50376
1984
215

50376
1984
215

THESE

PRESENTEE A

N° d'ordre 1231

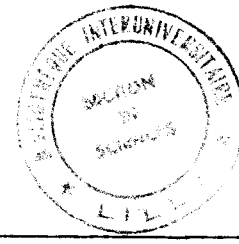
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE DE VILLENEUVE D'ASCQ

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT DE TROISIEME CYCLE

MENTION BIOCHIMIE

Claire Langlet



UTILISATION DE VARIANTS SOMATIQUES DANS L'ANALYSE DES DETERMINANTS ANTIGENIQUES DE LA MOLECULE H-$2K^b$ INTERVENANT DANS LA RECONNAISSANCE PAR DES ALLOANTICORPS ET PAR DES CELLULES MONOSPECIFIQUES.

SOUTENUE LE 10 DECEMBRE 1984 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Président	Mr MONTREUIL
Rapporteur	Mlle SCHMITT-VERHULST
Examinateurs	Mlle SPIK
	Mr CAPRON

Ce travail a été effectué dans le laboratoire d'immunologie cellulaire de Marseille-Luminy (Centre INSERM-CNRS) sous la direction scientifique d'Anne-Marie SCHMITT-VERHULST.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidée à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS p 1

INTRODUCTION p 2

GENERALITES p 4

I LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE p 4

A) DEFINITION p 4

B) HISTORIQUE p 4

C) STRUCTURE DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE p 5

1) Introduction p 5

2) Les souris et leur nomenclature p 6

3) Antisérums et anticorps monoclonaux p 8

4) Structure des trois classes de molécules p 9

D) LES GENES ET ANTIGENES DE CLASSE I p 10

1) Structure des antigènes de classe I p 10

2) Structure des gènes de classe I p 10

a) Clone de cDNA de classe I p 10

b) Organisation d'un gène de classe I p 11

c) Localisation chromosomique des différents gènes de classe I p 11

d) Mécanisme de génération du polymorphisme p 12

e) Mutants spontanés de classe I p 12

f) Obtention de lignées cellulaires exprimant des antigènes de classe I "mutés" p 13

II LES CELLULES T CYTOTOXIQUES p 14

A) HISTORIQUE p 14

B) SPECIFICITE DE LA REPONSE DES CTL : rôle du CMH dans les intéractions entre effecteurs et cibles p 14

1) L'Alloréactivité p 15

a) Mécanisme cellulaire impliqué dans la génération de CTL p 15

b) Déterminants reconnus par les CTL p 15

2) La restriction H-2 p 16

C) STRUCTURES MEMBRANAIRES IMPLIQUEES DANS LES INTERACTIONS CELLULAIRES POUR L'INDUCTION D'EFFECTEURS CYTOTOXIQUES p 18

1) Marqueurs de surface permettant la classification des cellules p 18
2) Fonctions des antigènes de différenciation dans les intéractions effecteurs/cibles p 19

D) FACTEURS SOLUBLES ET CELLULES IMPLIQUES DANS LA GENERATION D'EFFECTEURS CYTOTOXIQUES p 20

1) Définition de l'IL-1 et du rôle de présentation de l'Ag par les macrophages p 21
2) Les cellules TA et IL-2 p 21
3) Le "cytotoxic T cell différenciation factor" : C.T.D.F. p 21
4) L'interféron (IFN-γ) et le "macrophage activating factor"(MAF) p 22
5) Le "colony stimulating factor" (CSF) p 22

E) APPORT DES CELLULES T CLONEES A LA DEFINITION DES INTERACTIONS CELLULAIRES p 22

MATERIELS ET METHODES p 23

MATERIELS

I SOUCHES DE SOURIS UTILISEES p 23

II LES ANTICORPS MONOCLONAUX p 24

III MILIEU DE CULTURE p 24

A) MILIEU LIGNEE p 24

B) OBTENTION D'UN MILIEU CONDITIONNE CONTENANT DES FACTEURS DE CROISSANCE p 25

METHODES p 25

I CELLULES UTILISEES p 25

A) PREPARATION DES CELLULES SPLENIQUES DE SOURIS p 25

B) OBTENTION DES BLASTES PAR STIMULATION AVEC LA CONCANAVALINE A (Con-A) p 25

C) OBTENTION DE CTL PRIMAIRES p 26

1) Obtention de CTL primaires spécifiques de H-2K^b p 26
2) Obtention de CTL primaires spécifiques de H-2K^b p 26

D) OBTENTION DE LIGNEES CELLULAIRES ET DE CLONES p 26

1) Etablissement de la lignée KB5 (1) p 26
2) Etablissement de la lignée BM (3) p 27
3) Etablissement de clone T à partir des lignées KB5 et BM p 27

E) OBTENTION DES VARIANTS DE CLASSE I p 27

1) A partir de la lignée R8 (NATHENSON et Coll.) p 27
2) Hybrides de classe I exprimés par les cellules L p 28

II TESTS CELLULAIRES p 28

A) TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE p 28
B) TEST D'INHIBITION DE PROLIFERATION CELLULAIRE p 28

1) Par les anticorps monoclonaux p 28
2) Par un agent chimique : le méthotréxate (MTX) p 29

a) Préparation des liposomes couplés à la protéine A (Lip-PA) p 29
b) Inhibition de l'incorporation de déoxyuridine tritiée par les cellules p 30

C) TEST DE CYTOTOXICITE p 31

D) TEST D'INHIBITION DE LA CYTOLYSE p 31

III MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENTS MARQUEURS CELLULAIRES p 32

A) REVELATION PAR LA PROTEINE A RADIOMARQUEE p 32

1) Marquage de la protéine A p 32
2) Dosage radioimmunologique p 33

B) REVELATION PAR UN SECOND ANTICORPS MARQUE A LA FLUORESCEINE p 33

1) Préparation des cellules p 33
2) Lecture de la fluorescence p 33

RESULTATS ET DISCUSSIONS p 35

I ETUDE DES RELATIONS ENTRE LES DETERMINANTS RECONNUS PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX ET PAR LES CELLULES T CYTOTOXIQUES p 35

A) OBTENTION DE VARIANTS STRUCTURAUX DE LA MOLECULE K^b p 35

1) Principe de la mutagénèse et de la sélection de variants de structure p 35

2) Réactivité des différents Acm anti H-$2K^b$ sur les variants de structure de R8 p 36

a) Analyse par fluorescence des variants de structure de R8 p 37

b) Schématisation des réactivités p 37

3) Discussion p 37

B) OBTENTION DES LIGNEES ET CLONES CYTOTOXIQUES p 39

1) Obtention des deux lignées alloréactives KB5 et BM spécifiques de H-$2K^b$: marqueurs de différenciation et condition de prolifération p 39

2) Obtention des clones cellulaires issus de KB5 et BM p 40

a) clones issus de la lignée KB5 p 40

b) clones issus de la lignée BM p 40

3) Etude de la spécificité de l'activité cytolytique des lignées KB5 et BM et des clones issus de ces deux lignées p 40

C) UTILISATION DES VARIANTS DE STRUCTURE DE LA LIGNEE R8 COMME CIBLES POUR LES CTL p 42

1) Pour une population totale anti-H-$2K^b$ ou anti-H-$2K^d$ p 42

2) Pour deux clones cytolytiques différents anti-H-$2K^b$ p 42

3) Réactivité de onze clones CTL spécifiques de H-$2K^b$ vis à vis de six variants de la lignée R8 p 43

4) Discussion p 44

D) ANALYSE DES INTERACTIONS EFFECTEURS-CIBLES DANS LE CAS DU VARIANT R8-10 p 48

1) Etude de l'affinité du clone BM2-17 pour les cellules cibles R8 et R8-10 p 48

2) Etude de l'intéraction entre le clone BM3-3 et les cellules cibles R8 et R8-10 p 49

3) Discussion p 49

II ETUDE DE L'ENDOCYTOSE DES MOLECULES H-2 DE CLASSE I MUTEES p 51

A) OBTENTION ET CARACTERISATION SEROLOGIQUE DE MOLECULES HYBRIDES DE CLASSE I p 51

B) ETUDE DE L'INTERNALISATION DES MOLECULES DE CLASSE I MUTEES p 52

CONCLUSIONS p 54

BIBLIOGRAPHIE p 57

ABREVIATIONS

C.M.H.	: Complexe majeur d'histocompatibilité
H-2	: Antigène du système majeur d'histocompatibilité murin
Ag	: Antigène
Ac	: Anticorps
Acm	: Anticorps monoclonal
CTL	: Cellule T cytotoxique
P-CTL	: Précurseur de cellule T cytotoxique
MLC	: Culture lymphocytaire mixte
TA	: Cellule T auxiliaire
TNP	: Trinitrophényl
IL-1	: Interleukine-1
IL-2	: Interleukine-2
IFN-γ	: Interféron-γ
Con-A	: Concanavaline-A
SnC16	: Surnageant de culture du clone 16
MTX	: Méthotréxate
CF	: Carboxyfluoresceine
RFI	: Relative fluorescence intensity
FACS	: Fluorescence activating cell sorting

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La dissection du système immunitaire chez les mammifères fait apparaître l'intervention d'un réseau complexe d'intéractions cellulaires conduisant à l'élaboration d'une réponse immune spécifique d'un antigène. Cette réponse peut être soit de type humoral (production d'anticorps), soit de type cellulaire (induction d'effecteurs cytotoxiques...).L'analyse de ces intéractions cellulaires met en évidence le rôle central joué par un ensemble de gènes étroitement liés qui compose le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces gènes codent pour des structures membranaires. L'analyse de ces antigènes de surface par des alloantisérums fait apparaître deux classes de molécules avec des rôles distincts. Par exemple, lors des réactions de rejets de greffe, une première classe de molécules (Antigène de classe II du CMH) induirait les cellules T "helper" à l'élaboration d'une réponse immune, dirigée contre la seconde classe de molécules (antigène de classe I du CMH). Cette réponse immune se traduit par la production anticorps et de cellules T cytotoxiques (CTL) ayant le même antigène cible : l'antigène de classe I du CMH.

La structure des anticorps et les mécanismes de la génération de la diversité dans ce système de reconnaissance sont aujourd'hui bien connus. Par contre la nature du récepteur antigène spécifique des cellules T est restée élusive et la question de savoir si le même système génétique était utilisé pour la génération de la diversité pour les cellules T et B (immunoglobulines) restait fossée jusqu'en 1983.

