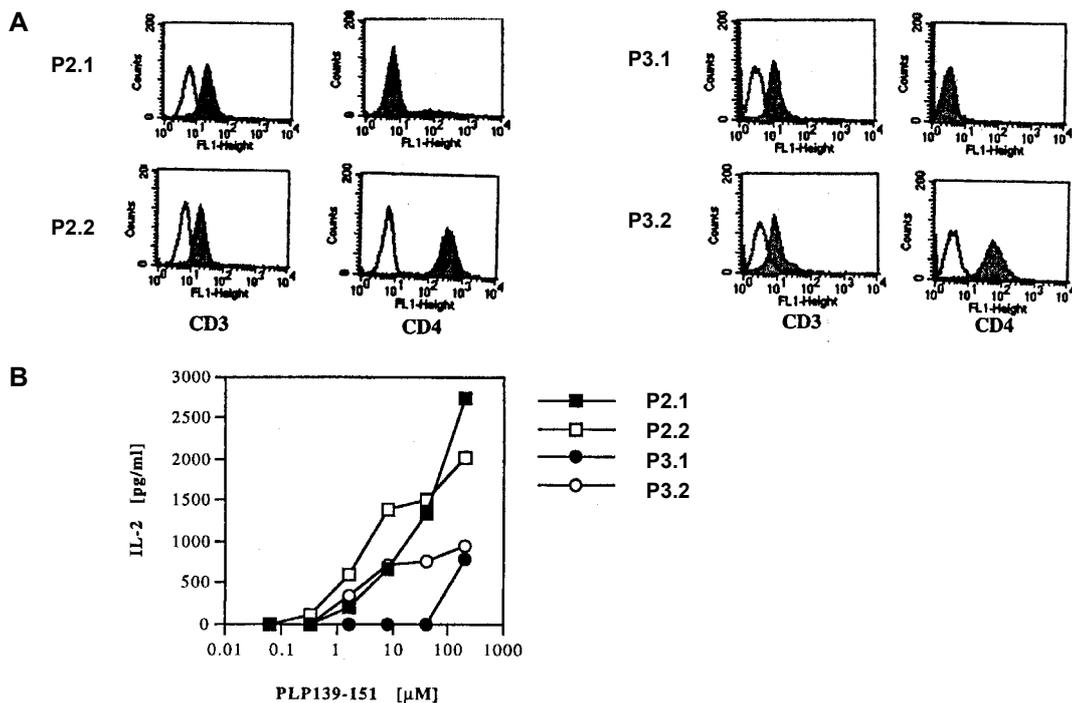
Dans une dernière série d'expériences, deux lignées de souris transgéniques sont produites comme suit : les gènes réarrangés TCR $\alpha$  et TCR $\beta$  des TCR des clones P2 (V $\alpha$ 11J $\alpha$ 12, V $\beta$ 16D $\beta$ 2J $\beta$ 2.5) et P3 (V $\alpha$ 4J $\alpha$ 8, V $\beta$ 6D $\beta$ 2J $\beta$ 2.6) ont été clonés par amplification génique à partir d'ADN génomique dans un vecteur plasmidique approprié. Cette construction a ensuite

été injectée dans le pronucleus d'ovocytes fertilisés de souris FVB/N (H2<sup>d</sup>). Après criblage pour la présence du transgène par la technique de Southern, les souris transgéniques obtenues sont croisées pendant plusieurs générations avec des souris SJL afin de réintroduire l'haplotype du CMH H-2<sup>s</sup>.

Ces mêmes constructions plasmidiques ont été également utilisées pour établir des clones T exprimant l'un ou l'autre des TCR P2 (P2.1 et P2.2) ou P3 (P3.1 et P3.2) : les constructions ont été transfectées par électroporation, avec ou sans un plasmide supplémentaire contenant le gène codant pour CD4, dans la cellule d'hybridome T 58 TCR $\alpha$ <sup>-</sup>, TCR $\beta$ <sup>-</sup>.

L'analyse phénotypique des clones P2.1, P2.2, P3.1 et P3.2 ainsi établis, de même que leur capacité d'activation, est présentée sur la Figure 2.

