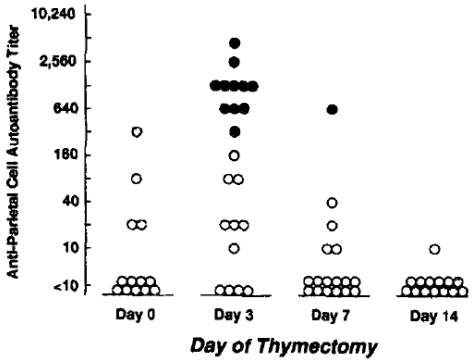
UERB immunologie:

Exercice 1

Des souris BALBc ($H2^d$) ont été thymectomisées à différents jours de leur vie (comme indiqué sur la figure) et après 3 mois, les taux d'auto-anticorps anti cellules pariétales (marqueur de gastrite autoimmune) ont été dosés dans le sérum de ces animaux (représentés en ordonnée) et les estomacs ont été analysés en histologie (les ronds pleins représentent les souris atteintes de gastrite sévère et les ronds vides celles qui ont un estomac normal).

Figure 1

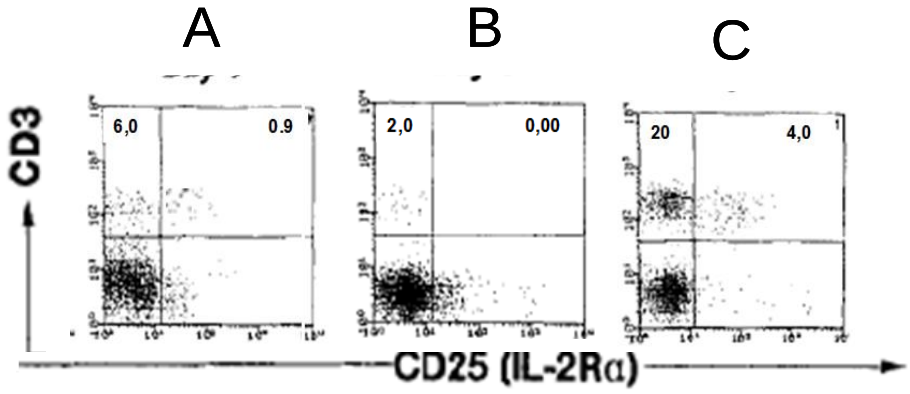


Question 1:

a) **explicitez et commentez les résultats expérimentaux obtenus pour les jours J0, J3 et J7**

A l'aide d'anticorps monoclonaux vous analysez en cytométrie en flux l'expression de CD3 et CD25 sur les splénocytes de souris Balbc normales au 3^{em} , au 7 ^{ème} et au 60eme jour de vie.

Vous obtenez les graphes ci-dessous pour un animal représentatif. Les nombres affichés dans les graphes représentent les pourcentages de cellules présents dans les quadrants correspondants.

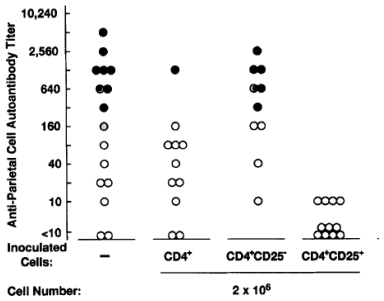


Question 2 : Avec vos connaissances sur l'acquisition des Treg naturelles chez la souris, indiquez à quel jour de vie correspond chaque graphe A B C.

Question 3 : En vous aidant de la figure ci-dessus, comment expliquez-vous les résultats observés sur la première figure?

