

Université Pierre et Marie Curie-Paris 6

Epreuve d'Immunologie Fondamentale - septembre 2003

Durée de l'épreuve : 3 heures

Vous devez obligatoirement traiter les exercices I et II sur deux copies distinctes.

Barème indicatif :

Exercice I noté sur 10 points

Exercice II noté sur 10 points

Exercice I (noté sur 10 points)

(d'après Lorenz et Allen, PNAS, 1988, 85:5220)

Il existe des variants alléliques de l'hémoglobine (Hb) de souris. On considère ici deux de ces variants appelés Hb^d et Hb^s. On immunise une souris CE/J (H-2^k, Hb^s) avec de l'hémoglobine Hb^d isolée d'une souris CBA/J (H-2^k, Hb^d). On isole des lymphocytes T (désignés T1) anti-Hb^d à partir de la souris CE/J ainsi immunisée. On dispose par ailleurs d'une lignée de lymphocytes B (désignée B1) anti-Hb^d et de CMH H-2^k.

1) On incube les cellules T1 dans les conditions du **Tableau 1** et on mesure la stimulation de ces cellules après 24 h.

Question 1. Commentez ces résultats.

2) On récupère des macrophages (MØ) à partir de souris CBA/J (MØ1) ou de souris CE/J (MØ2). Les MØ 1 ou 2 sont immédiatement mis en présence de cellules T1 et de divers additifs. On mesure la stimulation de T1 après 24 h (**Tableau 2**).

Question 2. Expliquez ces résultats, expérience par expérience. Expliquez pourquoi les cellules T1 sont stimulées par les MØ1 même en absence de Hb^d ou par les MØ1 fixés au paraformaldéhyde, alors que ce n'est pas le cas avec les MØ2.

Tableau 1

Exp. N°	Cellules T1 incubées avec	Stimulation des cellules T1
1	Hb ^s	-
2	Hb ^d	-
3	B1 + Hb ^s	-
4	B1 + Hb ^d	+
5	B1/PF + Hb ^d	- (1)

Tableau 2

Exp. N°	Conditions d'incubation	Stimulation des cellules T1
1	MØ1 + T1	+
2	MØ1/PF + T1	+ (2)
3	MØ2 + T1	-
4	MØ2 + T1 + Hb ^d	+
5	MØ2/PF + T1 + Hb ^d	- (2)

(1) les cellules B1 sont fixées au paraformaldéhyde (PF), puis lavées et incubées en présence de Hb^d avec les cellules T1.

(2) les macrophages sont fixés au paraformaldéhyde, puis lavés et incubés dans les conditions indiquées.

3) On veut s'assurer que les stimulations mesurées à la Question 2 ne sont pas dues à des réponses anti-Mls. On utilise dans ce but des MØ isolés de différentes souches de souris, dont les caractéristiques H-2, Hb et Mls sont présentées dans le **Tableau 3**.

Exp. N°	Origine des MØ	Caractéristiques des souris			stimulation de T1	
		H-2	Hb	Mls	sans Hb ^d	avec Hb ^d
1	CBA/J	k	d	a	+	+
2	CBA/CaJ	k	d	b	+	+
3	CE/J	k	s	a	-	+
4	B10.BR	k	s	b	-	+

Question 3. *Expliquez ces résultats, expérience par expérience. Vous permettent-ils d'exclure l'hypothèse d'une réponse anti-MIs dans les expériences précédentes ?*

4) On recherche chez les souris CBA/J d'autres cellules que les MØ, capables de stimuler T1 même sans Hb^d exogène comme ci-dessus. On en trouve en effet dans le thymus.

Question 4. *Quelle est la nature de ces cellules? Quelle est leur fonction probable, sachant qu'on ne trouve pas de lymphocytes T anti-Hb^d chez ces souris. Dans quelles conditions le même type de cellules thymiques isolées de souris CE/J pourrait-il aussi stimuler T1?*

Exercice II (noté sur 10 points)

(d'après Mellins et al., Nature, 1990, 343:71)

On étudie le comportement de certaines lignées de cellules humaines présentant l'antigène (CPA) associé aux molécules de classe II du CMH.

