



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche de l'action des molécules d'histocompatibilité dans le traitement des antigènes par des cellules phagocytaires

Thibaut de Maisières, Gabriel

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1987



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

Recherche de l'action des molécules
d'histocompatibilité dans le traitement
des antigènes par des cellules
phagocytaires

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

THIBAUT DE MAISIERES

Gabriel

ABBREVIATION

Ag : antigène

Ag.p : fragment de l'antigène qui est présenté au lymphocyte

Ac : anticorps

CMH : Complexe Majeur d' Histocompatibilité

T_H : lymphocyte T helper



T : lymphocyte T

CPAg : cellule présentatrice de l'antigène

HLA : Human Leucocyte Antigene

ERRATA

p.11 (verso) légende du schéma 4.

Ag = □
récepteur = 
molécule de classe II = 

p.25 la référence de la cytochrome oxydase est (23) et non (18). La référence 18 n'existe pas .

p.39 (tableau n°1) Le nombre de cellules est en ... 10^6 de cellules...

p.41 unité / **mg** protéine

p.42 (ligne 8) ...n'est en effet pas solubilisable **dans nos condition.**

p.45 (ligne 13) ...de nombreuses vacuoles d'endocytose et des
"**coated vesicles**" reflétant une endocytose.

p.52 (ligne 5) 50 **ul**

p.53 (légende de la figure 10) en abscisse: **l'inverse de la dilution**
de l' Ac marqué.

p.54 (ligne 8) la fixation du 7C7 (Fig.11).

p.55 (ligne 6) ...anticorps cytotoxique **complément** dépendant...

p.56 L'abscisse de la courbe d' étalonnage de la peroxydase (pure ou
extrait) est l'inverse de la dilution **totale.**

p.59 (ligne 4) ...quantité correspondant à 67,5 **ug** / $1,35 \cdot 10^6$
cellules/ml..

p.60 (ligne 5) ...suspension cellulaire contenant **10** 10^6 cellules /ml
et 500 ug de peroxydase...

p.64 ... 6,66 mg par 20 10^6 cellules pour le fractionnement Témoin...

p.65 (ligne 9) ...une diminution de la quantité de molécules de classe
II rapporté aux protéines.

p.65 (ligne 18) ...pour 10 min et **65,2% pour 60 min.Si nous...**

p.65 (dernière ligne) La radioactivité s'accumule dans les structures
de grandes tailles.

p.66 (→) :indique la densité médiane de la distribution
de l' enzyme.

(➔) :densité autour de laquelle est centrée chaque
partie de la distribution de l'enzyme
(distribution bimodale).

p.76 (ligne 17) Nous avons donc choisi malgré l'intérêt que présente
l'étude de la présentation de l' antigène par les
lymphocytes B **de centrer notre travail sur le
processing de l' antigène par des cellules
myéloïdes.**

p.77 (ligne 2) ...nous avons effectué **un** fractionnement et **un** gradient
pour chaque temps...

addenda de la bibliographie

19: W.Straus

J.Biophys.Biochem.Cytol.,vol 4,pp.548 (1958)

25: P.G.Canonico,H.Beaufay,M.Nyssens-Jadin

Analytical fractionation of mouse peritoneal macrophage:
Physical and biochemical properties of subcellular organelles from
resident (unstimulated) and cultivated cells. Journal of the
reticuloendothelial society.vol 24,n°2 (1978)

Dosage des protéines (annexes): Miller .Analytic Chemicals,
vol 31,pp.924 (1959)

Dosage du phosphate (annexes): Ames. Methods in enzymology,
vol 8,pp.115 (1966)

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

FACULTE DES SCIENCES

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081-229061 Télex 59222facnam-b téléfax 081-230391

Recherche de l'action des molécules d'histocompatibilité dans le traitement des antigènes par des cellules phagocytaires.

Thibaut de Maisières Gabriel

Résumé:

Tous les mécanismes impliqués dans le système immunitaire sont loin d'être bien connus. En particulier, le modèle du traitement de l'antigène est sujet à discussion. Nous avons voulu, sur des cellules myéloïdes transformées, faire une approche de ce problème.

Cette approche nécessite de pouvoir suivre dans le trafic cellulaire, à la fois l'antigène d'endocytose et les molécules de classe II.

Nous avons ainsi mis au point les dosages d'enzymes marqueurs de la membrane plasmique et des lysosomes de ces cellules myéloïdes.

En outre nous avons développé un test d'inhibition permettant de "doser" les molécules de classe II du CMH bovin au sein de diverses fractions cellulaires.

Pour terminer nous avons d'une manière préliminaire suivi l'évolution conjointe d'un antigène et de molécules de classe II au cours du temps.

Mémoire de licence en Science Biologique

Septembre 1987

Laboratoire d'immunologie

Promoteur: Le Professeur A. Depelchin

Au terme de ce mémoire, je désire remercier le Professeur Delpechin, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis ainsi d'entreprendre ce travail.

Je remercie aussi le Professeur Wattiaux S. de Conninck. de m'avoir permis d'accéder, à son laboratoire, suivi et encouragé dans mon travail.

je gratifie le Docteur Letesson pour l'amabilité avec laquelle Il m'a guidé tout le long de cette année.

Mes remerciements vont aussi au laboratoire d'immunologie et au laboratoire de Chimie Physiologique, pour leur bonne humeur leur disponibilité ,et tout particulièrement à Messieurs : Christian Didembourg, Anne Gilbert, le Docteur M.Jadot et à Franz Dubois.

Toute ma gratitude va à mes parents qui m'ont permis d'entreprendre ces études universitaires .

PLAN

Introduction.

I.	Le système immunitaire.	P.3
I.1	L'immunité non spécifique.	P.3
I.2	L'immunité spécifique.	P.4
I.2.1	L'immunité humorale.	P.5
I.2.2	L'immunité cellulaire.	P.5
I.2.2.1	Les lymphocytes T.	P.6
I.2.2.2	Les cellules présentatrices de L'antigène.	P.6
I.2.3	Le complexe majeur d'histocompatibilité.	P.7
I.2.3.1	La structure des antigènes du CMH.	P.7
I.2.3.2	Fonction du CMH.	P.8
II.	De l'ingestion à la reconnaissance.	P.8
II.1	La présentation.	P.9
II.2	La reconnaissance.	P.9
II.3	Le processing de l'antigène.	P.11
II.3.1	Modèle du processing.	P.11
II.3.2	Points de litiges sur le modèle du processing.	P.12
III.	Objet du travail.	P.14

Matériels et méthodes

I	Préparations cellulaires.	P.17
	I.1	
	Isolement des lymphocytes du sang périphérique de bovin.	P.17
	I.2	
	Lignée bovine myéloïde établie.	P.18
II	Centrifugations.	P.19
	II.1	
	Aspect théorique.	P.19
	II.2	
	La centrifugation différentielle en milieu homogène.	P.20
	II.3	
	La centrifugation isopycnique.	P.23
III	Les dosages enzymatiques.	P.23
IV	Marquage de la peroxydase.	P.29
	V	
	Tests immunologiques.	P.31
	V.1	
	L'anticorps utilisé pour détecter les molécules de classe II du CMH.	P.31
	V.2	
	Marquage isotopique par voie métabolique.	P.31
	V.3	
	Fixation des cellules de la lignée bovine établie.	P.31
	V.4	
	Solid phase radio-immuno assay.	P.32
	V.5	
	Test d'inhibition.	P.32
	V.6	
	Témoin de non spécificité.	P.34

VI	Mesure de la radioactivité B par scintillation liquide.	P.35
----	---	------

Résultats et discussions.

Introduction.	P.37
I Les lymphocytes bovins.	P.38
I.1 Mise au point de l'homogénéisation.	P.38
I.2 Fractionnement.	P.40
I.3 Conclusion.	P.43
II La lignée myélocytaire établie.	P.44
II.1 Les cellules myéloïdes.	P.44
II.1.1 Mise en culture des cellules myéloïdes.	P.44
II.1.2 Vérification de la présence des molécules de classe II.	P.44
II.1.3 Vérification de la capacité d'endocytose des cellules.	P.45
II.1.4 Identification des éléments impliqués dans l'endocytose.	P.45
II.2 Les molécules de classe II.	P.53
II.2.1 Mise en évidence des molécules de classe II par S.P.R.I.A direct.	P.53
II.3 L'antigène	P.55
II.3.1 Mesure de la peroxydase endogène.	P.55
II.3.2 Marquage de la peroxydase.	P.57
II.3.3 Test de l'endocytose.	P.57

II.4	Centrifugation différentielle.	P.59
II.4.1	Activités spécifiques.	P.64
II.4.2	Distribution des enzymes de référence et des molécules de classes II.	P.64
II.4.2.1	Fractionnement témoin.	P.64
II.4.2.2	Fractionnement à 10 minutes et 60 minutes	P.65
II.5	Centrifugation isopycnique.	P.66
II.5.1	Gradient témoin.	P.70
II.5.2	Gradient à 10 minutes et 60 minutes.	P.70
II.6	Discussion.	P.70
II.7	Conclusion.	P.74
III	Conclusions générales.	P.76

Annexes.

Bibliographie.

INTRODUCTION

I. Le système Immunitaire

Les vertèbres ont une organisation structurelle complexe, au sein de laquelle existe une série de systèmes (circulatoire, respiratoire, digestif...) contribuant tous à la sauvegarde de l'intégrité de l'organisme. Pour que l'homéostasie soit préservée, il est nécessaire que ces êtres vivants soient protégés contre l'invasion de la plupart des éléments étrangers au soi. C'est le rôle du système immunitaire. Ce mécanisme de défense, existant déjà chez les spongiaires sous une forme primitive, a évolué vers une complexification et l'acquisition d'une spécificité plus grande pour aboutir au système immunitaire moderne des vertébrés.

Ainsi cette défense, d'abord non spécifique a su acquérir les moyens de reconnaître une structure et d'engager une réponse spécifique contre elle.

I.1. L'immunité non-spécifique.

La base même de l'immunité est la reconnaissance entre le soi et le non-soi. Cette distinction se fait dès que les cellules s'associent pour former un organisme pluricellulaire (1). Pour défendre cette structure, les organismes primitifs ont dû développer un mécanisme de défense. C'est ainsi que les spongiaires ont tiré profit de la capacité phagocytaire de leur amœbocytes, qui ont un rôle digestif, pour détruire tous corps étrangers perturbants leur organisation (2). La défense non-spécifique est mise en place, sous forme de la propriété phagocytaire de certaines cellules.

Cette fonction de phagocytose se verra améliorée au cours de l'évolution par plusieurs éléments. Ainsi chez les invertébrés, tel que les arthropodes, les annélides et les mollusques, apparaissent des produits humoraux appelés antisomes. Ils recouvrent les antigènes (Ag = molécules ou

corps reconnu comme n'appartenant pas au soi) facilitant ainsi la destruction de ceux-ci par les cellules phagocytaires. Les vertébrés, pour qui les antisomes sont des immunoglobulines, ont aussi acquis des cellules tueuses. Ces "natural Killer" sont spécialisées dans la destruction de toutes cellules infectées par un virus.

Tous ces éléments forment l'immunité non-spécifique, qui est la première ligne de défense. La majorité des corps étrangers voulant envahir l'organisme sont arrêtés par cette barrière. Cependant il arrive qu'elle ne soit pas suffisante. Alors l'hôte va développer une réponse centrée sur cet agent extérieur qui a su se propager malgré l'immunité non-spécifique.

I.2. L'immunité spécifique.

Les organismes ont donc installé petit à petit une autre ligne de défense, qui, comme nous le remarquerons plus tard n'est pas venu s'adjoindre à l'immunité non-spécifique indépendamment de celui-ci. Mais au contraire, il y est étroitement lié par le rôle de certaines cellules phagocytaires.

Cette seconde barrière est caractérisée par deux propriétés fondamentales : la spécificité et la mémoire. La mémoire existe déjà chez les spongiaires, mais à court terme. Tandis que la spécificité de la réponse n'est vraiment montrée que chez les vertébrés, et correspond à la mise en place de cellules spécialisées : Les lymphocytes.

Ils agiront soit au travers de molécules libérés dans le système circulatoire, c'est l'immunité humorale, soit en attaquant des cellules infectées ou reconnu comme étrangères au soi, c'est l'immunité cellulaire. Leur action est dirigée contre une structure moléculaire précise, le déterminant antigénique ou épitope reconnues antérieurement.

I.2.1. L'immunité humorale.

C'est une défense particulière pour éviter la propagation rapide de l'Ag grâce à la circulation du sang et de la lymphe. Elle est caractérisée par la production d'anticorps (Ac). Les responsables de cette fabrication sont les lymphocytes B, après avoir été activé par deux signaux. En premier lieu le lymphocyte B doit rencontrer un antigène présenté par une cellule présentatrice de l'Ag (C.P. Ag), c'est le signal antigénique. Ensuite il doit subir l'action d'interleukines, produit par les lymphocytes T helper. C'est le second signal.

Les anticorps libérés dans le système circulatoire vont se lier à l'antigène formant un complexe Ag - Ac. Il se trouve que les cellules phagocytaires les mêmes qui sont dans le système non-spécifique, ont des récepteurs pour les anticorps. Ces cellules vont capter les antigènes via l'anticorps et détruire ce complexe. Cette destruction de l'élément étranger au soi est lié à l'interaction anticorps-antigène. Or les anticorps sont des molécules de grandes tailles (150-1000 Kdalton). Ils ne peuvent donc pas rentrer librement dans une cellule et en ressortir. Alors comment va être détruit un virus qui s'est introduit dans une cellule ? C'est ici qu'interviennent les cellules T.

I.2.2 L'immunité cellulaire.

L'immunité cellulaire, permet de défendre l'organisme plus particulièrement contre des agents infectieux qui se logent dans les cellules de l'organisme hôte, échappant ainsi à l'action des anticorps. C'est aussi elle qui est responsable du rejet des greffes. Regardons de plus près les cellules impliquées dans une réponse à médiation cellulaire. Cette réponse est spécifique, et, qui dit spécifique, dit reconnaissance.

Ce sont les lymphocytes T qui reconnaissent les déterminants antigéniques.

I.2.2.1. Les lymphocytes T.

Ils sont originaires de la lignée lymphoïdes de moëlle osseuse comme les cellules B. Quand ils arrivent dans le sang, ils ne sont pas encore mature. Pour pouvoir agir, ils vont devoir subir deux signaux : le signal antigénique et l'action d'interleukines, provenant cette fois-ci de la C.P.Ag. Les lymphocytes, précurseur des Thelper, ayant reçu les deux signaux deviennent des T immuno-compétent, qui à leur tour vont synthétiser l'interleukine II, qui va activer d'autres lymphocytes précurseurs sensibilisés à l'Ag. Ces derniers vont acquérir une fonction et on distinguera les cellules T sécrétrices, qui secrètent des produits influençant la fonction des autres cellules impliquées dans le système immunitaire, les lymphocytes T cytotoxique (Tc) qui détruisent les cellules infectées, les lymphocytes T supprimeur qui vont inhiber la réponse immunitaire dirigée cont l'Ag. Réponse qui a été développée par l'intermédiaire des cellules T, des CPAg et des lymphocytes B... Comme les cellules B, les lymphocytes T ne savent reconnaître l'Ag que si ce dernier est présenté par une C.P.Ag. Nous pouvons percevoir ici l'importance de ces cellules dans l'élaboration d'une réponse immunitaire.

I.2.2.2. Les cellules présentatrices de l'antigène.

Souvent lorsqu'on parle des C.P.Ag, on sous-entend que ce sont des cellules dérivant des monocytes.

Cela sera notre cas puisque nous avons utilisé principalement ce type de cellules lors du travail.

Toutefois il y a de plus en plus d'études faites in vitro qui montrent que les CPAg ne sont pas définies par un seul type cellulaire. Effectivement les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer, les lymphocytes B et même des cellules Endothéli ales ont montré une capacité de présenter un Ag soluble (3). Cependant la littérature ne comporte pas encore grand chose sur les cellules qui ont cette fonction de présenter

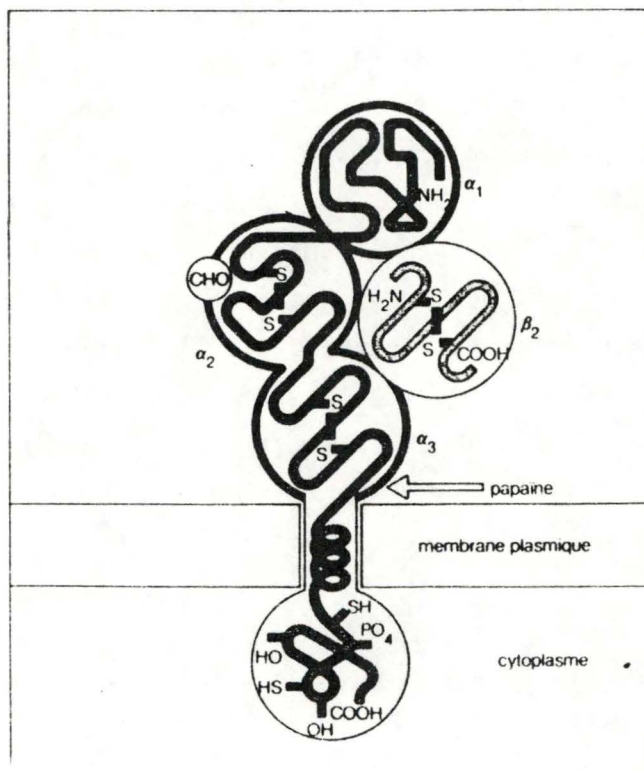


Schéma 1:

Structure des molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

ref: I.Roitt et al,1985(4)

l'Ag dans le cadre de l'organisme.

Le but principal de ces cellules est de faire connaître aux lymphocytes un épitope appartenant au corps étranger. Or celui ci en contient une multitude.

Il est donc très probable que l'Ag subit une dégradation réduisant ainsi l'Ag original en petits morceaux présentables. Ces derniers seront appelés par la suite Ag.P. Après cette destruction partielle le petit morceau va être recyclé dans la membrane de la CPAg pour y être exposé avec une autre protéine, formant ensemble une structure, laquelle pourra être reconnue par les récepteurs des lymphocytes. Ainsi donc la présentation et la reconnaissance de l'Ag.p est étroitement lié à cette protéine secondaire, qui n'est autre que le produit des gènes du complexe Majeur d'Histocompatibilité permettant aux cellules de différencier le Soi du Non Soi.

I.2.3. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

C'est une région dans le génome qui a été découverte par son effet sur le rejet des greffes. Chez le bovin le complexe majeur d'Histocompatibilité (CMH) est encore peu connu, mais il a été bien étudié chez l'homme où ce complexe est dénommé HLA. Il contient deux régions chacune codant pour un type de protéine appelée protéine de classe I ou de classe II, selon la région considérée.

La structure des antigènes du CMH.

Les molécules de classe I sont localisées dans les membranes plasmiques de toutes les cellules nucléées. Elles sont constituées d'un polypeptide (44 000 d) associés à une microglobuline. (Schéma 1).

Les antigènes de classe II ne sont localisés dans la membrane plasmique que de quelques cellules : lymphocytes B; CPAg; lymphocyte T activé (Th). Ils sont formés par deux peptides (30 000 d) associés de

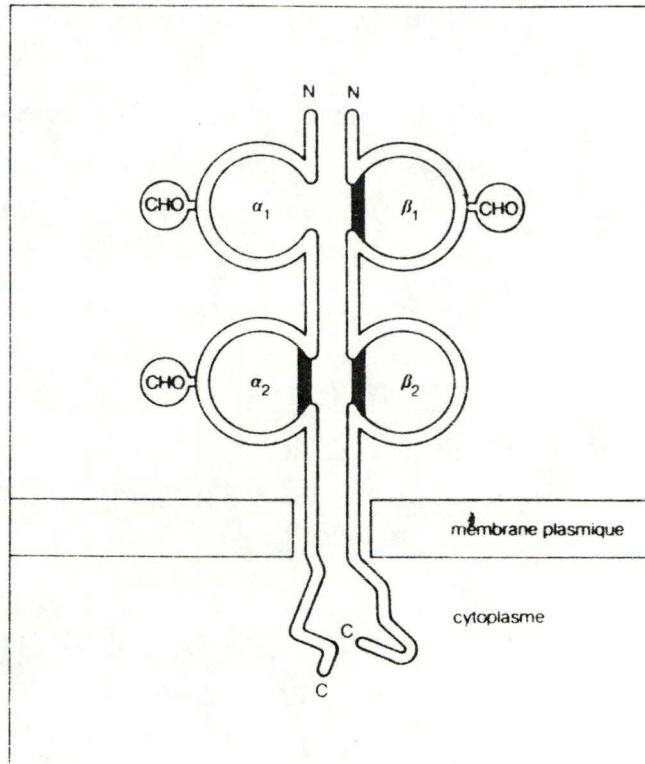


Schéma 2:

Structure des molécules de classe II du Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

ref: I.Roitt et al,1985 (4)

façon non covalente. Ce sont les chaînes α et β (Schéma 2).

Fonction de ce CMH.

Le CMH représente la plaque tournante du système immunitaire. Ainsi, la fonction principale du système immunitaire, qui est de défendre l'hôte contre les invasions pathogènes, nécessite un moyen qui permet de discriminer les structures du SOI celle du NON-SOI. Le mécanisme précis qui conduit à cette discrimination est inconnu mais il apparaît évident que ces molécules dérivant du CMH ont un rôle central dans ce processus. Il a été établi que les TH qui contrôlent toutes les reconnaissances spécifiques des antigènes, dans le système immunitaire, réagissent uniquement avec des molécules étrangères à condition qu'elles soient associées aux protéines de classe II. De plus les Tc exercent leur fonction uniquement lorsque l'Ag est juxtaposées à une molécule de classe I du CMH.

Ces réponses du système immunitaire peuvent varier d'un individu à l'autre contre un même Ag. Ces différences sont attribuées au niveau des molécules d'histocompatibilité, qui selon leur degré d'affinité s'associeront avec l'Ag en un complexe pouvant être reconnu par les lymphocytes T. Ainsi le CMH serait un régulateur de la réponse immunitaire (5).

A présent que nous avons passé en revue les éléments qui entrent en jeu pour développer une réponse immunitaire spécifique, attardons nous aux relations existant entre les CPAg et les lymphocytes T.

II. De l'ingestion à la reconnaissance

Nous avons brièvement vu qu'entre la pénétration du corps étranger dans l'organisme et sa reconnaissance par les lymphocytes T. Nous pouvons distinguer trois étapes qui dans l'ordre chronologique sont le processing, la présentation et la reconnaissance. Pour des raisons de

clarté nous allons d'abord parcourir la présentation puis la reconnaissance et enfin le processing.

II.1 La présentation

La présentation de l'Ag.P implique sa juxtaposition à une molécule de classe II. Mais la nature de la relation qui existe entre ces deux éléments est sujet à discussion.

Pour certains il ne s'agit que d'une proximité étroite, pour que les récepteurs du lymphocyte T puissent reconnaître les deux molécules.

Pour d'autres il existe un lien physique. Ce lien est-il covalent, non covalent ? Là aussi les points de vue sont différents. Barber (6) remet en cause l'idée que la molécule de classe II se lierait à l'Ag de façon non covalente comme le ferait un Ac. Car, alors, comment expliquer que la protéine de classe II puisse se lier à tant d'Ag différent ? Comment dans des conditions de faible concentration, ce faible lien pourrait-il persister longtemps ? Il émet une idée qui pourrait répondre à ces questions : la molécule de classe II se lie à l'Ag de manière covalente.

Cette attache se ferait par une réaction enzymatique, capacité inhérente à la molécule du CMH ou à un peptide étroitement associé à celle-ci. Ce lien pourrait être réversible permettant le recyclage du produit du CMH.

Cette idée libère la molécule de classe II de la contrainte de se lier à l'Ag de manière spécifique et reste en accord avec le modèle du soi altéré, de la reconnaissance de l'Ag, que nous allons voir plus loin.

II.2. La reconnaissance.

Donc l'Ag est toujours reconnu en association avec des protéines du CMH. Cette observation a mené deux hypothèses majeures.

La première (a) est celle de la double reconnaissance, elle propose l'existence sur les lymphocytes T, de deux récepteurs : un qui reconnaît l'Ag, l'autre, la protéine du CMH.

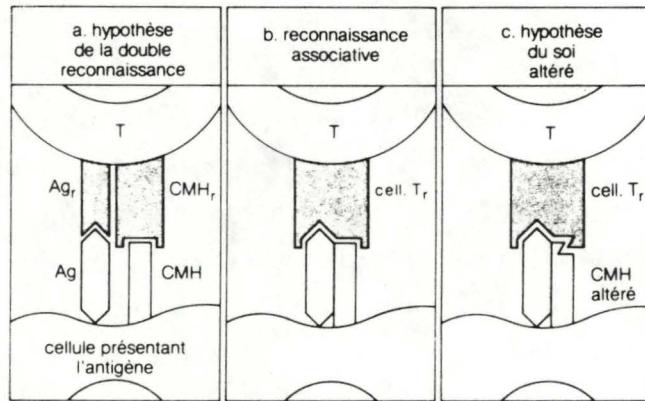


Schéma 3:

Les trois hypothèses de la reconnaissance de l'antigène par les cellules T:

la double reconnaissance, la reconnaissance associative et la reconnaissance du SOI altéré.

ref: I.Roitt et al, 1985 (4)

La seconde (b), dénommée reconnaissance associative, préconise une reconnaissance, par un récepteur unique, de l'Ag liée à la molécule du CMH. Une troisième hypothèse (c) dérivant de cette dernière suppose que le récepteur reconnaît l'Ag et le produit du CMH modifié par l'antigène. C'est le modèle du soi altéré. (Schéma 3).

Les études actuelles n'ont pas encore permis de déterminer laquelle est la plus adéquate. Selon Peter Creswell, certains chercheurs auraient eu des résultats qui vont dans le sens d'une reconnaissance d'un nouveau déterminant généré par l'association de l'Ag et de la protéine de classe II du CMH (7). Ce qui défend les deux dernières hypothèses.

Pour donner affirmativement l'avantage à l'une de ces théories il faudrait mettre en évidence l'existence ou non d'un complexe Ag - Protéine du CMH. Ce qui n'a pas été fait de manière indiscutable. Devant un manque de résultats probants pour l'un ou l'autre modèle CHESNUT et GREY (3) ont posés une autre façon de voir cette reconnaissance de l'Ag par les cellules T, en corrélation avec les molécules du CMH.