D'un point de vue fonctionnel une différence apparaissait entre le système des anticorps et celui des cellules T à savoir que le répertoire des cellules T semblait dirigé essentiellement vers la reconnaissance de produits de classe I ou de classe II du CMH, qu'il s'agisse de la reconnaissance des alloantigènes eux-mêmes ou d'antigènes exogènes. En effet ces derniers sont "co-reconnus" avec des produits de classe I ou II par les cellules T alors qu'ils sont reconnus de façon indépendante par les anticorps. Il paraissait donc intéressant de comparer comment des variations de la structure d'une molécule de classe I ($H\text{-}2K^b$) pouvait influencer la reconnaissance par les anticorps et par les cellules T. C'est la question posée dans la première partie de notre travail.Dans la seconde partie de notre travail nous examinons une autre propriété des antigènes de classe I, à savoir leur endocytose cellulaire mesurée par l'internalisation de ligands fixés à ces molécules. Bien que peu étayée

encore, l'hypothèse a été émise que les molécules de classe I ou II serviraient de "récepteurs" pour des antigènes exogènes contribuant éventuellement à leur endocytose. C'est dans cette optique qu'il semblait intéressant d'examiner si des variations de structure de la molécule H-2K^b auraient un effet sur l'endocytose de ces molécules.

Dans la première partie de notre travail, la comparaison des déterminants antigéniques reconnus soit par les Acm anti-K^b soit par des CTL alloréactifs anti-K^b se fait par l'intermédiaire d'une lignée tumorale induite chez une souris (H-2^b x H-2^d)F1. Après mutagénèse de cette lignée et immuno-sélection on obtient un certain nombre de variants présentant à la surface membranaire des molécules K^b mutées (NATHENSON et Coll.). Cette méthode est complémentaire à celle qui a consisté à sélectionner des souris mutantes pour H-2K^b par des réactions d'immunité cellulaire (137, 123) (voir chapitre : mutants spontanés de classe I p 12). Dans un premier temps nous allons définir les épitopes sérologiques de la molécule K^b affectés par la mutagénèse. Pour ce faire, nous allons utiliser les Acm qui ont permis à HAMMERLING et Coll. (68) de dresser la carte topographique des épitopes sérologiques au niveau de la molécule K^b (Voir chapitre : antisérums et anticorps monoclonaux p 8). En parallèle nous avons défini la spécificité cytolytique de clones cellulaires T en les testant sur des cellules cibles issues de souris mutantes H-2K^{bm}. Ces clones T vont ensuite être testés sur les variants de R8. Nous pourrons ensuite comparer la reconnaissance des variants par les Acm et par les clone T.

Dans la seconde partie du travail, pour analyser l'endocytose des molécules de classe I mutées, nous disposons de cellules qui expriment des hybrides de classe I entre molécule D^b et K^b (voir chapitre hybrides de classe I exprimés par les cellules L p 28) (4). Nous savons que la fixation d'Acm sur les molécules K^b et D^b ne fait pas varier leur internalisation par la cellule ( ). Donc pour visualiser cette endocytose on va coupler par l'intermédiaire d'un Acm des liposomes auxquels on a couplé de façon covalente la protéine A et qui contiennent un inhibiteur de la prolifération cellulaire. S'il y a endocytose l'inhibiteur relargué dans le cytoplasme empêche la prolifération cellulaire.

Avant d'exposer et de discuter nos propres résultats, il nous a paru nécessaire de définir brièvement le complexe majeur d'histocompatibilité ainsi que les cellules T cytotoxiques.

GENERALITES

I LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE

A) DEFINITION

Une allogreffe est une transplantation de tissus d'un individu donné à un autre individu de la même espèce, mais génétiquement distinct du premier. Chez tous les mammifères étudiés jusqu'à ce jour, un ensemble de gènes semble être d'une importance primordiale pour le devenir de ces allogreffes. Cet ensemble de gènes porte le nom de complexe majeur d'histocompatibilité ou C.M.H. En plus du contrôle de la réponse immunitaire aux allogreffes, le C.M.H. semble jouer un rôle important dans le contrôle des interactions cellulaires responsables de la physiologie de la réponse immunitaire. Ainsi, une compréhension de la génétique du C.M.H., de la structure et de la fonction de ses produits, est d'une importance capitale pour l'interprétation d'un des phénomènes les plus fondamentaux de la biologie, la reconnaissance des cellules du soi et du non-soi.

B) HISTORIQUE

Le complexe majeur d'histocompatibilité (complexe H-2 pour la souris) a été découvert par GORER P. (60) au cours d'une étude sur les groupes sanguins de la souris. Il distinguait au moyen de sérums xénogéniques, deux systèmes antigéniques : un système commun à toutes les souches de souris étudiées appelé antigène I; un second système appelé antigène II présent sur les cellules de certaines souches de souris consanguines exclusivement. En 1948, GORER et Coll. (59) montrent par une analyse classique que les gènes codant pour ce second antigène sont liés aux gènes responsables des rejets de greffes qu'il s'agisse de tissus normaux ou de cellules tumorales. Ces gènes, codant pour les antigènes II, sont appelés par la suite, gènes d'histocompatibilité (H-2) appartenant au C.M.H.

L'étude de cet ensemble de gènes a été rendue possible grâce à l'élaboration de deux grands outils méthodologiques : 1) le développement de lignées de souris congéniques (184) et recombinantes (61) (voir chapitre sur les souris et leurs nomelclatures p 6) et 2) l'élaboration d'alloantisérums à partir de ces souris a permis de définir les structures membranaires codées par le CMH (voir chapitre p 8).

SNELL (184) grâce aux lignées de souris congéniques a pu démontrer que des individus ayant des haplotypes H-2 différents rejettent mutuellement la transplantation de peau. L'analyse d'alloantisérums (185) a montré qu'à chaque haplotype H-2 correspond un ensemble d'antigènes de la surface cellulaire dont

certains sont communs à plusieurs haplotypes (spécificités publiques) et d'autres spécifiques d'un haplotype donné (spécificités privées). Ces alloantisérums, par des techniques d'immunoprécipitation ont permis l'étude de la structure de ces antigènes codés par le CMH (27) (voir chapitre structure des trois classes de molécules p 9). L'étude sur des souris recombinantes au H-2 (61) a permis dans un premier temps de delimiter les frontières génétiques des différents loci du CMH (figure 5 p 9) et dans un second temps, grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, de définir la topographie des différents gènes du complexe H-2.

L'importance du CMH dans le contrôle de la réponse de type humoral a été mise en évidence par les travaux de Mc DEVITT et Coll. (114) qui montrent qu'un locus du CMH (région Ir ou plus tard appelé H-2 I par KLEIN et Coll (84)) est impliqué dans le contrôle du taux d'anticorps en réponse à un antigène particulier. D'autre part, les travaux de ZINKERNAGEL et DOHERTY (216, 35) ont montré le rôle joué par les déterminants du CMH dans l'induction et la reconnaissance des cellules tueuses vis à vis de cellules syngéniques infectées par un virus. Ils ont mis ainsi en évidence le phénomène de"restriction"exercé par le complexe H-2 (Voir p 16).

L'importance de ces deux observations, ainsi que les données sérologiques et génétiques, puis les méthodes de biologie moléculaire ont permis l'étude plus approfondie de ce complexe H-2 afin de comprendre son rôle dans le système immunitaire (pour revue générale voir : 85, 87, 91, 92, 120, 74, 162).

C) STRUCTURE DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE

1) Introduction

Le complexe H-2 de la souris est un ensemble de gènes étroitement liés, localisé sur le chromosome 17. Il a une longueur approximative de 1,5 centimorgans. La caractérisation des structures du C.M.H. impliquées dans le contrôle génétique de la reconnaissance de l'antigène et dans la stimulation des cellules alloréactives a conduit à une fragmentation du C.M.H. murin (181, 87). On distingue les produits des gènes de classe I qui sont classiquement des antigènes (Ag) de transplantation,ubiquitaires chez l'animal adulte. Ils sont regroupés dans les régions K, D (83) et L (191). Les gènes Qa et TLa codent également pour des Ag de classe I exprimés à la surface de certaines cellules

lymphoïdes seulement (189, 191, 112,50). Les gènes de classe II ou gène Ir codent pour des molécules qui interviennent dans les mécanismes de contrôle de la réponse immunitaire (114, 10, 115, 191). Et enfin les gènes de classe III correspondant à la région appelée "S" codent pour des molécules qui contrôlent l'activité du complément (162, 25) Figure N°4.

2) Les souris et leur nomenclature

Pour permettre l'étude du complexe H-2 il a été nécessaire de développer des souches de souris génétiquement homogènes. C'est ainsi qu'à partir de souris sauvages génétiquement polymorphes on a effectué des croisements frère-soeur pour aboutir à une lignée pure de souris ou lignée consanguine (figure 1). Après environ 25 générations on aboutit à des individus génétiquement équivalents qui n'engendrent plus que des descendants identiques à eux-mêmes si on les croise toujours entre frère-soeur.

Figure N°1

Représentation schématique des différentes définitions génétiques des souches de souris.

