Académie de Paris
Université Pierre & Marie Curie
UFR 927 Sciences de la Vie
4 Place Jussieu , 75252 Paris Cedex 05
☎ (1) 44.27.47.46

Professeur Pierre-André Cazenave
Responsable de la Formation Doctorale en Immunologie

MODULE d'IMMUNOGENETIQUE

SESSION DE JUIN 1993 - Durée : 3 heures

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

Les cellules du thymus et des ganglions provenant des deux types de souris sont analysées par cytofluorométrie. Les cellules sont marquées par trois anticorps couplés à des fluorochromes différents. Les résultats sont présentés sur les Figures 1 et 2.

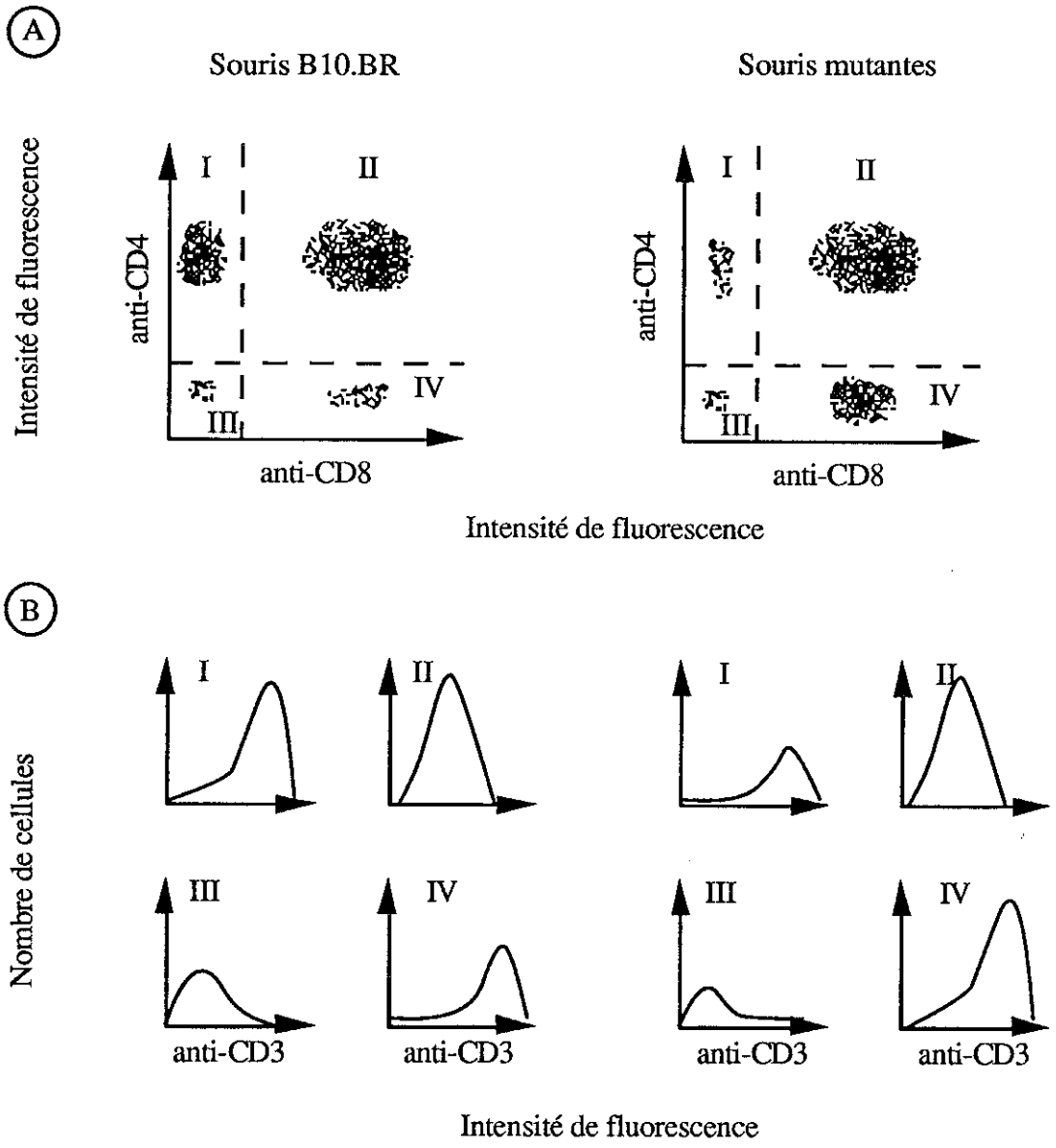

Figure 1 : Marquage des thymocytes à l'aide des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD3.