Question 5. *Rappeler brièvement l'organisation des gènes du CMH humain et murin, et représenter le schéma d'une molécule de classe II (humaine ou murine).*

On dispose de CPAs (sauvages) que l'on traite à l'éthyle méthane sulfonate. Cette mutagenèse est suivie d'une sélection des cellules CPAm (mutantes), résistantes au traitement par un anticorps monoclonal (Acm) + complément. L'Acm reconnaît un déterminant polymorphe porté uniquement par les chaînes β_1 des molécules DR3. On rappelle que le complément lyse les cellules ayant fixé l'anticorps.

On met en culture des clones de cellules T helper, en présence de CPAs ou de CPAm, et de certains antigènes intacts dont ces clones T sont spécifiques. Le Tableau 4 représente les spécificités de ces clones T (nature de l'antigène, nature de la restriction au CMH) ; le clone T1 par exemple est spécifique d'une protéine de mycobactérie "présentée" par une molécule DR3 dont la chaîne α est de type indéterminé (α_x), et dont la chaîne β est de type β_1 .

Tableau 4

Clone	Antigène	Restriction Classe II
T1	Protéine de Mycobactérie	DR3 $\alpha_x\beta_1$
T2	Toxine tétanique	DR3 $\alpha_x\beta_1$
T3	Protéine d'enveloppe du virus Epstein-Barr	DQ2 $\alpha_x\beta_x$
T4	Protéine de surface du virus hépatite B	DP4 $\alpha_x\beta_x$

La prolifération de ces clones T (induite par l'antigène et les CPA) est mesurée par incorporation de ^3H -thymidine. La **Figure 1** résume les résultats de ces expériences.

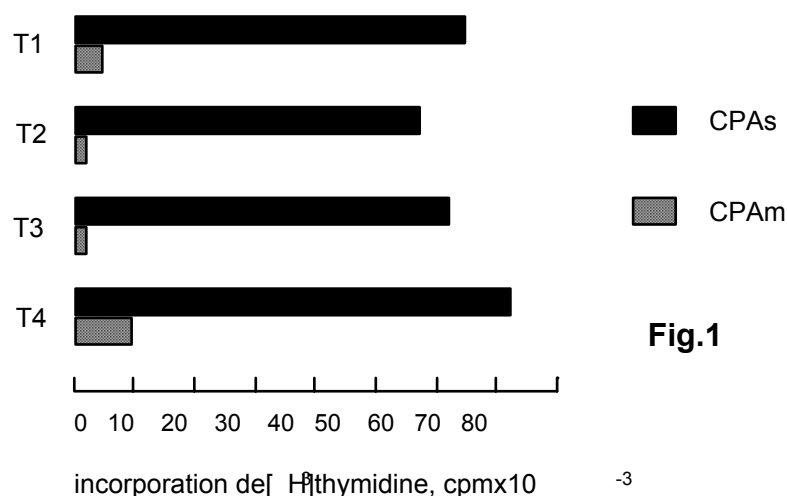


Fig.1

Figure 1

Question 6. Quelles hypothèses peut-on formuler quant au comportement des CPAm par rapport aux CPAs, sachant que le protocole utilisé pour la mutagenèse rend improbable l'apparition de mutations simultanées dans les différents gènes de structure des classe II ?

On étudie l'influence de la fixation des CPA au glutaraldéhyde sur la réponse proliférative du clone T4. Dans ces expériences, T4 est mis en présence de CPAs ou CPAm non fixées (-) ou fixées (+) au glutaraldéhyde, et de la protéine de surface entière du virus de l'hépatite B (Antigène intact), ou bien d'un peptide synthétique correspondant aux aminoacides 14 à 33 de cette même protéine du virus de l'hépatite B (peptide 14-33). Ce peptide 14-33 est reconnu par T4 dans le même contexte HLA que l'antigène intact. Les résultats sont représentés dans la **Figure 2**.

