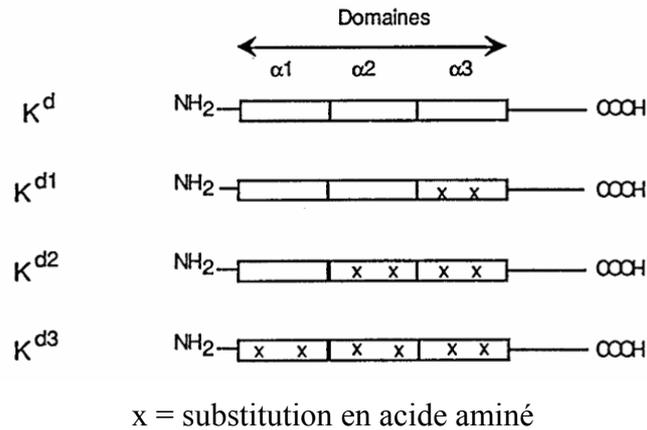


Présentation antigénique; CPA/CMH

I.

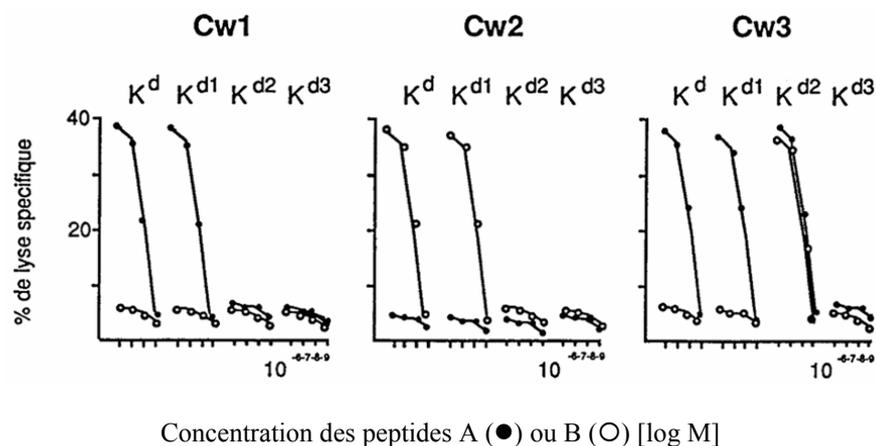
Une série de transfections est réalisée à l'aide de différentes constructions dérivées du gène K^d de classe I dans des fibroblastes ($H2^k$). La **Figure 1** présente les différentes molécules pouvant être exprimées.

Figure 1



On se propose d'analyser la capacité de trois clones cytotoxiques ($Cw1$, $Cw2$, $Cw3$) à reconnaître les peptides A ou B présentés par les cellules transfectantes. Ces deux peptides ne diffèrent que par un seul acide aminé. 2×10^3 cellules cibles marquées au ^{51}Cr sont incubées avec différentes concentrations de peptide puis 2×10^4 cellules effectrices sont ajoutées. Après 6 heures d'incubation, les cellules sont centrifugées et la radioactivité contenue dans le surnageant est déterminée. La **Figure 2** montre le pourcentage de lyse spécifique en fonction de la concentration de peptide utilisée :

Figure 2



Question 1. *Quelle est la spécificité de chaque clone ? Peut-on déterminer la zone d'interaction de l'antigène de classe I avec le peptide ? Expliquer comment la spécificité de reconnaissance du clone $Cw3$ est modifiée quand la molécule transfectée est K^{d2} ?*

Si l'on transfecte le gène codant pour la molécule K^d dans des cellules de fibroblastes H-2^c (c'est-à-dire n'exprimant pas de molécule du CMH) aucune cytotoxicité n'est décelable.

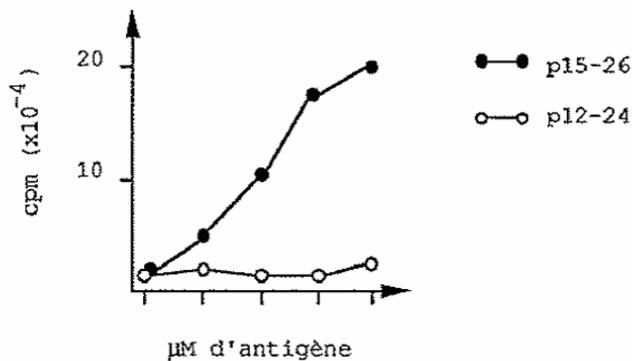
Question 2. Expliquer pourquoi en donnant les raisons possibles pour lesquelles ces cellules de fibroblastes sont H2⁻.