Ce quatrième modèle propose que l'Ag et les protéines de classe II se fixent sur le récepteur du lymphocyte T indépendamment l'un de l'autre pour former un complexe trimoléculaire. Ensuite l'interaction Ag Protéine du CMH serait en faveur ou en défaveur d'une stabilisation de ce complexe.

Cette idée est partagée par Parham (8). Cependant Chesnut et Grey pensent que ce complexe trimoléculaire commence par un complexe bi-moléculaire entre le récepteur T et la molécule de classe II.

Par la suite viendrait se joindre l'Ag. Ce dernier pourrait s'engager dans le récepteur sous le contrôle du complexe moléculaire. Ceci dit le mécanisme de la reconnaissance de l'Ag par les cellules T reste encore à l'état hypothétique.

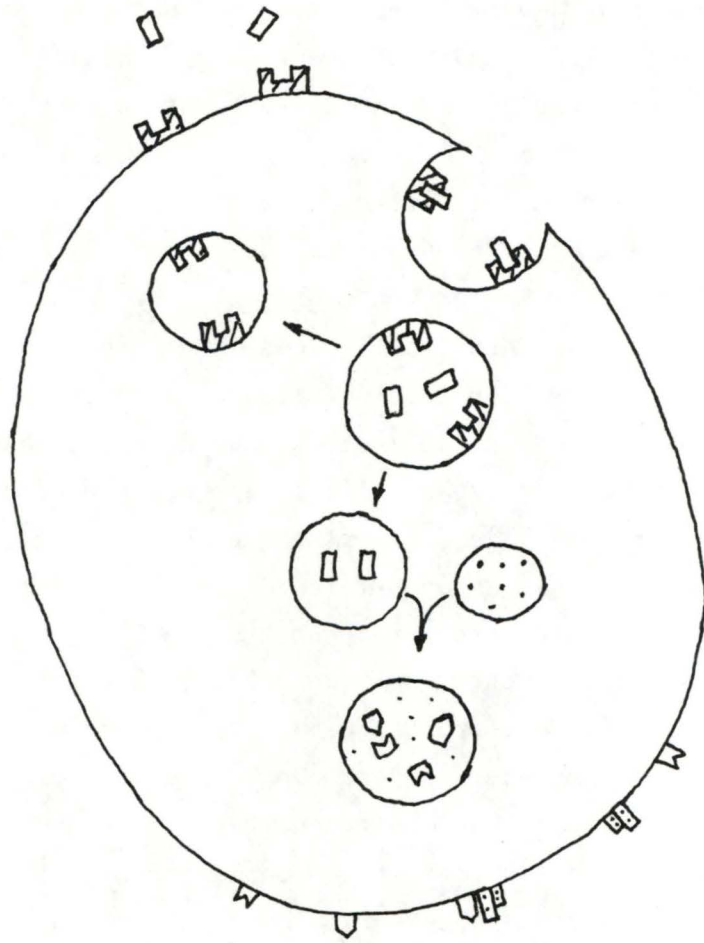


Schéma 4:

Modèle conventionnel du "processing".

L'antigène () est fixé sur un récepteur (). Il est ingéré et subit une dégradation dans les lysosomes. Des fragments de l'antigène sont recyclés dans la membrane plasmique où certains s'associent avec les molécules de classe II ().

II.3 Le processing de l'Ag.

Avant que l'Ag soit reconnu par les lymphocytes T; celui-ci doit s'associer aux molécules du CMH. On peut se demander où cela se passe. Est-ce une fixation de l'Ag à la surface de la CPAg ou y-a-t-il une internalisation antérieure à la présentation de l'Ag ?

Le problème abordé ici est celui du traitement de l'Ag. Le processing de l'Ag représente le traitement, éventuel, que subit l'Ag depuis sa fixation sur la CPAg jusqu'à sa présentation aux cellules T.

La première idée venue à l'esprit est : une fixation directe de l'Ag à la surface de la CPAg et sa présentation, sans traitement antérieur.

Mais bien vite, des arguments plaident pour une autre vision de ce mécanisme (3)(9). En effet l'existence d'un temps de latence entre la fixation de l'Ag sur les CPAg et sa reconnaissance par les T, l'inhibition de la présentation par des agents lysosomotropes, et la présence de l'Ag dans la CPAg, suggèrent que l'Ag subit un traitement protéolytique. Cela va conduire rapidement au modèle généralement admis. (Shéma 4)

II.3.1 Modèle du Processing.

Le corps étranger (molécule, bactéries) est internalisé par les CPAg, par le biais de récepteurs membranaires. L'endosome fusionne avec des lysosomes conduisant l'Ag à la phase de dégradation. Cette protéolyse serait partielle et les peptides restant sont recyclés dans la membrane où ces "rescapés" s'associeraient avec les molécules de classe II du CMH pour être reconnu par les lymphocytes T.

Toutefois ce concept du processing reçu des avis critiques remettant en cause plusieurs aspects.

II.3.2 Points de litige sur le modèle du processing.

Ainsi, dans le quatrième symposium international sur l'immunobiologie des protéines et des peptides (7), une des questions soulevées était : le processing de l'Ag est-il indispensable à la reconnaissance de l'Ag par les TH ?

Plusieurs chercheurs tels que Unanue (10), Grey (11) ont montré que le processing n'est nécessaire que pour des protéines entières, tandis que des fragments provenant d'une protéolyse d'un Ag peuvent être reconnus par des T, sans être internalisés dans la CPAg.

D'autres chercheurs ont essayé de montrer que des protéines entières pouvaient être reconnues par des cellules T. Mais ils ne sont pas parvenus à déterminer que cet Ag originel ne subissait réellement pas de dénaturation. Or Berzofsky (12) a montré qu'une dénaturation est suffisante pour une reconnaissance par des T.

Cependant si l'on considère que leurs résultats sont représentatifs d'une reconnaissance de l'Ag natif, alors on pourrait penser que le processing de l'Ag est parfois nécessaire, et parfois pas.

Il y aurait peut être des conditions dépendantes de l'Ag, des lymphocytes T, qui détermineraient la nécessité ou non de ce phénomène.

Ceci est dans la ligne d'idée de l'équipe de Mr. Kingston (9). Ils ont observés d'après une étude, faite sur la reconnaissance de la structure native par des clones de lymphocyte T spécifiques au virus influenza, qu'une partie des lymphocytes T reconnaissent des déterminants conformationnels. Un déterminant conformationnel est un site reconnu, qui résulte de la structure tridimensionnelle de la protéine. En outre, ils remarquent que les agents lysosomotropes n'inhibent pas tou-

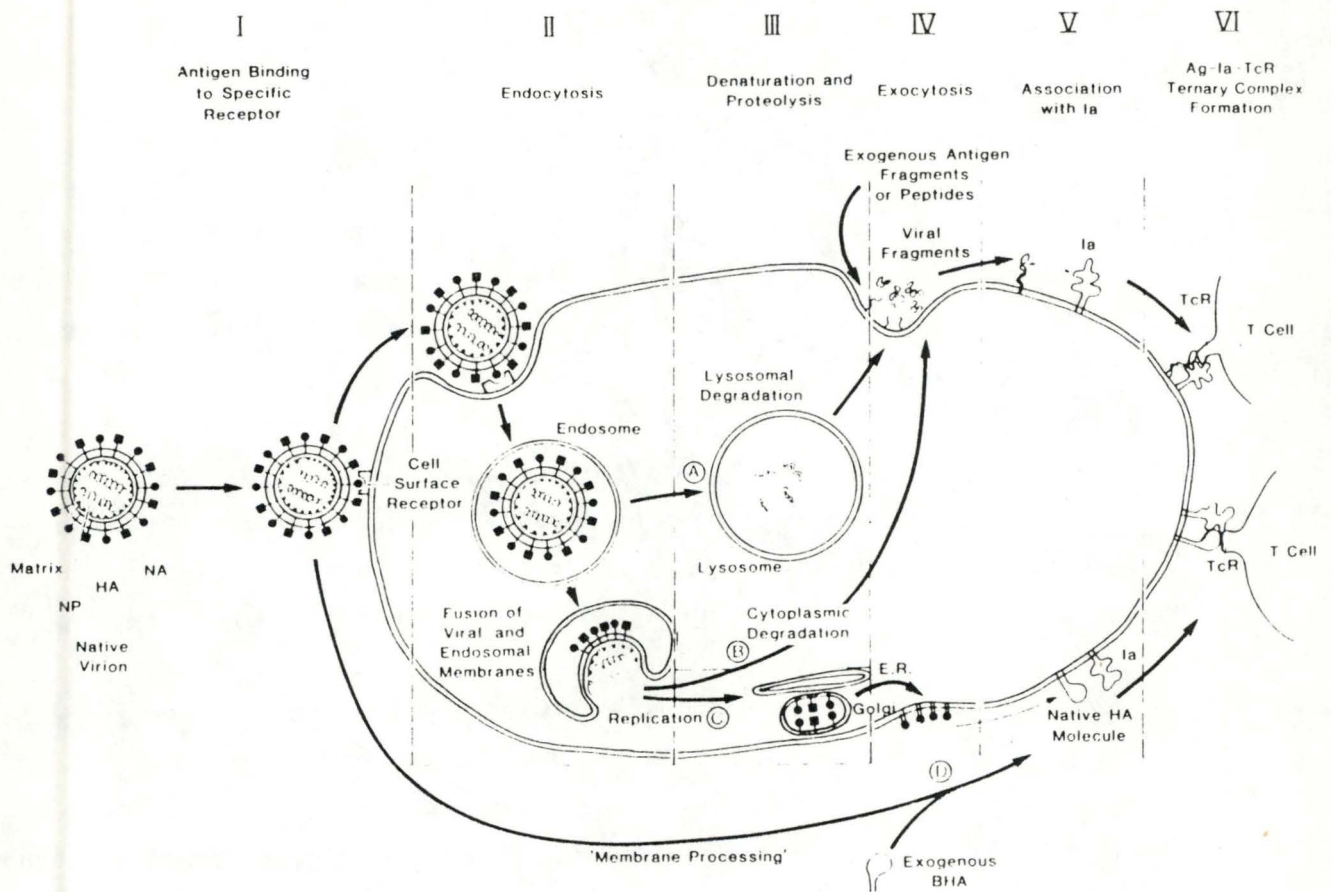


Schéma 5:

Représentation des différents chemins suivi par l'antigène du virus influenza lors du "processing".

- A..traitement interne dans les lysosomes.
- B..dégradation interne hors des lysosomes.
- C..infection de la CPAg par un virus, suivi par l'expression de glycoprotéines à la surface cellulaire.
- D..présentation de l'antigène natif sans "internalisation".

ref: Kingston et al, 1986 (9)

jours la présentation de l'Ag. De là ils supposent l'existence de différentes manières de traiter l'Ag et proposent quatre mécanismes de "Processing".

Le premier mécanisme (A) fait intervenir une protéolyse par le biais des lysosomes. C'est le modèle cité ci-dessus. Le second (B) met en oeuvre une dégradation dans le cytoplasme et non dans les lysosomes.

Le troisième (c), particulier au virus, ne fait plus intervenir une étape de dégradation. Ce mécanisme suppose l'expression de glycoprotéines virales qui, recyclées dans la membrane, s'associeront aux protéines de classe II.

Enfin, le quatrième (D) et dernier type de processing exclut la phagocytose. L'Ag se fixe sur la membrane et s'associe aux molécules du CMH. (Schéma 5).

Selon cet auteur le processing n'est pas un simple et unique mécanisme, c'est un traitement variable appliqué à l'Ag selon les caractéristiques de ce dernier, des cellules T, et pourquoi pas des CPAg. Par exemple, si un lymphocyte T reconnaît un déterminant antigénique enfoui dans la structure de l'Ag et donc inaccessible, la dégradation se fera. Ce qui ne sera le cas si la cellule T reconnaît un déterminant conformationnel en surface de l'Ag et accessible.

Le processing se fait donc à différents endroits selon le chemin utilisé. Et les lysosomes sont impliqués dans l'un de ces mécanismes, pour opérer une protéolyse partielle, puisque il y a un recyclage des morceaux de l'Ag originel. Dans ce cas ci comment des lysosomes qui ont pour fonction de dégrader totalement les substrats qu'ils reçoivent pourraient-ils dégrader partiellement l'Ag ?

J.H. Brock (13) ayant relevé ce fait propose alors une dégradation incomplète dans une vésicule non-lysosomiale ayant un contenu acide.

Cependant une dégradation partielle de l'Ag dans les lysosomes pourrait se faire à condition que le morceau recyclé dans la membrane soit protégé de l'action des enzymes lysosomiaux. De quelle nature serait cette

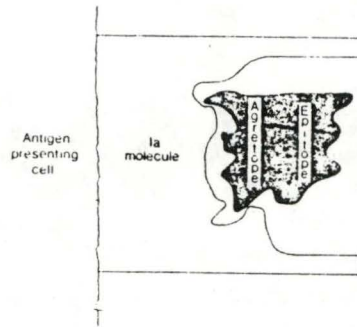


Schéma 7:

Fixation d'un peptide, ayant un agrétope, sur une molécule de classe II du CMH.

ref: O.Werdelin, 1986 (14)

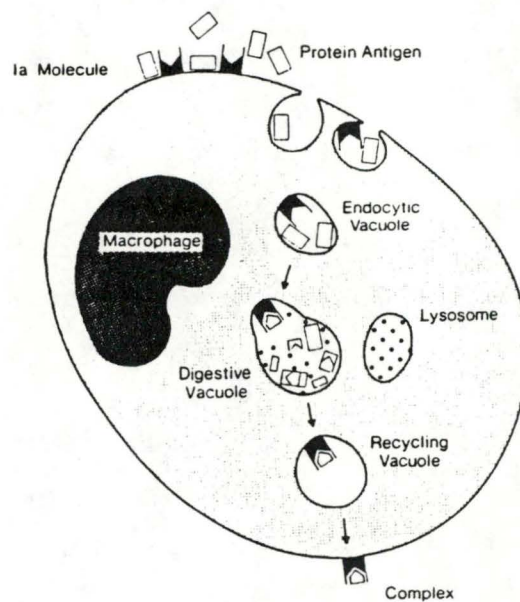


Schéma 6:

Le "processing" selon O.Werdelin.

L'antigène ingéré, est hydrolysé en petit morceau, dont certains montrent des sites, qui n'apparaissent pas sur l'antigène natif. Ces fragments sont reconnus par les molécules de classe II. L'ensemble est recyclé dans la membrane plasmique.

ref: O.Werdelin, 1986 (14)

protection ? Cela pourrait être le récepteur sur lequel s'est fixée la protéine étrangère.

Cette idée est partagée en partie par O.Werdelin (14) qui voit le processing de la manière suivante :

L'Ag est phagocyté et fractionné dans un compartiment acide. Ceux qui, parmi les fragments ont un site appelé agrétope (Schéma 6), reconnu par les molécules de classe II du CMH, se lieront avec ces derniers (Schéma 7). Ils seront ainsi protégés d'une dégradation plus poussée et seront recyclés dans la membrane. Les autres morceaux seront complètement dégradés. Donc seul les peptides ayant un agrétope seront immunogènes.

Remarquons ici que l'Ag traité s'associe aux protéines du CMH avant d'être recyclé. Mais ne serait-il pas possible d'imaginer que l'Ag puisse déjà se lier au produit du CMH par l'agrétope à la surface même de la CPAg. Le complexe ainsi formé serait internalisé. Les protéines de classe II auraient un rôle de protection d'un morceau de l'Ag contre une protéolyse totale. Ce morceau serait constitué par l'agrétope et le site reconnu par les TH, et recyclé dans la membrane avec l'Ag du CMH. C'est cette idée qui forme l'objet de ce travail.

III. Objet du travail

L'objet de ce travail est de faire une approche sur la relation qui existe éventuellement entre les molécules de classe II et le processing de l'Ag. Ceci dans les perspectives d'étudier le rôle exact joué par les protéines de classe II entre l'internalisation de l'Ag et sa présentation sur la membrane de la CPAg.

Cette approche nécessite la connaissance de la distribution des organites impliqués dans l'endocytose des monocytes Bovins. Au cours de ce travail nous avons essayé de déterminer la répartition des enzymes "marqueurs", en corrélation avec l'évolution de la distribution de l'Ag et des molécules de classe II en fonction du temps.

Ce type de travail implique la séparation des différents éléments sub-cellulaires. La centrifugation est une méthode adéquate pour ce travail en plus il nous est possible de comparer la distribution d'éléments tel que Ag, protéine de classe II, à celle des enzymes spécifiques à des organites permettant d'associer ces éléments à des organites sub-cellulaires.

MATERIELS ET METHODES

I. Préparation cellulaire.

I.1. Isolement de lymphocytes du sang périphérique de bovin.

300 ml de sang de Bovin sont récoltés dans 30 ml d'EDTA (4 mM, PH 7.4) que l'on centrifuge à 770 g, 15 min à température ambiante, pour séparer grossièrement les leucocytes des globules rouges.

- on récolte le "Buffo-coat" qui est l'anneau des leucocytes, que l'on dilue au minimum volume pour volume avec du PBS isotonique (voir composition en annexe).
- Ensuite on dépose 20 ml de cette suspension dans 15 ml d'un mélange de Ficoll urographiné et centrifuge à 1000g, 25 min à température ambiante. Ce qui permet de séparer les lymphocytes des autres éléments sanguins.
- L'anneau de lymphocytes récolté est resuspendu dans du PBS et centrifugé à 289 g, 10 min. Après élimination du surnageant on effectue un choc osmotique sur le culot avec 20 ml de NH_4Cl à 7,5 % pour détruire les globules rouges restant. La suspension est centrifugée à 216 g 10 min.
- Ensuite trois à quatre lavages sont effectués au PBS afin d'éliminer un maximum de plaquettes sanguines.
- Enfin le culot de lymphocytes est resuspendu dans du saccharose quart molaire, de manière à avoir une suspension de concentration désirée.

I.2. Lignée bovine myéloïde établie. (15)

C'est une lignée cellulaire continue, fournie par le Professeur Leibold (Hannover), obtenue en infectant des cellules lymphoïdes bovines par les sporozoïtes de *Theileria Annulata*. Ces cellules n'expriment pas des structures caractéristiques des lymphocytes T ou B, mais des molécules que l'on retrouve sur des monocytes. Elles expriment des molécules de classe I et II du complexe majeur d'Histocompatibilité.

Culture cellulaire :

La culture cellulaire se fait à 37°C avec 5% CO₂ dans un milieu de la composition suivante:

RPMi 1640 (GIBCO)	
Pyruvate de sodium	1%
Glutamate	1%
Serum foetal de veau (décompléter à 56°C, 30')	10 %
HEPES	4.74 gr/L
Nali Co3	0,85 gr/L

Les cellules se multiplient dans un premier temps sous une forme adhérente jusqu'à un stade de semi confluence à la suite de quoi des formes libres isolées ou en amas apparaissent dans le surnageant.

Le transfert de ces formes libres dans de nouveaux flacons permet d'amplifier la culture.

Après avoir récolté les cellules sous forme libre, on les lave au PBS par trois fois en centrifugeant à 289 g, 10 min. Le culot est ensuite resuspendu dans du saccharose quart molaire de façon à obtenir une suspension de 8 10 de cellules par ml.

II. 1 Centrifugations.

La centrifugation est une méthode adéquate pour séparer les différents organites cellulaires.

On utilise la centrifugation différentielle, qui sépare les structures subcellulaires principalement selon leur taille et la centrifugation isopycniqne, séparant les organites en fonction de leur densité.

II.2. Aspect théorique

Sous l'action de la force centrifuge les organites acquièrent une certaine vitesse de sédimentation caractérisée par la relation de Svedberg :

$$V_s = \frac{v (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x}{f} \quad (1)$$

V_s : vitesse de sédimentation	ω : vitesse angulaire
v : volume de la particule	du rotor.
ρ_p : densité de la particule	x : distance de la particule
ρ_m : densité du milieu	f : coefficient de friction
	de la particule

En considérant que la particule est sphérique, ce qui est approximativement le cas pour la majorité des organites, on obtient la relation suivante :

$$V_s = \frac{2 r^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x}{9 \eta}$$

r : rayon de la particule
 η : coefficient de viscosité

Le coefficient de sédimentation (S) est défini comme étant la vitesse de sédimentation par unité de champs.

$$S = \frac{v_s}{\omega^2 x} = \frac{2 r^2 (\rho_p - \rho_m)}{9 \eta} \quad (2)$$

L'unité la plus fréquemment utilisée pour le coefficient de sédimentation est le svedberg.

1 Svedberg correspondant à 10^{-13} secondes.

II.2. La centrifugation différentielle en milieu homogène.

Elle s'effectue dans un milieu saccharose isotonique à partir d'un homogénat. En reprenant la formule (2) on remarque que le facteur $(\rho_p - \rho_m)$ est dans ce cas ci constant. Le milieu étant isotonique par rapport aux particules, leur taille ne varie pas. D'où le coefficient de sédimentation est constant. Cela permettra de séparer les différentes particules en fonction de leur S. C'est-à-dire principalement en fonction de leur taille puisque contrairement à la densité, le rayon de la particule intervient au carré dans la formule du coefficient de sédimentation.

Différentes étapes du fractionnement.

Une suspension cellulaire est préparée à la concentration désirée puis on réalise un homogénat à partir de cette suspension, c'est-à-dire on libère le contenu cellulaire. Cela se fait à l'aide d'un homogénéiseur (Balch - Rothman), qui casse les membranes plastiques en les soumettant à des forces de friction tout en préservant l'intégrité des organites.

L'homogénéiseur correspond à un petit cylindre de plexiglass contenant une bille de plomb. L'homogénéisation consiste à faire passer, plusieurs fois, dans ce cylindre la suspension cellulaire à l'aide d'une seringue.

1) "Aller retour" de la suspension dans l'homogénéiseur correspond à un passage. La séquence des passages est les différents nombres de passages effectués entre chaque centrifugation citée ci-dessous.

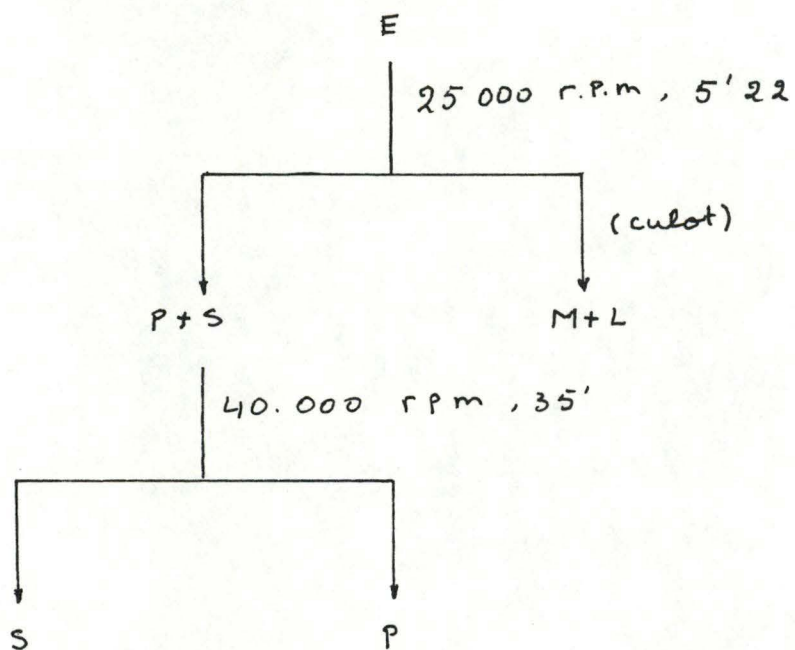
Ensuite on centrifuge à 1700 rpm pendant 10' dans une centrifugeuse internationale PR-2 (toutes les centrifugations se font à 0°C). Le surnageant est enlevé, le culot resuspendu avec la solution de saccharose puis rehomogénéisé et centrifuger à 1500 rpm, 10 min. On opère ainsi une troisième fois, en centrifugeant à 1500 rpm, 10 min. Cette dernière phase provoque souvent la rupture des membranes nucléaires entraînant la libération de l'ADN.

Deux fractions sont ainsi obtenues. Le culot donnant la fraction nucléaire (N) qui contient les noyaux, des fragments cellulaires et éventuellement encore des cellules entières. Le surnageant constituant l'extrait (E) est constitué des structures subcellulaires à l'exception du noyau.

A partir de l'extrait on peut séparer quatre autres fractions : la fraction mitochondriale lourde (M) composée surtout de mitochondries, la fraction légère (l) contenant principalement les lysosomes et les peroxysomes, la fraction microsomale (p) composé surtout par les membranes plasmiques le réticulum endoplasmique et la fraction soluble (S)

Schéma de centrifugation décrit ci-dessous.

Shéma de centrifugation :



Les fractions M, L, P sont resuspendues et rassemblées en une fraction MLP qui sera soumise à une centrifugation isopycnique.

II.3. La centrifugation isopycniqne

C'est une méthode qui permet de sous fractionner la fraction MLP. On utilise un gradient de sac harose linéaire ayant comme limite de densité 1.09 et 1.26 ou 1.05 et 1.30 gr/ml.

La fraction MLP est déposée au sommet de ce gradient.

La centrifugation se fait avec un rotor SW 65 dans une centrifugeuse Beckman de type spinco L2-75B, à 39000 rpm pendant une nuit.

En progressant dans le gradient sous l'effet de la force centrifuge, la particule va rencontrer des zones de densité croissante en saccharose. Comme le montre l'équation 1, la vitesse de sédimentation s'annulera lorsque la densité de la particule et celle du milieu seront égales. La particule aura alors atteint sa densité d'équilibre.

La centrifugation finie, le gradient sera sectionné en une quinzaine de coupes dont le contenu est recueilli.

La densité de chaque coupe est mesurée.

III. Les dosages enzymatiques.

La localisation des structures sub cellulaires se fait en mesurant l'activité d'enzyme "marqueurs". Cette pratique repose sur deux postulats.