Deux millions de lymphocytes CD4+ provenant de souris BALBc ($H2^d$) adultes normales sont inoculées au 10ème jour de vie à un groupe de 11 souris BALBc qui ont été thymectomisées au 3ème jour de leur vie (désignés par la suite souris 3DTx). Vous constituez un groupe « contrôle » de souris 3DTx qui a reçu une injection de PBS. Les souris sont examinées 3 mois plus tard pour le taux d'anticorps et pour développement histologique de la gastrite (selon les mêmes critères et les mêmes légendes que sur la figure 1).
Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous.
(les ronds pleins représentent les souris atteintes de gastrite sévère et les ronds vides celles qui ont un estomac normal).

souris receveuses thymectomisées
à J3 de vie (3DTx)



Question 4 :

a) **expliquez les résultats observés dans la condition d'injection de cellules CD4+ totale (2em colonne)**
b) **en analysant les 3 dernières colonnes que pouvez vous en conclure ?.**

Vous disposez de souris BALBc nude qui naissent sans thymus (elles seront dénommées par la suite par l'abréviation : BALB/c (nu/nu).

Question 5 : à votre avis ses animaux vont-ils développer spontanément des maladies autoimmunes du type gastrite ?

Justifiez brièvement

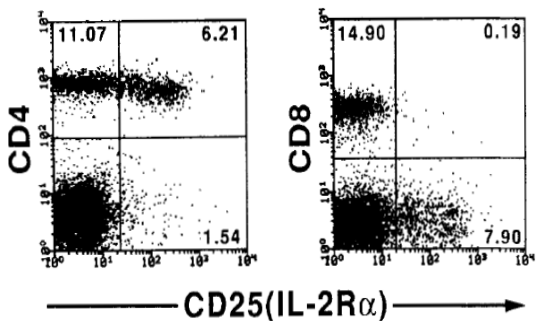
Des souris BALB/c(nu/nu) ont reçu des lymphocytes T CD4+CD25- provenant de souris BALBc adultes normales. Trois mois après, vous analysez l'estomac de ces animaux en histologie.

QCS 1 : indiquez parmi les 2 propositions ci-dessous, ce que vous observerez sur les biopsies gastriques de ces animaux

A- les biopsies d'estomac montreront une gastrite chez la majorité des animaux
B- les biopsies d'estomac seront normales chez la majorité des animaux

Les résultats d'une analyse des ganglions paragastriques de ces animaux en cytométrie de flux pour les marqueurs CD4, CD25 et CD8 sont présentés sur la figure ci-dessous dans le panel A.
Les cellules CD4+CD25+ et CD4+CD25- ont ensuite été purifiées et réinjectées séparément à des animaux BALBc (nu/nu) naifs. Les souris ont été analysées deux mois plus tard. Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous dans le panel B

A



B

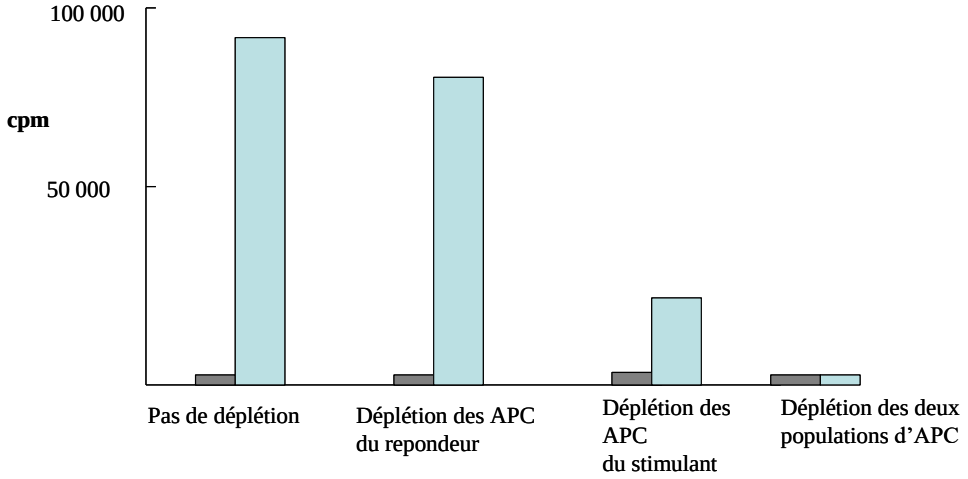
Expt. Group	Autoimmune Disease in Donor Mice	Transferred Cells	Gastritis
A[a]	Gastritis	$CD4^+$ cells (1×10^6)	3/3 (640, 320, 320)
		$CD4^+CD25^+$ cells (1×10^6)	3/3 (320, 320, 160)
		$CD4^+CD25^-$ cells (1×10^6)	2/3 (320, 160, <10)