Question 3. Pour chacune de ces raisons indiquez quelles molécules du CMH des cellules dendritiques de même génotype peuvent exprimer.

II.

Un clone « auxiliaire » de lymphocyte T (7B7), issu d'une souris BALB/c (H-2^d), est obtenu contre le répresseur du bactériophage lambda. L'activation de ce clone est étudiée à l'aide de peptides dérivés du répresseur dans le test suivant : 5x10⁴ cellules 7B7 sont mélangées à 5x10⁴ cellules présentatrices d'antigènes en présence de différentes concentrations de peptide. Après 24h d'incubation, 50 µL de surnageant sont ajoutés à 10⁴ cellules d'un clone T cytotoxique dépendant de l'IL2. L'incorporation de thymidine tritiée est ensuite déterminée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3**.

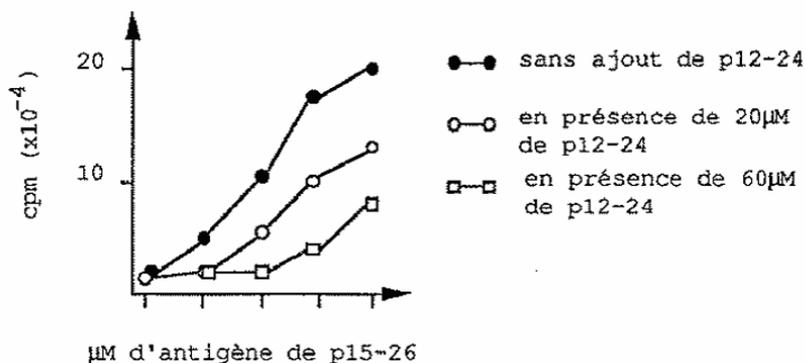
Figure 3



D'autre part, l'activation observée avec le peptide p15-26 est inhibée par un anticorps spécifique de I-A^d mais pas par un anticorps spécifique de I-E^d.

Dans une autre expérience, l'activation par le peptide p15-26 est effectuée en présence du peptide p12-24. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4**.

Figure 4



Question 1. Interpréter ces résultats en précisant comment le peptide p12-24 peut inhiber l'activation du clone 7B7 ?

La capacité inhibitrice du peptide p12-24 est testée dans différents systèmes antigéniques de façon analogue à celle décrite ci-dessus. La compilation des résultats est présentée dans le **Tableau 1**. La

fixation directe du peptide p12-24 sur les molécules de classe II est déterminée par dialyse à l'équilibre comme présentée sur le **Tableau 2**.

Tableau 1

Antigène reconnu par le clone T	Elément de restriction	Pouvoir inhibiteur du peptide p12-24
Ovalbumine	I-A ^d	+
Myoglobine	I-E ^d	+++
Lysozyme	I-A ^k	-
Cytochrome c	I-E ^k	+

Tableau 2

Antigène de classe II	Fixation du peptide
I-A ^d	+
I-E ^d	+++
I-A ^k	-
I-E ^k	+

Question 2. Analyser l'ensemble de ces résultats

III.

A partir d'une souris F1 (H-2^{d/k}) infectée par le virus de l'influenza, divers clones T cytotoxiques, capables de lyser des cellules spléniques H-2^{d/k} en présence de l'hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza, sont obtenus. La spécificité de ces clones est analysée par des expériences de cytotoxicité à l'aide de deux peptides dérivés de l'hémagglutinine (HA252-271 et HA240-259) en présence ou non d'anticorps anti-K^k ou anti-I-A^d. Les cellules spléniques H-2^{d/k} marquées au ⁵¹Cr en présence de concentrations variables de peptides sont mélangées aux différents clones T. Après 4 heures d'incubation à 37°C, le pourcentage de lyse spécifique est calculé. Les clones T peuvent être répartis en trois groupes (K, U et G) en fonction de leur spécificité comme illustré dans la **Figure 5**.

Question 1. Sachant que les clones K1 à K4 sont CD8⁺ et les clones U4, U5 et G1 sont CD4⁺, commenter les résultats présentés en précisant les éléments de restriction des clones T.