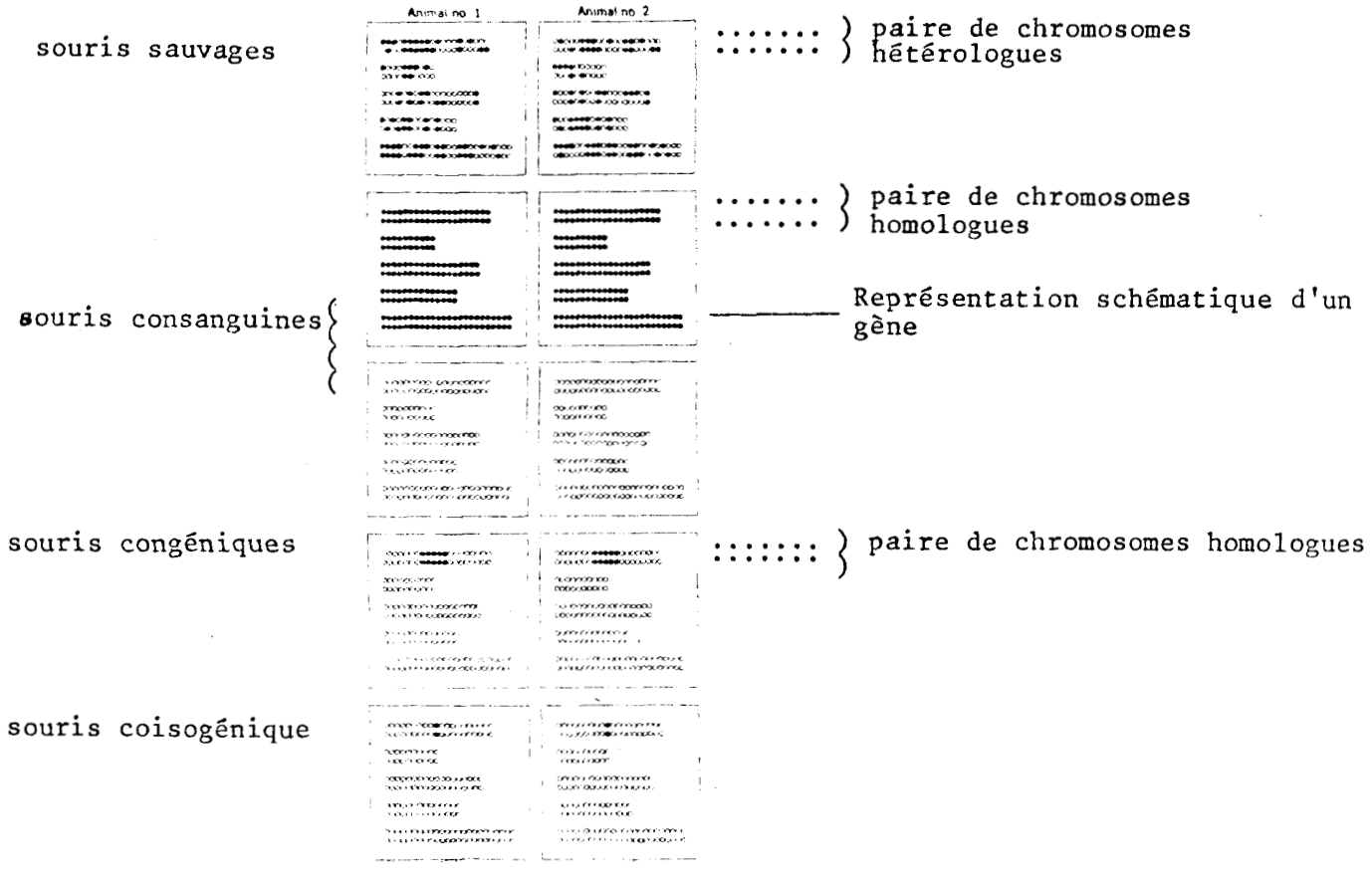


Figure N° 2

Etablissement d'une lignée congénique pour H-2

	Loci	non H-2	H-2
1 souris de lignée consanguine - - - - - -	A	A/A	a/a
1 souris de lignée consanguine - - - - - -	B10	B/B	b/b
on veut obtenir une lignée congénique — — — — —	B10.A	B/B	a/a

On sélectionne au moyen de sérum B10 anti-H-2^a

$\frac{[B]}{[A]}$ augmente

Nombre de générations

No	A x B10 AB	ab
N1	B10xF1(AxB10) AB^2	ab
N2	B10x(B10xF1(AxB10) AB^3	ab
N12	(A)B^{13}	ab

Croisement frère x soeur pour établissement de congénecité

N12 F1 frère x soeur

(A)B a/b x (A)B a/b

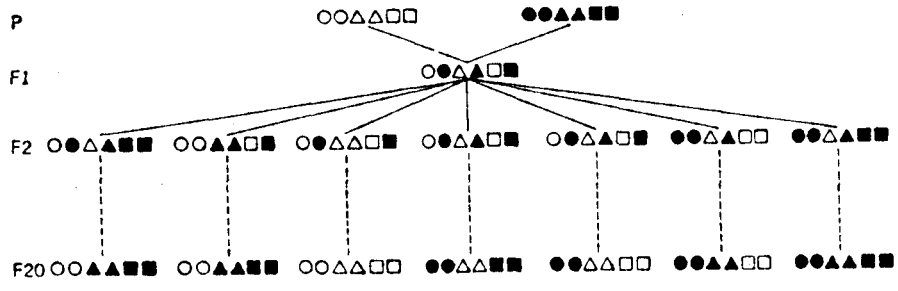
N12 F6 B/B a/a

Sélectionné par des rejets rapides de peau de B10

On obtient une lignée congénique B10.A H-2^a.

Figure N° 3

Représentation schématique de l'établissement de lignées recombinantes (91)



A partir de 1948, Georges SNELL (188) réalise grâce à d'innombrables croisements en retour("Backcross") une série de lignées dites congéniques. Ces souches sont absolument identiques à une lignée consanguine déjà établie sauf pour un gène (coisogénique)ou pour un groupe de gènes (congénique), par exemple pour les gènes du complexe H-2 (Figure 1) l'obtention de ces lignées congéniques est résumée(figure 2). Pour le C.M.H., à partir d'une lignée consanguine par exemple B10 on peut obtenir, après "backcross" avec différentes souches de souris consanguines ou non (souris donneuses) un nombre important de lignées congéniques ayant le même fond "B10" mais se différenciant par les gènes du complexe H-2 qui seront de l'haplotype de la souris donneuse (pour exemple voir tableau 1).

Tableau N° 1

Exemple de souris congéniques issues d'un croisement entre une même souris consanguine B10 et différentes souris donneuses.

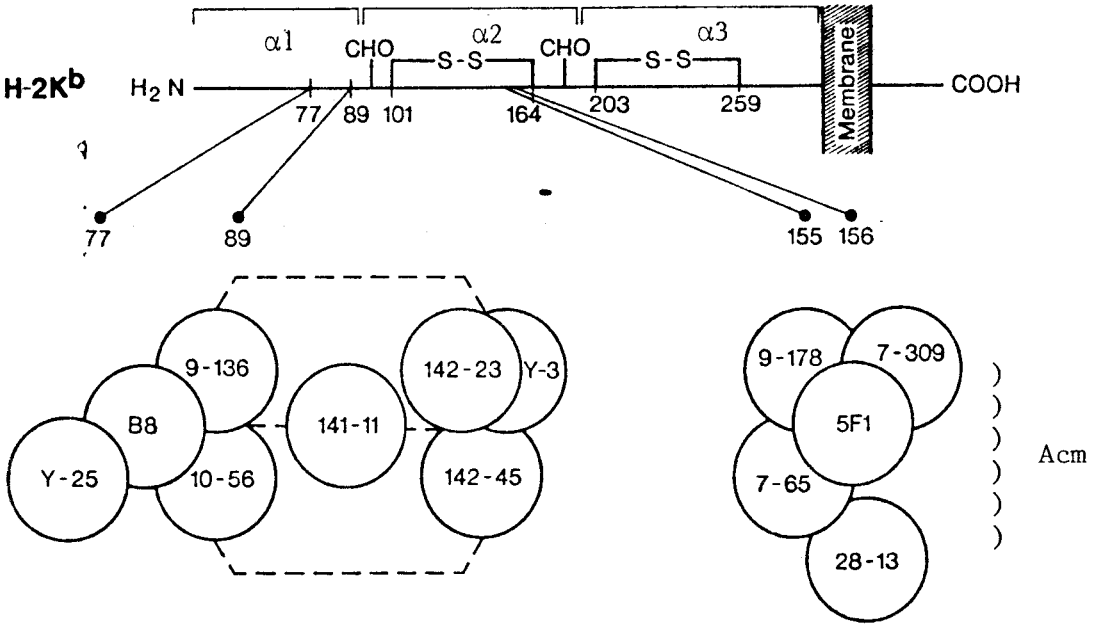
souris consanguine B10		donneur	H-2 haplotype
Souris congénique	B10.A	A/WySmSg	a
	B10.Br	C57Br/cd	k
	B10.CBA	CBA/Ph	k
	B10.D1/Ph	DBA/1	q
	B10.A(4R)	A/WySnSg	h 4
	B10.A(5R)	A/WySnSg	i 5

Les souris recombinantes sont issues de croisements entre souris de différentes lignées congéniques ou consanguines (voir figure 3). Par exemple pour le complexe H-2 on obtient un panachage entre les différents gènes des deux souches croisées. Pour chaque lignée obtenue les produits des gènes sont généralement dénotés par une lettre majuscule pour désigner la région génétique (K, I, D, L...) et suivie par une lettre miniscule pour désigner la forme allélique(61).

Par exemple, pour la lignée recombinante B10MBR d'haplotype bql on note K^b, I^k, D^q, L^q (Pour revue générale sur les différentes lignées de souris existantes voir : 87,91).

Figure N° 4

Carte topographique des différents épitopes de la molécule Kb reconnus par les Acm (68)



Légende : (77, 89, 155, 156) - Acides aminés mutés dans les molécules mutantes K^b (voir chapitre mutation spontanée de classe I p 12).