A. Fluorescences obtenues avec anti-CD4 et anti-CD8.

B. Fluorescence obtenue avec anti-CD3 sur les différentes sous-populations cellulaires (I, II, III, IV) définies en *A*.

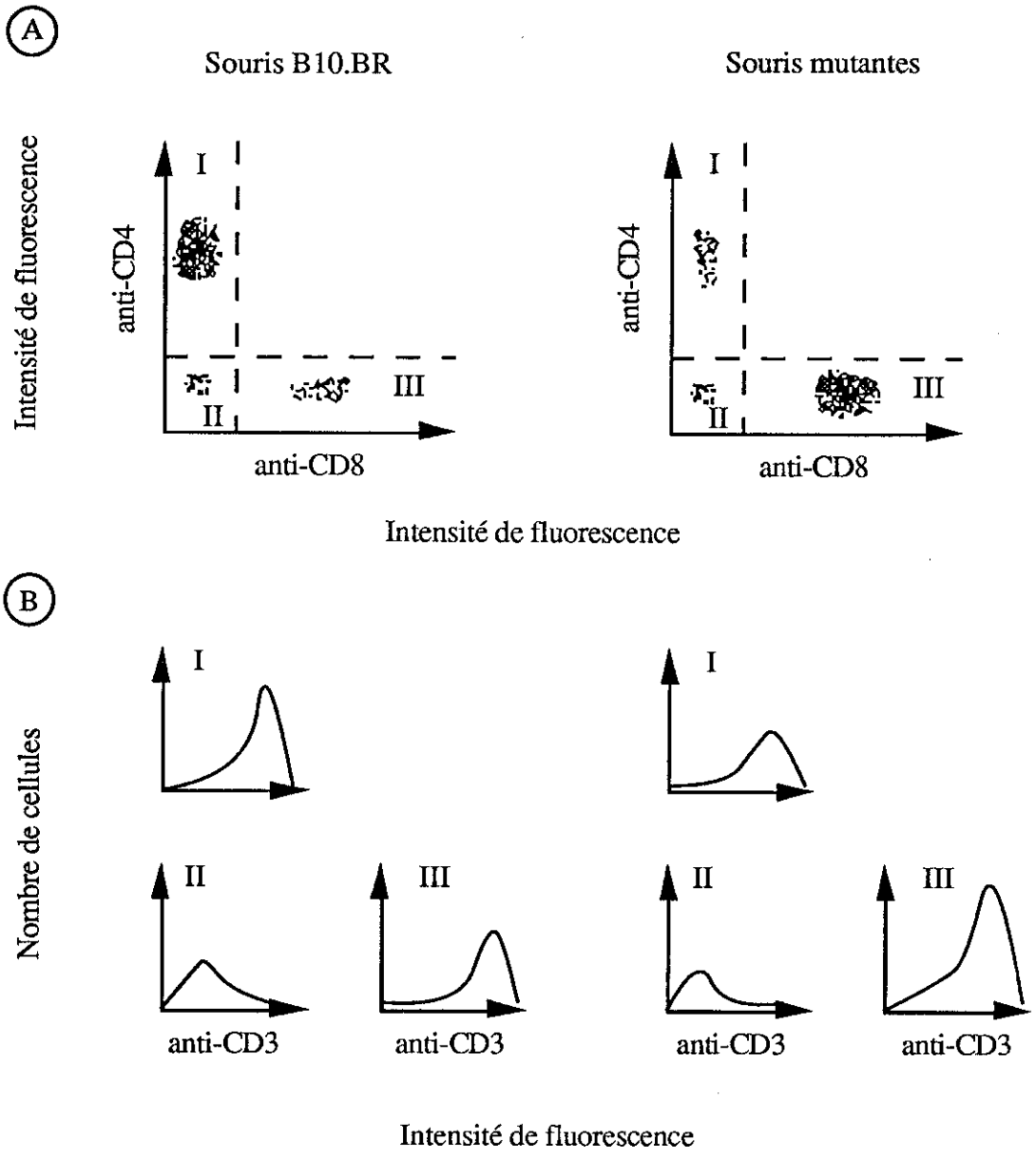

Figure 2 : Marquage des cellules de ganglions lymphatiques à l'aide des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD3.