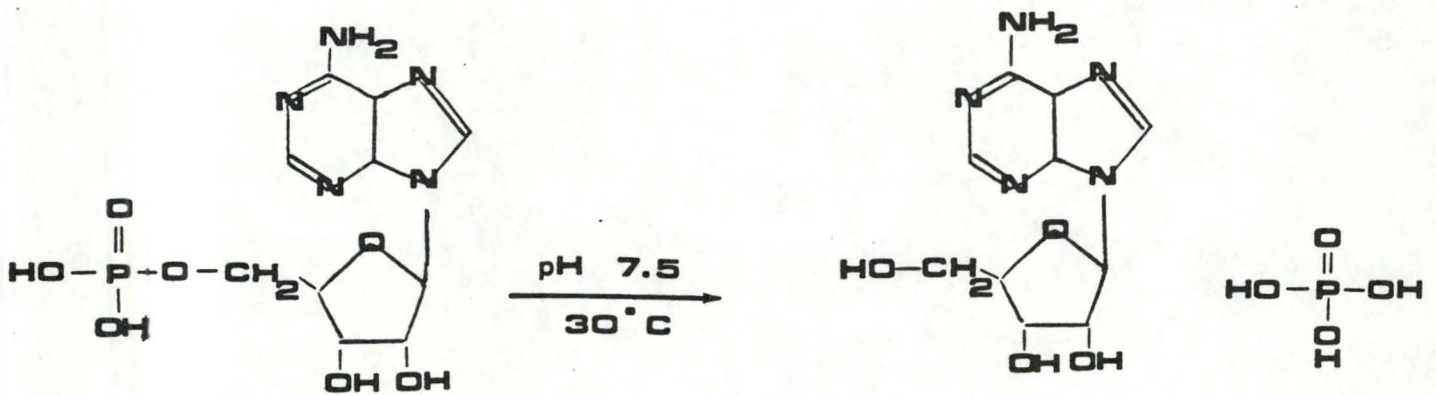
1. Le postulat d'homogénéité biochimique suppose que toutes les particules d'un même type ont la même concentration enzymatique

2. Le postulat de localisation unique qui suppose qu'une enzyme de référence donnée est spécifique d'un type d'organite. Dans la première partie de ce travail on s'est limité à établir la localisation des lysosomes du réticulum endoplasmique et des mitochondries. En utilisant respectivement comme enzyme "marqueurs" la β -galactosidase, l' α -Glucosidase et la cytochrome oxydase.

Dans la seconde partie on a utilisé la Phosphodiesterase alcaline et l'mannosidase pour localiser respectivement la membrane plasmique et les lysosomes. Mais on a testé d'autres enz spécifiques de la membrane plasmique : la 5' AMP; le Phosphatase alcaline, la Dipeptidyle peptidase IV et la leucyl - naphtylamidase.

1) La 5' AMPase (16)

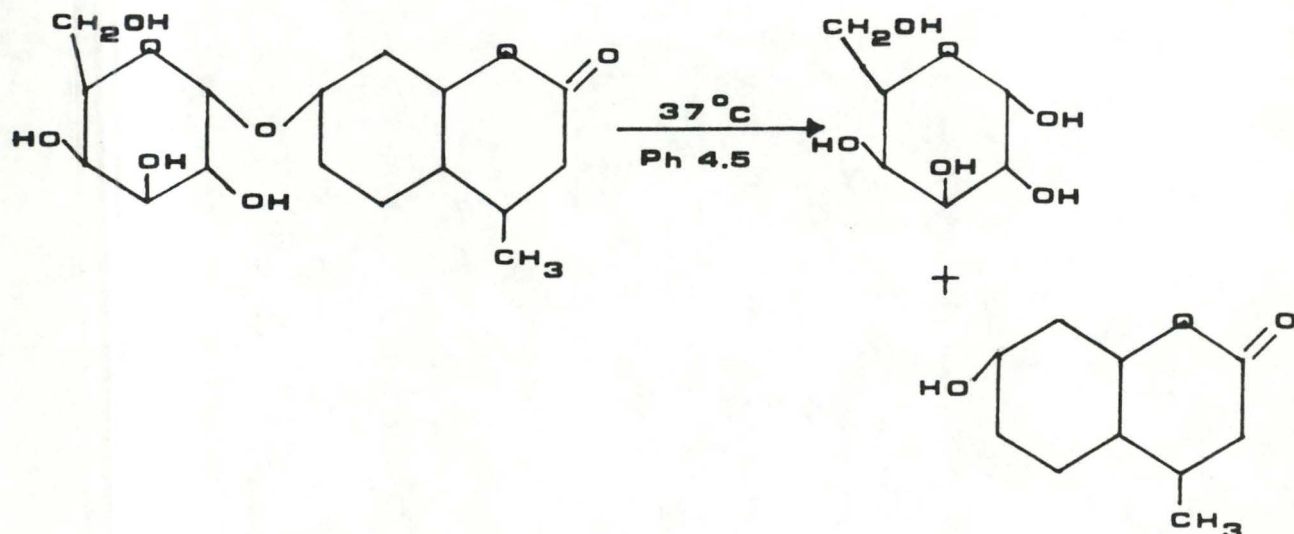
La 5'AMPase enlève un Phosphate inorganique à partir du 5' AMP



2) β.Galactosidase. (17)

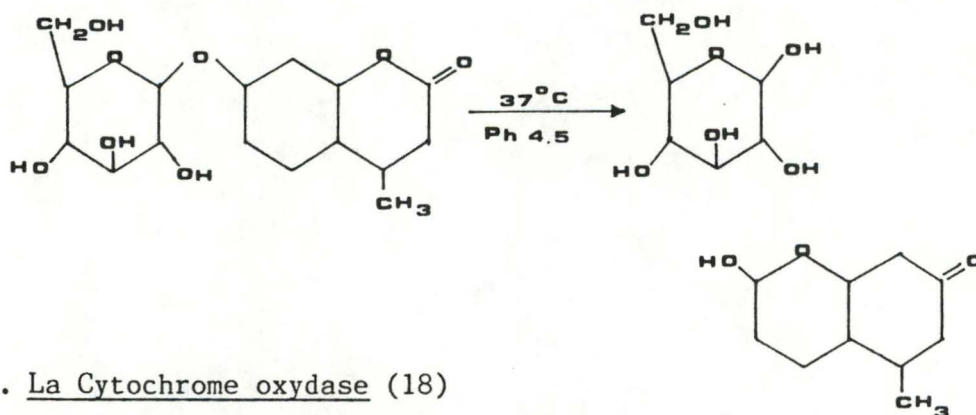
La B. Galactosidase libère un galactose à partir du méthy-

lumibelliferyl galactoside.



3. L' Glucosidose. (17)

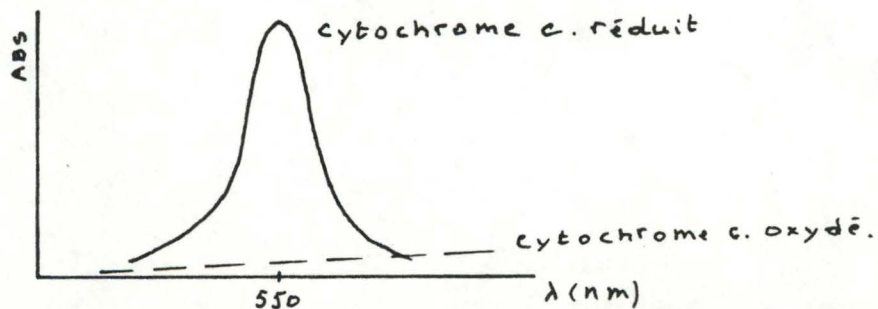
L' -Glucosidase libère un glucose à partir du methylumbelliferyl glucoside.



4. La Cytochrome oxydase (18)

Le cytochrome est réduit à un maximum d'absorbance à 850 mn. Il est oxydé par la Cytochrome oxydase.

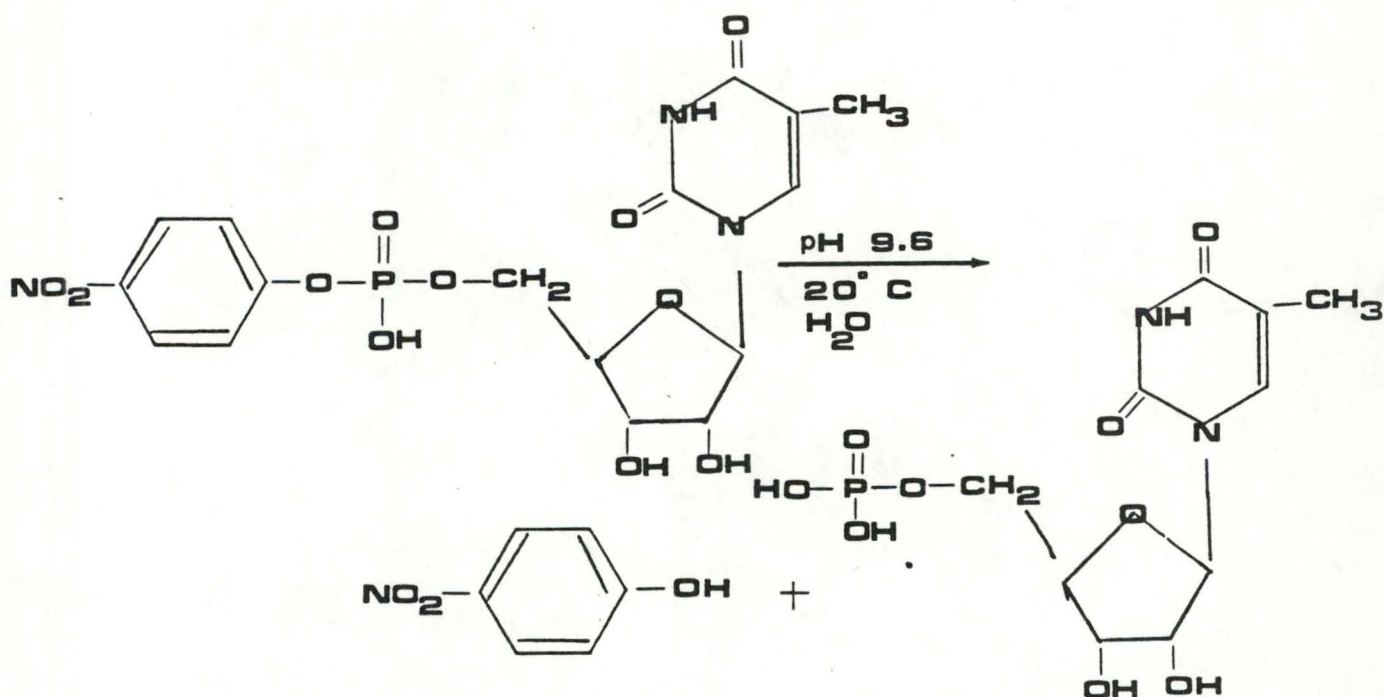
On mesure la variation d'absorbance du cytochrome réduit pendant une minute.



5. La Phosphodiesterase alcaline (16)

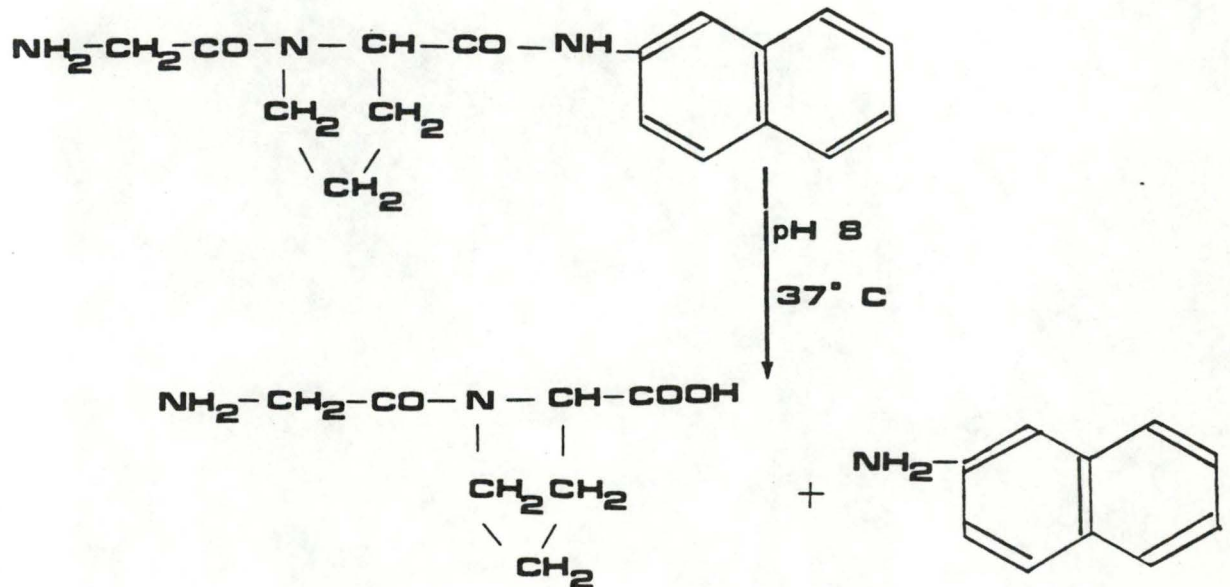
La Phosphodiesterase alcaline coupe la thymidine 5' monophosphate

- paranitrophényl est en deux produits : le paranitrophénol (coloré) et la thymidine 5' monophosphate.

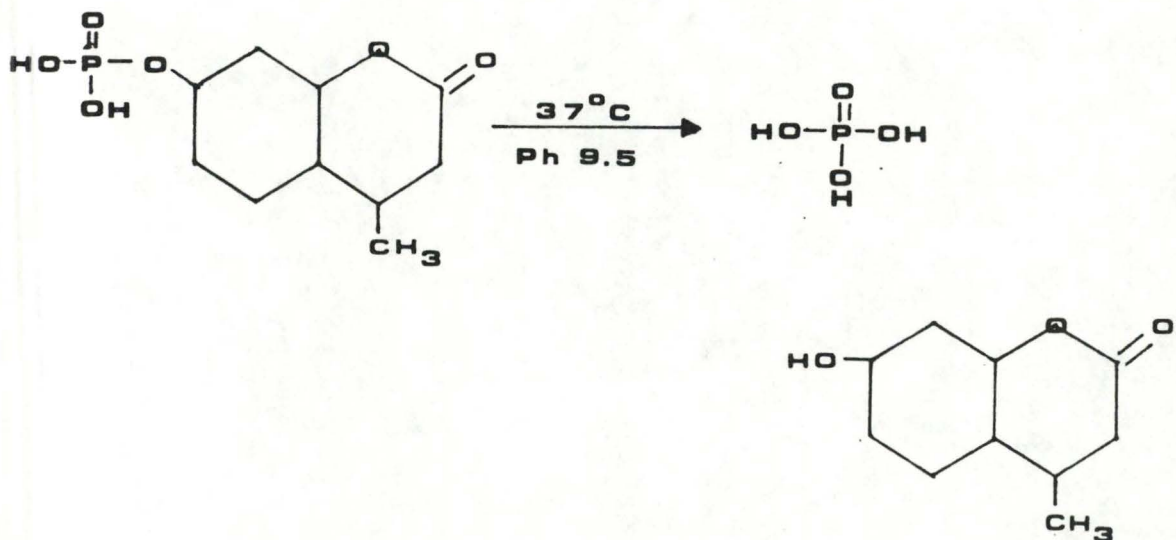


6. La Dipeptidyl peptidase IV. (16')

La Dipeptidyl peptidase IV enlève le dipeptide à partir du glycyl proline naphthylamide.

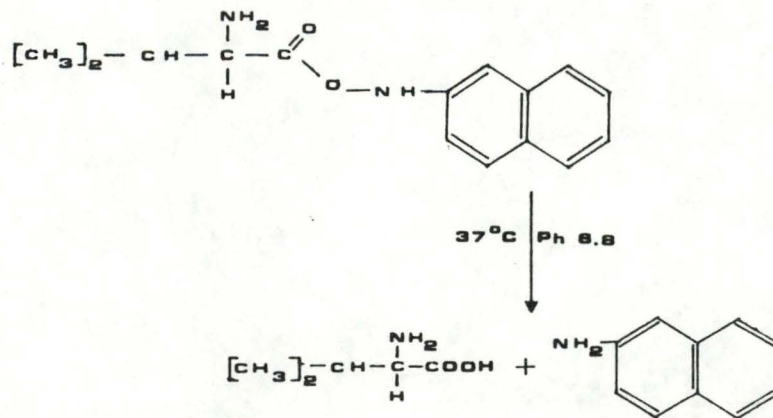
7. La phosphatase alcaline.(17)

La Phosphatase alcaline libère une Phosphate inorganique à partir de la methyl umbelliferyl phosphate.

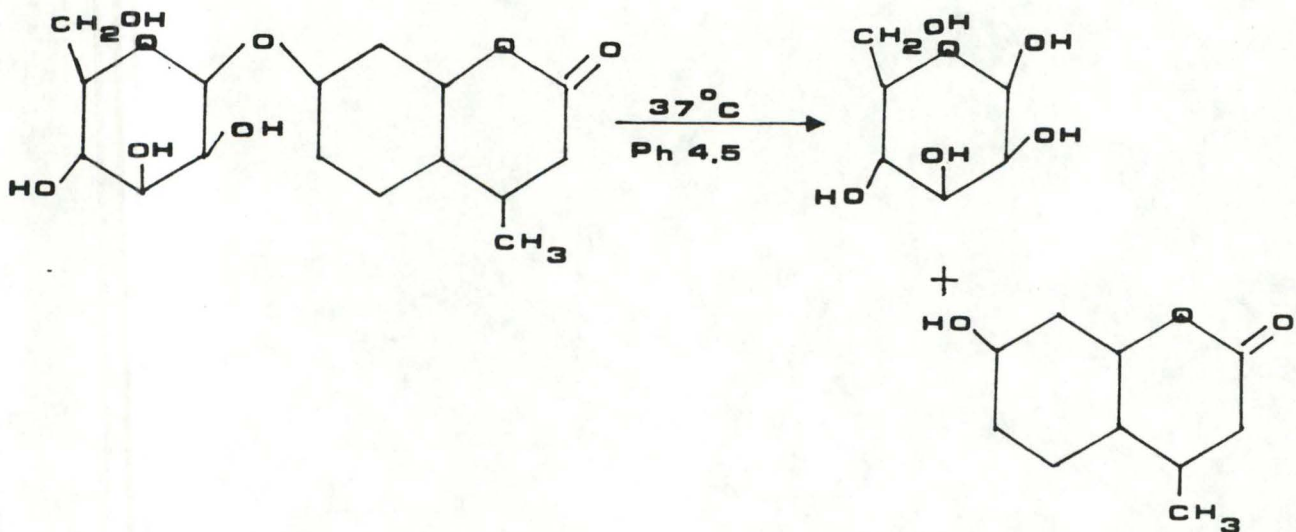


8. La Leucyl naphthylamidase (17)

La L. Leucyl Naphthylamidase scinde le L leucine à partir de la L. leucyl-p-naphthylamide.

9. L' Mannosidase. (17)

L' mannosidase libère un manose à partir du methylumbellipheryl mannoside.



Principe du dosage de la peroxydase (19)

La peroxydase réduit l' $\text{H}^2 \text{O}^2$ et oxyde le NN diméthylphénylendiamine.

Le NN diméthyl phénylendiamine oxydé est un produit coloré qui absorbe à 520 nm.

Fluométrie

- Certaines molécules ont la capacité d'être fluorescentes c'est-à-dire qu'elle transforme une radiation reçue en une radiation de plus grande longueur d'onde.

C'est l'intensité de ce rayon émis que nous mesurons, il nous permet de calculer la quantité de produit fluorescent existant dans l'aliquot.

IV. Marquage de la peroxydase. (20)

Les hydrates de carbone la peroxydase seront, selon la technique de Schneider, marquée au tritium afin de pouvoir déterminer où la peroxydase se situe dans la cellule

Solution stock :

Tampon Borate : 0,2 M PM = 9
PM = soit 76,2 gr/L

Paraformaldehyde : 0,12 M
PM = soit 36 gr/L

Peroxydase : 0,25 mM
PM = 40 000 soit 10mg/ml de TP Borate

Borohydrure de sodium froid : 5 mM
Soit 0,189 gr/L TP Borate

Borohydrure marqué au tritium :
20 XX/m mole

Méthode.

La paraformaldehyde est mélangé à 1 ml de peroxydase le tout est stocké dans de la glace.

Après 5 min, 125 de Borohydrure tritiée est ajoutée à la solution. L'incubation dure 60 min. La réaction est saturée par 1ml de Borohydrure froid pendant 15 min.

La peroxydase est séparée du borohydrure tritiée qui n'a pas réagi à l'aide d'un tamis moléculaire (G-25 de pharmacie). Nous effectuons ensuite une dialyse de 2 jours dans un sac à dialyse (spectrapor 2).

V. Tests immunologiques.

1. Anticorps utilisés pour détecter les molécules de classe II du CMH (21)

L'anticorp utilisé est une immunoglobuline murine monoclonale de classe G1, dénommé : 7C7. Elle est dérivée contre les protéines de classe II du CMH bovin.

2. Marquage isotopique par une voie métabolique

Disposant de l'hybridome producteur du 7C7, il nous est loisible de marquer isotopiquement in vitro, l'anticorp monoclonal produit, en fournissant à l'hybride un acide aminé précurseur radioactif. Ce dernier sera incorporé dans les synthèses protéiques de l'hybride et notamment dans celle de l'anticorps monoclonal.

Incorporation du précurseur marqué.

Après avoir récolté $4 \cdot 10^6$ de cellules en phase de croissance exponentielle, elles sont suspendues dans 2 ml de milieu M.E.M sans méthionine que l'on dépose dans un macropuit.

Ensuite 100 μ Ci de méthionine S sont ajoutés dans le macropuit.

Après une incubation de 6 heures, le surnageant est récolté et passé sur une colonne de séphadex G.25 M contre du PBS, Na₃PO₄ 0,1 %. Le 7C7 marqué est ainsi séparé de la méthionine libre restante.

3. Fixation des cellules de la lignée bovine établie (22)

Des boîtes de P.V.C à 96 puits, à fond plat, sont pré-incubés à T° ambiante avec 100 μ l/puit de PBS contenant 0,05 mgr/ml de poly-L-lysine (Sigma)

Après avoir enlevé le PBS, 100 μ l d'une suspension cellulaire de $1,6 \cdot 10^6$ cell/ml sont déposés dans les puits. La boîte est ensuite centrifugée à 450g 10'.

La monocouche cellulaire ainsi formée est fixée dans un bain de PBS

glutaraldéhyde (GDA) 1 % pendant 30' à T° ambiante.

Après trois lavages en P.B.S, les groupements aldéhydes libres sont neutralisés par addition de 150 l/puit de PBS; BSA 1 %; Na N3 0,1 %.

Les boites peuvent être stockées pendant 1 mois à 4°C.

5. Solid Phase Radio Immuno Assay (S.P.R.I.A).

Ce test va nous permettre de mesurer la quantité de 7C7 radiomarqué à utiliser pour le test d'inhibition.

Il s'agit en quelque sorte d'une Solid Phase Radio Immuno Assay.

On effectue une série de dilution de facteur deux, pour l'anticorps marqué (Ac*) dans du PBS PMSF 20 mM Na N3 0,1 %. Ensuite on dépose en duplicate 45 l de chaque dilution sur les cellules fixées, pour un temps d'incubation de 1 H 30 à 4° c.

Les cellules du fond des puits sont lavés trois fois en PBS pour enlever l'Ac* non fixé. Les puits sont séchés, coupés et déposés dans des fioles contenant 4 ml d'instafleur. Le comptage est effectué dans un compteur à scintillation (Beckman LS-180)

6. Test d'inhibition.

Il constitue à mesurer la quantité d'Ac* resté libre après avoir mis en présence un volume constant de l'Ac* avec un échantillon de chaque fraction contenant une quantité inconnue de protéines de classe II. La mesure de l'Ac* libre sera inversement proportionnelle à la quantité de molécules de classe II existant dans la fraction utilisée. L'Ac* libre est mesurée par sa fixation sur les cellules fixées.

Pour chaque fraction, provenant de la centrifugation différentielle et isopycnique, on fait une série de dilution de facteur deux, dans du PBS, Na N3 0,1 %, PMSF 0,2 mM.

- 50 l chacune de ces dilutions sont incubés avec 50 l de 7C7 radiomarqué à la dilution choisie, pendant 1 H 30 à 40°C.
- Ensuite 4/5 l de ces échantillons sont déposés en duplicate sur les cellules fixées et incubées pendant 1 H 30 à 4°C.

rentielle et isopycnique, on fait une série de dilution de facteur deux, dans du PBS, Na N3 0,1 %, PMSF 0,2 mM.

- 50 μ l chacune de ces dilutions sont incubés avec 50 μ l de 7C7 radio-marqué à la dilution choisie, pendant 1 H 30 à 40°C.
- Ensuite 4/5 μ l de ces échantillons sont déposés en duplicate sur les cellules fixées et incubées pendant 1 H 30 à 4°C.
- Après trois lavages en P.B.S, les puits sont séchés, coupés et mis dans des fioles contenant de l'instafleur. Le comptage s'effectue dans un compteur à scintillation (Beckman L.S 1801)

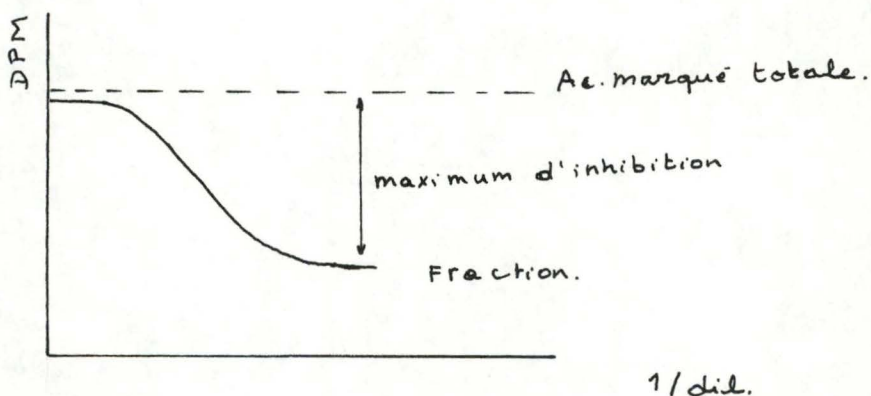
Mesure de l'unité d'inhibition.