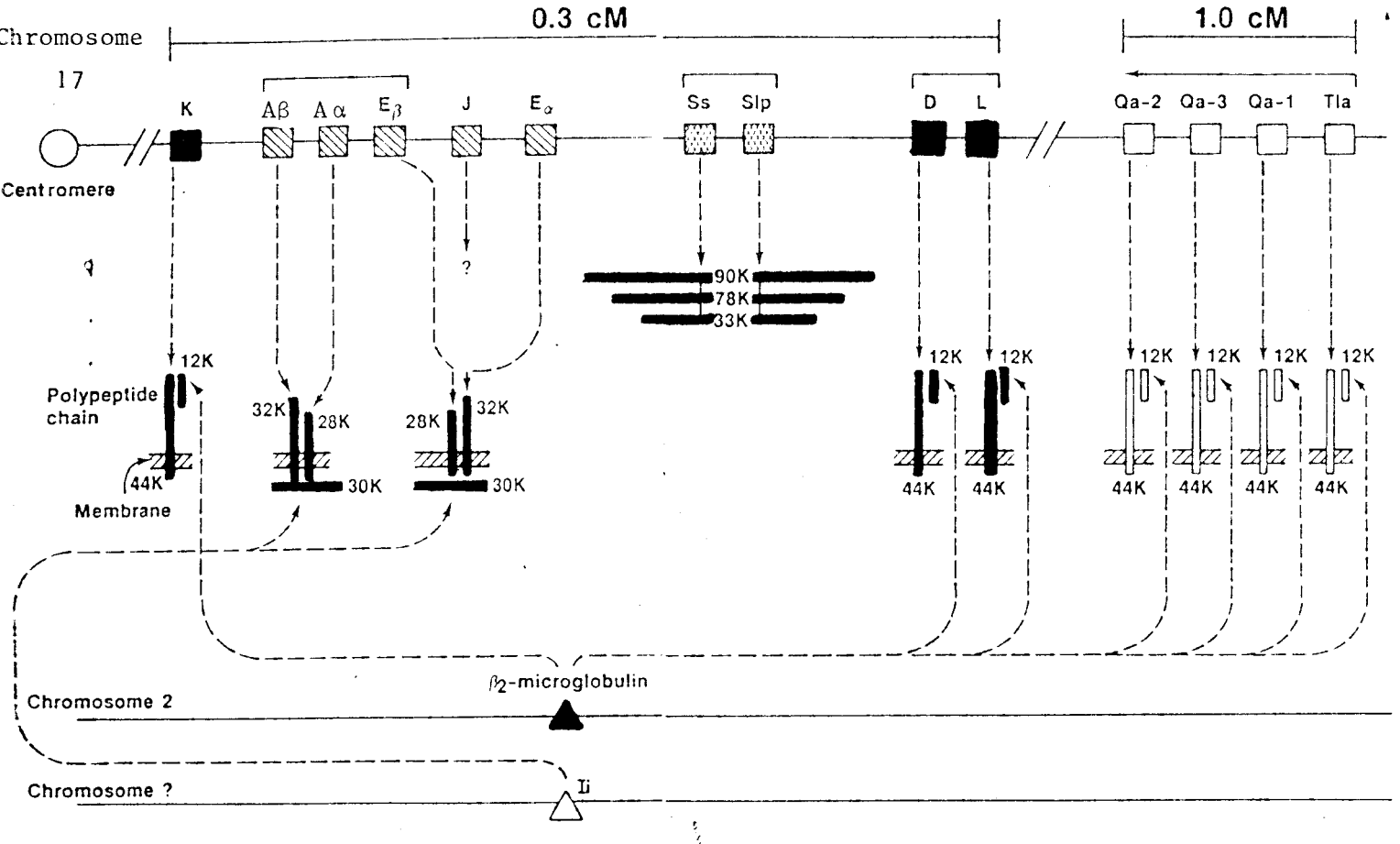
3) Antisérums et anticorps monoclonaux

Dans un premier temps, les antigènes codés par le CMH furent détectés à la surface des cellules par l'utilisation d'antisérums préparés dans un système d'immunisation allogénique (27) ertains auteurs (pour revue voir 89) purent remarquer ainsi la grande complexité de ce système antigénique et analyser la structure des différentes molécules H-2. Mais l'hétérogénéité moléculaire des anticorps produits dans ce système d'immunisation conventionnel fut longtemps l'obstacle à l'étude des différents épitopes des molécules H-2. L'arrivée des anticorps monoclonaux (Acm) (221) produits après hybridation des lymphocytes B de souris immunisées avec une lignée myélomateuse permet de résoudre partiellement ce problème. Par exemple les antisérums ne permettent pas de distinguer entre la molécule K^b (molécule de classe 1 du complexe H-2) native et les molécules mutantes K^{bm} (voir chapitre sur les mutants spontanés de classe I p 12). Par contre les différents Acm développés contre la molécule K^b (voir matériels et méthodes) permettent de définir les différents déterminants antigéniques de la molécule K^b et ensuite de définir l'emplacement de certaines mutations pouvant intervenir au sein de cette molécule.

La définition des différents épitopes de la molécule K^b a été essentiellement étudiée par HAMMERLING (68). Ces travaux ont consisté à définir l'arrangement topographique des différents déterminants antigéniques reconnus par les Acm spécifiques de $H\text{-}2K^b$ par deux approches, l'une utilisant des cellules de souris mutantes $H\text{-}2K^{bm}$, l'autre faisant appel à des expériences d'inhibition de la fixation d'un anticorps radioactif par les autres anticorps "froids" sur la molécule K^b native. La première approche permet de localiser dans le domaine $\alpha 1$ ou dans le domaine $\alpha 2$ la fixation de certains des Acm. Dans la seconde approche, on peut remarquer qu'il n'y a jamais inhibition de la fixation entre deux Acm dont les épitopes se trouvent dans deux domaines distincts de la molécule ($\alpha 1$ et $\alpha 2$). Les résultats de ces deux types d'analyse ont abouti à l'établissement de la carte topographique des différents épitopes de la molécule K^b reconnus par les Acm (figure 4 ; voir également la représentation schématique des différents domaines de la molécule K^b figure 11 p 13)

Figure N° 5

Représentation schématique des différentes régions qui composent le complexe H-2 de la souris (82).



- Les gènes de classe I ■ □ codent pour les antigènes de classe I qui sont associés à la β 2-microglobuline .

- Les gènes de classe II ▨ codent pour les antigènes de classe II qui s'associent à une chaîne invariante Ii pour être exprimés à la membrane cellulaire.

- Les gènes de classe III ▨ codent pour des composants du complément.

4) Structure des 3 classes de molécules

Les antigènes de classe I sont définis comme étant des complexes moléculaires comprenant une glycoprotéine codée par le C.M.H. d'un poids moléculaire de 45000 daltons associée de façon non covalente à une protéine non codée par le C.M.H., la β 2-microglobuline d'un poids moléculaire de 12000 daltons (Figure5). Cette définition s'étend aux antigènes Qa et Tla bien que ces antigènes aient une répartition tissulaire différente des antigènes classiques de transplantation H-2K, H-2D et H-2L. Historiquement ces antigènes étaient considérés comme des produits de gènes adjaç nts au C.M.H. mais ne faisant pas partie de celui-ci (51). Mais des études récentes sur la structure des antigènes Qa et Tla révèlent des homologies significatives avec les molécules H-2 (214, 190, 187). Ces antigènes sont donc étudiés parallèlement aux antigènes H-2.

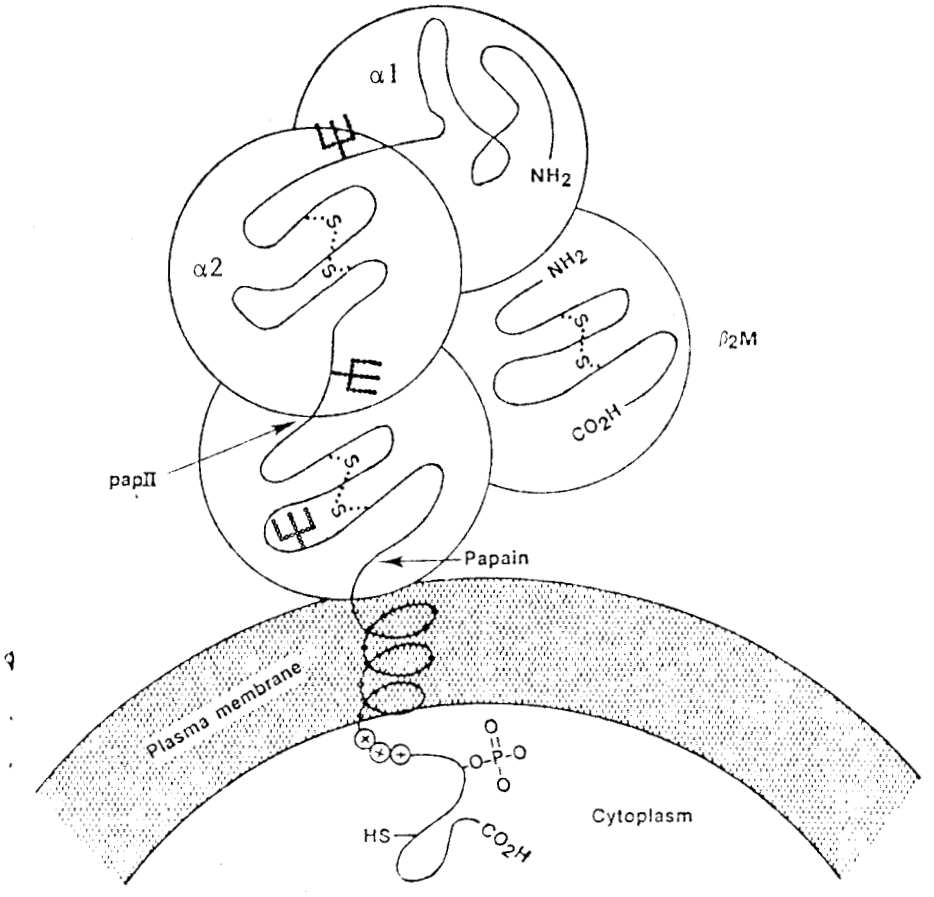
Les antigènes de classe II sont formés de deux glycoprotéines codées par le C.M.H. (Figure 5). La sous-région I-A comprend au moins trois loci dont deux codent respectivement pour les chaînes α et β de la molécule I-A (32000 et 28000 daltons) et le troisième code pour la chaîne β de la molécule I-E. Le locus I-E code pour la chaîne Eα de la molécule I-E. Les quatre chaînes sont synthétisées séparément et s'associent à la membrane des cellules en hétérodimères (Aα Aβ et Eα Eβ). Au niveau intracellulaire une chaîne supplémentaire (invariante) (181) est associée aux chaînes α et β mais ne semble pas être exprimée à la membrane.

Enfin les antigènes de classe III sont en fait des antigènes solubles qui entrent dans le contrôle de l'activation du complément (162, 25). Chez la souris, les loci qui codent pour les composés C_3 et C_4 du complément se trouvent liés aux gènes de classe III. Nous ne nous étendrons pas sur leurs structures étant donné qu'ils ne nous intéressent pas directement.

La caractéristique la plus frappante du C.M.H. murin et humain est l'importance du polymorphisme génétique exhibé par certains gènes de classe I ou II. Par exemple, les gènes de classe I, K et D présentent plus de 50 allèles dans les populations de souris sauvages ou domestiques (89). Les gènes de classe I, Qa et TLa sont beaucoup moins polymorphes (51). Certains gènes de classe II, Aβ et Eβ sont également très polymorphes, par contre Aα et Eα sont beaucoup moins polymorphes (51).

Figure N° 6

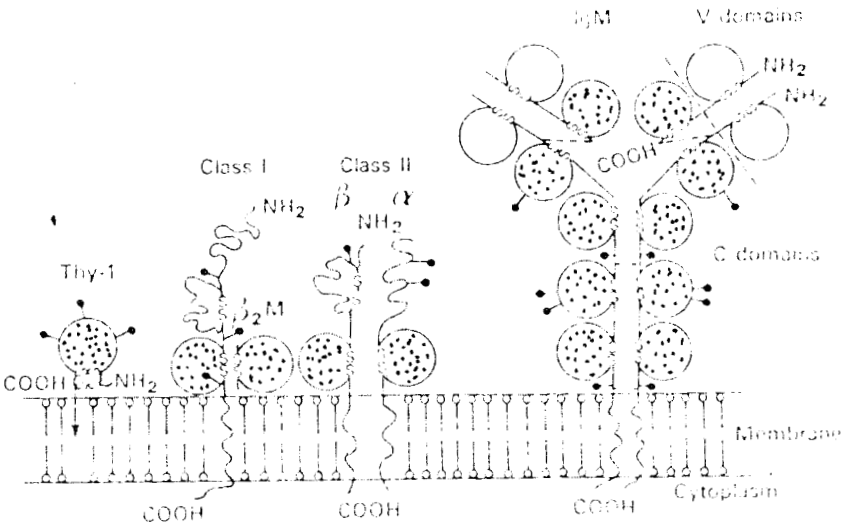
Représentation schématique de la molécule H-2 de classe I sur la membrane plasmique (111)



PS : Le 3ème site de glycosylation en α 3 se trouve exclusivement sur les molécules K^d, D^b, L^d.