A. Fluorescences obtenues avec anti-CD4 et anti-CD8.

B. Fluorescence obtenue avec anti-CD3 sur les différentes sous-populations cellulaires définies en *A*.

1) Commenter ces analyses (3 points).

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 suivant.

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

2) Proposer un test permettant de révéler de tels anticorps. Pouvez-vous corréler le défaut de réponse des souris mutantes avec les résultats présentés à la première question? Expliquer (2 points).

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 monoiclonaux anti-I-A^k ou anti-I-E^k couplés à un fluorochrome et analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.

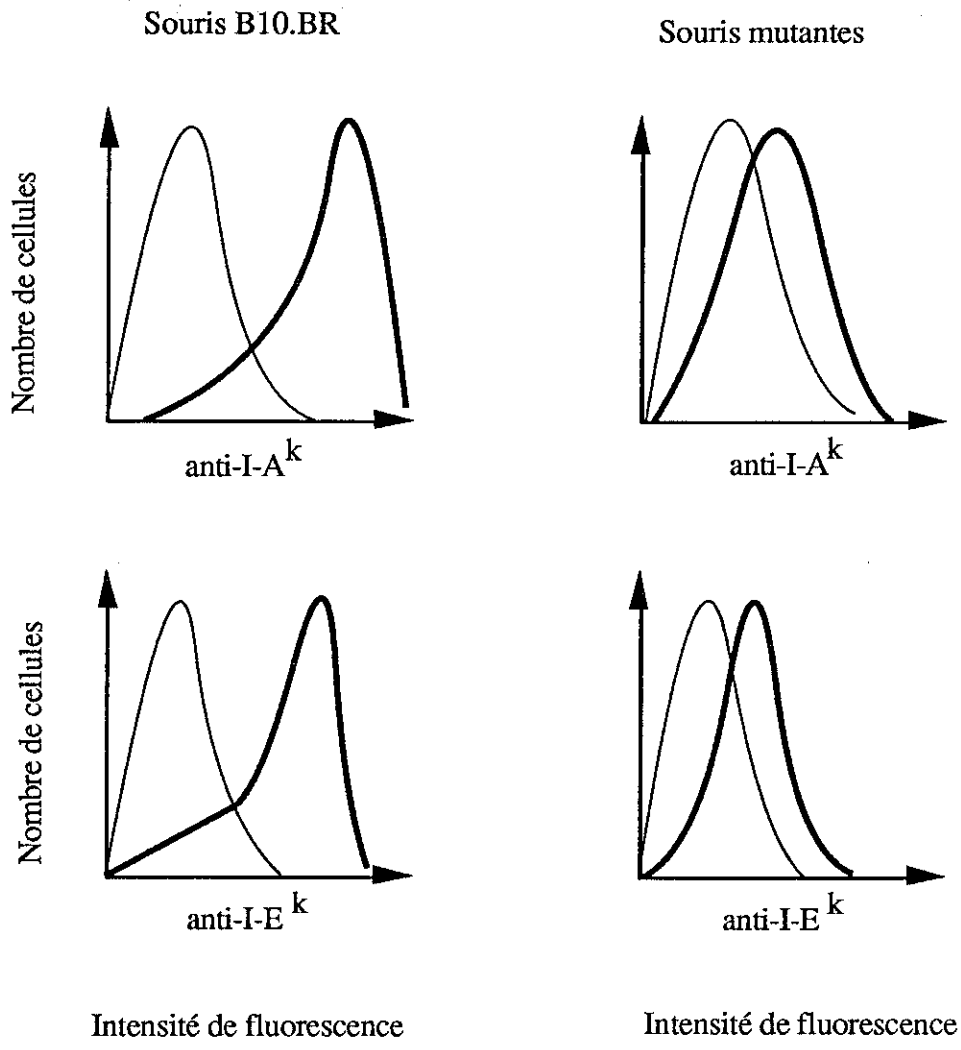

Figure 3 : Fluorescence des cellules spléniques IgM$^+$. Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'autofluorescence des cellules.

Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine ^{35}S 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 4.