Afin d'analyser la capacité de présentation du peptide HA252-271 par les molécules du CMH, la lignée LK35.1 (I-A^{d+} et K^{k+}) subit certains traitements exposés dans la légende du tableau suivant. Après traitement, les cellules LK35.1 sont utilisées comme cellules cible vis-à-vis des différents clones T dans des expériences de cytotoxicité similaires à celles décrites dans la **Figure 5**; les résultats sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

Figure 5

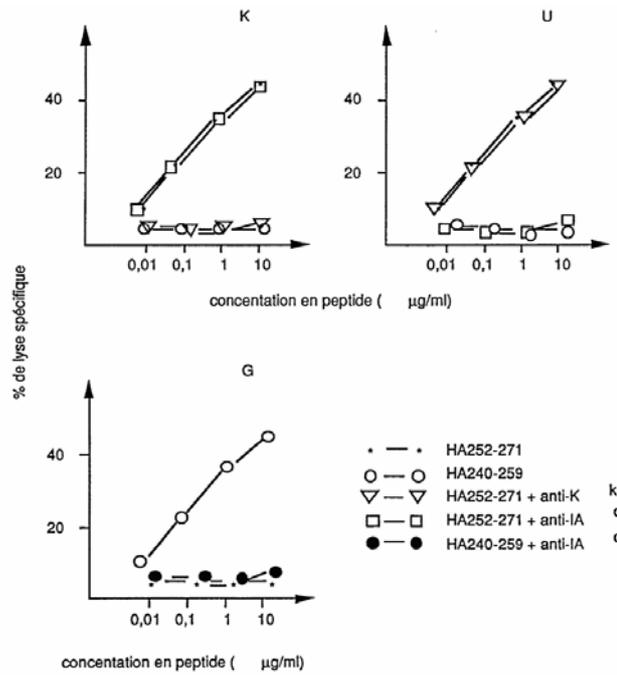


Tableau: % de lyse spécifique

Cellules effectrices	Cellules cibles						
	non-infectées a)	HA252-271 b)	Virus c)	Virus in-actives d)	vecteur SC11 e)	vecteur HA-SC11 f)	vecteur HA252-271 -SC11 g)
K1	0	71	67	3	1	45	48
K2	4	68	63	5	3	34	41
K3	0	66	64	1	1	41	49
K4	0	68	71	1	1	41	50
U4	7	66	71	59	6	12	3
U5	9	49	60	46	5	4	2
G1	3	5	78	66	1	11	1

- a) LK35.1 est seulement marquée au ⁵¹Cr.
- b) LK35.1 est mise en présence du peptide HA252-271.
- c) LK35.1 est infectée par le virus de l'influenza
- d) LK35.1 est mise en présence du virus inactivé.
- e) LK35.1 est transfectée avec le vecteur d'expression SC11
- f) LK35.1 est transfectée avec le vecteur d'expression SC11 contenant le gène qui code pour l'hémagglutinine.
- g) LK35.1 est transfectée avec le vecteur d'expression SC11 contenant l'oligonucléotide qui code pour le peptide HA252-271

Question 2. Interpréter les résultats du tableau. Proposer un schéma de présentation du peptide HA252-271 dérivé de l'hémagglutinine par la cellule LK35.1.

IV.

Une lignée de souris mutantes est obtenue à partir de souris de la lignée consanguine B10.BR (H-2^k). L'impact de cette mutation sur le système immunitaire est recherché.

Les souris B10.BR et mutantes sont immunisées contre l'ovalbumine (OVA). La production d'anticorps contre l'antigène est recherchée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau ci-dessous**.

	Souris B10.BR	Souris mutante
Anticorps anti-OVA	++++	+

Question 1. Commenter.