Figure N° 7

Représentation schématique de l'orientation membranaire des molécules thy-1, classe I, classe II et d'immunoglobuline (74).



PS : Les domaines en pointillés indiquent les homologies de séquence qui suggèrent l'existence d'un gène ancêtre commun.

D) LES GENES ET ANTIGENES DE CLASSE I

1) Structure des antigènes de classe I

L'analyse des séquences d'acides aminés montre que les antigènes de classe I se divisent en cinq domaines ou régions (192, 27). Les trois domaines externes de la molécule α 1, α 2, α 3 ont chacun environ 90 acides aminés. La région transmembranaire compte 40 acides aminés dont 25 hydrophobes, et le domaine intracytoplasmique 30 résidus. Les domaines α 2 et α 3 ont chacun un pont disulfure qui forme une boucle de 60 résidus d'acides aminés. Il y a deux -N-glycoconjugués fixés au domaine α 1 et α 2 des molécules K^b, D^d ainsi qu'un troisième sur le domaine α 3 des molécules K^d, L^d et D^b (111). Des études de fixation avec des fragments peptidiques des molécules de classe I montrent que la β 2-microglobuline s'associe avec le domaine α 3 de la molécule (215) (pour la structure des antigènes de classe I voir la figure 6).

L'analyse de la séquence des acides aminés révèle également que le domaine α 3 (192, 189) et la 2-microglobuline présentent des homologies avec les régions constantes des immunoglobulines (151). L'organisation des gènes codant pour ces molécules corrobore l'idée d'une appartenance à une même famille (209). Certains auteurs suggèrent une origine commune dans un même gène ancêtre qui pourrait être thy-1 (74). La duplication et la divergence des autres gènes auraient eu lieu à partir de ce gène primordial (74) (Voir figure 7).

2) Structure des gènes de classe I

a) Clone de cDNA de classe I

Deux méthodes peuvent utilisées pour obtenir et isoler des clones de cDNA de classe I de souris. Une première technique consiste à obtenir des clones de cDNA par transcription réverse de mRNA. Ces mRNA sont sélectionnés après purification, traduction in vitro et immunoprécipitation des polypeptides synthétisés par des anticorps anti-classe I (95, 152). Une autre approche consiste à synthétiser des oligonucléotide correspondant à la séquence connue des acides aminés d'un polypeptide de classe I. Ce court oligonucléotide va servir de sonde d'hybridation soit pour identifier des clones de cDNA de classe I soit pour servir d'amorce pour synthétiser du cDNA à partir de mRNA non purifié (158, 188). Après vérification des clones de cDNA classe I par l'analyse de séquence du DNA, il s'avère que beaucoup d'entre eux ne corrèlent pas avec des molécules de classe I connues, se sont des pseudogènes non transcrits. Un certain nombre de cDNA de classe I sont maintenant identifié (27, 157, 206, 158, 98, 212, 96, 190, 122, 44, 131). Les sondes de cDNA classe I sont utilisées pour cribler des

Figure N° 8

36 gènes de classe I sont isolés et regroupés en 23 "clusters" qui contiennent un nombre variable de gènes (191).

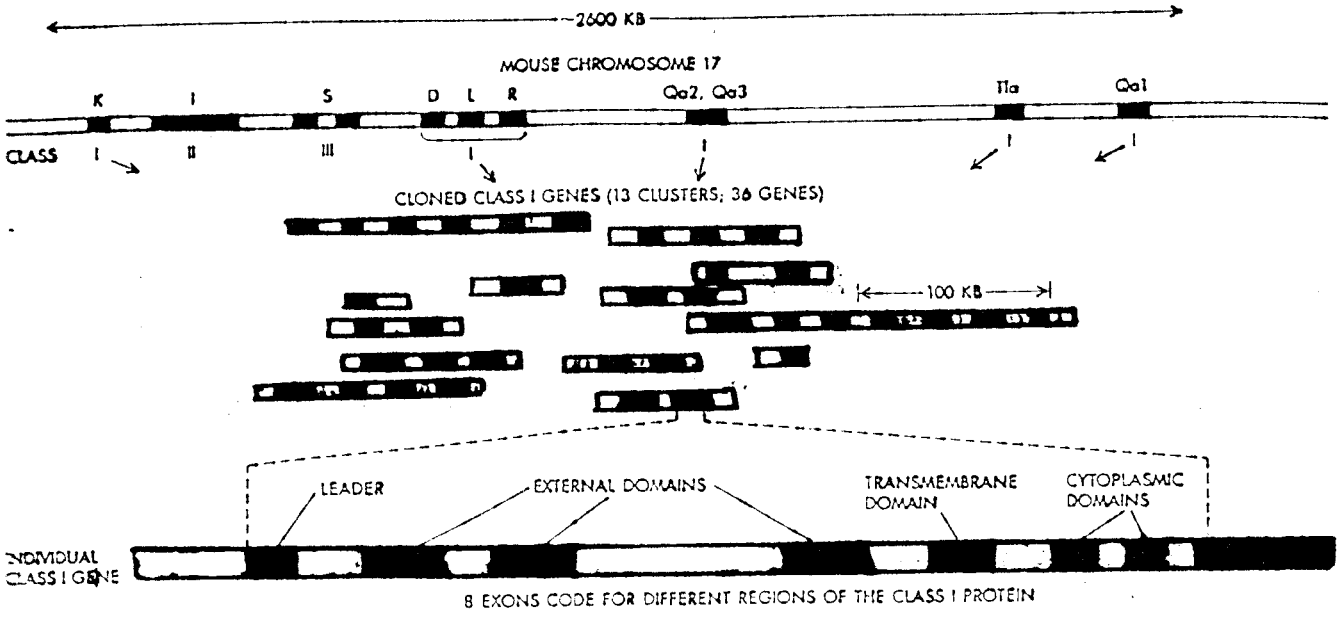
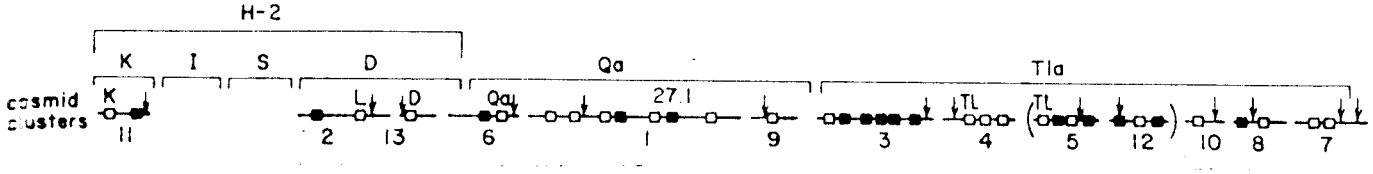


Figure N° 9

Localisation des 36 gènes de classe I au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité (211).



↓ : Localisation des sondes de cDNA utilisées pour faire cette carte génétique

■□ : gènes

librairies génomiques afin d'obtenir des clones qui serviront par la suite à analyser la structure et l'organisation des gènes de classe I (191, 188, 152, 95, 189, 110). C'est ainsi qu'on a isoler 36 gènes de classe I différents chez la souris BALB/c (191) (Voir figure 8). Un certain nombre d'entre eux sont des pseudogènes mais un gène codant par exemple pour la molécule L^d a pu être identifié et analysé.

b) Organisation des gènes de classe I

Chez la souris, plusieurs gènes de classe I ont été complètement séquencés. A la suite de cette étude plusieurs remarques peuvent être faites. Tout d'abord l'organisation des séquences intron et exon des différents gènes de classe I est remarquablement similaire. Chaque gène est divisé en 8 exons qui corrèlent précisément avec les domaines des polypeptides de classe I (189) (Voir figure 8). Le premier exon code pour la séquence "promotrice", les deuxième troisième et quatrième exons codent pour les domaines α 1, α 2 et α3 des molécules de classe I, le cinquième exon code pour la partie transmembranaire les sixième , septième et huitième exons codent pour la partie cytoplasmique.

La séquence des gènes de classe I a permis de mettre en évidence les très grandes homologies qui existent entre les gènes codant pour les molécules Qa TL et les gènes codant pour les autres molécules de classe I (186). Ceci renforce l'idée d'une évolution des gènes de classe I (y compris Qa et TL) à partir d'un gène ancêtre commun (Pour revue générale sur les gènes de classe I voir : 17).

c) Localisation chromosomique des différents gènes de classe I

L'organisation des gènes de classe I du C.M.H. chez les souris d'haplotype (b) (206) et (d) (191, 211) est déterminée par l'utilisation d'enzymes de restriction pour déceler les différents sites de polymorphisme existant dans des souris congéniques recombinantes H-2 (211).

Cette approche qui permet la localisation des différents groupes de gènes de classe I sur le C.M.H. se fait en plusieurs étapes. Dans un premier temps des sondes de cDNA ont été isolées à partir de 13 groupes renfermant les 36 gènes de classe I. Ensuite chaque sonde est utilisée dans l'analyse du DNA de souris H-2 congéniques et recombinantes pour déceler des sites de polymorphisme par les enzymes de restriction. Le recoupement des différents morceaux de DNA obtenus grâce à l'existence des sites de polymorphisme permet de déterminer la carte moléculaire des gènes de classe I (figure 9).