La mesure de l'Ac* totale utilisée est faite avec du 7C7 radiomarqué incubé avec la solution de dilution, puis déposé sur les cellules fixées. Cette mesure permet de calculer la quantité d'Ac* fixé sur les fractions.

Lors de chaque test on a pu mesurer un maximum d'inhibition que l'on a considéré comme étant 100 % d'inhibition.

Shéma.

Mesure de la radioactivité de l'Ac* libre sur une fraction montrant un maximum d'inhibition.



Chaque valeur de la radioactivité fixée sur les fractions est rapportée sur le maximum d'inhibition donnant ainsi des valeurs en % d'inhibition. L'unité d'inhibition est définie comme étant la dilution totale (= dil de la fraction x dil. du dosage avant incubation) des protéines de classe II à laquelle nous ayons 50 % d'inhibition.

7. Témoin de non-spécificité.

Les immunoglobulines pouvant se fixer de manière non-spécifique. On a vérifié si le 7C7 pouvait se fixer autre part que sur les molécules de classe II présentes à la surface des cellules fixées.

Pour cela on a incubé les cellules cible avec un anticorp de même isotype (Ig G1), le 8C11. Ainsi si le 7C7 se fixe de façon non spécifique, sa fixation sera d'autant plus faible que la quantité de 8C11 incubé est grande.

Les cellules cibles sont incubés 1 h 30 à 4°C avec 45 μ l d'une série de diluion du 8 C 11 froid.

Après lavage au PBS, nous ajoutons 45 μ l de 7C7 radiomarqué dans chaque puit, pour une incubation d'1 h 30 à 4°C. Après trois lavages en PBS, les puits sont séchés, coupés et mis dans une fiole contenant 4 ml d'instafleur pour le comptage de la radioactivité.

VI. Mesure de la radioactivité par scintillation liquide.

Le comptage se base sur la mesure de la lumière émise par les photons provenant d'atomes qui ont été excités directement ou indirectement par le rayonnement .

Les différents isotopes émettent un rayonnement d'énergie différent, on peut les caractériser par un spectre d'émission. L'échantillon radioactif est dissous dans un solvant organique contenant le substrat de scintillation. Le solvant a pour rôle de transformer

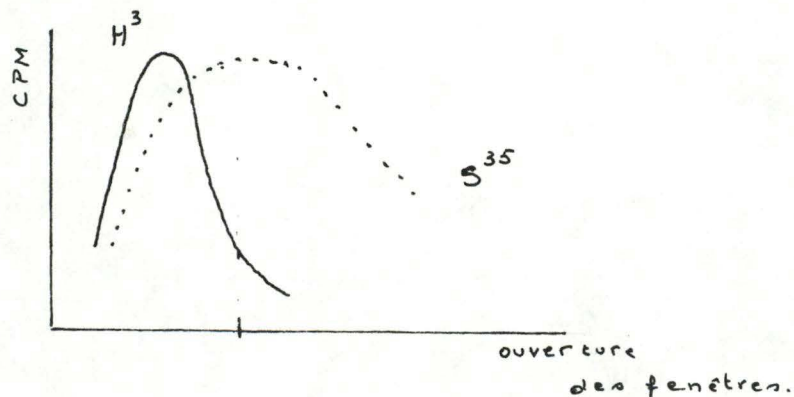
l'énergie cinétique des rayons en énergie électrique d'excitation et de transférer cette dernière aux molécules de scintillant. L'émission de photon se fera lorsque les électrons excités des molécules de scintillant, vont redescendre au niveau énergétique fondamentalement. Cette lumière qui a une longueur d'onde précise va passer dans un photomultiplicateur. Ce dernier est une cellule photoélectrique qui transforme l'énergie lumineuse en énergie électrique, en la majorant. Cette majoration entraîne un bruit de fond que l'on peut atténuer. Soit en utilisant un discriminateur ou fenêtre qui ne tient compte que des courants électriques d'une certaine intensité. Soit d'utiliser deux photomultiplicateurs de compter les impulsions dans un laps de temps très court. C'est le système de coïncidence.

- On appelle CPM : le nombre de coup par minute indiqué par l'appareil de comptage.

DPM : le nombre de désintégration des atomes .

Lorsque nous comptons la radioactivité de la méthionine S35 nous devons tenir compte du rayonnement du tritium, car ils interfèrent entre eux.

Etant donné les différences énergétiques des rayonnements, on va se mettre dans des conditions tel que dans un canal on mesurera un seul isotope (H^3) et l'autre canal comptera l'autre isotope (S^{35}). Les fenêtres à travers lesquelles on compte seront différentes pour chaque isotope. On choisit les fenêtres de façon à compter un % max de l'isotope voulu et un % minimum de l'autre. Connaissant ces pourcentages on pourra enlever les CPM contaminant, et connaître les CPM de l'isotope voulu.



RESULTATS ET DISCUSSIONS

Introduction

Les lymphocytes B, bien que n'étant pas des cellules myélocytaires, sont capables de présenter un antigène soluble. Il est donc possible d'entreprendre l'étude de la relation molécule de classe - processing de l'antigène avec ce type de cellules. Nous avons commencé la caractérisation des lymphocytes bovins, au niveau de la distribution de quelques enzymes de référence. Au cours de ce travail, qui formera le premier chapitre, le laboratoire d'immunologie a reçu des lignées de cellules myéloïdes établies. Ces cellules offrent l'avantage de pouvoir présenter un antigène insoluble ou soluble. De plus, elles sont d'une utilisation plus aisée que les lymphocytes isolés du sang.

Aussi, le second chapitre sera consacré aux cellules myéloïdes et comprendra la détermination de la distribution d'enzymes de référence; l'étude du chemin suivi par un antigène endocyté en fonction du temps et cela en relation avec la distribution des molécules de classe II du CMH.

I. Les lymphocytes Bovins

Avant de déterminer la distribution des enzymes "marqueurs" d'éléments sub cellulaires il faut d'abord s'assurer que nous pouvons libérer un maximum d'organites cellulaires sans les détériorer. Pour cela il nous a fallu mettre au point un protocole d'homogénéisation.

I.1 Mise au point de l'homogénéisation

L'homogénéisation consiste à forcer la suspension cellulaire à passer entre la bille et la chambre de l'homogénéiseur (fig 1)

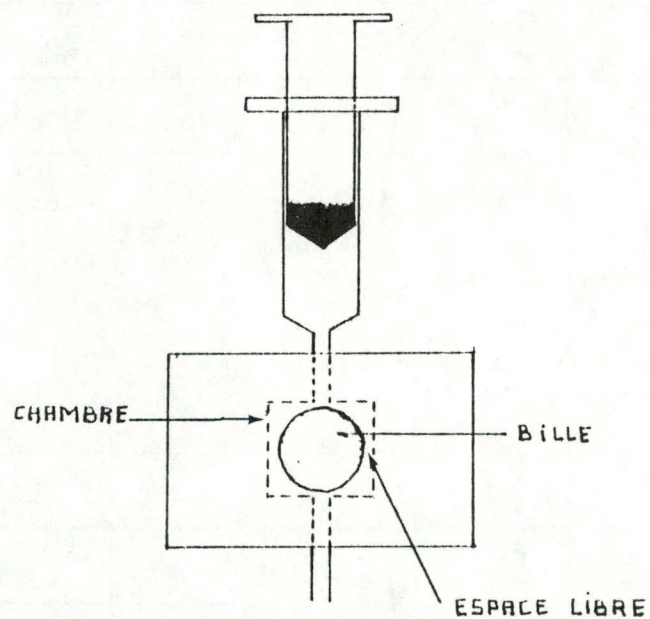


FIG:1 SCHEMA de L'HOMOGENEISEUR

20 10 cellules / ml 10 ml

NOMBRES de PASSAGES	I FRACTION	% PROTEINE	% β GAL.	% α GLU.
	N	31.4	41.2	41.0
3	E ₁	15.8	8.4	10.6
3	E ₂	32.5	28.6	22.5
3	E ₃	20.3	21.8	25.2
% RECUPERATION		80.2	95.0	91.7

256 10 cellules / ml 2 ml

	N	11.2	8.0	6.3
3	E ₁	20.5	12.1	14.1
3	E ₂	21.6	25.6	23.7
3	E ₃	23.4	33.9	26.4
6	E ₄	23.3	20.4	29.5
		57.0	54.0	48.0

200 10 cellules / ml 12 ml

	N	22.8	-	-
3	E ₁	29.1	-	-
3	E ₂	26.74	-	-
4	E ₃	21.4	-	-
			-	-

Tableau 1:

Distribution des enzymes de référence et des protéines après homogénéisation.

L'espace libre de cet appareil est conçu de façon à rompre principalement la membrane plasmique. Trois paramètres influencent surtout l'efficacité de l'homogénéisation : la concentration de la suspension cellulaire, le nombre de passages et le volume utilisé en fonction du volume de la seringue, ce qui influence la pression subie par les cellules à l'entrée de l'homogénéiseur.

La mise au point est basée sur trois types d'expériences où les facteurs : concentration, volume et nombres de passages ont varié.

Après avoir isolé les lymphocytes bovins des autres constituants du sang et déterminé la concentration cellulaire de la suspension, nous avons suivi le schéma d'homogénéisation décrit dans la rubrique "Materiels et Méthodes".

Mais dans ce cas nous gardons séparés les surnageants des différentes centrifugations, qui constituent l'extrait.

Le tableau n° 1, indique pour les trois expériences :

- la concentration de la suspension (nombre de cellules/ml), le volume utilisé pour l'homogénéisation.- le pourcentage corrigé (l'activité de la fraction rapportée à la somme des activités de toutes les fractions) de chaque enzyme considéré et celui des protéines obtenu dans chaque fraction.
- la séquence des passages est aussi précisée à chaque expérience.

L'expérience faite avec 10 ml d'une suspension contenant $20 \cdot 10^6$ cellules/ml, avec une séquence de passage égales à 3.3.3, nous a donné une fraction N contenant 31,4 % des protéines et plus de 40 % de l'activité de la β -galactosidase et de l' α -glucosidase. Il semble donc qu'il reste encore beaucoup d'organites cellulaires, plus précisément des lysosomes et du réticulum endoplasmique dans N et donc, peut être, une quantité appréciable de cellules intactes.

Une homogénéisation a alors été faite avec 2ml d'une suspension cellulaire de $256 \cdot 10^6$ de cellules/ml et une séquence de passage

	VAL. ABS. (N+MLP+S)	% N	% ML	% P	% S	% REC.
PROTEINE	0.03	32	20.1	11.3	36.6	66.7
CYTOCHROME OXYDASE.	0.055	32.72	58.18	9.09	0	76.4
β GALACTOSIDASE	0.96	31	42.8	6.6	19.6	56.3
α GLUCOSIDASE	1.45	13.1	15.9	55.2	15.9	77.5

Tableau 2:

Distribution des enzymes de référence et des protéines après centrifugation différentielle.

correspondant à 3.3.3.6. La fraction N obtenue, contenait 11,2 % des protéines et moins de 10 % de l'activité des enzymes de références utilisées. Donc la majorité des lysosomes et du réticulum endoplasmique se trouvent dans l'extrait.

Nous avons recommencé l'expérience avec cette fois 12 ml d'une suspension à $200 \cdot 10^6$ cellules/ml et une séquence de passage égale à 3.3.4, mais dans ce cas le dernier culot était devenu visqueux, à la suite probable d'une libération de l'ADN.

La fraction N contenait 22,8 % des protéines.

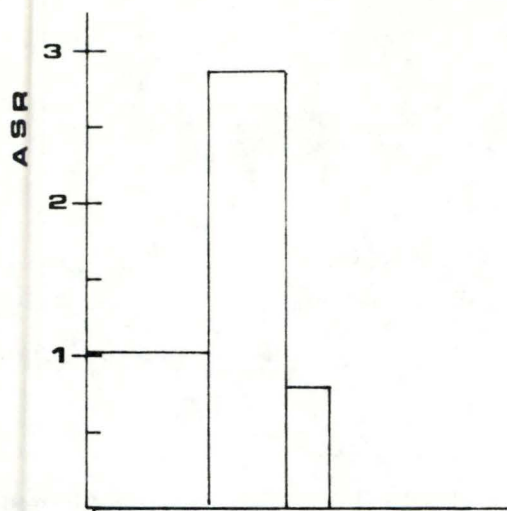
En adoptant comme séquence de passage pour l'homogénéisation, la séquence 3.3.3., une suspension de $200 \cdot 10^6$ est adéquate. Mais il faut tenir compte du volume utilisé. Un volume trop important semble entraîner la rupture de gros organites comme les noyaux. Il est donc préférable d'utiliser un petit volume de l'ordre de 2 à 3 ml.

I.2. Fractionnement

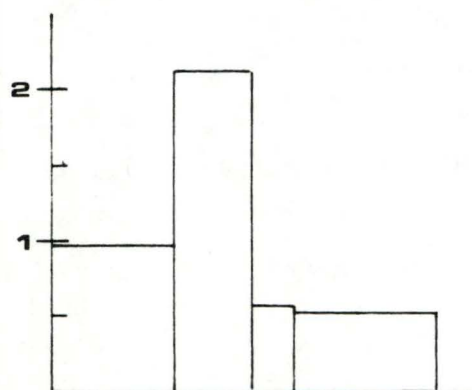
Le schéma de fractionnement utilisé, est un schéma mis au point avec les cellules du foie de rat. Nous nous proposons de voir si ce schéma convient aux lymphocytes bovins.

Le schéma du fractionnement a permis de séparer les fractions N, ML, P et S sur lesquelles ont été dosés trois enzymes : l' α -glucosidase, enzyme de référence du réticulum endoplasmique, la cytochrome oxydase, enzyme de référence des mitochondries et la β -galactosidase, enzyme de référence des lysosomes.

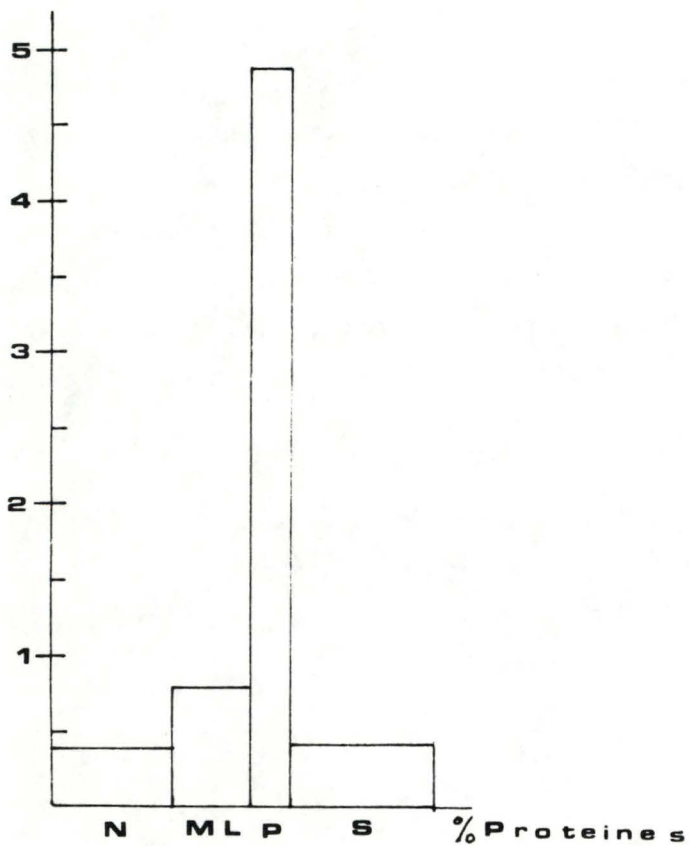
Le tableau 2 présente pour chaque enzyme l'activité mesurée dans chaque fraction exprimée en pourcentage corrigé. Les valeurs absolues sont données en mg/ $20 \cdot 10^6$ cellules pour les protéines et en unités/ $20 \cdot 10^6$ cellules pour les enzymes.



Cytochrome oxydase



β -Galactosidase



α -Glucosidase

Figure 3 :

Distribution des enzymes de référence et des protéines après centrifugation différentielle.

La figure 3 représente la distribution de ces enzymes dans les différentes fractions.

en abscisse est indiqué le pourcentage

cumulatif des protéines présent dans chaque fraction

en ordonnée est notée l'activité spécifique

relative (ASR), c'est-à-dire l'activité spécifique de l'enzyme (unités/ protéines) rapportée à l'activité spécifique dans l'homogénat
(N + ML + P + S)

Chaque fraction est ainsi représentée par un rectangle. La hauteur du rectangle est proportionnelle à la purification de l'enzyme et la surface du rectangle représente le pourcentage de l'enzyme présent dans cette fraction.

La cytochrome oxydase, se retrouve respectivement à raison de 58 %, c'est-à-dire la majeure partie, dans la fraction ML. Une quantité non négligeable de la cytochrome oxydase est située dans N alors que la fraction soluble n'en contient pas. Cet enzyme intrinsèque à la membrane mitochondriale interne n'est en effet pas solubilisable.

La β -galactosidase est située principalement dans la fraction ML. Nous retrouvons aussi un pourcentage appréciable dans la fraction N. Par contre la fraction soluble contient un pourcentage égal à 19,6 %. Cet enzyme est donc solubilisable, il suffit que la membrane lysosomale se rompe pour libérer l'enzyme qui va se retrouver dans la fraction S.

L' α -glucosidase est localisé à 55,2 % dans la fraction microsomale (P). Cette enzyme se retrouve dans les fractions N, ML et S. C'est donc une protéine qui, si elle est attachée à la membrane, est facilement détachable.

Ainsi la fraction ML est enrichie en mitochondries et en lysosomes, tandis que la fraction P est enrichie en réticulum endoplasmique. Ce résultat est semblable à ceux que l'on obtient en fractionnant les cellules du foie de rat. Ce qui signifie que le schéma de centrifugation utilise semble être valable aussi pour les lymphocytes bovins.

Notons que cette séparation n'est jamais totale, ce qui explique que l'on retrouve dans des fractions autres que ML, de l'activité de cytochrome oxydase ou de β -galactosidase. C'est pourquoi on parlera de l'enrichissement d'une fraction en un type d'organite plutôt que de purification. Il faut remarquer que lorsque nous dosons les enzymes de références, les valeurs mesurées (résultats non montrés) sont faibles. Aussi nous avons comparé l'activité spécifique (activité de l'enzyme rapporté au mg de protéine) de ces enzymes pour l'homogénat (N + ML + P + S) à l'activité spécifique obtenue pour un homogénat de foie de rat qui est

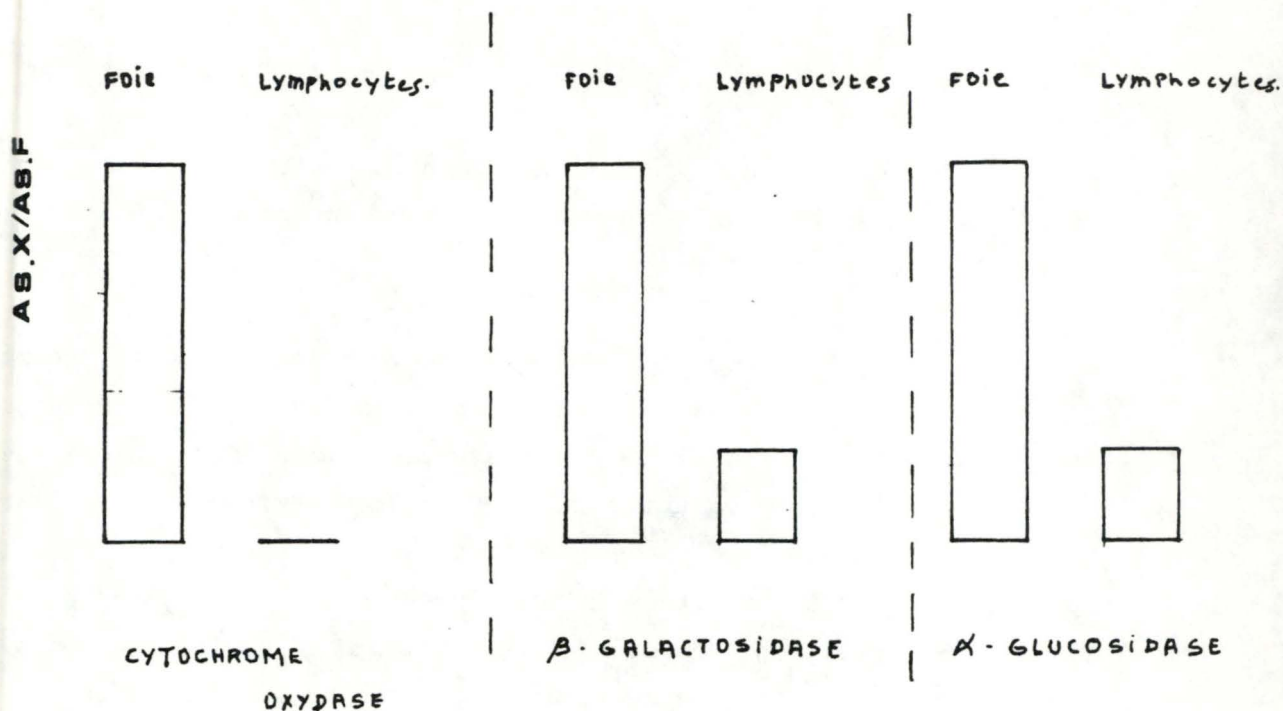


Figure 4:

Comparaison de l'activité spécifique des enzymes "marqueurs", utilisées, pour un homogénat de lymphocytes bovin et l'activité spécifique de ces mêmes enzymes pour un homogénat de foie de rat.

en ordonnée: activité spécifique de l'enzyme de l'homogénat (foie ou lymphocytes) rapporté à l'activité spécifique de l'homogénat de foie de rat (AS.X/AS.F)

l'organe le plus utilisé pour les études biochimiques (figure 4). Nous pouvons observer que l'activité spécifique de ces enzymes sont faibles, ce qui explique les valeurs obtenues.

I.3. Conclusion

Nous pouvons donc séparer les différents organites subcellulaires des lymphocytes bovins en utilisant le schéma de fractionnement mis au point par Duve et al., 1955 (23), et déterminer leur répartition dans les différentes fractions en dosant les enzymes de référence connus, tels que ceux utilisés ici.

Ces expériences devraient être répétées afin de confirmer le résultat décrit.

Une caractérisation plus profonde, de ces cellules pourra alors être abordée, en utilisant d'autres enzymes "marqueurs". On pourra aussi séparer la fraction ML en deux fractions (M et L) et enfin effectuer des centrifugations isopycniques sur la fraction MLP, pour observer la distribution des organites subcellulaires qu'elle contient, en fonction de leur densité d'équilibration en gradient de saccharose.

II. La lignée myélocytaire établie.

Rappelons rapidement le problème posé. Nous voudrions savoir si éventuellement et à quel moment les molécules de classe II du CMH s'associent à l'Ag, qui sera internalisé pour être éventuellement après modification présenté. Pour cela il faut suivre l'Ag le long du "Processing". C'est-à-dire depuis son "internalisation" jusqu'à son recyclage vers la membrane plasmique et observer ce qu'il advient conjointement des protéines de classe II. Cette étude contient trois impératifs : la possession de cellules qui soient capables de présenter l'Ag, ces cellules doivent exprimer des molécules de classe II, et enfin être à même d'endocyter une protéine antigénique à savoir la peroxydase de raifort.

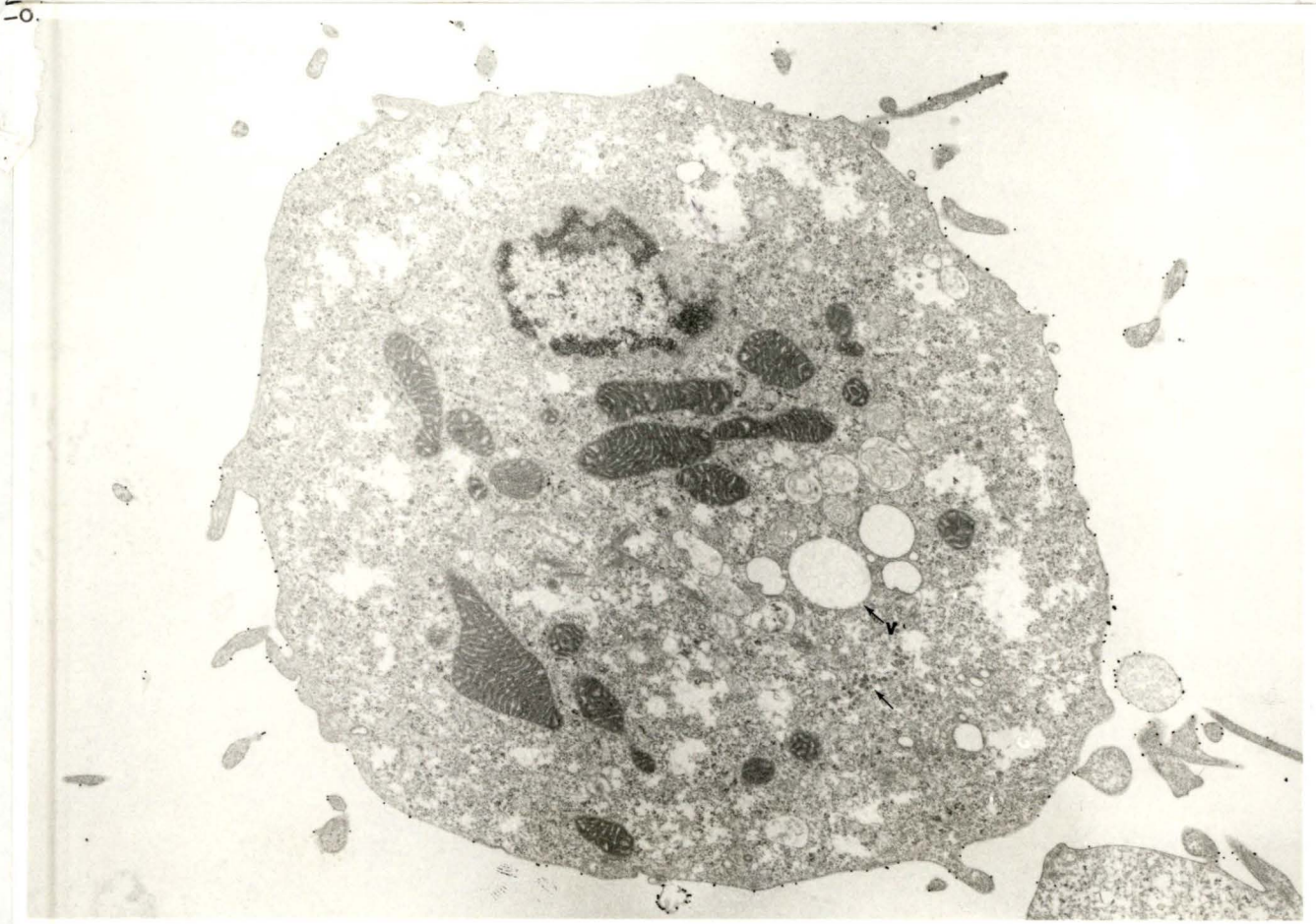
II.1. Les cellules myéloïdes

II.1.1. Mise en culture des cellules myéloïdes

Nous avons mis en culture quatre lignées myéloïdes établies. La croissance de ces cellules myéloïdes est lente, il faut attendre 7 à 10 jours pour en avoir un nombre suffisant lors de chaque récolte. Le milieu de culture recommandé, ne contenant pas d'antibiotiques, elles ont subi à plusieurs reprises des contaminations qui ont ralenti et perturbé l'organisation du travail. Au fil des repiquages et des cultures, une des lignées, la lignée 328 s'est adoptée à une croissance en gros flacon et dès lors, est devenue disponible en plus grande quantité. Cette lignée fut dès lors utilisée.

