

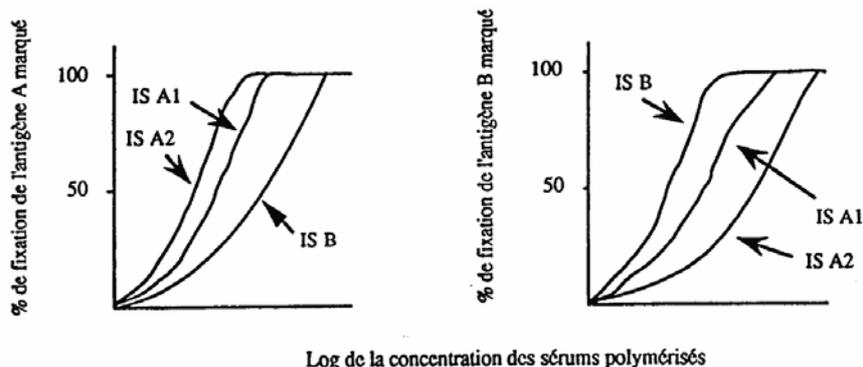
Structure/Fonction des récepteurs de l'immunité

I.

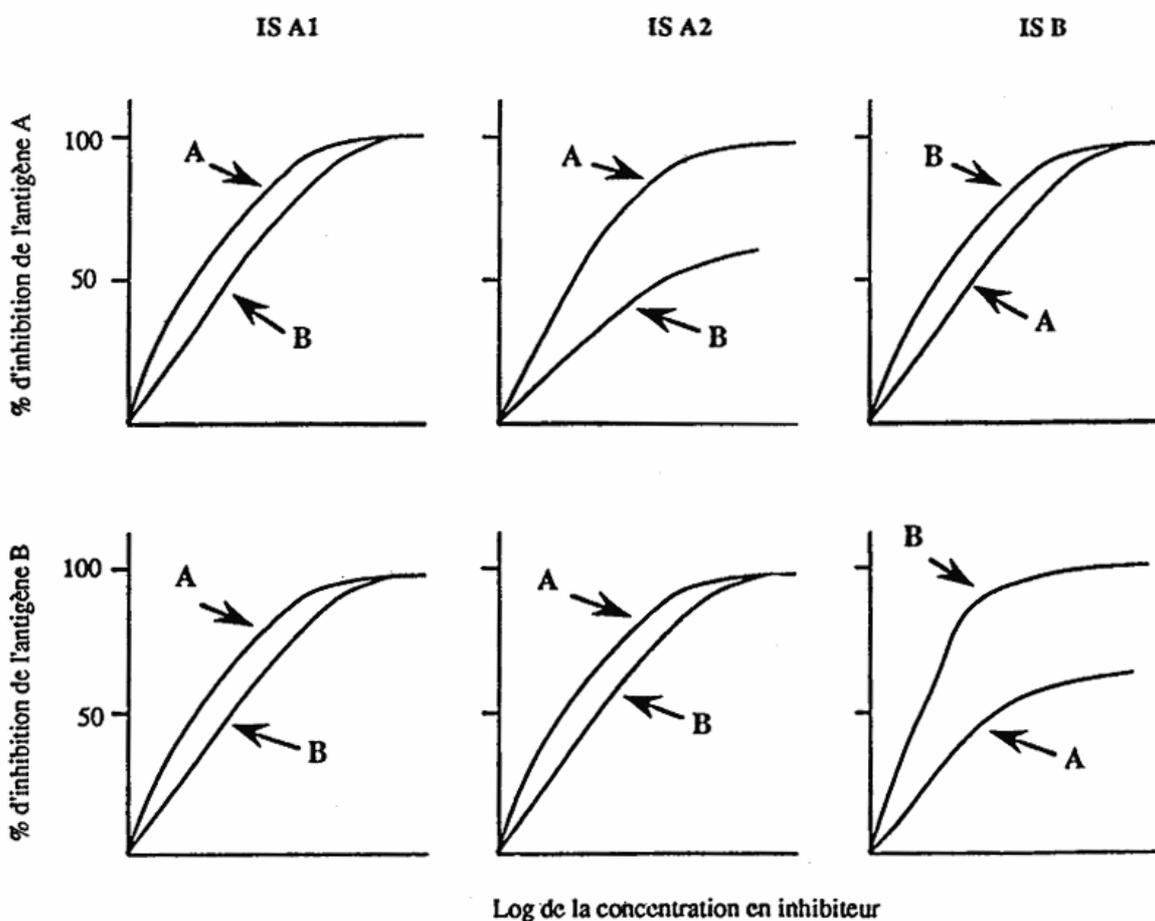
Des immunsérums sont préparés contre deux antigènes A et B :