Figure N° 10

COMPARAISON DES SEQUENCES DE DNA ENTRE LES GENES K^b, Q10, K^{bm1} (121)

H-2K^b	GGGGTCCCGCA	GGC	TCT	CAC	ACT	ATT	CAG	GTG	ATC	TCT			100 GGC	TGT	GAA	GTG	GGG	TCC	GAC	GGG	CGA	CTC	110 CTC	CGC	GGG
		Gly	Ser	His	Thr	Ile	Gln	Val	Ile	Ser			Gly	Cys	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Gly
DONNEUR Q10	ATC	GT				G	C		TG	G	A				A						C	T			
									Trp	Met	Tyr				Lys							Phe			
bm1																									
H-2K^b	TAC	CAG	CAG	TAC	GCC	TAC	GAC	120 GGC	TGC	GAT	TAC	ATC	GCC	CTG	AAC	GAA	GAC	130 CTG	AAA	ACG	TGG	ACG	GCG	GCG	
	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Gly	Cys	Asp	Tyr	Ile	Ala	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu	Lys	Thr	Trp	Thr	Ala	Ala	
DONNEUR Q10		T	A		A				C			T											A		
		Leu	Gln						Arg																
bm1																									
H-2K^b	GAC	ATG	GCG	140 GCG	CTG	ATC	ACC	AAA	CAC	AAG	TGG	GAG	CAG	150 GCT	GGT	GAA	GCA	GAG	AGA	CTC	AGG	GCC	TAC	160 CTG	
	Asp	Met	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Lys	His	Lys	Trp	Glu	Gln	Ala	Gly	Glu	Ala	Glu	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	
DONNEUR Q10		C			A T			CG	G							CT			TAT	TA					
					Ile			Arg	Arg							Ala			Tyr	Tyr					
bm1																CT			TAT	TA					
																Ala			Tyr	Tyr					
H-2K^b	GAG	GGC	ACG	TGC	GTG	GAG	TGG	CTC	CGC	170 AGA	TAC	CTG	AAG	AAC	GGG	AAC	GCG	ACG	CTG	180 CTG	CGC	ACC			
	Glu	Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Lys	Asn	Gly	Asn	Ala	Thr	Leu	Leu	Arg	Thr			
DONNEUR Q10		C	GA						T				G	CT		G	A								
		Ala	Glu						Leu				Glu	Leu		Lys	Glu								
bm1																									
H-2K^b	GGTGCAGGGGCCGCGGG																								

La mutation H-2K^{bm1} serait le résultat de l'introduction dans la séquence H-2K^b d'une séquence de base (soulignée dans la figure) venant d'un gène donneur Q10.

d) Mécanisme de génération du polymorphisme

Les enzymes de restriction ont mis en évidence des sites de polymorphisme principalement dans des gènes K, D et L. Ceci est en accord avec le fait que les antigènes de transplantation K, D, L sont extrèmement polymorphes alors que le polymorphisme pour les antigènes Qa et TL semble plus limité (2 à 3 allèles). Un changement détecté dans les gènes par les enzymes de restriction peut être dû 1) à un changement dans la taille d'un fragment de restriction (mutation) 2) à la perte d'un fragment de restriction (deletion) ou 3) à un accroissement dans le nombre de fragments de restriction (duplication). Une hypothèse quant à la génération du polymorphisme dans les familles multigéniques suggère un rôle important pour un mécanisme de conversion génique (144, 206, 121, 98, 43). Le polymorphisme serait le résultat d'échanges de très courtes séquences de DNA entre des chromosomes mal appariées par des séquences homologues mais non identiques.

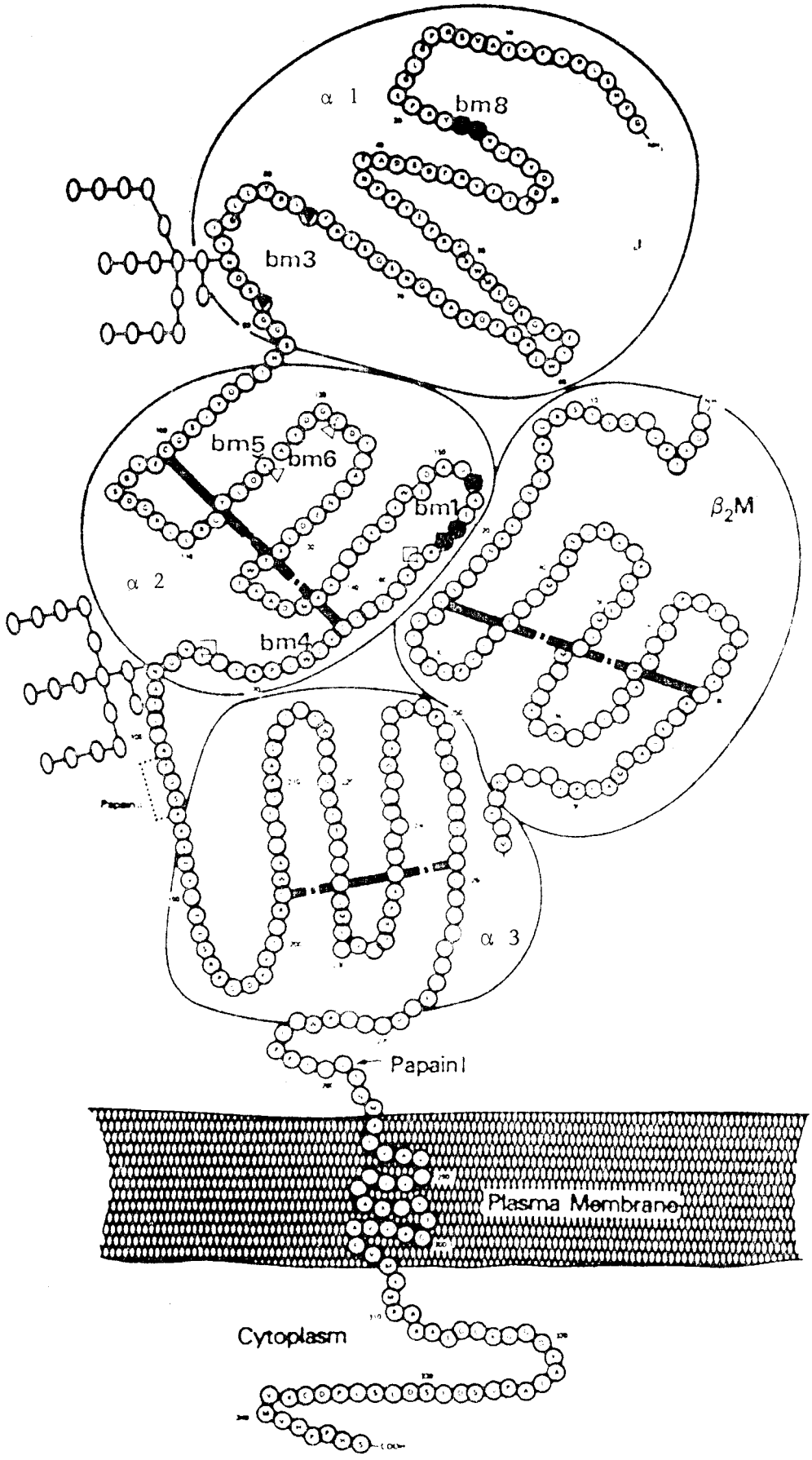
Par exemple, MELLOR et Coll. (121) montrent que la mutation H-2K^{bm1} apparue lors d'un croisement F1 (C57BL/6 x BALB/C) (8) serait le résultat de l'introduction dans la séquence H-2K^{b} d'une séquence de base venant d'un gène donneur qui serait dans ce cas le gène Q10 qui se trouve dans le locus Qa 2, 3 (Voir figure 10). Ce mécanisme de conversion génique expliquerait la grande fréquence de "mutants spontanés"observés pour les antigènes de transplantation. Il est à noter que les mutations détectées par rejets de greffes de peau interviennent là où le degré de polymorphisme est le plus important c'est-à-dire dans les domaines α 1 et α 2.

e) Mutants spontanés de classe I

Les mutations dans des gènes de transplantation sont détectées par les rejets de greffes de peau à partir d'animaux issus soit de croisements, frère x soeur, soit de croisements entre souris de lignées congéniques (137, 123). Ce rejet peut être unidirectionnel (parent-mutant ou mutant-parent) ou bidirectionnel (parent-mutant) indiquant respectivement la perte, le gain ou une combinaison gain/perte de déterminants induits par la mutation. Les mutants de l'antigène de transplantation K^{b} s'avèrent être très interessants pour plusieurs raisons: 1) Tout d'abord leurs fréquences d'apparition est élevée. 2) Les mutations antigéniques reposent sur la substitution de 2 à 3 acides aminés dans la structure primaire de K^{b} ce qui suffit à l'haplotype mutant pour être reconnu comme alloantigène (87,94). 3) Une même mutation peut apparaître de façon répétitive. 4) Et enfin,

Figure N°11

Représentation schématique de la molécule K^b
Positions des différentes mutations (44).



toutes les mutations de la protéine K^b apparaissent à des positions où les résidus mutants sont observés dans d'autres molécules de classe I. Par exemple, le polypeptide L^d contient la plupart des acides aminés substitués retrouvés dans les mutants de la série K^b (44, 144). Cette remarque suggère que le gène K^b peut échanger des séquences de gène avec des autres gènes de classe I pour donner naissance à des mutants contenant des acides aminés substitués (98, 44). Une moindre fréquence de mutation est observée également pour les gènes H-$2K^k$, H-$2D^b$ et H-$2D^d/L^d$. La séquence protéique de quelques mutants spontanés K^{bm} est aujourd'hui connue (137). Un modèle hypothétique de la structure de K^b est représenté (Figure 11) avec indication de quelques mutations qui sont rappelées également tableau 2 avec les acides aminés substitués. D'autre part, ces mutants ont permis l'étude de l'immunogénécité des antigènes de classe I du C.M.H.

Ils permirent de montrer que la majorité des déterminants antigéniques se trouvent dans les deux premiers domaines α 1 et α 2 des antigènes de classe I (68). Certaines de ces mutations, détectées à l'origine par des rejets de greffes de peau qui correspondent à un mécanisme de réaction d'immunité cellulaire, semblaient "silencieuses" pour les réactions sérologiques (88). Récemment, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine K^b a permis de corréler la position des acides aminés substitués avec l'épitope de l'anticorps monoclonal (68).

f) Obtention de lignées cellulaires exprimant des antigènes de classe I "mutés"

Depuis deux ou trois ans, certains auteurs afin d'analyser les relations qui existent entre la structure des molécules de classe I et leur fonction ont cherché à obtenir des lignées cellulaires in vitro exprimant des antigènes de classe I mutés. Deux méthodes peuvent être utilisées pour obtenir ce type de cellule.

Une première consiste à construire des gènes hybrides contenant des exons pouvant provenir de différentes molécules de classe I (4, 44). Ces gènes hybrides sont ensuite transfectés dans des cellules tumorales. Une seconde technique consiste à faire subir une mutagenèse chimique à une lignée tumorale exprimant une molécule de classe I suivie d'une immunosélection au moyen d'anticorps monoclonaux, spécifiques de l'antigène de classe I, ceci permet d'obtenir des cellules exprimant des molécules de classe I ayant divers degrés de mutations qui doivent être précisées par la suite avec la séquence des gènes (153).

Les premiers résultats obtenus avec des mutants induits seront discutés lors des résultats de ce mémoire.

Tableau N° 2

Positions des mutations sur la molécule K^b et le type de substitutions. (44)

	MUTANT	POSITION	SUBSTITUTION
α 1	bm8	23	Met Ile
		24	Glu Ser
	bm3	77	Asp ?
		89	Lys Ala
α 2	bm5	116	Tyr Phe
	bm6	116	Tyr Phe
		121	Cys Arg
	bm1	152	Glu Ala
		155	Arg Tyr
		156	Leu Tyr
	bm4	158-173	?