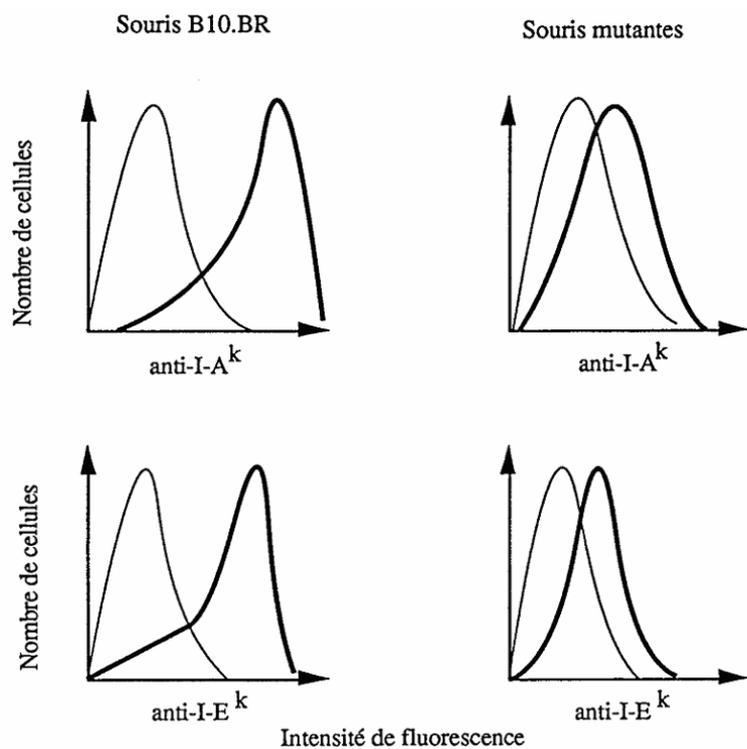
Les cellules spléniques sont isolées à partir des deux types de souris. Grâce à un trieur de cellules, les cellules marquées avec un anticorps anti-IgM fluorescent sont séparées et utilisées dans les trois expériences décrites ci-dessous.

Expérience n°1 : Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps monoclonaux anti-I-A^k ou anti-I-E^k couplés à un fluorochrome et analysées par cytofluorométrie.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 6**.

Figure 6 : Fluorescence des cellules spléniques IgM⁺.

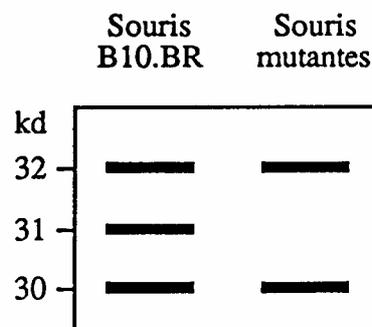
Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'auto fluorescence des cellules.



Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine ³⁵S puis lysées. Le lysat est incubé en présence de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé. Les produits immunoprécipités sont ensuite chauffés à 95°C puis déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Après migration électrophorétique, le gel est séché et autoradiographié. Les résultats sont présentés sur la **Figure 7**.

Figure 7 :

Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

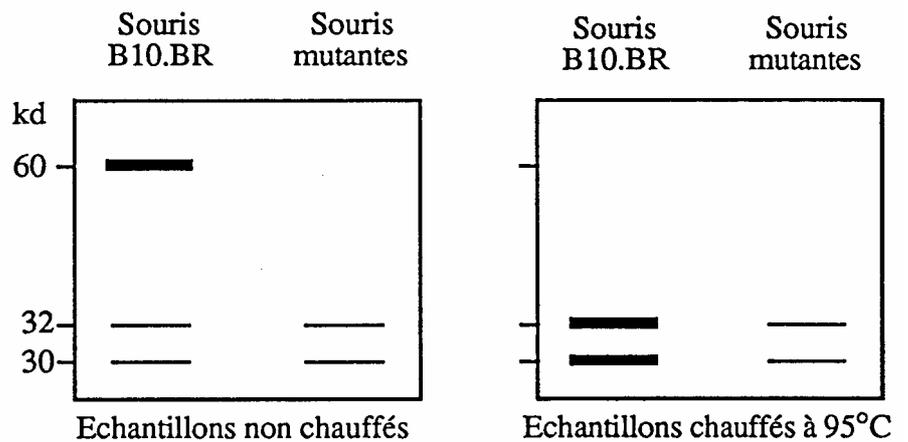


Expérience n°3 : Les cellules sont marquées à leur surface à l'aide de l'iode 125 puis lysées. La même expérience d'immunoprécipitation que ci-dessus est réalisée. Cependant, les échantillons

immunoprécipités sont ou non chauffés à 95°C avant d'être déposés sur le gel. Les résultats sont présentés sur la **Figure 8**.