- deux immunsérums ISA1 et ISA2 sont dirigés contre l'antigène A ;
- un immunsérum ISB est dirigé contre l'antigène B.

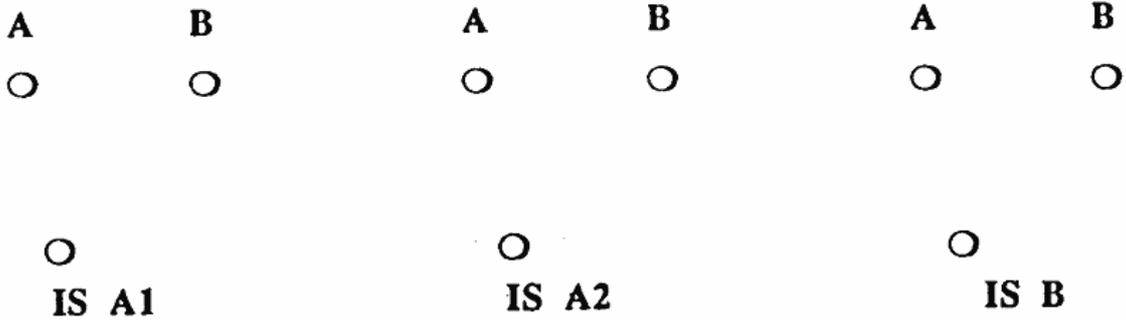
Ces trois immunsérums précipitent en milieu liquide les antigènes A et B. Les courbes de fixation des antigènes marqués sur les sérums insolubilisés sont les suivantes :



L'inhibition de la fixation des antigènes marqués sur les différents immunsérums, par A et B froids, donne les résultats suivants :



Question 1. Que peut-on conclure de ces résultats ? Complétez, sur la base de ces conclusions, les schémas suivants (précipitation en milieu gélifié) :



ISB est passé sur une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle l'antigène A est insolubilisé. L'effluent et l'éluat obtenus fixent l'antigène B.

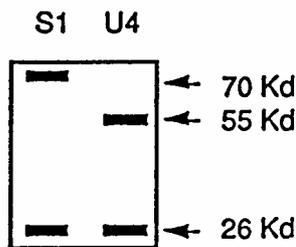
Question 2. Prévoir les courbes d'inhibition de la fixation de B marqué sur les différentes fractions d'anticorps obtenus par A et B froids.

II.

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

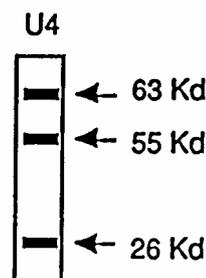
* Titre d'hémagglutination

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.

III.

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 myélomes tous d'origine BALB/c (**Tableau 2**).