II.1.2. Vérification de la présence de molécules de classe II.

Les cellules (328) étant transformées, il est possible qu'elles aient perdu l'expression des molécules de classe II. Il est donc nécessaire de vérifier si les cellules en possèdent encore. Deux méthodes ont été utilisées pour effectuer cette vérification. La première est une méthode immuno-histochimique qui consiste à révéler la



Micrographie n°1:

Observation en T.E.M. d'un marquage immunogold direct sur les cellules myeloïdes. De la protéine A couplée à des particules d'or colloïdale (16nm) qui se fixe directement sur l'anticorps monoclonal anti classe II. Après marquage, les cellules sont fixées et traitées pour la microscopie électronique.

Grossissement 4.500

fixation de l'Ac, qui reconnaît les molécules de classe II, par la protéine-A couplée à de l'or colloïdal.

La micrographie électronique n°1 révèle bien l'existence de particules d'or, et donc des molécules de classe II, à la surface de la cellule.

Un S.P.R.I.A a aussi été effectué pour détecter les molécules de classe II. Le résultat qui est montré plus loin (voir II.3.1) confirme celui de la micrographie électronique.

II.1.3. Vérification de la capacité d'endocytose des cellules

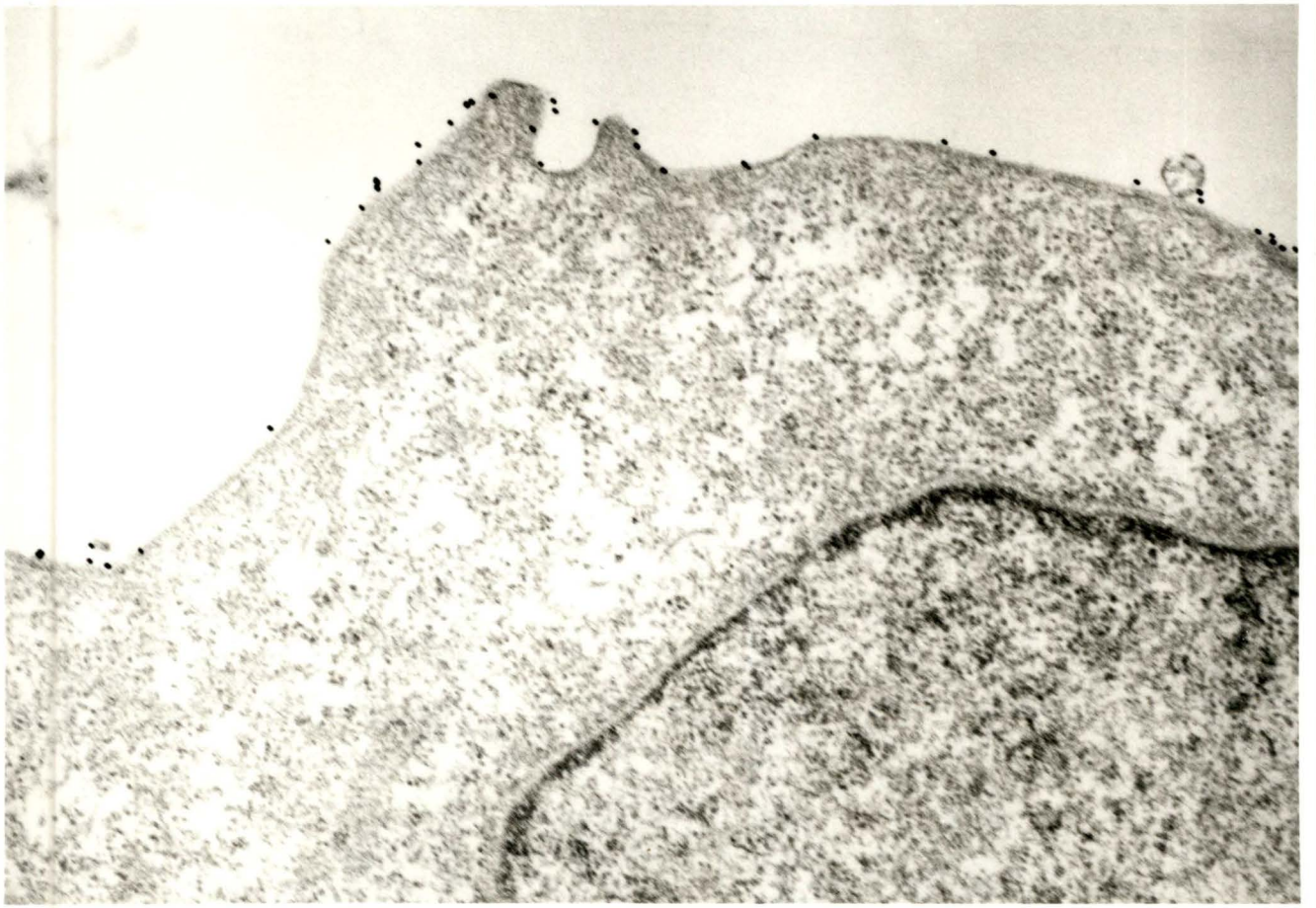
Comme nous voulons faire ingérer aux cellules un Ag, nous avons vérifié si celles-ci montrent une capacité d'endocytose active. Nous avons trouvé un premier élément de réponse dans les micrographies électroniques faites pour vérifier l'existence des molécules de classe II. En effet, sur la première micrographie nous pouvons voir de nombreuses vacuoles d'endocytose (✓) et des "coated-pits" (→) reflétant une endocytose. Un agrandissement de l'invagination de la membrane a été fait (micrographie n° 2) et montre accessoirement des molécules de classe II en cours d'"internalisation".

En outre, des travaux effectués au laboratoire d'immunologie indiquent que ces cellules sont capables de phagocyter des bactéries radiomarquées. (résultat non montré).

II.1.4. Identification des éléments impliqués dans l'endocytose.

Lorsqu'on suit l'Ag, durant son "processing", il faudra le situer dans la cellule, l'associer à un ou des organites impliqués dans l'endocytose : Nous nous sommes limités à identifier les lysosomes et la membrane plasmique en utilisant dans un premier temps comme enzymes de référence respectifs : l' α - mannosidase et la 5'AM Pase. A cet effet nous avons mis au point leur dosage sur des extraits cellulaires.

Une courbe d'étalonnage et une cinétique (Fig 5) ont été établies pour l' α -mannosidase, afin d'ajuster au mieux le temps d'incubation et les dilutions



Micrographie n°2:
Agrandissement de l'invagination de la membrane
plasmique.

Grossissement : 15.000

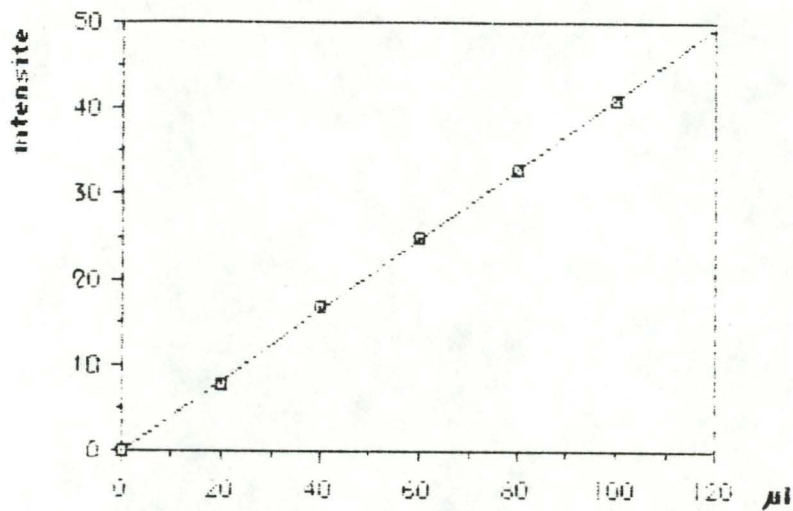
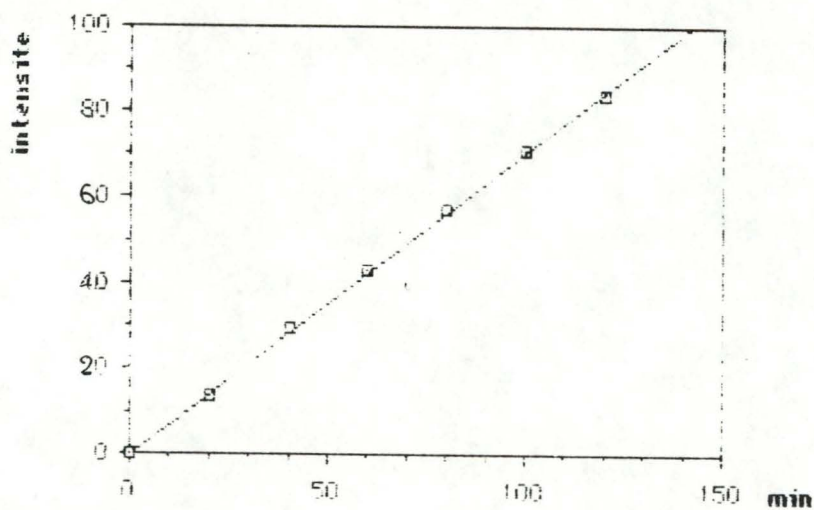
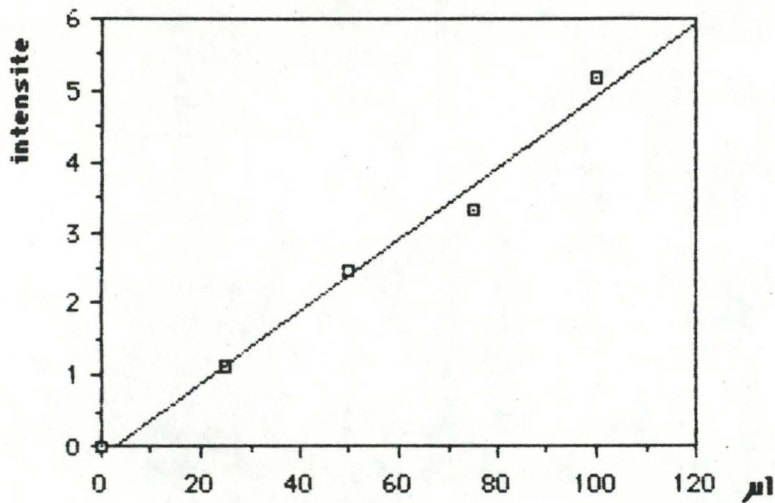
courbe d'étalonnage : α -Mannosidasecinétique : α -Mannosidase

Figure 5 :

- courbe d'étalonnage de l' α -mannosidase
 - en abscisse : le volume, en μ l, de la fraction E de dilution égale à 32,5 utilisé lors de l'incubation.
 - en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.
- cinétique de l' α -mannosidase
 - en abscisse : le temps d'incubation en minutes
 - en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.

Nous avons rencontré des problèmes pour établir une courbe d'étalonnage et une cinétique valables pour la 5'AMPase. Les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants. En effet, les mesures effectuées présentaient une variabilité trop importante. Aussi quatre autres enzymes marqueurs de la membrane plasmique ont été essayés : la Dipeptidyl peptidase IV (ou peptidase IV), la phosphodiesterase alcaline, la phosphatase alcaline et la Leucyl Amino Peptidase. Pour chacun de ces enzymes une courbe d'étalonnage et une cinétique (Fig 6 à 9) ont pu être établies. Les dosages furent faits sur une fraction extrait, de dilution égale à 6,5.

courbe d'etalonnage: dipeptidyl peptidase IV



48

cinetique : dipeptidyl peptidase IV

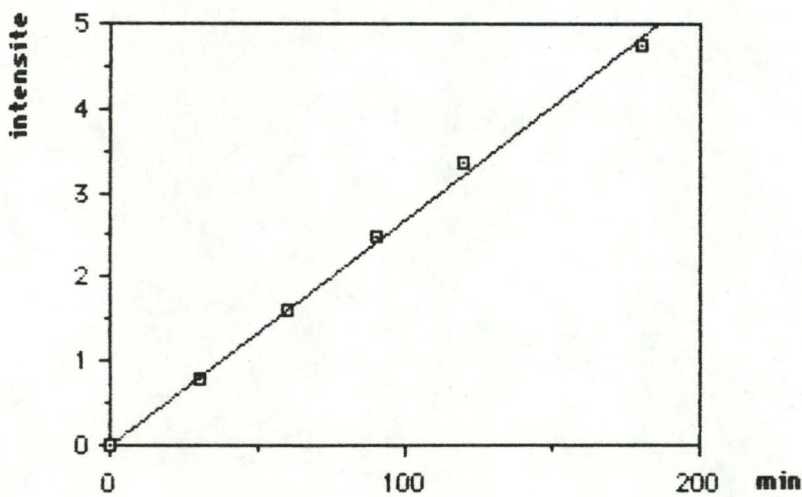
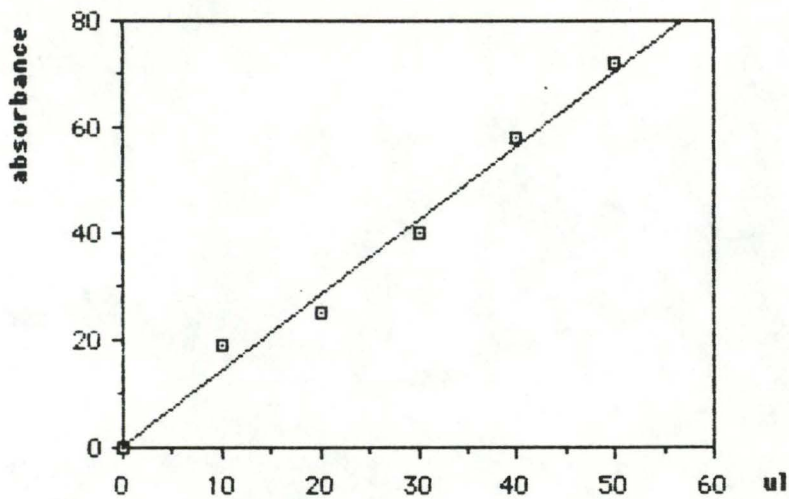


Figure 6

- courbe d'étalonnage de la peptidase IV
en abscisse : le volume, en μ l, de la fraction E utilisée lors de l'incubation
en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.
- cinétique de la peptidase IV
en abscisse : le temps d'incubation en minutes.
en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.

courbe d'étalonnage : Phosphodiesterase alcaline

49



cinétique : Phosphodiesterase alcaline

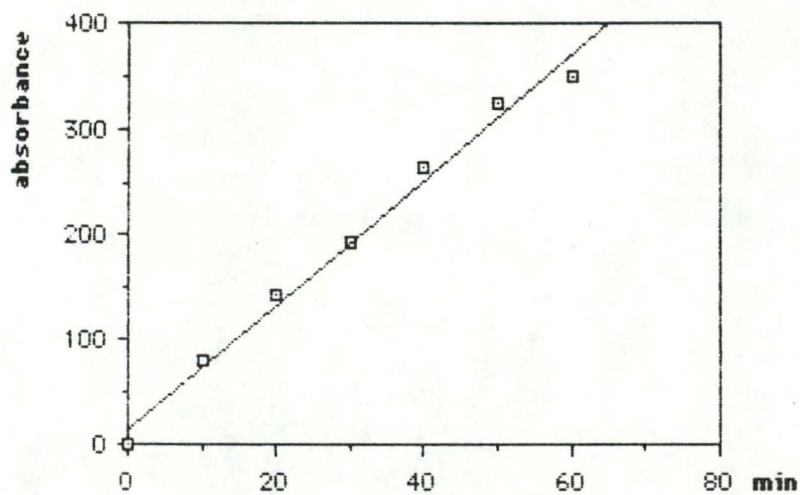
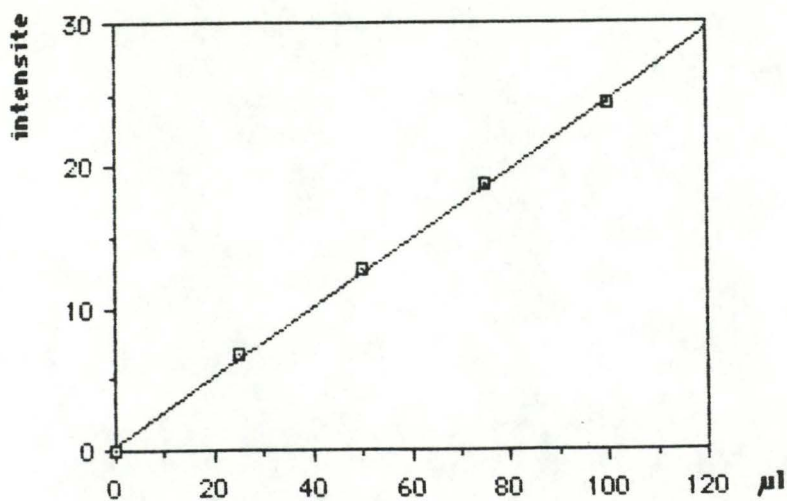


Figure 7 : - courbe d'étalonnage de la phosphodiesterase alcaline.
en abscisse : le volume, en μl , de la fraction E, utilisée lors de l'incubation .
en ordonnée : valeur mesurée en absorbance.
- cinétique de la phosphodiesterase alcaline.
en abscisse : le temps d'incubation en minutes.
en ordonnées : valeur mesurée en absorbance.

courbe d'étalonnage : Phosphatase alcaline

50



cinétique : Phosphatase alcaline

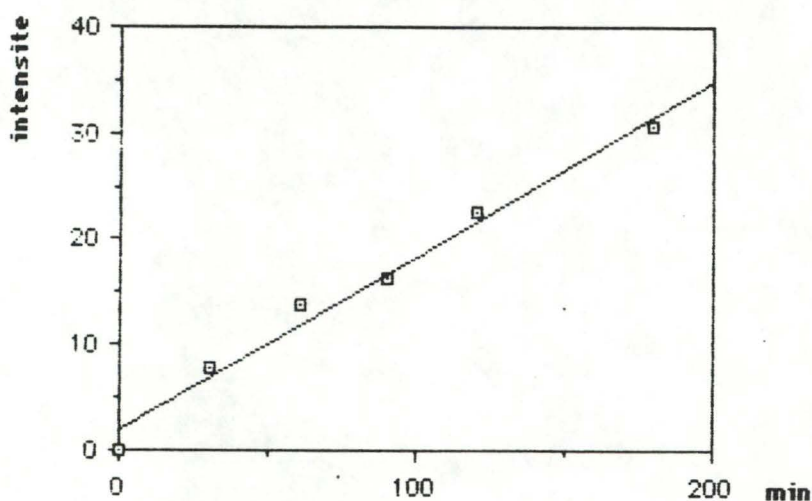
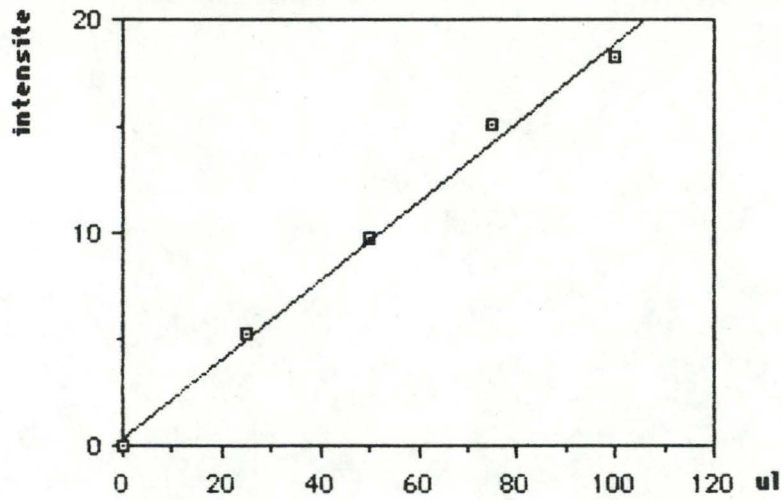


Figure 8 :

- courbe étalonnage de la phosphatase alcaline
en abscisse : le volume, en μl , de la fraction E utilisée lors de l'incubation
en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.
- cinétique de la phosphatase alcaline
en abscisse : le temps d'incubation en minutes
en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.

courbe d'etalonnage :Leucyl Amino Peptidase



51

cinétique :Leucyl Amino Peptidase

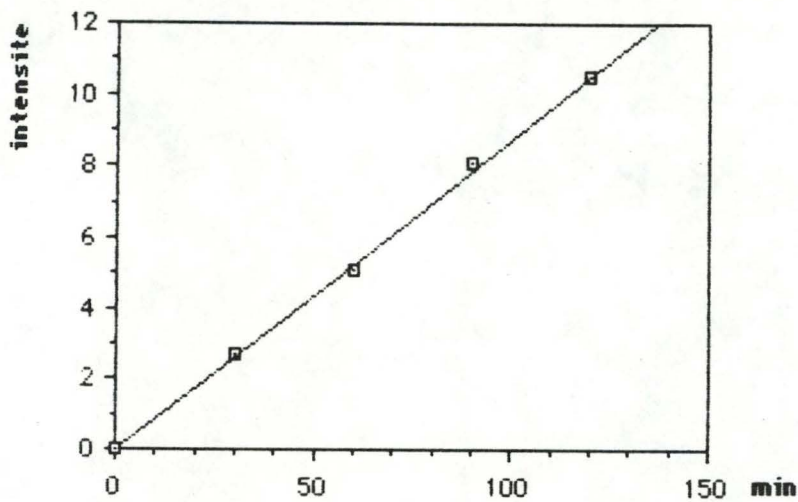


Figure 9 :

- courbe d'étalonnage de la Leucyl Amino peptidase
en abscisse : le volume, en μl , de la fraction E utilisé lors de l'incubation
en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.
- cinétique de la Leucyl Amino peptidase
en abscisse : le temps d'incubation en minutes.
en ordonnée : valeur mesurée en intensité de fluorescence.

Ces quatre enzymes sont donc détectables sur ces cellules myéloïdes transformées. Nous avons choisi l'enzyme qui offre le rapport test/Blanc le plus grand (à savoir la phosphodiesterase alcaline). Les valeurs utilisées pour ce calcul correspondant aux valeurs mesurées lorsque nous incubons 50 μ l de la Fraction E, dilué 6,5 fois, pendant 60 min.

Tableau n° 3 :

	TEST	BLANC	TEST/ BLANC
D. P. PEPTIDASE IV	2.5	0.9	2.78
PHOSPHODIESTERASE ALCALINE.	373	23	16.22
PHOSPHATASE ALCALINE	28	14.1	1.99
LEUCYL A. PEPTIDASE	6.3	1.23	5.12

Test : valeur mesurée lors d'une incubation en présence d'enzymes, en absorbance pour la phosphodiesterase alcaline, en intensité de fluorescence pour les trois autres enzymes.

blanc : valeur mesurée lors d'une incubation en absence d'enzyme.

Il est évident que la phosphodiesterase alcaline offre le meilleur rapport. Nous mesurerons donc, pour détecter les lysosomes et les membranes plasmiques : l' α -mannosidase et la phosphodiesterase alcaline.

II.2. Les molécules de classe II.

II.2.1. Mise en évidence des molécules de classe II par SPRIA direct

Le deuxième prérequis est l'existence de molécules de classe II dans les cellules 328. Nous les avons mises en évidence par une méthode histochimique (voir I.1.2.). Nous les avons aussi détectés par SPRIA direct, c'est-à-dire que les molécules de classe II sont décelées par un Ac marqué par un isotope radioactif.

