

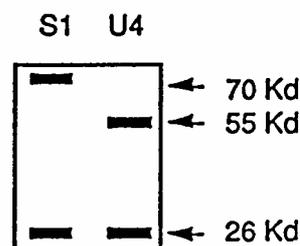
Structure des immunoglobulines et TCR

I.

L'hybridome S1 a été obtenu en fusionnant les cellules d'un myélome non sécréteur avec les cellules spléniques d'une souris immunisée contre la phosphorylcholine (PC) couplé à de l'hémocyanine. S1 synthétise un anticorps d'isotype μ, κ . Après un nouveau clonage de l'hybridome S1, 30000 clones sont obtenus, l'un d'eux (U4) est particulièrement étudié.

Les cellules S1 ou U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S . Les immunoglobulines sécrétées sont précipitées par un sérum de lapin anti- κ , puis réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. L'autoradiographie de ce gel est présentée sur la **Figure 1** :

Figure 1



Question 1. Proposer au moins deux hypothèses pour expliquer ces résultats.

La spécificité des immunoglobulines sécrétées par U4 est analysée par des tests d'hémagglutination. Une éventuelle activité anti-PC est recherchée vis-à-vis de la phosphorylcholine couplée aux globules rouges de mouton (PC-GRM). Les titres agglutinants obtenus sont présentés dans le **Tableau 1** :

Tableau 1

Surnageant de culture	GRM	PC-GRM	Hémagglutination de PC-GRM en présence d'un sérum amplificateur	
			Anti-IgM	Anti-IgG1
S1	0*	7	7	7
U4	0	0	0	5

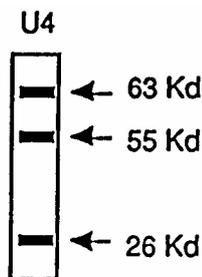
* Titre d'hémagglutination

Question 2. Ces nouvelles données permettent-elles d'étayer l'une des hypothèses formulées précédemment ?

Les cellules U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S , puis lysées. Les immunoglobulines ainsi synthétisées sont précipitées par un anti- κ , réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. La **Figure 2** ci-dessous présente l'autoradiographie obtenue.

Question 3. Comment expliquer la présence des deux chaînes lourdes ? Est-ce compatible avec le caractère monoclonal des hybridomes ?

Figure 2



N.B. : La séquence partielle NH2-terminale des deux chaînes lourdes est identique au VH de S1.

II.

Une protéine de myélome, de souris BALB/c, appelée TEPC15, et qui possède une spécificité anti-phosphorylcholine (PC), est injectée à une souris de souche A/He. Les splénocytes immuns sont fusionnés aux cellules d'un myélome non sécréteur de souris BALB/c. La spécificité des anticorps monoclonaux anti-T15 est analysée en inhibant l'interaction T15 radioactif/anticorps monoclonaux par d'autres anticorps monoclonaux ou des protéines de myéloblastes tous d'origine BALB/c (Tableau 2).

Tableau 2

Hybridomes	Inhibiteurs											
	a	T15	167	503	HPCM2	G1	G3	61	558	104	109	315
anti-T15	b	κ, α	κ, α	κ, α	κ, μ	$\kappa, \gamma 1$	$\kappa, \gamma 3$	κ, α	λ, α	λ, μ	κ, α	λ, α
	c	PC	PC	PC	PC	PC	PC	Lev	Lev	Dex	Lev	TNP
S1 60		+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
S1 04		+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
2E8		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F6		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

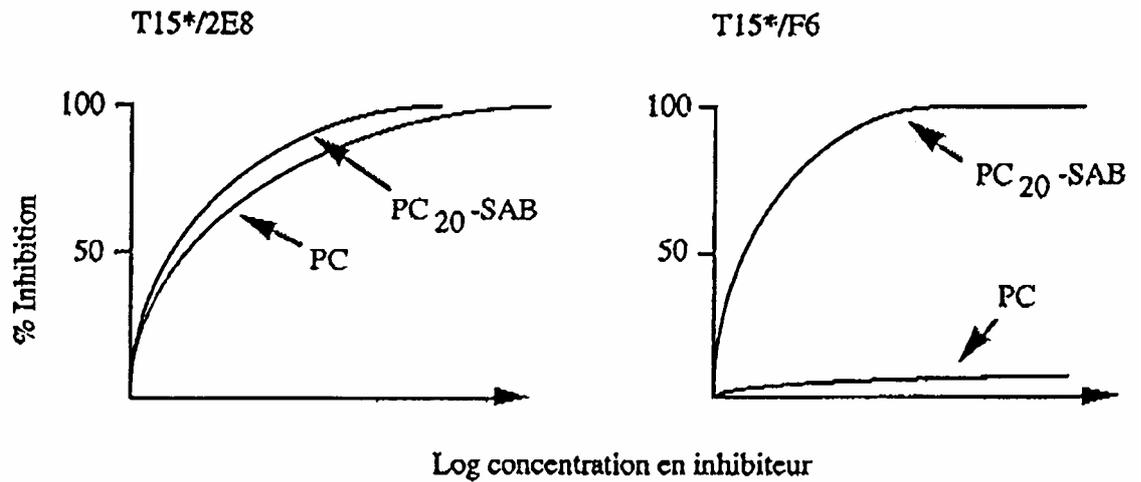
a: Nomenclature des inhibiteurs,
 b: Isotype des chaînes légère et lourde,
 c: Nature de l'antigène reconnu
 PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.
 + = inhibition, - = pas d'inhibition.