Tableau 2

Hybridomes anti-T15	Inhibiteurs											
	a	T15	167	603	HPCM2	G1	G3	61	558	104	109	315
	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	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

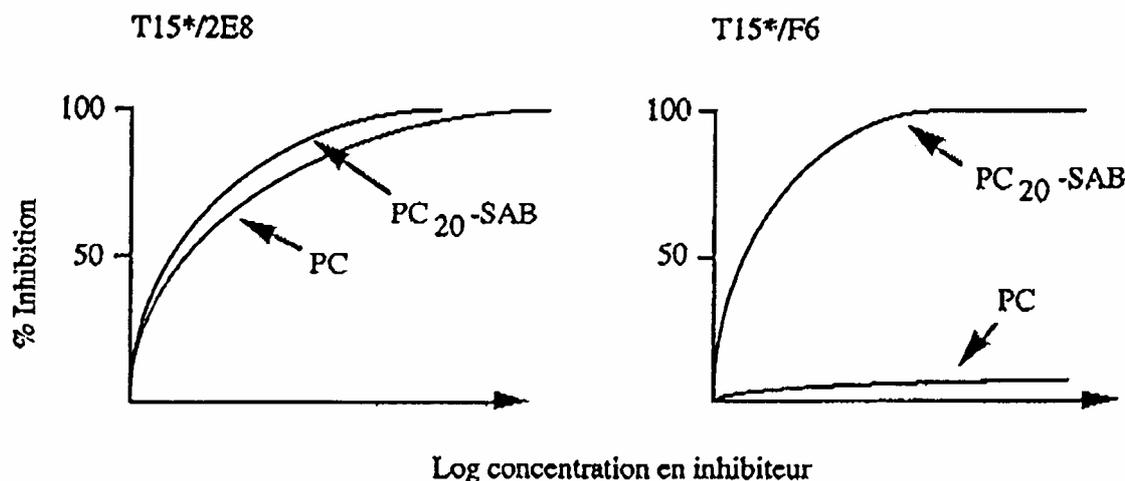
a: Nomenclature des inhibiteurs,
 b: Isotype des chaînes légère et lourde,
 c: Nature de l'antigène reconnu
 PC = phosphorylcholine. Lev = Levane. Dex = Dextrane. TNP = trinitrophenol.
 + = inhibition, - = pas d'inhibition.

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 ?

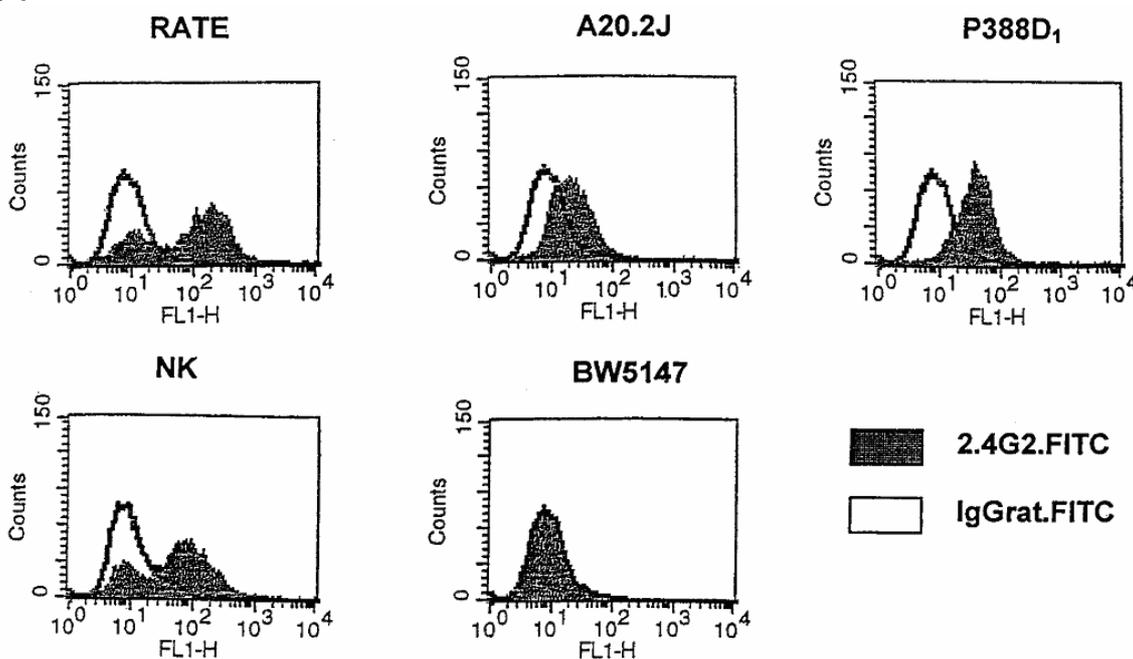
IV.