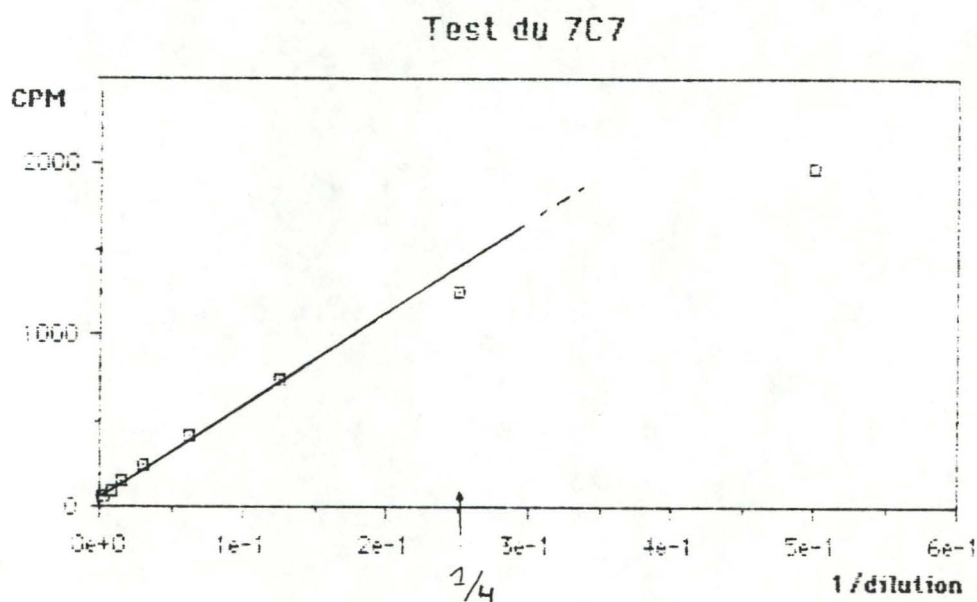


Figure 10 : Mise en évidence des molécules de classe II par SPRIA direct.

en abscisse : dilution de l'Ac marqué

en ordonnée : le nombre de coups par minute (CPM)

Ce test montre bien l'existence de molécules de classe II puisque l'Ac marqué se fixe sur les cellules. On peut toutefois se poser

la question de la spécificité de cette fixation. En effet les cellules cibles utilisées sont des monocytes et les monocytes ont des récepteurs pour la partie Fc des immunoglobuline (r.Fc). On peut donc se demander si le 7C7 se fixe spécifiquement sur les molécules de classe II ou si le 7C7 se fixe aussi sur les récepteurs Fc. Pour trancher la question, nous avons bloqué les récepteurs Fc. des cellules cibles avec une immunoglobuline de même isotypie que le 7C7 (à savoir une Ig G1) : le 8C 11.

Puis nous avons vérifié si cela avait un impact sur la fixation du 7C7. (Fig 10)

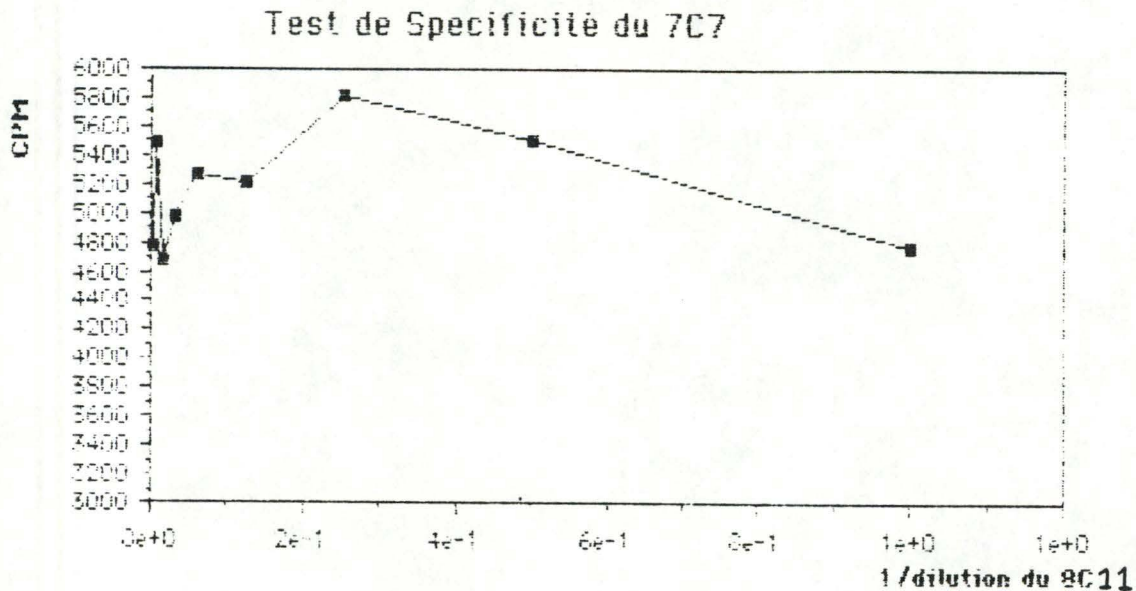


Figure 11 : Test de la spécificité du 7C7
 en abscisse : dilution de l'ascite 8C 11
 en ordonnée ; le nombre de coups par minute (CPM)

Le test montre bien qu'il n'y a pas de baisse de la radioactivité corrélée à la dilution du 8C 11. Le 7C7 se fixe donc spécifiquement sur les molécules de classe II. Les cellules expriment les molé-

cules de classe II, ces dernières sont décelées spécifiquement par le 7C7 marqué. Il reste à doser les molécules de classe II. Le seul moyen à notre disposition est de faire un test d'inhibition. Cependant la littérature ne décrit que des tests d'inhibition de la cytotoxicité d'un Ac, dépendant du complément.

Or le 7C7 n'est pas un anticorps cytotoxique complètement dépendant. Il a donc fallu mettre au point un test d'inhibition tenant compte de cet impératif le test consiste à inhiber la fixation de l'Ac marqué sur les cellules cibles par une préincubation de ce même Ac. en présence de molécules de classe II présentes dans les fractions. (voir rubrique Matériels et méthodes : test d'inhibition)

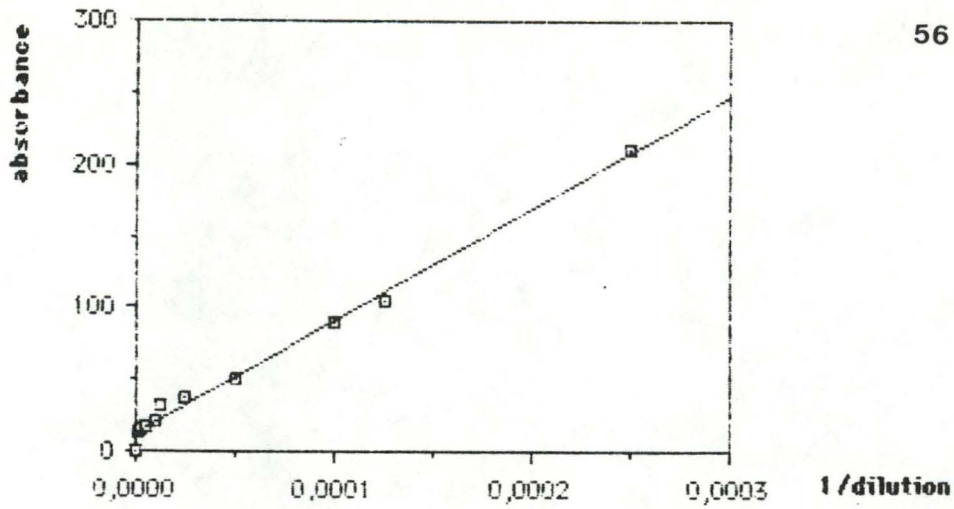
Dans ce dosage nous avons dû déterminer la dilution du 7C7 radio marqué à utiliser pour l'incubation avec les fractions. Nous avons choisi une dilution pour laquelle l'anticorps n'est pas en excès par rapport aux molécules de classe II présentes sur les cellules fixées. La figure montre que la dilution 1/4 est une dilution adéquate. Nous avons donc choisi cette dilution qui correspond à la dilution du 7C7 radiomarqué lors de l'incubation

II.3. L'Antigène

Le troisième pré-requis de ce travail est d'avoir une molécule que l'on peut déceler après qu'elle ait été endocytée par les cellules. La peroxydase est une molécule qui présente l'avantage de pouvoir être détectée par un dosage de son activité enzymatique ou en la marquant avec un isotope.

II.3.1. Mesure de la peroxydase endogène

Désirant la détecter de la première manière, nous avons pris soin de vérifier si ces cellules contenant de la peroxydase endogène, en essayant de quantifier celle-ci. A cet usage nous avons établi une courbe d'étalonnage en dosant une solution de peroxydase purifiée (1mg/ml) à différentes dilutions (Fig 12). Et une autre courbe d'étalonnage en dosant la peroxydase sur un extrait cellulaire (Fig 12)



courbe d'etalonnage: peroxydase de E

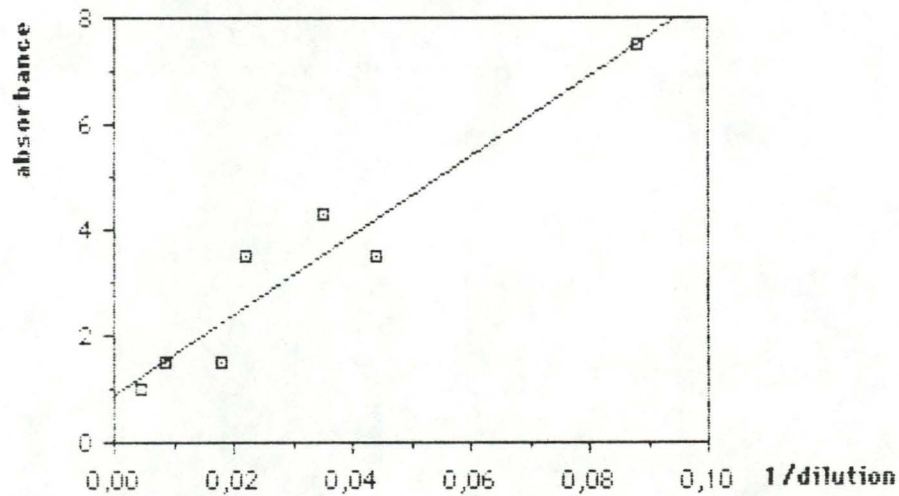


Figure 12 :

en abscisse : l'inverse de la dilution utilisée pour le dosage.
 en ordonnée ; la variation d'absorbance mesurée en une minute.

Connaissant la variation d'absorbance due à 1 mg de peroxydase on a pu calculer que $20 \cdot 10^6$ contiennent approximativement 10,4 microgrammes de peroxydase.

Les cellules de la lignée 328 contenant de la peroxydase endogène, il est préférable de détecter cette molécule exogène en la marquant à l'aide d'un isotope radioactif.

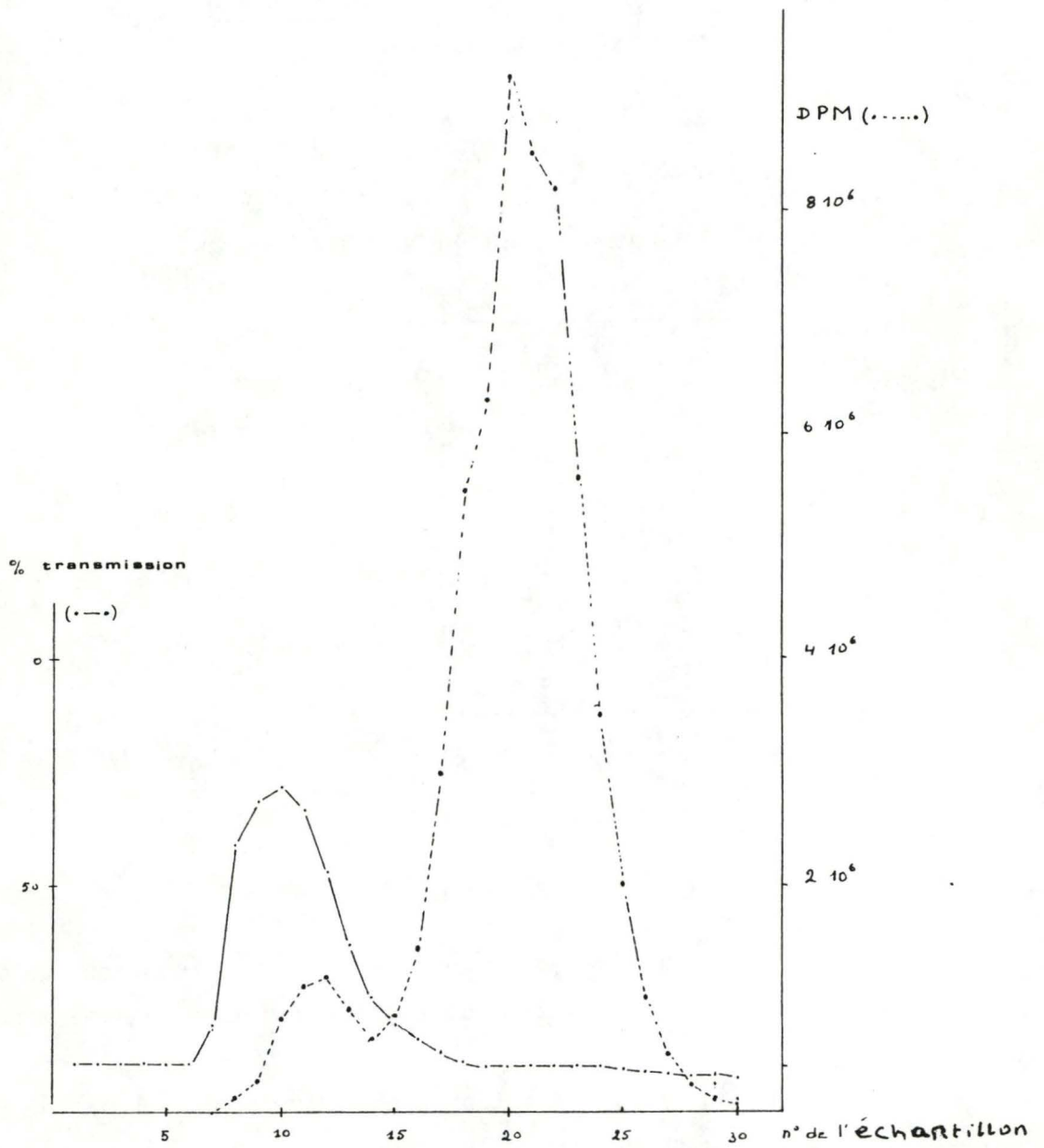


Figure 13

II.3.2. Marquage de la peroxydase

Nous avons marqué la peroxydase au tritium, selon la méthode de Schneider (19) mais en remplaçant la dialyse par une chromatographie sur tamis moléculaire (Séphadex G.25 colonne P.D10) pour séparer la peroxydase tritiée du Borohydrure tritié. Nous avons suivi l'élution de la peroxydase par lecture du pourcentage de transmission (280 nm). Nous avons de même mesuré la radioactivité dans les diverses fractions récoltées lors de l'élution pour situer l'isotope radioactif. (Fig 13).

Figure 13 :

en abscisse le numéro de l'échantillon
 en ordonnée : (à gauche) le pourcentage de transmission
 (à droite) le nombre de désintégrations par
 minute (DPM)

Le premier pic de radioactivité correspond à la peroxydase marquée. Le second au borohydrure tritié libre. Ces deux pics ne sont pas parfaitement séparés, aussi avons nous effectué une dialyse de deux jours afin de compléter la séparation de la peroxydase et du borohydrure tritié.

II.3.3. Test de l'endocytose.

Rappelons que l'idée que nous poursuivons ou essayons de mettre en évidence est la suivante : des molécules de classe II du CMH où sont-elles impliquées et de quelle manière dans l'incorporation de l'Ag (peroxydase) ?

Il faut donc se placer dans des conditions telles que la peroxydase soit internalisée via un mécanisme par récepteurs. Nous avons effectué des tests préliminaires de l'endocytose de la peroxydase. Ayant peu de peroxydase marquée, à notre disposition, nous avons, dans les expériences préliminaires, détecté la peroxydase endocytée par dosage enzymatique. La quantité de la peroxydase endocytée étant au moins 10 fois supérieures à celle de la peroxydase endogène.

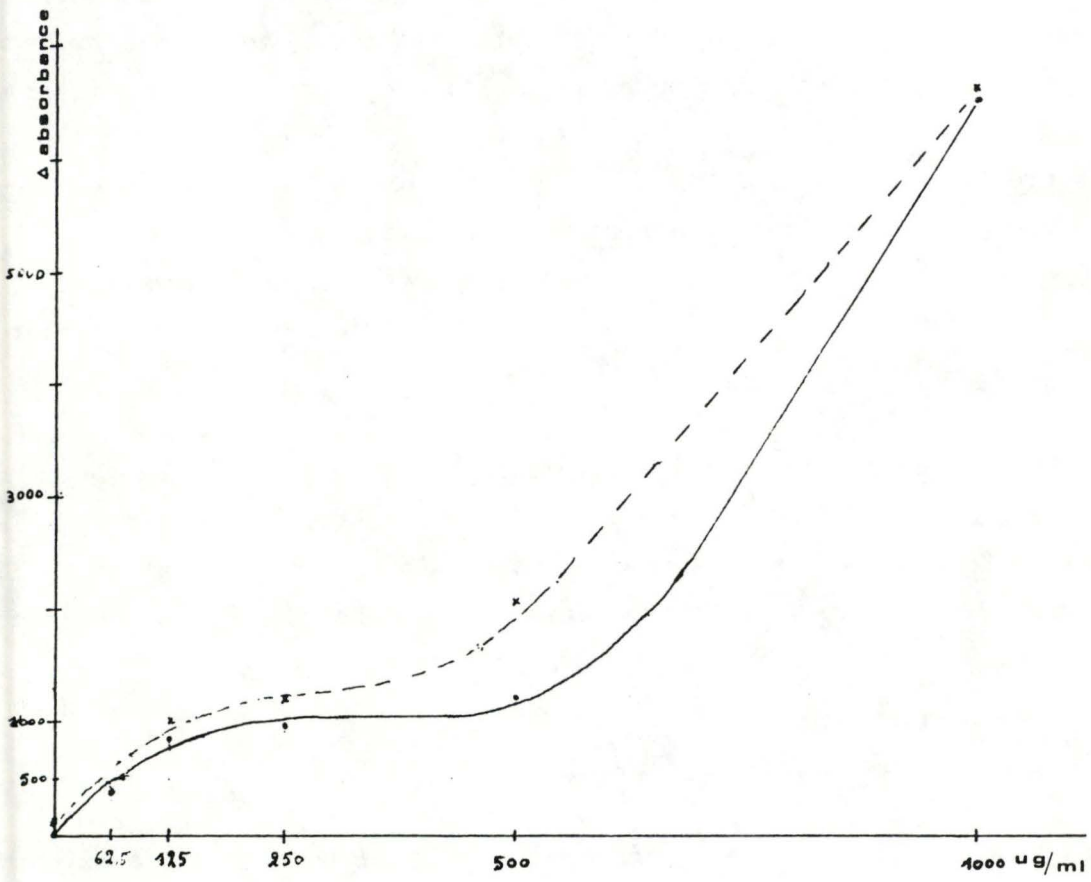


Figure 14

Nous avons fait différents contrôles. Le premier met en évidence la relation existant entre la concentration de la peroxydase présente dans le milieu et la quantité de celle-ci endocytée par les cellules. Une courbe de saturation met en évidence une endocytose par récepteur, une évolution linéaire, au contraire, montre un mécanisme d'endocytose fluide. Nous avons observé parallèlement l'influence du mannan, qui entre en compétition avec les ligands reconnus par les récepteurs à mannose : la peroxydase est une protéine à résidus d'hydrate de carbone mannose (Fig 14).

Figure 14 : influence de la concentration en peroxydase et du mannan sur l'endocytose de la peroxydase.

- la suspension cellulaire contenant $1,35 \cdot 10^6$ cellules/ml
- quantité de mannan utilisé 10 mg/ml

en abscisse : concentration de la peroxydase (mg/ml) incubée avec les cellules

en ordonnée : la variation d'absorbance mesurée par minute

- - - : avec mannan

_____ : sans mannan

La courbe qui reflète l'internalisation de la peroxydase est bimodale, la première partie correspond à une courbe de saturation (endocytose par récepteurs), la seconde partie est linéaire, ce qui se rapproche de l'endocytose fluide.

Nous n'observons pas de différence entre l'incorporation de la peroxydase en présence ou en absence de mannan (Fig 14). Le mannan ne semble donc pas influencer l'endocytose de la peroxydase, celle-ci se ferait peut être par des récepteurs autres que des récepteurs à mannose.

Un autre contrôle teste l'effet de la concentration cellulaire dans les milieux de culture sur l'endocytose (fig 15).

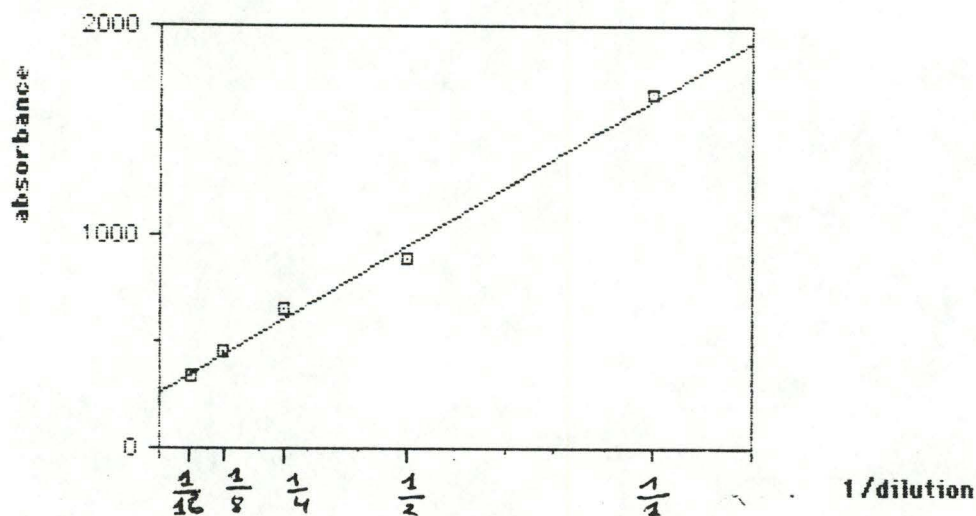


Figure 15 : influence de la concentration cellulaire sur l'endocytose de la peroxydase.

en abscisse : dilution d'une suspension cellulaire de $1.35 \cdot 10^6$ cellulaire de $1.35 \cdot 10^6$ cellules /ml.

en ordonnée : variation d'absorbance mesurée sur une minute.

L'internalisation de la peroxydase est, donc directement proportionnelle à la concentration des cellules dans le milieu.

Nous avons choisi lors des expériences de centrifugation de nous situer à de faibles quantités correspondant à $67,5 \text{ gr} / 1,35 \cdot 10^6$ cellules/ml, nous positionnant ainsi dans la première partie de la courbe. Dans ce cas cependant nous utilisons la peroxydase tritiée.

II.4. Centrifugation différentielle

A présent que les prérequis sont réunis, nous sommes en mesure d'étudier l'endocytose de l'Ag en relation avec les molécules de classe II sur des cellules myéloïdes.

Lors de la préparation des extraits cellulaires pour la mise au point

des dosages enzymatiques, il est apparu que l'homogénéisation d'un volume de 5 à 6 ml d'une suspension cellulaire de $8 \cdot 10^6$ /ml avec une séquence de passages égale à 4.3.3, était acceptable. Ce sont ces conditions que nous avons adopté pour la suite.

Nous avons incubé chaque fois la suspension cellulaire contenant 10^6 cellules/ml et 500 ug de peroxydase/ml (marquée au tritium) pendant 0 min, 10 min et 60 min. nous avons effectué trois fractionnements appelés respectivement par rapport au temps d'incubation avec l'Ag : le fractionnement Témoin, 10 min et 60 min. Les résultats seront présentés sous forme de tableaux et d'histogrammes.

Les tableaux 4 à 6 rapportent le % corrigé de la radioactivité, des molécules de classe II, des protéines et de l'activité pour les différents enzymes utilisés dans les fractions N, MLP et S.

Les figures 16 à 18 représentent la distribution de ces enzymes dans les différentes fractions

en abscisse : le pourcentage cumulatif des protéines présents dans chaque fraction.

en ordonnée : l'activité spécifique relative (ASR)
en pourcentage d'activité enzymatique/pourcentage de protéines.

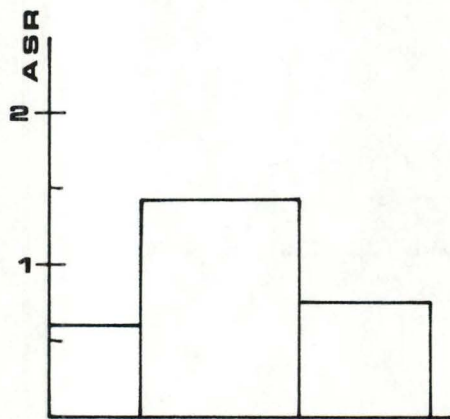
TABLEAU 4

	VAL. ABS. (N+MLP+S)	% N	% MLP	% S	AS	% REC
PROTEINE	6.6	23	42	35		80
PHOSPHODIESTERASE ALCALINE	2292	8.1	88.1	3.8	343.89	95.7
α -MANNOSIDASE	2728.26	15.22	83.05	1.73	409.35	96
RADIOACTIVITE	-	-	-	-		
MOLECULE d+ CLASSE II	655.54	13.76	60.15	26.08	98	129

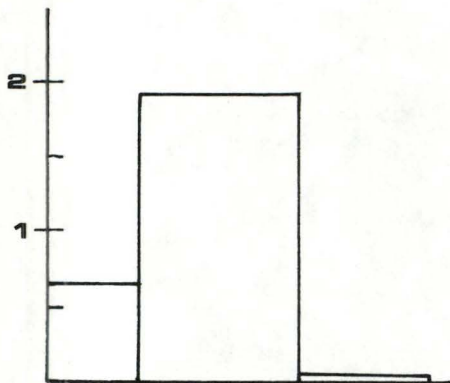
Tableau 4 :

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation différentielle.Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 0 minute.

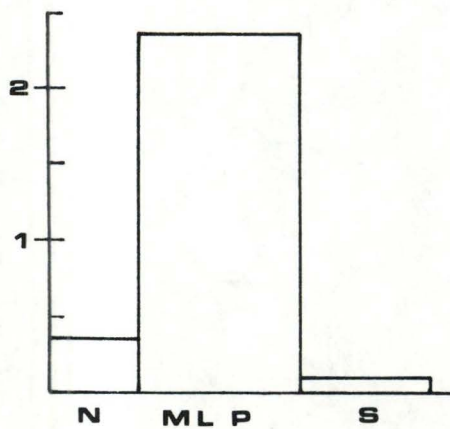
FIGURE 16



Molécule de classe II



Mannosidase



Phosphodiesterase

N MLP S % Proteines

Figure 16:

Distribution des enzymes de référence, de la radioactivité, des molécules de classe II, après centrifugation différentielle. Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 0 minute.