Question 1. Quelle peut être la spécificité de chaque anticorps monoclonal?

L'interaction T15 radioactif/anticorps 2E8 ou anticorps F6 est étudiée en présence de l'antigène PC ou de ce dernier couplé à la sérum albumine bovine (PC₂₀-SAB). La Figure 3 résume les caractéristiques de ces inhibitions.

Question 2. Interpréter ces résultats.

Figure 3



Les quatre anticorps monoclonaux ont été utilisés pour tenter d’inhiber des plages d’hémolyses locales (PFC) obtenues en mélangeant *in vitro* des cellules de souris BALB/c anti-PC, de la PC couplée à des globules rouges de mouton et du complément. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3	Anticorps inhibiteurs	Nombre de PFC anti-PC/rate
	-	120 000
	S1 60	115 000
	S1 04	117 000
	2E8	800
	F6	950

Question 3. Ces résultats sont-ils en accord avec la spécificité supposée de chaque hybridome ?

III.

Des cellules de poulet, issues du sang, sont injectées à des souris. Après plusieurs jours, les cellules spléniques de ces souris sont fusionnées avec un myélome non-sécréteur afin d’obtenir des hybridomes. Deux anticorps monoclonaux (A1 et A2) sont particulièrement étudiés. Les lymphocytes périphériques du poulet sont étudiés, grâce à un analyseur de cellules (FACS), avec les anticorps couplés à des fluorochromes (Figure 1) :

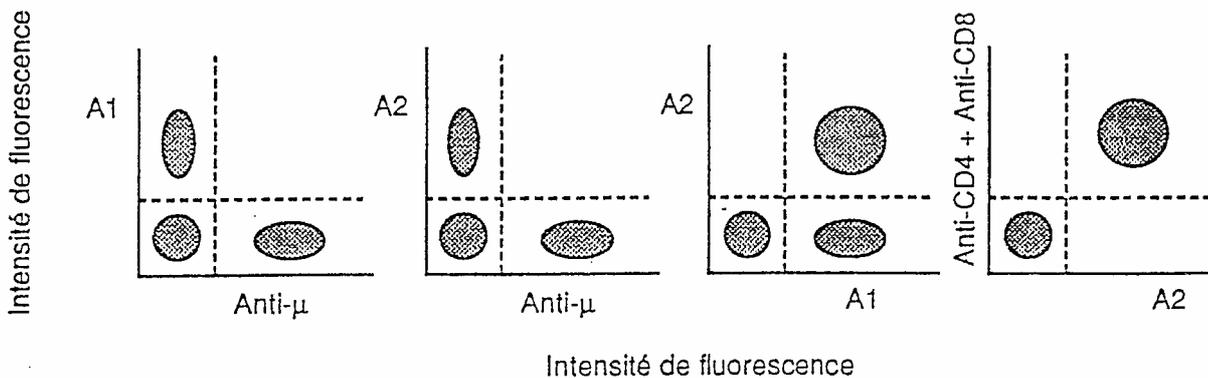


FIGURE 1

Les lymphocytes périphériques sont radiomarqués à leur surface. Les cellules sont ensuite lysées en présence de détergent afin de solubiliser les membranes. Des expériences d'immunoprécipitation sont réalisées avec les anticorps monoclonaux insolubilisés et les produits immunoprécipités sont traités ou non avec du dithiothréitol (DTT) puis analysés en SDS-PAGE (Figure 2) :

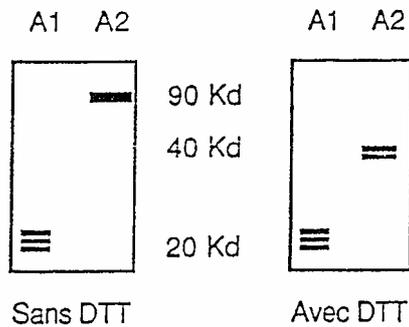


FIGURE 2

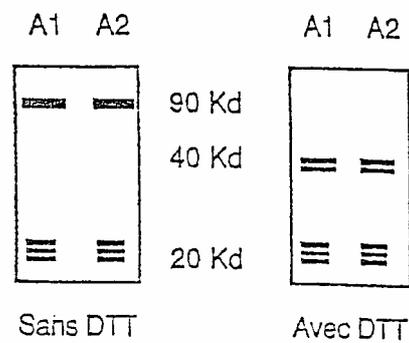


FIGURE 3

La même expérience est réalisée avec un détergent doux (Figure 3) :

La capacité des anticorps A1 et A2 à stimuler les lymphocytes périphériques est analysée (Tableau 1) :

Agent stimulant	Incorporation ³ H-thymidine (cpm)
A1	30 000
A2	25 000
ConA	200

Question 1. Quelle est la spécificité des anticorps A1 et A2 ?