Il existe, chez la souris, deux types de récepteurs $Fc\gamma$ liant les complexes immuns à IgG, les $RFc\gamma II$ et $RFc\gamma III$ qui sont codés par deux gènes distincts. Les $RFc\gamma II$ et $RFc\gamma III$ sont des glycoprotéines transmembranaires qui présentent une forte identité de séquence dans les régions extracellulaire et transmembranaire mais pas dans les régions cytoplasmiques.

On analyse l'expression et la nature de ces récepteurs sur les cellules du système immunitaire de la souris. On utilise des cellules de rate, différentes lignées cellulaires : lignée de macrophages (P388D1), de cellules B (A20.2J), de cellules T (BW5147), et des cellules NK obtenues par culture de cellules de rate pendant 5 jours en présence d'IL2.

Dans une première expérience, on réalise un test d'immunofluorescence avec un anticorps monoclonal de rat anti- $RFc\gamma II$ et anti- $RFc\gamma III$ (2.4G2) ou avec une IgG monomérique contrôle couplés à de la fluorescéine. L'analyse des suspensions cellulaires au FACS donne les résultats présentés dans la Figure 4.

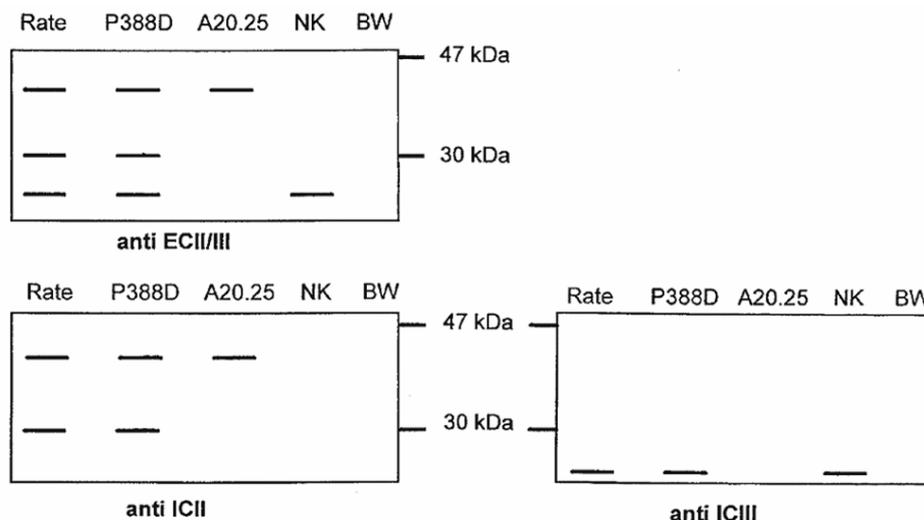
Figure 4



Question 1. Que concluez-vous ?