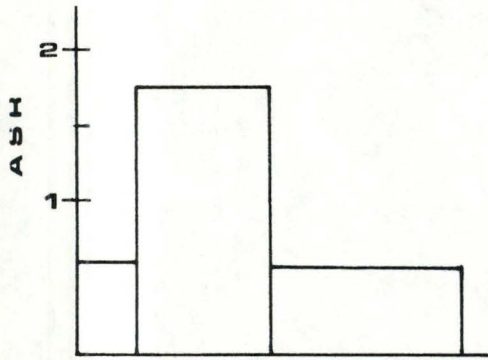
TABLEAU 5

	VAL. ABS. (N+MLP+S)	% N	% MLP	% S	A.S
PROTEINE	4.19	16	35	49	
PHOSPHODIESTERASE ALCALINE	3397.39	8.63	81.59	9.78	810 83
α -MANNOSIDASE	2394.31	12.73	83.84	3.42	571.43
RADIOACTIVITE	20234	52.08	36.23	11.69	
MOLECULE α +CLASSE II	356.06	9.96	61.08	28.96	84,98

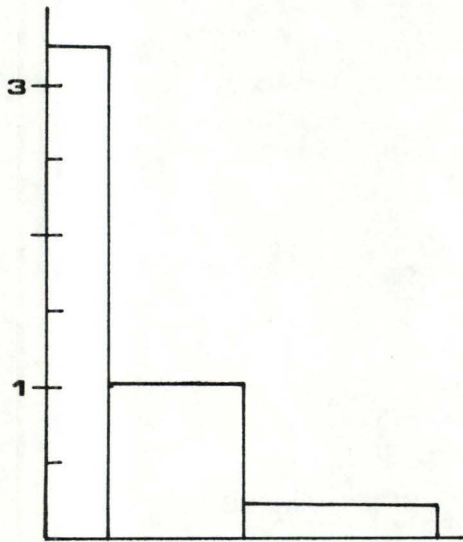
Tableau 5 :

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation différentielle.Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 10 minutes.

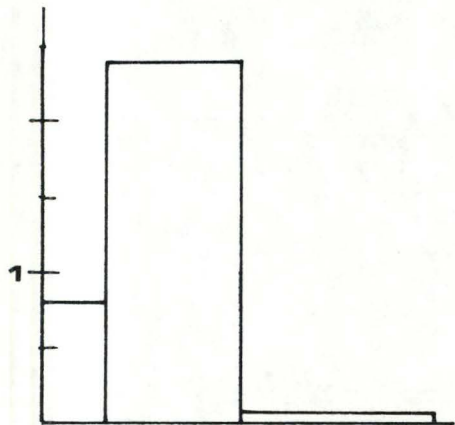
FIGURE 17



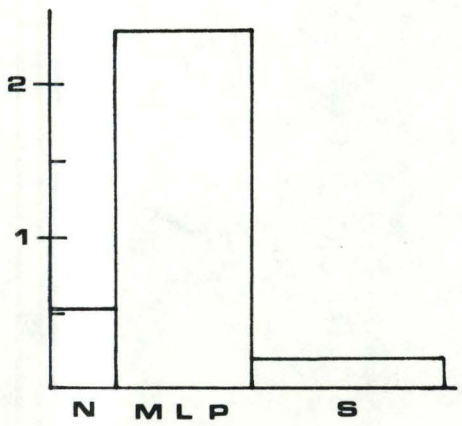
Molécule de classe II



Radioactivité



α -Mannosidase



Phosphodiesterase

%Proteines

Figure 17:

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation différentielle.Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 10 minutes.

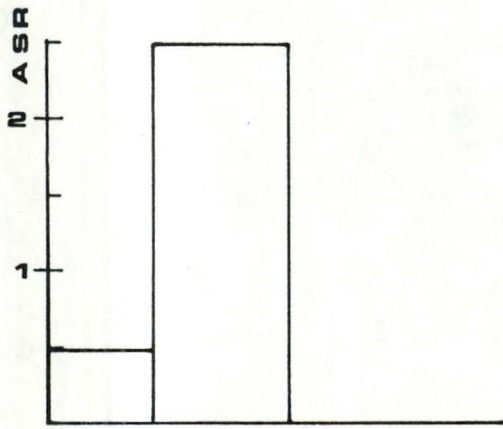
TABLEAU 6

	VAL. ABS. (N+MLP+S)	% N	% MLP	% S	A.S
PROTEINE	2,58	28	35	37	
PHOSPHODIESTERASE ALCALINE	2165.6	9.42	88.44	2.14	839.38
α -MANNOSIDASE	1776.13	13.61	80.76	5.63	688.42
RADIOACTIVITE	12922.56	65.23	26.74	8.03	
MOLECULE d+CLASSE II	91.17	13.17	86.83	0	35.34

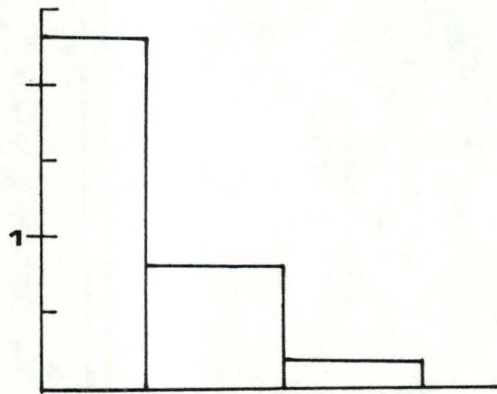
Tableau 6:

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation différentielle.Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 60 minutes.

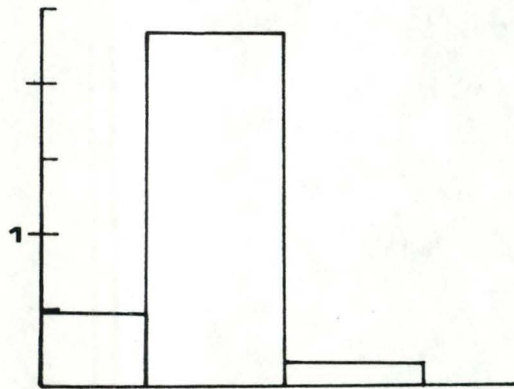
FIGURE 18



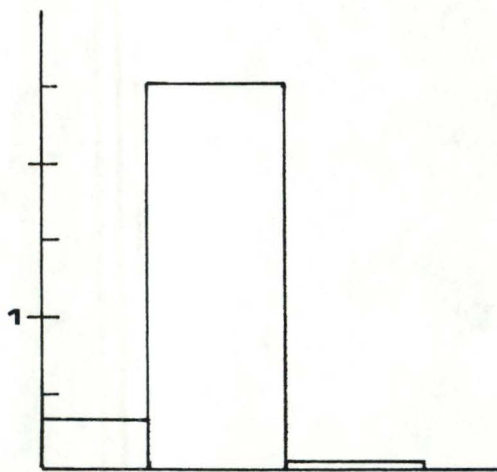
Molécule de classe II



Radioactivité



α -Mannosidase



Phosphodiesterase

N MLP S % Proteines

Figure 18:

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation différentielle.Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 60 minutes.

II.4.1. Activités spécifiques

Les tableaux montrent que la quantité de protéine varie assez fortement : elle est de 6,66 mg pour 20 10^6 cellules pour le fractionnement témoin, de 4,19 mg après une incubation de 10 min en présence de peroxydase et de 2,58 mg après une incubation de 60 min, pour le même nombre de cellules. Nous n'avons actuellement pas d'explication pour cette variation.

D'autre part les activités spécifiques de la phosphodiesterase alcaline sont dans le même ordre, de 343.89, 810.83, 839.38 et présentent donc semble-t-il une augmentation lors de l'endocytose.

L' α -mannosidase, toujours dans le même ordre est douée d'une activité spécifique de 409.35, 571.43, 688.42. Les variations évoluent ici encore dans le même sens.

Par contre les rapports molécules de classe II/protéines sont de 98, 84.98 et 35.34. Lors d'une endocytose d'une durée de 60 min on constate une diminution. Ces résultats permettraient de supposer que les molécules de classe II subissent une dégradation sélective au cours du temps long d'endocytose. Ceci est une donnée tout à fait intéressante et non décrite jusqu'à ce jour du moins à notre connaissance. Cependant nos résultats sont tout à fait préliminaires et demandent confirmation.

II.4.2 Distribution des enzymes de référence et des molécules de classe II

II.4.2.1. Fractionnement témoin :

Les résultats du fractionnement témoin montre que plus de 80 % de l'activité des enzymes marqueurs, l' α -mannosidase (lysosomes) et la phosphodiesterase (membrane plasmique) sédimentent dans la fraction MLP, contenant la plupart des organites subcellulaires excepté le noyau. Les protéines de classe II sont elles aussi sédimentables à 60,2 % dans la fraction MLP. Cependant 26 % sont situés dans la fraction soluble. Ce qui est beaucoup pour une protéine transmembranaire. Nous en discuterons plus loin.

II.4.2.2. Fractionnement 10 min et 60 min

La distribution des enzymes de référence pour les deux fractionnements est identique à celle du témoin. Les différents fractionnements sont donc semblables.

En ce qui concerne les molécules de classe II si nous retrouvons après 10 min d'endocytose de la peroxydase un pourcentage élevé des molécules de classe II dans la fraction S, comme pour le témoin, la fraction soluble obtenue après 60 min ne contient plus de molécules de classe II. Du moins elles ne sont plus décelables. On note donc après 60 min d'incubation non seulement une diminution de la quantité de molécules de classe II mais encore une modification du comportement en centrifugation différentielle des molécules de classe II. La fraction MLP contient la majorité de ces molécules et ceci dans tous les fractionnements. La fraction N n'en contient jamais plus de 13 % . C'est la raison pour laquelle ultérieurement nous avons analysé les fractions MLP en gradient de densité.

La radioactivité, et donc sans doute la peroxydase endocytée, est principalement retrouvée dans la fraction N, 52,8 % pour 10 min et 65,2 % . Pour 60 min, si nous considérons que 10 % de variation est significatif alors il semblerait que la radioactivité semble s'accumuler dans la fraction N, avec le temps. La peroxydase serait associée à des structures de grande taille et cette taille augmente de 10 min à 60 min. La fraction MLP, perdrait elle conjointement de la radioactivité au cours du temps. En effet, le pourcentage de radioactivité associée à cette fraction passe de 36,23 % après 10 min à 26,74 % après 60 min.

La fraction S, garde une proportion de radioactivité plus ou moins constante (11,69 % et 8,03 %).

Quoiqu'il en soit malgré les résultats très restreints (10 et 60 min) il semble que des modifications entre ces deux temps existent. La quantité de molécules de classe II rapportée aux protéines se modifie, au cours de l'endocytose, de même que la distribution en centrifugation différentielle. La radioactivité s'accumule dans les structures de

II.5 Centrifugation isotopycnique

Les centrifugations isopycniques ont été effectuées avec les fractions MLP riches en molécules de classe II, des fractionnement montrés ci-dessus. Les gradients sont des gradients continus et linéaires, formés de saccharose. Le gradient témoin et 60 min ont comme limites de densité 1,09 et 1,26 gr/ml. Le gradient 10 min a comme limites 1.05 et 1.30 gr/ml.

Les figures 19, 20, 21 montrent la distribution des enzymes de références mesurées, de la radioactivité et des molécules de classe II.

en abscisse : la densité (gr/ml). Chaque rectangle est centré sur la densité moyenne de la fraction.

en ordonnée : la fréquence c'est-à-dire le pourcentage d'activité de l'enzyme dans les fraction considérée rapportée à la variation de densité qui existe entre les extrémités de cette fraction.

FIGURE 19

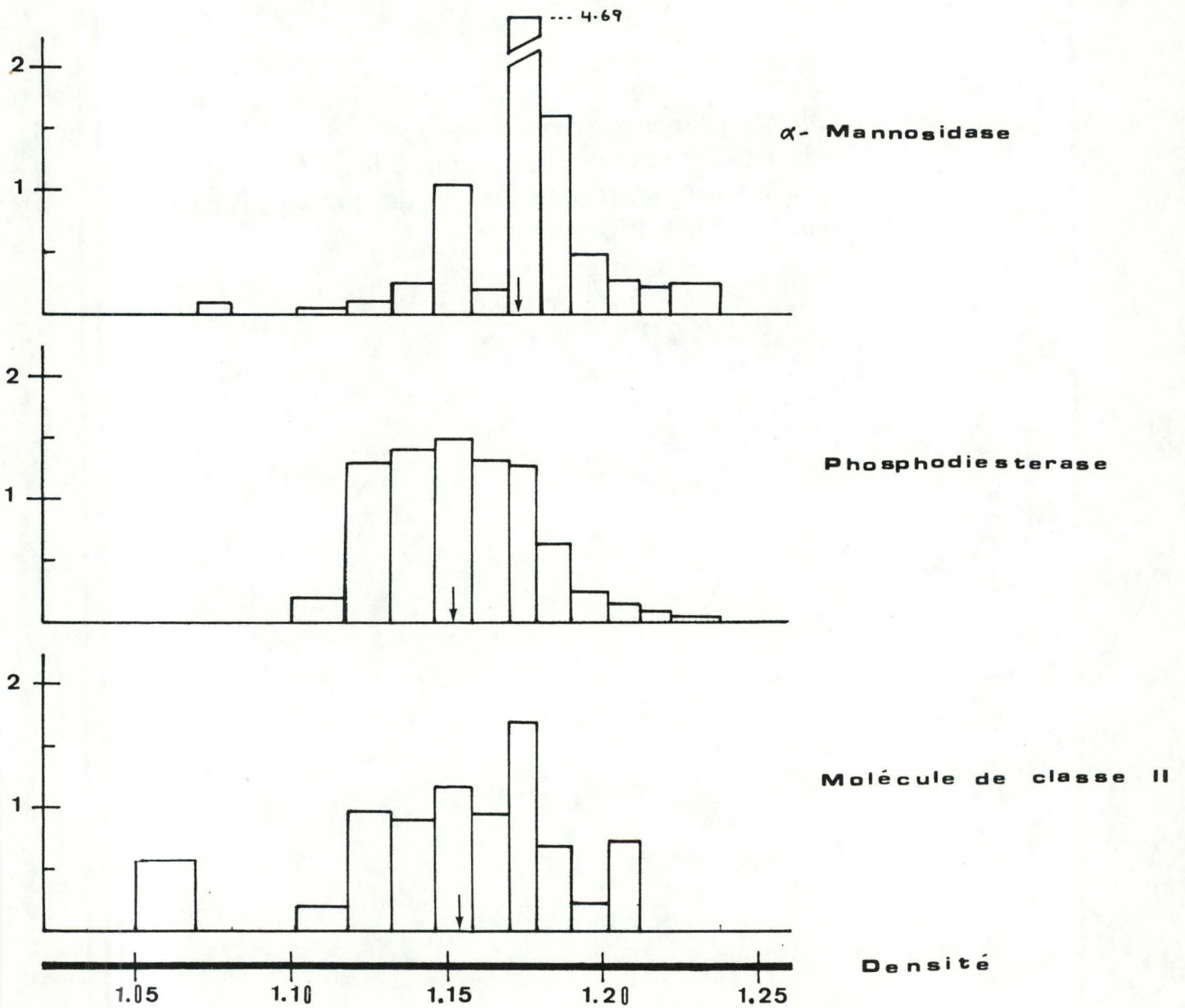


Figure 19:

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation isopycnique.Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 0 minute.

FIGURE 20

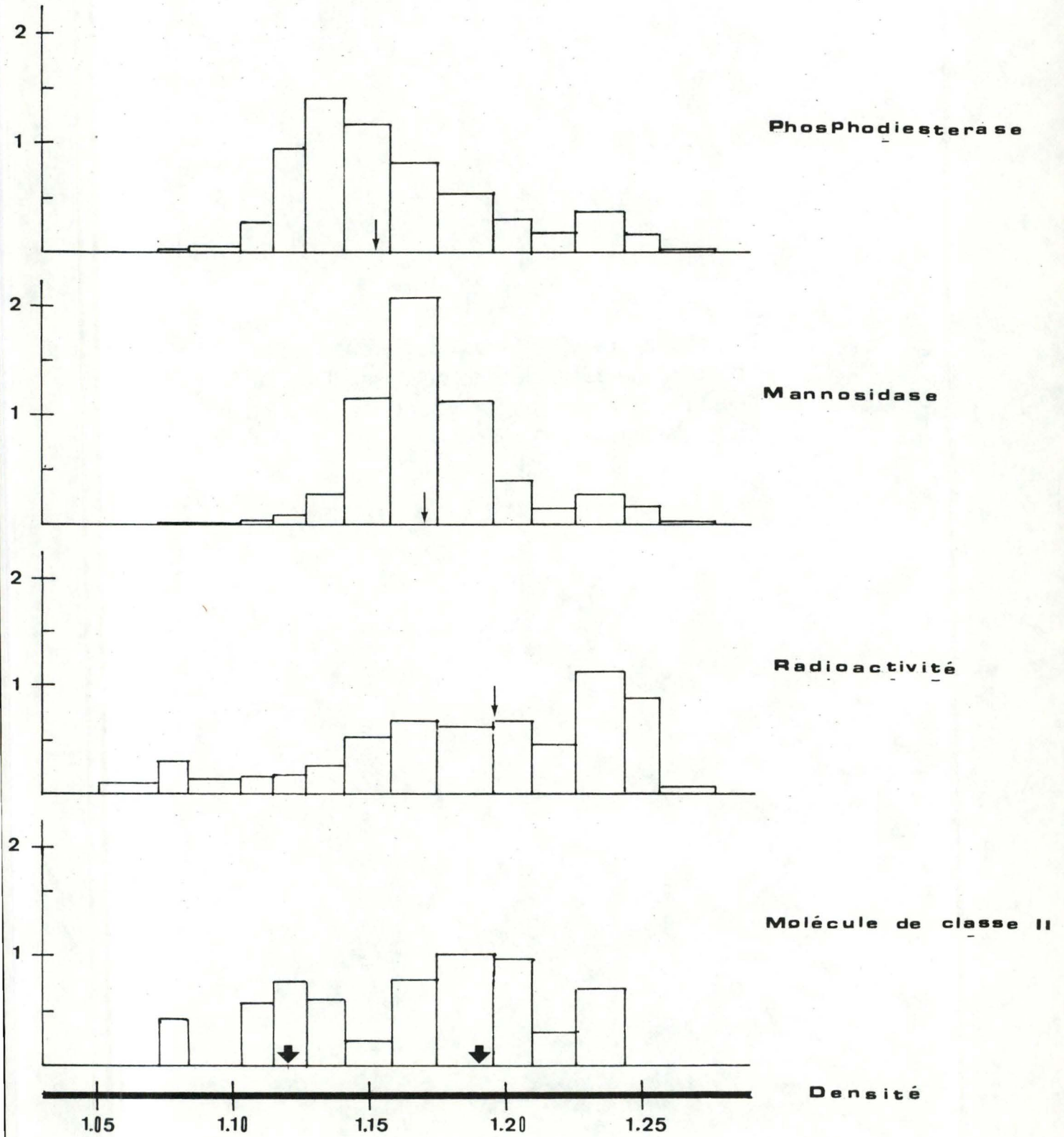


Figure 20:

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation isopycniqne.Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 10 minutes.

FIGURE 21

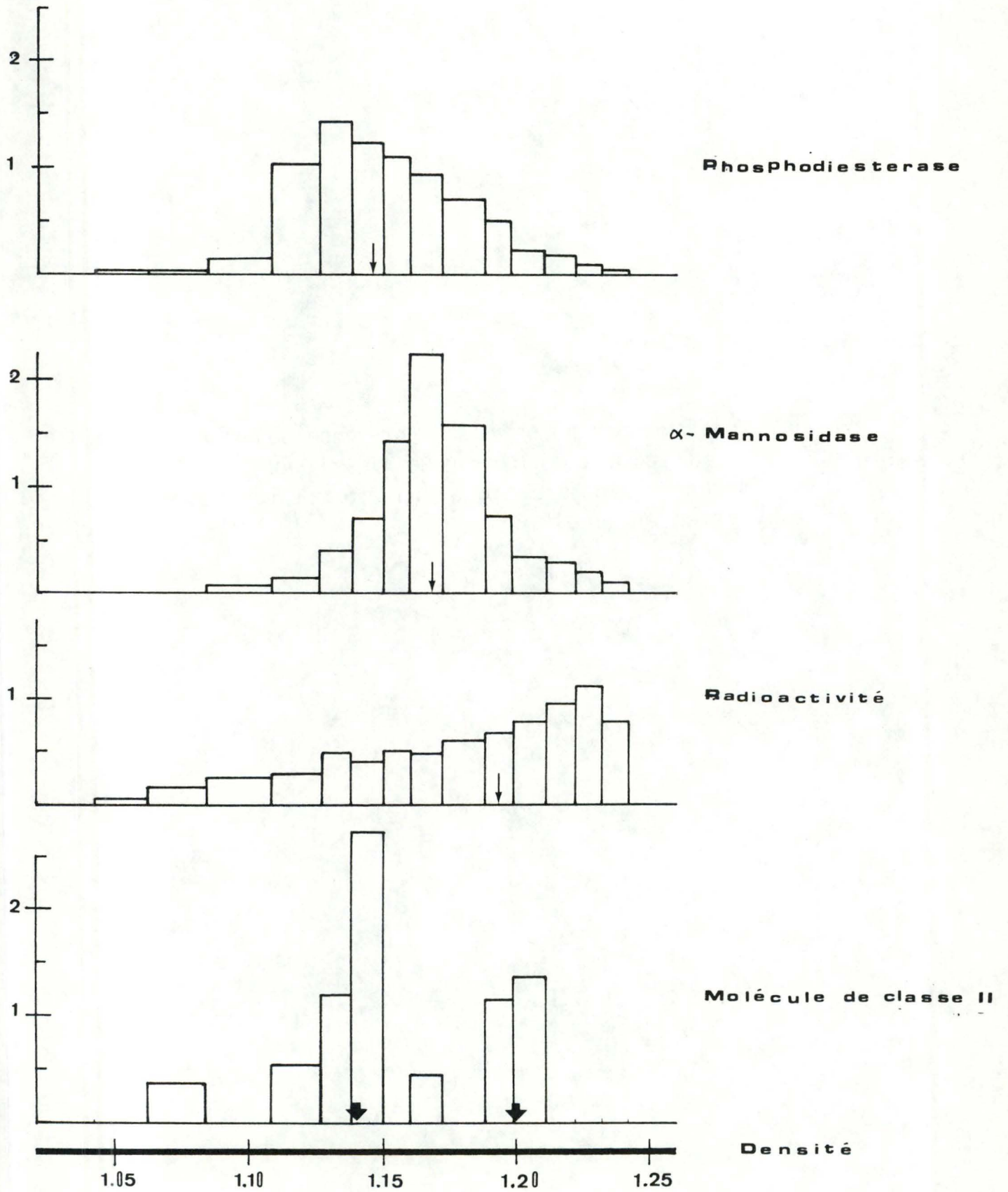


Figure 21:

Distribution des enzymes de référence ,de la radioactivité,des molécules de classe II, après centrifugation isopycniq. Pour un temps d'incubation avec l'antigène de 60 minutes.

II.5.1. Gradient témoin

L' α -mannosidase et la phosphodiesterase alcaline, présentent une distribution unimodale.

L'activité de l'enzyme de référence des lysosomes se distribue autour d'une densité médiane égale à 1.173g/ml. La densité médiane de la phosphodiesterase est égale à 1.152 gr/ml. Une étude faite sur des macrophages péritonéaux de souris a montré que la densité médiane de l' α -mannosidase est égale à 1.20 gr/ml et la 5' AMPase, se distribue autour de 1.15 (25). Les membranes plasmiques des cellules myélocytaires (328) de bovins ont donc une densité semblable à celle des macrophages de souris. Mais les lysosomes de ces derniers sont plus lourds que les lysosomes des cellules myélocytaires (328) de bovins.

La distribution des molécules de classe II est centrée autour d'une densité médiane correspondant à 1.154 gr/ml/. Les molécules de classe II seraient donc associées, en ce qui concerne le témoin à la membrane plasmique.

Remarquons que 11.5 % des molécules de classe II, sont localisés dans la première fraction. Ce qui indique que cette protéine, ou du moins la partie antigénique correspondant au site de fixation du 7C7, est soluble et aisément détachable. Probablement sous l'action des protéases libérés lors de l'homogénéisation. Notons que nous avons travaillé sans inhibiteurs de protéases. (figure 19)

II.5.2. Gradients 10 min et 60 min

Les distributions des enzymes "marqueurs" restent unimodales et comparables à celles du témoin. De même leurs densités médianes sont proches. La distribution de ces enzymes ne semble donc pas être influencée par l'endocytose de la peroxydase. Les molécules de classe II, quant à elles, montrent une évolution de leur distribution. Après 10 min, la distribution de ces molécules semble bimodale. Cette bimodalité pourrait refléter l'association des molécules de classe II à des struc-

tures de densité élevée (environ 1.20 g/ml) qui ne correspondait ni à la distribution de la phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique), ni à la distribution de l' α -mannosidase (lysosomes) et que nous ne sommes donc pas à même d'identifier. L'autre population de molécules de classe II centrée autour d'une densité 1.11 - 1.15 g/ml, serait associée à la membrane plasmique. Les structures de densité 1.20 pourraient être des lysosomes dépourvus de mannosidase. Pour le gradient 60 min, les molécules de classe II présentent aussi une distribution bimodale. Nous avons en fait l'impression que, ici encore, le "pool" des molécules de classe II s'est divisé en deux populations. L'une centrée aux environs d'une densité de 1.15, ce qui l'associerait aux membranes plasmiques. L'autre centrée sur une densité de l'ordre de 1.20 s'associant à l'organe de type inconnu déjà présent après 10 min d'endocytose. Cependant une plus grande quantité est associée après 60 min, avec la membrane plasmique, par rapport à ce qui existe après 10 min. Ce qui conduit à supposer la possibilité d'un recyclage. Tout comme le gradient témoin, il existe au début des gradients 10 et 60 min un certain pourcentage de molécules de classe II qui seraient solubles.