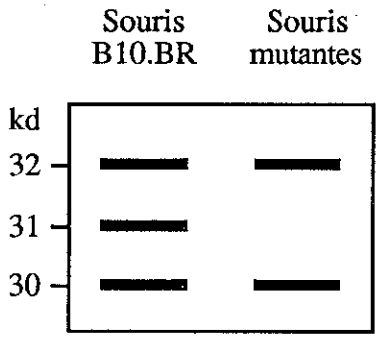

Figure 4 : Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k. Noter bien : les peptides de 32 kd et 30 kd correspondent respectivement aux chaînes α et β de la molécule I-A; le peptide de 31 kd est toujours trouvé au niveau du réticulum endoplasmique en association non covalente avec des molécules de classe II et est supposé stabiliser l'association des chaînes α et β néosynthétisées.

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 5.

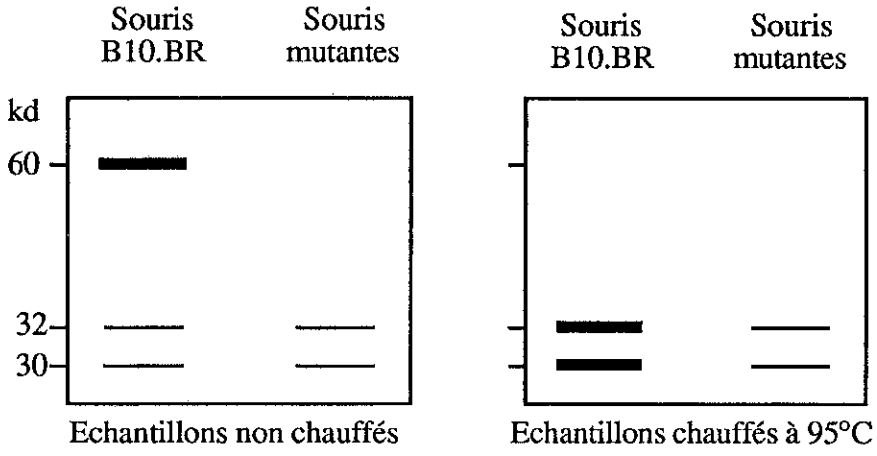

Figure 5 : Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k. Noter bien : la protéine de 60 kd représente une forme relativement stable de la molécule I-A.

3) Interpréter ces expériences en indiquant notamment pourquoi les cellules IgM+ ont été sélectionnées (4 points).

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 6.