II - LES CELLULES T CYTOTOXIQUES

A) HISTORIQUE

L'idée de cytotoxicité découle de l'observation des rejets de greffes de tissus entre différents individus (104). Les expériences de transfert de MITCHISON (128) et les travaux de WEAVER et ses collaborateurs (205) sur les chambres de diffusion montrèrent que dans la plupart des rejets de greffes ce sont les cellules et non les anticorps qui interviennent. Un peu plus tard, GOVAERTS (62) montre que les lymphocytes du canal thoracique d'un chien ayant reçu une greffe de singe sont cytotoxiques pour les cellules épithéliales du singe ayant servi comme donneur, et non pour des cellules de chien étranger à l'expérience Cette expérience fut rapidement confirmée (210), des premières conclusions purent être tirées : a) la cytotoxicité est un mécanisme spécifique qui requiert le contact entre une cellule effectrice vivante et une cellule cible ; b) le sérum des animaux greffés n'intervient pas dans le mécanisme de lyse. Il est montré par ailleurs que des lymphocytes cytotoxiques spécifiques peuvent être dirigés non seulement contre des xénogreffes ou des allogreffes mais aussi contre des tumeurs syngéniques (160). Il faut ensuite attendre l'année 1968 pour que progresse l'étude du mécanisme de la cytotoxicité, et ceci pour deux raisons essentielles : d'une part la mise au point d'une technique simple, rapide et quantitative pour la mise en évidence des cellules spléniques cytotoxiques, qui permet de mesurer l'activité lytique d'une cellule effectrice par le relargage de ^{51} chrome des cellules cibles vivantes ayant préalablement incorporé le chromate de sodium (^{51}Cr) (15, 102), d'autre part les cellules cytotoxiques sont identifiées comme étant des lymphocytes "T" (23, 15). Par la suite, la mise au point de systèmes expérimentaux in vitro, permirent de définir les paramètres intervenant dans la sensibilisation d'effecteurs T cytotoxiques (C.T.L.).

B) SPECIFICITE DE LA REPONSE DES C.T.L. : ROLE DU C.M.H. DANS LES INTERACTIONS ENTRE EFFECTEURS ET CIBLES

Les produits des gènes de classe I, H-2K et H-2D sont les molécules cibles majeures pour les CTL dans différents systèmes. Dans les systèmes xénogéniques (107) ou allogéniques (24) les produits du C.M.H. jouent le rôle de l'antigène (Ag). Dans les modèles de cellules syngéniques présentant un antigène exogène, les produits du C.M.H jouent un rôle de restriction dans la reconnaissance de l'Ag par les cellules T (216, 169).

1) L'Alloréactivité

L'alloréactivité a été décrite initialement in vivo par les rejets de greffes de peau. On met ainsi en évidence une réponse à médiation cellulaire qui fait intervenir plusieurs types de cellules (18). Ceci a pu être confirmé in vitro (26, 200) par l'élaboration d'un système de culture qui fait intervenir deux populations cellulaires allogéniques dont l'une sert d'immunogène, sa synthèse de DNA étant préalablement bloquée. Cette culture cellulaire in vitro est appelée "culture lymphocytaire mixte" ou M.L.C. Elle obéit aux lois de la transplantation (prolifération cellulaire dépendante du C.M.H.) (36, 70, 40, 135). A partir de ce modèle in vitro, le processus de génération de CTL a pu être étudié. Un certain nombre d'auteurs ont démontré que ce processus fait intervenir une cascade d'évènements complexes impliquant de nombreux types cellulaires que nous allons détailler.

a) Mécanisme cellulaire impliqué dans la génération de CTL

Dans un premier temps, l'intervention de deux populations cellulaires reconnaissant des déterminants différents du C.M.H et ayant des fonctions particulières fut suspectée (6), et amena à l'élaboration d'un modèle possible de génération de CTL durant une allo-MLC (200). En distingant les cellules T par des marqueurs de différenciation, CANTOR et BOYSE (20) montrèrent que les cellules qui prolifèrent suite à une stimulation par les alloantigènes et les cellules précurseurs de CTL (P-CTL) sont différentes, et que leur coopération est nécessaire pour l'induction de CTL (135).

L'ensemble de ces résultats met en évidence une population T auxiliaire (TA) spécifique des antigènes de classe II du CMH de la cellule allostimulante, permettant la différenciation d'une autre population cellulaire, les P-CTL dirigées plus particulièrement contre les antigènes de classe I du CMH (7) portés par les cellules stimulantes. L'induction d'effecteurs cytotoxiques requiert également la présence de cellules adhérentes exprimant les antigènes de classe II (Ia^+) (200). Un modèle hypothétique de génération de CTL est montré dans la figure 14 p 20.

b) Déterminants reconnus par les CTL

Dans un premier temps la génération d'effecteurs cytotoxiques en M.L.C était obtenue entre deux populations cellulaires qui différaient pour l'ensemble du complexe H-2. Des expériences d'inhibition de l'interaction entre

CTL et cible au moyen de "cellules froides" de souris recombinantes dans le complexe H-2 ont permis de montrer qu'une population d'effecteurs CTL alloréactifs était composée de CTL spécifiques de H-2K et d'autres spécifiques de H-2D (11).

Maintenant, la génération des CTL peut être obtenue en M.L.C entre deux populations cellulaires ne différant que pour une région du complexe H-2. C'est le cas de CTL dirigés contre les déterminants codés par la région H-2I (134, 201, 86). L'alloantigène est alors localisé dans la région I-A ou I-E (145). De même, parallèlement aux rejets de greffes observés entre les mutants H-$2K^{bm}$ et la souche parentale H-$2K^{b}$ (118), des CTL peuvent être obtenus en coculture in vitro de cellules H-$2K^{bm}$ et de cellules H-$2K^{b}$ (52, 119).

Les travaux effectués avec les mutants spontanés de la molécule K^{b} (171, 172, 174) ainsi que ceux effectués plus récemment sur les mutations induites au niveau des molécules de classe I exprimées à la surface de cellules tumorales (196, 142, 4) semblent montrer que les CTL reconnaissent des déterminants conformationnels au niveau des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des molécules de classe I.

Par ailleurs, les cellules T pourraient "reconnaître" non pas des antigènes du CMH seuls mais en association avec des protéines membranaires peu polymorphes (113). La stimulation de CTL par des produits du CMH immunopurifiés et insérés dans des liposomes a pu aussi être obtenue en réponse secondaire (à partir de populations de cellules T sensibilisées in vivo) (72, 2). Dans ce cas la structure membranaire (membranes plasmiques ou liposomes) est nécessaire pour l'induction des CTL puisque les antigènes solubles du CMH sont incapables d'induire la réponse. Il semble cependant que les produits du CMH présentés par les liposomes ou par les cellules ne stimulent pas exactement la même population de cellules T (2).

2) La restriction H-2

Un rôle physiologique pour les antigènes du CMH est apparu dans les expériences de ZINKERNAGEL et al. (216) et DOHERTY et al. (35) sur la réponse CTL spécifique d'un virus chez un animal infecté. Lors d'une infection par le virus de la lymphochoriomeningite, des cellules sensibilisées à ce virus sont capables d'éliminer des cellules cibles syngéniques infectées par le même virus mais sont incapables de lyser des cellules allogéniques infectées par le même virus ou des cellules syngéniques infectées par un virus différent. Cette expérience décrit le phénomène de restriction joué par le déterminant du CMH.

Pendant la même période SHEARER et Coll. (169, 170) firent une observation similaire mais dans un modèle in vitro de cellules syngéniques modifiées par un groupement trinitrophényl (TNP). En MLC il y a induction de CTL spécifiques de cellules cibles syngéniques modifiées par le TNP. Par ailleurs, les expériences de SCHMITT-VERHULST et Coll. (163) et de BURAKOFF et Coll. (16) montrent qu'un sérum anti-H-2 ou anti-TNP mais pas un sérum anti-Ia est capable d'inhiber la lyse de la cellule cible. Ceci met en évidence que les produits du complexe H-2 font partie de l'antigène reconnu sur les cellules cibles.

Le mécanisme de "H-2 restriction" a été décrit ultérieurement pour d'autres antigènes. Il a été mis en évidence dans d'autres infections virales comme par exemple pour le virus influenza (42, 37, 14), le virus Herpes (150) et le réovirus (48) et aussi pour la reconnaissance d'antigènes mineurs d'histocompatibilité par les CTL (11, 178). Ces différents modèles montrent que la "H-2 restriction" est un phénomène indépendant du type d'antigène utilisé. L'analyse de souris recombinantes pour le H-2 montre que les molécules de classe I (K, D ou L) peuvent servir d'élément de "restriction" pour la reconnaissance d'un antigène X par les CTL.

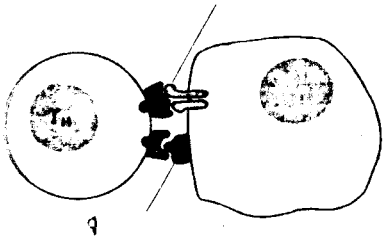
Par ailleurs des études effectuées à l'aide de mutants spontanés de la molécule K^b ont montré l'absence de réactivité croisée entre H-2K^b + X et certains H-2 K^{bm} + X pour la présentation de l'antigène X viral (217, 208) ou des antigènes mineurs d'histocompatibilité (208, 179). Dans ce cas la restriction H-2 apparait stricte, ce qui n'est pas le cas dans le système TNP ou l'on observe des réactions croisées (53).

La nature de l'association entre antigène et produit du CMH reconnue par la cellule T s'est révélée difficile à étudier.
L'utilisation d'haptènes réagissant avec différents groupements réactifs des protéines (NH2, SH) a permis de montrer que la modification covalente des protéines du CMH n'est ni nécessaire, ni suffisante pour l'induction de CTL reconnaissant l'haptène de façon restreinte par le CMH (164, 106). Pour les antigènes viraux la nécessité d'un complexe antigène H-2 est très difficile à prouver étant donné que des protéines virales peuvent être associées à des produits du CMH ou être exprimées de façon indépendante à la surface cellulaire (Pour revue : 218). Dans tous les systèmes, l'antigène doit être exprimé à la surface cellulaire (169, 58, 7, 164, 71, 140).