La radioactivité (peroxydase) présente une distribution étalée tout le long du gradient avec un pourcentage croissant vers les densités élevées que ce soit pour le gradient 10 min ou 60 min. Pour les deux gradients la densité médiane est respectivement de 1.196 et 1.193 gr/ml et donc très semblable. Nous ne pouvons associer la radioactivité à des organites détectés ici. (les lysosomes représentés par l' α -mannosidase ou la membrane plasmique). Cependant par comparaison, l'endocytose de l'invertase par les cellules endothéliales de foie de rat présente aussi une distribution continue sans que l'on puisse distinguer les endosomes des lysosomes. (24)

II.6. Discussion

Nous avons remarqué que la fraction soluble contenait un pourcentage assez important des molécules de classe II pour les fractionnements témoin et 10 min, ce qui pour une protéine transmembranaire est assez étrange. Des études antérieures ont montré que des molécules de classe II ayant subi l'action de la papaïne sont encore reconnaissables par l'anticorps 7C7 (N Løstrie 1985). Nous pouvons donc imaginer qu'une hydrolyse semblable à celle de la papaïne se soit effectuée sur les molécules de classe II, libérant un morceau soluble, reconnaissable par le 7C7. Ceci serait peut être du à l'action de protéases cytoplasmiques libérées au cours de l'homogénéisation. Cela soulève une autre question : pourquoi la fraction soluble du fractionnement de 60 min ne contient-elle pas de molécules de classe II ? Nous ne pouvons émettre que des hypothèses à ce sujet. Remarquons tout d'abord que la quantité relative de molécules de classe II est tombée à la moitié de sa valeur initiale après 60 min d'endocytose. On peut supposer que les molécules de classe II restantes sont peut être plus résistantes à l'action protéolytique et/ou associées à une ou des structures où elles sont à l'abri des protéases cytoplasmiques.

Nous avons pu remarquer également qu'au début du gradient, il y a des sites antigéniques reconnus par l'anticorps. Ces molécules sont isolées du reste de la distribution. Afin de vérifier si les molécules de classe II dans les premières fractions du gradient sont solubles ou associées à une structure sédimentable. Nous avons récentrifugé la fraction soluble à 65 000 rpm pendant trois heures. Cette expérience n'a pas abouti pour des problèmes techniques. Remarquons que si ces molécules de classe II étaient associées à un élément sédimentable, celui-ci ne contiendrait ni l' α -mannosidase ni la phosphodiesterase alcaline. Quant à sa densité, elle serait de l'ordre de 1.073 gr/ml.

D'autre part nos résultats semblent suggérer que les molécules de classe

II, sont principalement associées à des structures de densité élevée après 10 min d'incubation et à la membrane plasmique après 60 min. Il est tentant de penser qu'après 60 min d'internalisation, ces molécules sont recyclées vers la membrane plasmique. Que représente la structure de densité élevée (1.20 g/ml) à laquelle s'associent les molécules de classe II essentiellement après 10 min d'endocytose de la peroxydase ? Tenant compte de la diminution notable des molécules de classe 2 on aurait tendance à croire que celui-ci aboutirait aux lysosomes nantis des enzymes aptes à effectuer cette dégradation. Mais dans ce cas il faudrait admettre que cette lignée de cellules myéloïdes aurait deux populations de lysosomes, l'une marquée par l' α -mannosidase, l'autre (de densité plus élevée) qui en serait dépourvue. Une étude de la distribution des lysosomes réalisée en plusieurs enzymes "marqueurs" de cet organite, pourrait peut être renforcer cette hypothèse.

Les fractionnements ont montré que la radioactivité pourrait passer de MLP vers N, alors que les molécules de classe II restent dans MLP. Il ne semble donc n'y avoir aucune relation entre ces deux éléments lors de l'endocytose. Cependant l'endocytose de la peroxydase influencerait la quantité de molécules de classe II et leur comportement en centrifugation. Alors que les molécules de classe II restent associées aux membranes plasmiques et à une structure dense (1.20 g/ml) non identifiée, la radioactivité pourrait être associée à un ou des organites de taille importante et plus encore après 60 min qu'après 10 min (centrifugation différentielle). En centrifugation isopycnique la distribution de la radioactivité est très étalée et centrée autour d'une densité de 1.195 tant après 10 min qu'après 60 min d'internalisation. Cependant on pourrait déceler une légère bimodalité après 10 min d'internalisation de la peroxydase tandis qu'après 60 min la distribution semble franchement unimodale.

C'est le même type de distribution qui a été décrit par Jadot et al pour l'invertase, protéine à haut mannose, endocytée par les cellules endothéliales de foie de rat. Dans ce cas on ne parvient pas non plus à

distinguer endosomes et lysosomes. Les auteurs ont proposé un système d'endocytose formant un continuum. Cependant dans ce cas la majeure partie de l'invertase se trouve dans les fractions MLP et non dans N. Ce qui est à l'encontre de ce nous observons.

Un recyclage de la radioactivité n'est pas observable or les cellules 328 sont des cellules supposées présenter l'Ag. Que signifie la présentation de l'antigène; est une partie mineure de la peroxydase qui reparviendrait à la surface cellulaire, sa partie glycosylée ou sa partie protéique ? Dans le deuxième cas le marquage que nous avons effectué ne permet pas de visualiser ce passage à la membrane plasmique. C'est en effet la partie glycosylée de la peroxydase qui est marquée dans les conditions que nous avons utilisées. Il serait donc indiqué de marquer la peroxydase sur sa partie protéique par un marquage à l'iode.

II.7 Conclusion :

L'Ag, à première vue ne semble pas être endocyté en association aux protéines de classe II puisqu'aucune corrélation entre la distribution de la radioactivité et celle des molécules de classe II ne ressort des résultats présentés.

L'abondance des molécules de classe II serait influencée par l'endocytose de la peroxydase de même que leur comportement en centrifugation différentielle et en centrifugation isopycnique. Il semblerait qu'un mouvement des molécules de classe II se fasse au cours de l'endocytose de la membrane plasmique vers des structures de forte densité, peut être des lysosomes dépourvus d' α -mannosidase. Ces molécules de classe II seraient ensuite recyclés progressivement vers la membrane plasmique (60 min).

Il n'est pas exclu que la population lysosomes soit composée de deux types de lysosomes ayant une composition enzymatique différente. Afin d'être sûr que la radioactivité est contenue dans des lysosomes, il faudrait doser d'autres enzymes de référence des lysosomes.

Il faut se rappeler que les centrifugations isopycniques analysent la fraction MLP, fraction qui ne contient pas la majorité de la radioactivité mais bien la majeure partie des molécules de classe II. Nos résultats quoique très partiels sont intéressants. Il serait indispensable de les compléter en les répétant, en multipliant les enzymes de référence ou marqueurs tels la clathrine visualisant les "coated pits" et "coated vesicles", les temps d'endocytose, en effectuant des gradients sur la fraction N, en utilisant des inhibiteurs d'endocytose. En marquant la peroxydase par l'iode, traceur de la partie protéique, en suivant l'internalisation d'autres protéines ou glycoprotéines antigéniques soluble lors de l'endocytose mais encore l'entrée par phagocytose de particules telles des billes de latex ou de bactéries.

III. CONCLUSIONS GENERALES

Les lymphocytes B, pouvant présenter des antigènes solubles, nous avons décidé dans un premier d'utiliser les lymphocytes, isolés du sang de bovin, pour étudier le "processing" de l'antigène. Les lymphocytes bovins n'ont pas été à ce jour caractérisés du point de vue biochimique. Nous avons par conséquent du mettre au point non seulement la détermination d'activités enzymatiques mais encore leur homogénéisation. Après avoir déterminé les conditions d'homogénéisation adéquates, nous avons effectué un fractionnement. Celui-ci nous a montré que les enzymes de référence utilisée (la cytochrome oxydase, la β -galactosidase et l' α -glucosidase) sont localisés principalement dans la fraction ML, pour la cytochrome oxydase et la β -galactosidase, et la fraction P, pour l' α -glucosidase. Les deux dernières enzymes sont facilement solubilisables.

Au cours de ce travail, nous avons reçu des lignées de cellules myélocytaires établies. Ces cellules présentent en plus de l'antigène soluble, un antigène insoluble. Nous avons donc choisi malgré l'intérêt que présente l'étude de la présentation de l'antigène par les lymphocytes B. Ces cellules étant transformées, nous avons vérifié si celles-ci comportaient bien les prérequis nécessaires à ce travail, à savoir : l'expression de molécules de classe II, la capacité d'endocytose, la possession en quantité facilement mesurable d'enzymes de référence des lysosomes et de la membrane plasmique. Les tests faits pour ces vérifications se sont révélés positifs. Le choix de l'antigène à endocyter s'est porté sur la peroxydase que nous avons marqué au tritium, car ces cellules contiennent de la peroxydase endogènes. Après avoir vérifié que la peroxydase est bien endocytée par récepteur nous avons choisi pour la suite de nos expériences une quantité de peroxydase telle que celle-ci soit bien endocytée par récepteurs, qui par ailleurs ne seraient peut être pas des récepteurs à mannose. Après endocytose

durant 0 min (témoin), 10 min et 60 min de la peroxydase marquée par les cellules myéloïdes, nous avons effectué trois fractionnements et trois gradients pour chaque temps sur la fraction MLP, contenant la majorité des molécules de classe II. Ces expériences ont mis en évidence des distributions des molécules de classe II et de la radioactivité dissemblables. Toutefois, pour autant que les résultats soient confirmés il semblerait que l'internalisation des molécules de classe II soient influencée par l'endocytose de la peroxydase. Ces molécules de classe II se retrouvent associés à la membrane plasmique et semble-t-il à une deuxième population de granules de forte densité. La peroxydase se retrouve dans un organite de grande taille, sédimentable surtout dans la fraction N.

Ce travail, bien que restreint, donne des résultats intéressants. Il faudrait sans aucune doute les approfondir afin de les confirmer et de les exploiter au maximum.

ANNEXES

DOSAGES ENZYMATIQUES.

5' AMP ase.

Référence : Beaufray et al (1974).

Solutions stock :

- substrat : Adénosine 5' monophosphate PM 369 + 81 = 450.
(acide adénylique from yeast type II sodium salt)
135 mg dans 10 ml (soit 0,03M)
- activateur : MgCl₂ PM 203,3
30mM soit 610 mg dans 100 ml
- Tampon : Tris PM 121,14
0,5M pH 7,5 soit 30,25 gr dans 500 ml (porter à pH avec
HCl N)
- tartrate NaK PM 282
100mM soit 2,82 gr dans 100 ml

Composition des tests :

<u>Par test</u> : 0,1 ml de substrat	<u>Pour 100 tests</u> : 10 ml de substrat.
0,1 ml de MgCl ₂	10 ml de MgCl ₂ .
0,06 ml de Tris	6 ml de Tris.
0,06 ml de tartrate NaK	6 ml de tartrate.
0,18 ml d'eau (porter à pH avec NaOH/HCl)	18 ml H ₂ O
0,5 ml.	

Concentration finale :

substrat : 5mM
MgCl₂ : 5mM
tampon Tris : 50mM

tartrate : 10MM

Incubation à 30°C

compléter les tests pour qu'ils fassent 0,6 ml à l'incubation.

Fixation.

2,4 ml de TCA 8% (acide trichloroacétique)

rem : Les blancs sont incubés sans enzyme durant le même temps que les tests, une fois fixés, on ajoute l'enzyme.

Dosage.

Centrifuger les tests à la Janetzki pendant 10 min. Prélever 0,3 ml de surnageant pour la révélation du phosphate inorganique.

Dosage du Phosphate.

ref : Ames Methods in enzymology vol 8 p115.

Solution stock :

a) acide ascorbique 10%

soit 10 gr dans 100 ml d'H₂O

b) molybdate d'ammonium 4H₂O

à 0,42% dans H₂SO₄ 1N.

soit 4,2 gr molybdate d'ammonium 4H₂O

dans 28,6 ml H₂SO₄ concentré porté à 1L avec H₂O.

fait une mixture avec 1 part de a) et 6 parts de b), juste avant l'emploi et maintenu dans la glace.

Mode opératoire /

0,3 ml du surnageant est incubé avec 0,7 ml de la mixture à 37°C pendant 1 h.

lecture ou Gilford ... à 820 nm.

PEPTIDASE IV

Référence : Golberg, Rutelberg (1958)

Solutions stock :

- substrat : Glycyl proline naphtylamide PM 297
0,5mM soit 14,85 dans 100 ml.
- tampon : HEPES PM 238,31
0,2 M PH8 soit 4,77 gr dans 100 ml d'H O.
- Triton X.100 : 10%

Composition des tests :

Pour 200 tests : 14,85 mg de substrat

100 ml de Tris

+ 78 ml H O.

- chauffer très légèrement, porter à pH (HCl/NaOH)
après solubilisation et refroidissement, ajouter
1ml de triton à 10%.

Porter à 180 ml avec de l'eau.

Par tests : 0,9 ml de mixture.

Concentration finale :

substrat : 0,25mM

tampon Tris : 0,1M

triton : 0,05%

Incubation : à 37°C

Compléter les tests pour qu'ils fassent 1 ml à l'incubation.

Fixation.

avec 2 ml Tp Glycine/NaOH 0,5M PH 9,6

lecture au fluorimètre (AMINCO)

filtre d'excitation 360

filtre d'emission 415.

PHOSPHODIESTERASE ALCALINE.

Téférence : Beaufay et al (1974)

Solutions stock :

- substrat : Thymidine 5' -monophosphate-paranitrophényl-ester PM
460 + 115 (eau)
- Activateur : Acétate de Zinc PM 219,49
0,01M soit 8,78 mg dans 4 ml d'eau.
- Tampon : Glycérine-NaOH pH 9,6 PM glyc. 75,07
0,5M 3,755 gr dans 100 ml.
- Fixateur : NaOH 0,1N

Composition des tests :

par test : 0,172 mg de substrat.
0,05 ml de tampon glycine-NaOH
0,05 ml d'acétate de Zn
0,1 ml d'eau
0,200 ml par test.

Pour 50 tests : 8,6 mg de substrat
2,5 ml de tampon
2,5 ml d'acétate de Zn
5 ml d'eau

Ajuster si nécessaire au moyen de NaOH le pH à 9,6.

Concentration finale :

substrat : 1,2mM
Acétate de Zn 2mM
Tampon glycine 0,1M

Incubation :

Pour fractionnement :

Compléter les tests pour qu'ils fassent 250 ml à l'incubation qui se fait à 25°C. (soit 0,010 ml enz. + 0,040 ml H₂O).

Fixation.

1 ml de NaOH 0,1N

Dosage.

Centrifuger les tests à la Janetzki pendant 5 min. et lire directement au Gilford 300N à 400nm.

Etalon.

Solution de paranitrophénol à 0,05 umoles/ml. Solution stock Sigma à 10 umoles/ml. Lecture de $\pm 0,360$.

Blanc de cet étalon : 1 ml d'eau et 1,5 ml de fixateur.

PHOSPHATOSE ALCALINE.

Réf : Peters T.J. et AL (1972)

Solutions stock :

Substrat : Méthyl umbelliferyl phosphate PM = 256,2
4mM soit 1,02 mgr/ml dans éthanol 50%.

Tampon : Glycine / NaOH PM = 75,07
0,5M PH 9,5 soit 18,77gr/500 ml.

activateur : MgCl PM = 203,31
100mM soit 2,033 gr/100ml

Triton X - 100 2%

Incubation : à 37°C
100 d'enz avec 250 de mixture.

Fixation
2 ml de Tp glycerine/NaOH EDTA.

lecture au fluorimètre (AMINCO)

filtre d'excitation 360
d'emission 460

L LEUCYL NAPHTHYLAMIDASE

Réf : Peters T.J et Al (1972).

Solution stock :

substrat : L - leucyl - p - naphthylamide PM 292,8
4mM soit 1,17 mg/ml.

Tampon : Piperazine / HCl PM 86,14
1M PH 6,75 soit 8,61 gr/100ml

Activateur : MgCl PM 203,31
0,5M soit 10,17gr/100ml

Triton X - 100 2%

Fixateur : Tampon glycine NaOH PM 75,07
0,05 M PH 10,4 soit 0,375 gr/100ml.

Composition des tests : concentration à l'incubation

Pour 20 tests :

0,350 ml de substrat	0,2mM
0,700 ml tampon piperazine.....	0,1M
0,700 ml MgCl	0,05M
0,350 ml Triton.....	0,1%
2,900 ml d'H O	

Incubation : à 37°C
100 d'enz avec 250 de mixture.

Fixation :

2 ml TP glycine/NaOH
Lecture au fluorimètre (AMINCO)
filtre d'excitation 360
filtre d'emission 415.

α -MANNOSIDASE

Réf : Peter et Al (1972).

Solution stock

Substrat : 4 Méthylumbelliferyl. Mannoside (MUM)

PM = 338,32

4mM soit 1,353 mg/ml éthanol 50%

Tampon Sodium acétate 0,136M PH = 4,5

Triton X - 100 à 10%

Tampon glycine/NaOH 50mM PH = 10,5.

PM = 75,07 soit 0,375 gr/100ml.

Mixture :

Pour 20 tests	concentration
0,2 ml MUM	0,4mM
1,75 ml TP. Na acétate	0,05M
0,048 ml Triton	0,1%

- chaque test contient 0,1 ml de mixture plus un volume d'eau afin d'avoir un volume de 0,2 ml à l'incubation.
- l'incubation se fait à 37°C
- pendant 80'
- la réaction est arrêtée par 2 ml de tampon glycine froid
- la lecture se fait au fluorimètre à 365 nm (filtre d'excitation)
460 nm (filtre d'émission)

Etalon : 0,2 ml de 4 méthyumbelliferol 0,01 g/ml TP Na acétate
+ 2 ml de fixateur.

DOSAGE DES PROTEINES

(Méthode de Miller)

Réf : analytic Chemicals vol 31 p. 924 (1959).

Solution stock :

Na CO à 14,3%
Na OH 2N
tartrate à 20%
CuSO à 05%
Folin dilué 11 fois.

Mixture A :

7 ml Na CO
2,5 ml N OH
0,5 ml tartrate.

Mixture B :

Ajouter 1 ml de CuSO à 10 ml de la mixture A.

Mode opératoire :

à 0,2 ml de votre échantillon ajouter 0,2 ml de la mixture B.
vortexer et attendre 10'
ensuite rajouter 0,6 ml de Folin dilué. Vortexer et incuber
10' à 50°.
après incubation attendre 10' puis lire au Gilford 250 à 660 nm.

Etalon : solution d'albumine
à 400 / ml dilué 4X.
Blanc enz remplacer par H O.

DOSAGE DE LA CYTOCHROME OXYDASE

Solution stock :

substrat : 13,5 mg de cytochrome C. ($1,7 \times 10^{-4}$ M)
3Ml de TP Phosphate 0,5M ; PH 7,4
0,5 ml de EDTA 0,1M PH 7,4
amener le volume à 50 ml avec l'H₂O.

Tampon phosphate : 0,5M PH 7,5

K₂ PO₄ PM : 228,23 soit 57,06 gr/500ml

KH₂ PO₄ PM : 136,09 soit 17,01 gr/250ml

EDTA : 0,1M PH 7,4

PM = 372,24 soit 3,7224 gr/100ml

PH est ajusté avec du NaOH.

Mixture de dilution de l'enzyme : concentration finale

2 ml de triton 2% 0,04%

1 ml d'EDTA 0,1M PH 7,4 1.10 M

0,2 ml TP. Phosphate 0,5M PH 7, 1.10 M

porté à 100 ml avec H₂O gardé dans de la glace.

Incubation :

0,1 ml enzyme + 2 ml de substrat à 25° suivre pendant 1 min
l'extinction à 550nm.

β - GALACTOSIDASE

Solution stock :

Substrat : 4 méthylumbelliferyl galactopyranoside (MUG).

PM = 338,32

4 mM soit 1,353 mg/ml éthanol 50%

Tampon Sodium acétate 0,136M PH = 4,5

Triton X - 100 à 10%

Tampon Glycine/Na OH 50 mM PH = 10,5

PM = 75,07 soit 0,375 gr/100ml

<u>Mixture</u>	concentration finale
Pour 20 tests	
0,2 ml MUG	0,4 mM
1,75 ml TP Na acétate	0,05 M
0,048 ml Triton	0,1%

- Chaque test contient 0,1 ml de mixture plus un volume d'eau afin d'avoir un volume de 0,2 ml à l'incubation.
- L'incubation se fait à 37°
- La réaction est arrêtée par 2 ml de tampon Glycine froid
- La lecture se fait au fluorimètre à 365 nm (filtre d'excitation)
460 nm (filtre d'émission).

Etalon : 0,2 ml de 4 méthylumbelliferyl 0,01 /ml TP Na acétate
+ 2 ml de fixateur.

α Glucosidase alcaline

Solution stock

Substrat : 4 méthylumbelliferyl D glucopyromiside 4 mM (MUG)

PM = 338,32 soit 1,352 mg/ml d'éthanol 50%

Tampon glycine / NaOH 0,5 M PH9

PM = 75,07 soit 3,75 gr/100ml

fixation : tampon glycine / NaOH 50mM PH 10,5

EDTA 5mM

Mixture :

Pour 30 tests

concentration finale

0,3 ml MUG

0,2 mM

0,6 ml T. glycine / NaOH 0,5 M

0,05 M

2,1 ml H O.

- chaque test contient 0,1 ml de mixture plus un volume d'eau afin d'avoir un volume de 0,2 ml à l'incubation.
- l'incubation se fait à 37°C
- la réaction est arrêtée par 2 ml de Tp glycine / NaOH 50 mM
- la lecture se fait au fluorimètre à 365 nm (filtre d'excitation)
460 nm (filtre d'émission)

Etalon : 0,2 ml de 4 méthylumbelliferol 0,01 g / ml de

TP glycine / NaOH 0,5 M

+ 2 ml de fixateur.

Dosage de la perosydase

Solution stock

Tampon phosphate 0,15 M PH 6,2

KH PO : PM = 136,09 soit 2,04 gr/100ml

K H PO : PM = 228,23 soit 3,42 gr/100ml

Triton 2%

H O 1% (1 ml dans 100 ml H O)

Mixture

40 ml de tampon phosphate

40 ml de triton 2%

71,96 ml d'H O

4,54 mg de NN de méthylphenulendiamine HCl

à conserver à l'abri de la lumière et à 4°C

Méthode

Par test : 2,8 ml de mixture

0,1 ml d'enzyme

lire le blanc

ajoute 0,1 ml d'H O 1%

Lire au Gilford 250 à 520 nm (500 abs).

Composition du P.B.S

KH PO : 0,2 gr
Na HPO : 1,15 gr
NaCl : 8 gr
KCl : 0,2 gr
H O : 1000 ml
PM : 7,3.

BIBLIOGRAPHIE.

1: W.L.Hildeman,I.S.Johanson,P.L.Jokiel

Immunocompetence in the lowest Metazoan Phylum: Transplantation Immunity in Sponges. Science,vol 204,pp.420 (1979)

2: E.L.Cooper

L'évolution de l'immunité. La Recherche n°103,vol 10,pp.824 (1979)

3: H.M.Grey,R.Chesnut

Antigen processing and presentation to T cells.Immunology Today , vol 6,n°3,pp.101 (1985)

4: I.Roitt,J.Brostoff,D.Male

Immunologie fondamentale et appliquée. Ed.Medsi (1985)

5: P.A.Peterson

The nature and role of the MHC. Animal Genetics,vol 18,supplement 1 ,pp.1 (1987)

6: B.H.Barber

On the interaction between antigen and MHC molecule. Immunology Today,vol 8,n°1,pp.9 (1987)

7: P.Cresswell

Antigen recognition by lymphocytes. Immunology Today,vol 8,n°3, pp. 67 (1987)

8: P.Parham

A repulsive view of MHC-restriction. Immunology Today, vol 5, n°4,
pp. 89 (1984)

9: H.G.M.Kingston

Processing of viral antigens and presentation to class II-restricted T
cells. Immunology Today, vol 7, n°9, pp. 260 (1986)

10: E.R.Unanue

Antigen presenting function of the macrophage. Annu.Rev.Immunol.,
vol 2, pp.395 (1984)

11: R.W.Chesnut, S.M.Colon, H.M.Grey

Antigen presentation by normal B cells, B cells tumor and
macrophage: Functional and Biochemical comparison. J.Immunol.,
vol 128, pp.1764 (1982)

12: H.Z.Streicher, I.J.Berkower, M.Busch, F.R.N.Gurd, J.A.Berzofsky
P.N.A.S., vol 81, pp.6831 (1984)

13: J.H.Brock

Are lysosomes involved in antigen processing ? Immunology
Today, vol 6, n°6, pp. 177 (1985)

14: O.Werdelin

T cells recognize antigen alone and not MHC molecules. Immunology
Today, vol 8, n°3, pp. 80 (1987)

14': O.Werdelin

Determinant protection. A hypothesis for the activity of immune
response genes in the processing and presentation of antigen by

macrophages. Scand.J.Immunol.,vol 24,pp.625 (1986)

15: W.Leibold,G.Büsher,J.J.Letesson,U.B.Chanska-Ziegler,W.Davis,
K.T.Freidhoff

Different subsets of bovine mononuclear cells from one individual
reestablished as lymphoblastoid cell lines (BoL CL) in vitro. Submitted to
the congress,1986, Guelph,Canada

16: Beaufay et al.,1974
J.Cell.Biol.,vol 61,pp.188

16': J.A.Golberg,A.R.Rutelberg
Inter.Y.,Cancer. pp.283 (1958)

17: T.J.Peters,M.Müller,C. de Duve
The Journal of experimental Medecin,vol 136,pp.1117 (1972)

20: Tack et al.,1980
J.B.C.,vol 255,pp.8844

21: J.J.Letesson,Ph.Coppe,N.Lostrie,A.Depelchin
A bovine Ia like antigen detected by a xenogeic monoclonal antibody.
Animal.Bi.Groups Biochem.Genet.,vol 14,pp.239 (1983)

22: J.W.Stocker,C.H.Heuser,R.M.Gisler
Method for binding cells to plastics: Application to a S.P.R.I.A. to cell
surface antigens .Methods in Enzymology,vol 73,pp.407(1981)

23: C.de Duve,B.C.Pressman,Gianetto,R.Wattiaux,R&Appelmans F.

Tissue fractionation studies 6.intracellulare distribution patterns
of enzymes in rat liver tissue. Biochem.J.,vol 60,pp.604 (1955)

24: M.Jadot,S.Misquith,F.Dubois,S.Wattiaux-De Conninck,R.Wattiaux

Intacellular pathway followed by invertase endocytosed by a rat liver.
Eur.J.Biochem.,vol 161,pp.695 (1986)