On réalise ensuite une expérience de Western blot. Pour cela, on immunoprécipite, à l'aide de l'anticorps 2.4G2, les RFc γ II et RFc γ III à partir d'extraits membranaires préparés par traitement des cellules au détergent triton X100. On traite les immunoprécipités par la PNGase, une enzyme qui hydrolyse les groupements N-glycosylés et on réalise une migration des échantillons dans un gel d'acrylamide en présence de SDS. On transfère les protéines sur un filtre de nitrocellulose. On fait ainsi migrer trois gels contenant la même série d'échantillons. On incube ensuite chacun des filtres soit avec des anticorps de lapin dirigés contre le domaine extracellulaire des RFc γ II et RFc γ III (anti-ECII/III), soit avec des anticorps de lapin dirigés contre les régions cytoplasmiques des RFc γ II (anti-ICII) ou des RFc γ III (anti-ICIII). On révèle les anticorps fixés sur les trois filtres à l'aide d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase et d'un système de révélation approprié. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 5**.

Figure 5



Question 2. *Comment interprétez-vous ces résultats ?*

V.

On prépare une suspension cellulaire par traitement de cellules de rate de souris C57BL/6 par un mélange d'anticorps monoclonaux anti-Thy1.1 et de complément.

Question 1. *Quel(s) type(s) cellulaire(s) cette suspension contient-elle ?*

Question 2. *Comment l'évaluer rapidement (en quelques heures) ?*

On prépare selon ce protocole des suspensions cellulaires à partir de rates de souris B6 (+/+) ou de souris B6 invalidées pour le gène codant pour le RFc γ de type II (-/-). On cultive des cellules en présence d'anticorps de chèvre anti-IgM (qui réagit avec le BCR) entiers (anti-IgM) ou de leurs fragments Fab'2 (Fab'2 anti-IgM) ou de LPS. On mesure la prolifération cellulaire après 48 heures de culture par incubation des cellules pendant 16 heures avec de la thymidine ^3H qui s'incorpore à l'ADN des cellules en phase S. On obtient les résultats suivants (l'anticorps 2.4G2 est un anticorps monoclonal de rat anti-RFc γ II et RFc γ III de souris) :

	cpm [³ H]±SD	
	Rate RFcγII ^{+/+}	Rate RFcγII ^{-/-}
Contrôle	800 ±100	700 ±200
Fab'2 anti-IgM (20 µg/ml)	4000 ±800	5000 ±900
IgG anti-IgM (30 µg/ml)	500 ±100	6000 ±1000
IgG anti-IgM (30 µg/ml) + 2.4G2 (1,5 µg/ml)	3800 ±800	5000 ±700
LPS	14000 ±1200	12000 ±1200

Question 3. *Quelles conclusions tirez-vous quant au rôle des RFcγII sur la prolifération cellulaire provoquée par l'agrégation du BCR ?*

VI. Vrai ou Faux ? [pour information]

- **Vrai ou Faux :** Une molécule anticorps a un type donné de site anticorps.
- **Vrai ou Faux :** Différentes molécules d'anticorps peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Différents récepteurs T peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Les immunoglobulines et les récepteurs des cellules T présentent des analogies structurales.
- **Vrai ou Faux :** Un haptène peut stimuler la production d'anticorps mais ne peut pas se combiner à des anticorps.
- **Vrai ou Faux :** La classe prédominante lors d'une réponse secondaire est IgM.
- **Vrai ou Faux :** Dans une immunoglobuline, la région "charnière" relie les chaînes légères aux chaînes lourdes.
- **Vrai ou Faux :** La région VH est deux fois plus longue que la région VL.
- **Vrai ou Faux :** Le site anticorps se compose principalement de la chaîne légère.
- **Vrai ou Faux :** Les molécules IgG1 et IgG2 sont définies par les différences de séquences en acides aminés dans les chaînes légères.
- **Vrai ou Faux :** Une cellule B peut présenter différentes molécules anticorps à sa surface.
- **Vrai ou Faux :** La spécificité des cellules T cytotoxiques est généralement restreinte aux antigènes d'histocompatibilité de classe II.
- **Vrai ou Faux :** Des facteurs génétiques autres que ceux liés aux gènes codant pour les immunoglobulines interviennent lors d'une réponse immunitaire.