A-Phénotype des cellules de ganglions lymphatiques paragastriques des souris BALBc nu/nu qui ont été injectées avec des lymphocytes CD4+CD25- de Balb/c normales trois mois auparavant.
B-résultats de la réinjection à des souris nu/nu des sous populations de lymphocytes issues de ces ganglions (les chiffes entre parenthèse de la dernière colonne indiquent le taux d'autoanticorps anti estomac).

Question 6: comment expliquez-vous la présence de gastrite chez les animaux injectés avec des cellules des ganglions CD4+CD25+?

Exercice 2

Vous réalisez une culture mixte de cellules mononuclées de rate entre deux lignées de souris qui n'ont aucun antigène du CMH en commun (figure ci-dessous). Des splénocytes de C57BL6 (répondeuses) et de BALB/c (stimulantes qui ont été irradiées) sont mélangés pendant 7 jours et la prolifération est analysée par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée à la fin de la culture mixte. Plus le nombre de coups par minute (cpm) est élevé plus le nombre de cellules en prolifération est important. La première colonne indique le mélange des splénocytes, la deuxième colonne la culture a été réalisée avec des splénocytes de C57BL6 après ablation de leurs cellules présentatrices d'antigènes (APC sur le schéma) qui ont été mis en contact avec des splénocytes BALB/c complets, la troisième colonne les splenocytes de BALB/c après déplétion de leur APC ont été mélangés avec des splénocytes de C57BL6. La dernière colonne les splénocytes des deux lignées de souris ont été déplétés en APC et mis en contact.



Question 11 : qu'est ce que cette expérience vous donne comme information sur les caractéristiques de l'alloréactivité?

Exercice 3

-Vous disposez d'un modèle de transplantation de peau chez la souris. Les souris donneuses et receveuses sont identiques pour le CMH mais différentes au niveau d'antigènes mineurs. Les animaux reçoivent une greffe de peau à J0 et sont traités par anticorps anti CD4 et anti CD8 non déplétifs à J0 J3 et J5. Vous surveillez les animaux, à J90 vous observez que la greffe de peau n'est pas rejetée chez les animaux traités alors que les animaux témoins ont tous rejeté leur greffe.

Question 1*2- Explicitez brièvement ce qui différencie, sur le plan de l'immunologie de transplantation, les antigènes mineurs des antigènes majeurs d'histocompatibilité.*

Question 1*3-Décrivez brièvement les conséquences de cette différence sur les caractéristiques des rejets des greffes d'organe disparates soit aux antigènes majeurs soit aux antigènes mineurs uniquement chez des animaux non modifiés*.

Vous souhaitez vous assurer que les animaux traités sont tolérants au sens littéral du mot à cette greffe.

Question 1*4-Définissez le concept de tolérance en greffe expérimentale.*

Question 1*5-Par rapport à cette définition, quel protocole expérimental pourriez-vous proposer pour vous assurer que les animaux traités sont tolérants?*

Vous voulez savoir si des lymphocytes du receveur jouent un rôle dans le maintien de cette tolérance.

Question 1*6-Décrivez les principes d'un protocole permettant de le prouver simplement.*

Vous envisagez l'hypothèse que ces lymphocytes sont des lymphocytes T régulateurs présents chez le receveur.

Question 17*-Décrivez les grandes lignes d'un protocole expérimental qui permettrait de le prouver.*

Question 1*8-décrivez brièvement les principes d'une expérience qui permettrait de prouver qu'il existe des lymphocytes T régulateurs dans le greffon de peau des animaux tolérants.*