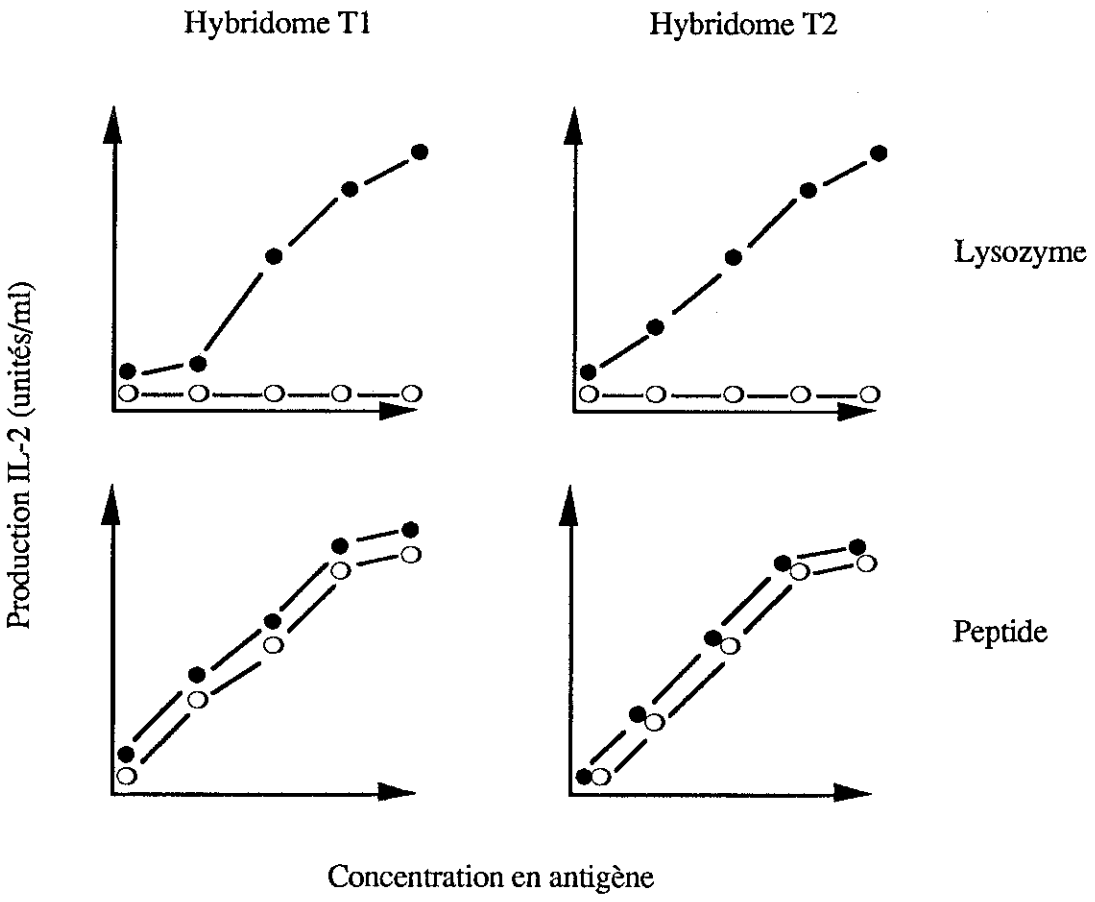

Figure 6 : IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou de mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).

4) Décrire succinctement un test permettant de mesurer la production d'IL-2 (2 points).

Afin de mieux comprendre l'observation ci-dessus, les expériences suivantes sont réalisées. Dans une première expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont marquées à leur surface à l'iode 125 et lysées. Puis, avant une 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. 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 ensuite déposé sur le gel de polyacrylamide sans chauffage. Les résultats sont présentés sur la Figure 7.

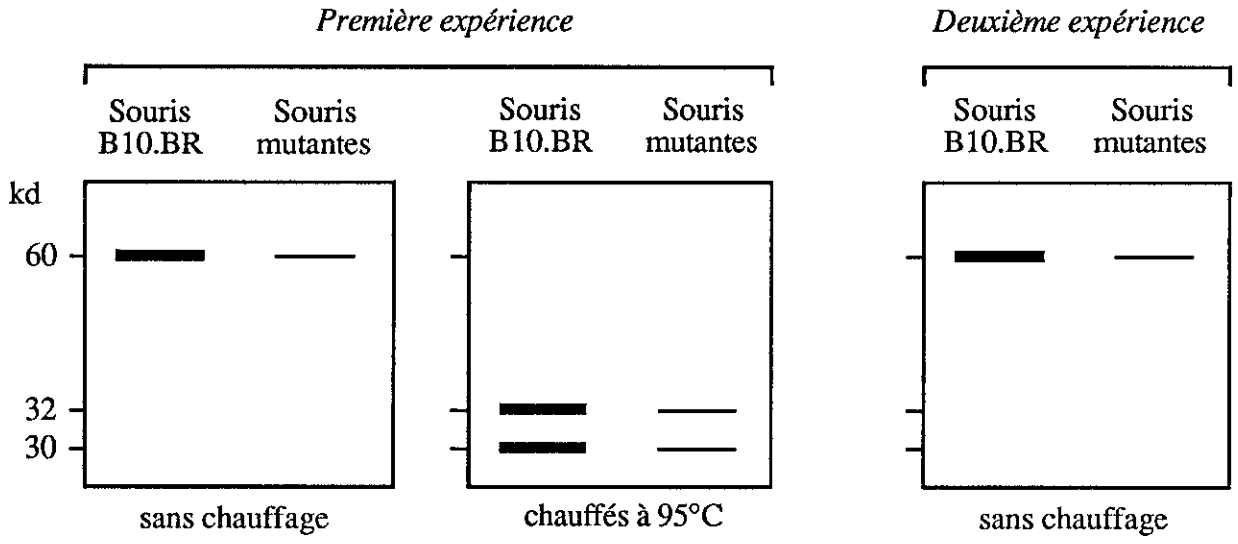

Figure 7 : Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A^k.

5) Interpréter ces résultats en les corrélant avec ceux de l'expérience de la question 4 (3 points).

6) Proposer un schéma simple rendant compte du défaut de présentation de l'antigène par les cellules de la souris mutante (3 points).

7) Quelle(s) hypothèse(s) suggérez-vous pour expliquer les résultats présentés aux deux premières questions (3 points).