**Figure 2 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelle des clones transfectants P2.1, P2.2, P3.1 et P3.2**



A/ Les clones transfectants P2.1, P2.2, P3.1 et P3.2 ont été analysés par cytométrie de flux après marquage avec les anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD4 couplés au FITC (profils plein) par comparaison au marquage obtenu avec un anticorps témoin de même isotype également couplé au FITC (profils blancs).

B/ Les clones transfectants P2.1, P2.2, P3.1 et P3.2 ont été cultivés en présence de splénocytes irradiés de SJL et de concentrations croissantes de peptide PLP-139-151. La concentration d'IL-2 dans les surnageants de culture a été déterminée par ELISA.

**Question 7 : Rappelez brièvement le principe de l'ELISA et précisez comment ce test doit être mis en œuvre pour réaliser le dosage ci-dessus.**

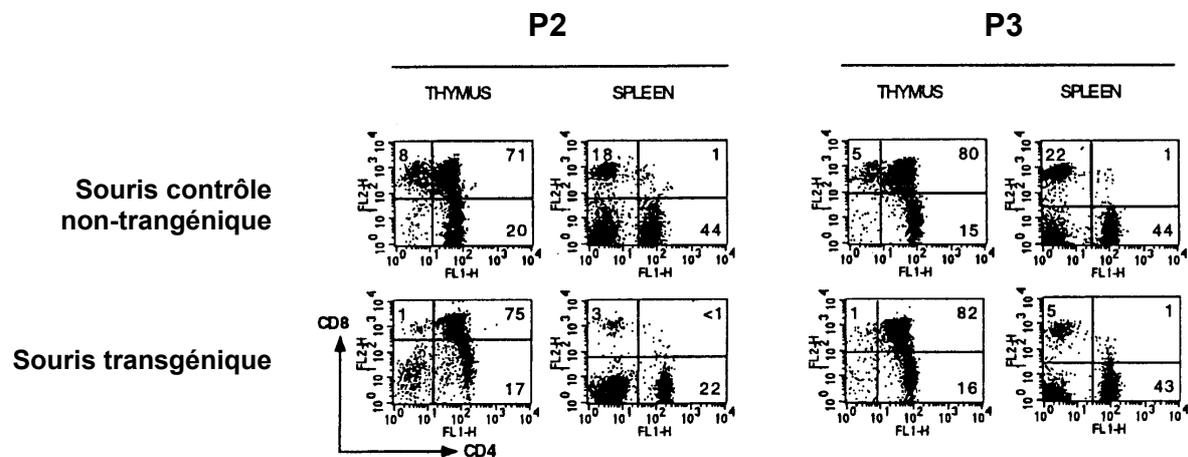
**Question 8 : Comment les résultats présentés dans la Figure 2 se rapprochent-ils des observations précédentes ?**

Les thymocytes et splénocytes des souris transgéniques pour TCR-P2 et TCR-P3 sont analysés par cytométrie de flux par double marquage avec les anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8 marqués. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

Par ailleurs, un marquage avec un anticorps anti-V $\beta$ 6 montre que plus de 98% des cellules T des souris TCR-P3 expriment V $\beta$ 6.

Enfin, on peut montrer que les cellules spléniques de souris transgéniques naïves TCR-P2 ou TCR-P3 prolifèrent vigoureusement lorsqu'elles sont incubées avec des cellules présentatrices syngéniques en présence du peptide PLP-139-151.

Figure 3 : Phénotypes des thymocytes et des splénocytes des souris transgéniques TCR-P2 et TCR-P3



Remarque : les thymus et rates des animaux transgéniques ont des tailles comparables à ceux des animaux non-transgéniques. En outre, on ne note aucune différence significative du nombre de cellules dans ces organes entre les animaux transgéniques et non-transgéniques.

**Question 9 :** Comment ces observations s'inscrivent-elles dans le schéma classique du développement et de la sélection des lymphocytes T ? Vous expliquerez notamment l'augmentation relative des cellules CD4<sup>+</sup> par rapport aux cellules CD8<sup>+</sup> dans le thymus et la rate des souris transgéniques.