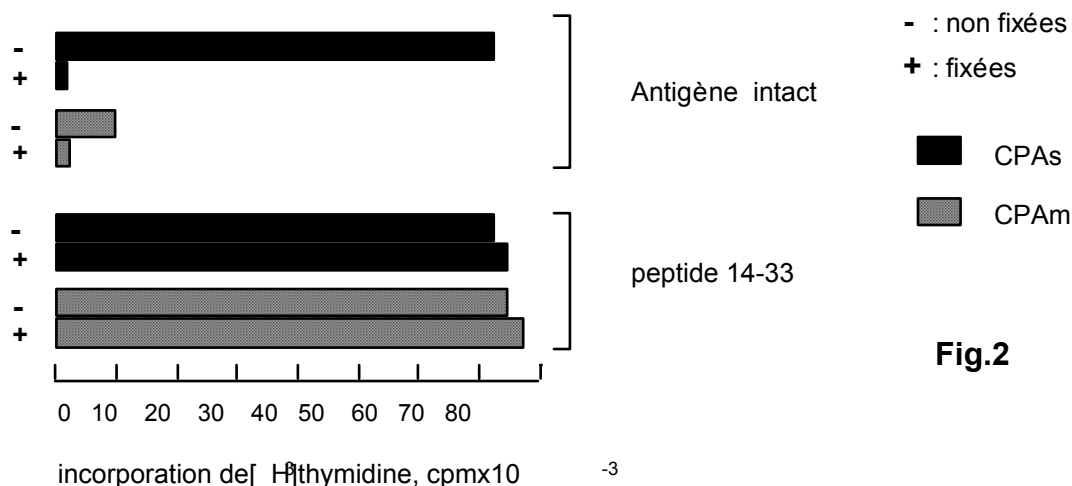


Fig.2

Figure 2

Question 7. Interpréter ces expériences.

Différentes expériences complémentaires montrent que les gènes de structure DR sont normaux chez CPAm, de même que l'expression de leurs produits en surface. On extrait les protéines totales des CPAs et CPAm avec un détergent doux (NP40), on sépare les protéines en gel de polyacrylamide/SDS, et on révèle la présence des molécules DP et DR par Western blot, à l'aide d'anticorps appropriés. Les conditions expérimentales utilisées (non détaillées ici) permettent ordinairement de préserver, au moins en partie, la structure dimérique des molécules de classe II, même après séparation en gel SDS. La **Figure 3** montre les résultats de ces expériences après le Western blot avec les anticorps suivants : en **Figure 3a**) un anticorps qui reconnaît les dimères DR et les monomères DR β , en **Figure 3b**) un anticorps qui reconnaît les dimères DP et les monomères DP α ou DP β , et en **Figure 3c**) le même anticorps qu'en **Figure 3a**. Dans cette dernière expérience, on a prétraité les CPAs pendant 48h avec de la chloroquine, avant d'en extraire et séparer les protéines comme précédemment. On rappelle que la chloroquine empêche le "processing" de l'antigène nécessaire à sa présentation par les classes II.

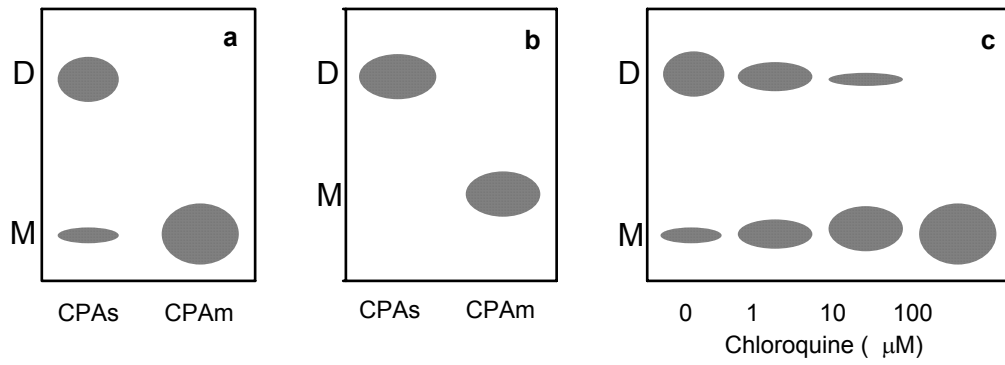


Fig.3

Figure 3 : Les positions des monomères (M) et dimères (D) sont indiquées.

Question 8. *Interpréter les **Figure 3a** et **b**. Que vous montre la comparaison des **Figure 3a** et **c**, en ce qui concerne les CPAs ? A l'aide de ces observations et de celles qui précèdent, proposer une(des) explication(s) au phénotype des CPAm.*