Figure 8 :

Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

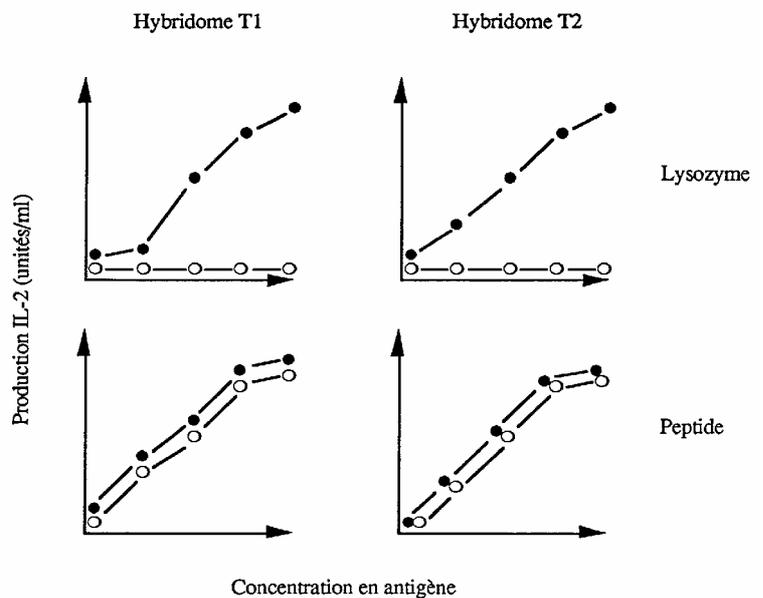


Question 2. *Interpréter ces expériences en indiquant notamment pourquoi les cellules IgM⁺ ont été sélectionnées.*

Deux hybridomes T (T1 et T2) obtenus contre le lysozyme de poulet sont testés pour leur capacité à produire de l'interleukine 2 (IL-2) en réponse à l'antigène. Celui-ci est présenté par des cellules spléniques provenant des deux types de souris. Les hybridomes T1 et T2 reconnaissent respectivement les peptides L46-61 et L112-129 présentés dans un contexte I-A^k. Les résultats sont résumés sur la **Figure 9**.

Figure 9 :

IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).



Question 3. *Décrire succinctement un test permettant de mesurer la production d'IL-2.*

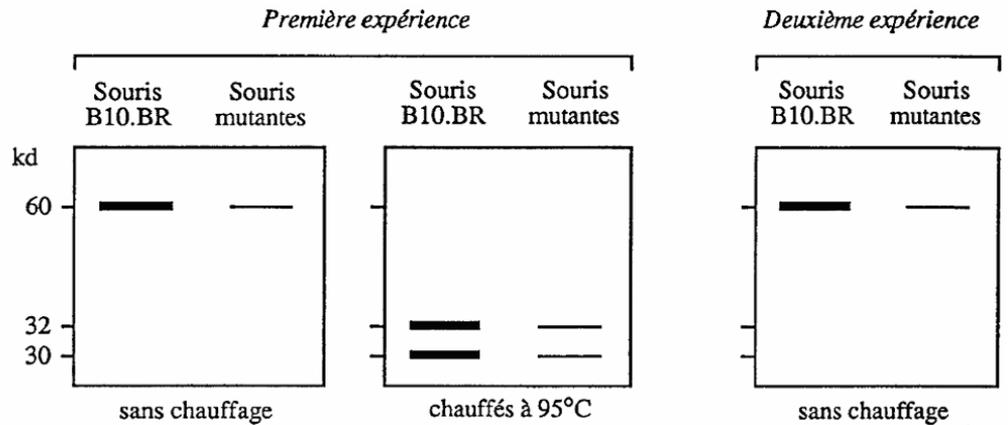
Afin de mieux comprendre l'observation ci-dessus, les expériences suivantes sont réalisées (**Figure 10**) :

- Dans une première expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont marquées à leur surface à l'iode 125 et lysées. Avant immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé, les lysats sont incubés en présence du peptide L46-61. Les échantillons sont ensuite chauffés ou non comme précédemment et déposés sur gel de polyacrylamide.

- Dans la seconde expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont incubées en présence du peptide L46-61 marqué à l'iode 125 puis lysées. Une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k est effectuée. L'échantillon immunoprécipité est déposé sur le gel de polyacrylamide sans chauffage.

Figure 10 :

Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A^k.



- Question 4. *Interpréter ces résultats en les corrélant avec ceux des expériences précédentes.*
- Question 5. *Proposer un schéma simple rendant compte du défaut de présentation de l'antigène par les cellules de la souris mutante.*