Figure N° 13

Reconnaissance de l'AgX associé au produit du CMH
par la cellule T

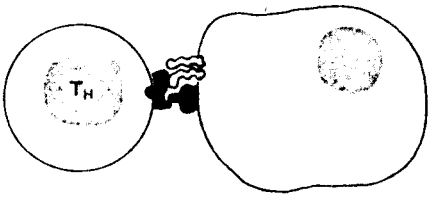
Antigène de classe II
du MHC



Antigène
Exogène

Deux récepteurs, l'un reconnaissant l'Ag et l'autre le produit du CMH

Cellule T "helper"



Cellule présentatrice de l'Ag

Un récepteur unique reconnaissant le produit du CMH associé à l'AgX

Par contre la nature du récepteur des cellules T impliqué dans la reconnaissance de l'antigène et du produit du complexe H-2 ont suscité beaucoup de discussions. Deux modèles ont été proposés pour rendre compte de la reconnaissance associée de l'Ag X et du CMH (figure 13). L' un suppose l'existence d'un récepteur reconnaissant le produit du CMH syngénique associé à l'antigène, l'autre implique deux récepteurs dont l'un est spécifique de l'antigène et l'autre du produit du CMH syngénique (double reconnaissance).

Des travaux récents sur la définition d'antigènes privés sur des clones T (clonotypes) aussi bien sur des cellules T murines qu'humaines ont permis d'avancer dans l'étude du récepteur des cellules T. Des anticorps monoclonaux "clonotypiques" ont été préparés après immunisation de souris au moyen de clones, hybridomes ou lymphomes T. La sélection de ces Ac se fait grâce à leur possibilité de bloquer spécifiquement les intéractions entre clone T et Ag. (69, 78). L'analyse des molécules immunoprécipitées par ces Ac dans le lysat cellulaire du clone T révèle l'existence d'une protéine d'environ 80 Kd qui se compose de deux sous-unités de 40-43 Kd chacune liées par des ponts disulfures entre chaîneα et β. Ces molécules sont impliquées dans la reconnaissance de l'Ag associé à H-2 (69, 78). L'analyse des cartes peptidiques des chaînes α et β montre qu'elles sont distinctes. Des chaînes α ou β provenant de différents clones présentent des peptides communs et d'autres qui leur sont spécifiques. Ces résultats suggèrent que chaque sous-unité pourrait avoir une région variable et une région constante.

Cependant beaucoup de questions restent encore en suspens, en particulier le mode d'association éventuelle entre l'Ag et les produits du CMH n'a pu être défini.

C) STRUCTURES MEMBRANAIRES IMPLIQUEES DANS LES INTERACTIONS CELLULAIRES POUR L'INDUCTION D'EFFECTEURS CYTOTOXIQUES

1) Marqueurs de surface permettant la classification des cellules

En 1966 REIF et Coll. (220) ont défini l'antigène Θ (Thy 1) commun aux lymphocytes issus du thymus (T) et aux cellules du cerveau. Par la suite, des immunisations avec des populations de cellules T ont montré l'existence d'antigènes membranaires permettant une classification des lymphocytes T. La définition et les caractéristiques de tous ces marqueurs sont rapportés dans le tableau 3 et dans la figure N° 14.

TABLEAU 3

PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES MARQUEURS Lyt et OKT

Marqueur	Structure	Distribution	Fonction associée
Thy-1	1 chaîne 25-30 Kd	100 % lymphocytes T + thymocytes	AC anti-Thy-1 stimulent la production I12 ; mitogéniques pour lymphocytes T non activés (220)
T3 (homme)	1 chaîne 20 Kd	95 % T périphériques + minorité thymocytes	AC anti-T3 inhibent la prolifération Ag-spécifique et la cytolyse ; augmentent réponse à I12 ; modulation (157,64)
Lyt 1	1 chaîne 67 Kd	Tous lymphocytes T + thymocytes (variation quantitative de l'expression)	AC anti-Lyt 1 inhibent induction CTL anti-soi modifié (66)
Lyt 2) Lyt 3) associés	2 chaînes 34 + 38 Kd 1 chaîne 30 Kd	50-60 % T périphériques + 95 % thymocytes	Impliqués dans la reconnaissance des Ag H-2 de classe I (T_S, CTL) (193, 194)

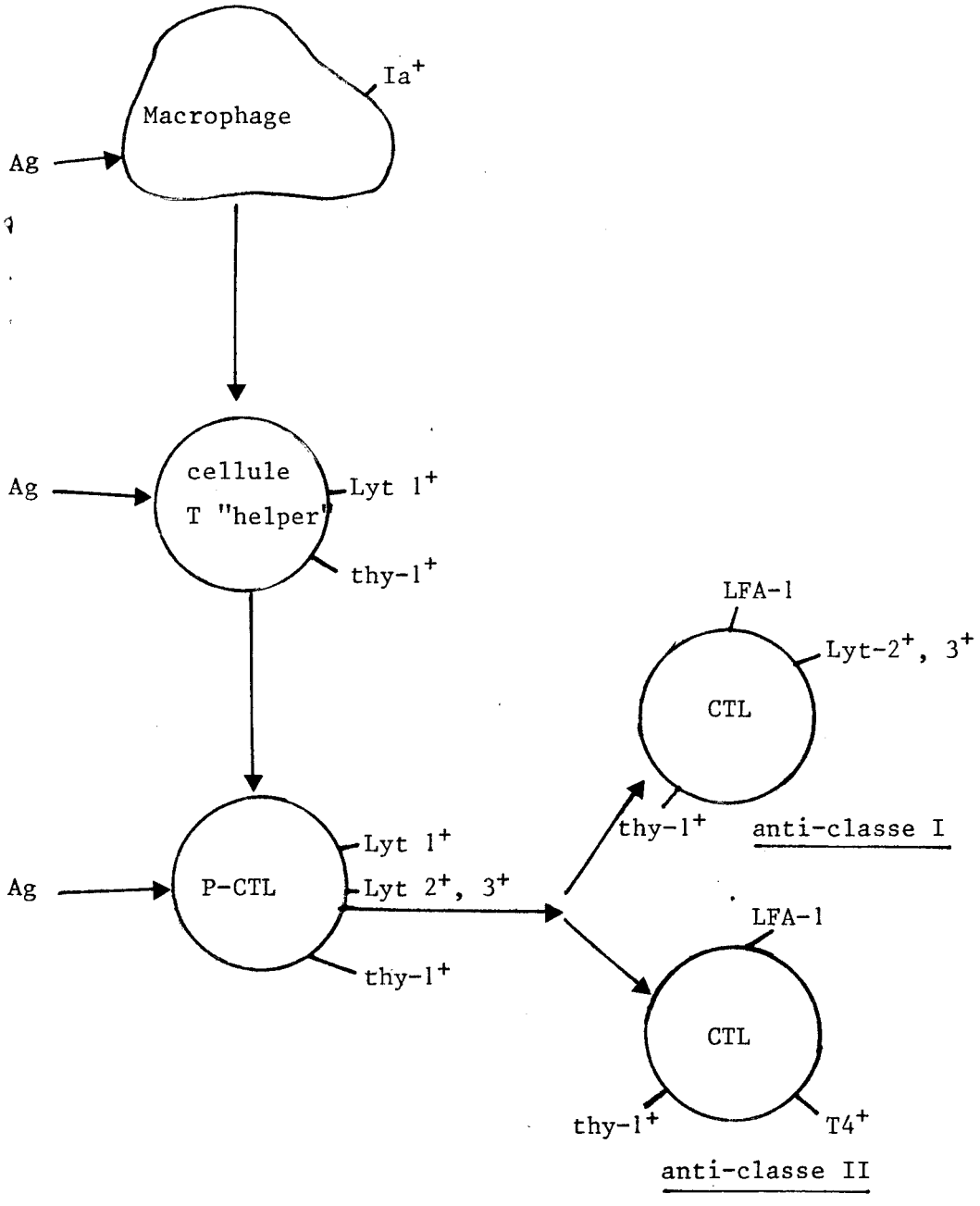
Les antigènes de différenciation Lyt-1, 2, 3 définis d'abord par des immunsérums puis par des Acm sont des glycoprotéines dont le niveau d'expression membranaire dépend de la maturation et de la fonction des cellules T (12, 13). Ces antigènes ont permis de classer les lymphocytes T (pour revue : 116) et de mettre ainsi en évidence des phénotypes différents pour des cellules T auxiliaires (T_A) Lyt 1^+, 2^-, 3^-, qui prolifèrent en réponse à des produits du MHC classe II et induisent la différenciation des p-CTL Lyt 1^+, 2^+, 3^+, en CTL Lyt 1^- 2^+ 3^+ spécifiques des produits classe I du CMH (7) (voir figure 13) avec cependant des exceptions selon le type de stimulation (175, 138, 208, 177, 147, 79). La préparation d'Acm spécifiques de cellules T a permis de caractériser d'autres molécules, ainsi LFA 1 est présent sur tous les lymphocytes T (32). La caractérisation des molécules T4 chez l'homme puis chez la souris (34) a permis d'aider à classer les lymphocytes T selon le produit du H-2 qu'elles reconnaissent. T4 serait plutôt associé à la reconnaissance des produits classe II du CMH et donc associé à la fonction TA, mais aussi présent sur les CTL anti-classe II, alors que Lyt-2 serait plutôt associé à la reconnaissance des produits de classe I du MHC. Chez l'homme, le marqueur OKT3 définit une structure fortement associée au récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (157). Son équivalent est mal défini chez la souris mais pourrait être Thy 1 (64).

2) Fonctions des antigènes de différenciation dans les intéractions effecteurs/cibles

Le rôle fonctionnel des molécules Lyt a été étudié par des expériences d'inhibition de lyse et d'induction des CTL soit par des Ac anti-Lyt_2 (176, 138, 33, 57), soit par des Ac anti-Lyt 1 (66). L'inhibition de lyse par des Ac monoclonaux anti-Lyt 2 apparait comme une caractéristique clonale des CTL (31, 108). Ceci a amené l'hypothèse que Lyt-2 ne serait pas indispensable à la fonction cytolytique (54), mais qu'il interviendrait dans la stabilisation des interactions effecteurs-cibles de faibles affinités (109). De plus, Lyt-2 semble jouer un rôle plus général dans les interactions cellulaires mettant en jeu des antigènes de classe I et non pas seulement dans les interactions donnant lieu à la cytolyse. Le rôle de Lyt-1 semble encore plus difficile à définir. Il est présent à la surface des cellules T_A mais les expériences d'inhibition de l'induction des CTL par des Ac anti-Lyt-1 semblent lui donner un rôle limité dans les intéractions cellulaires générant les CTL. Ainsi des Ac anti-Lyt-1 inhibent l'induction d'effecteurs cytotoxiques anti-soi modifié, mais sont sans effet sur l'induction des CTL alloréactifs (66).

Figure N° 14

MARQUEURS PRESENTS LORS DE LA GENERATION D'EFFECTEURS CYTOTOXIQUES



L'expression de T_4 ou de Lyt-2 n'est pas en corrélation avec la fonction lymphocytaire même si on remarque que 90 % des précurseurs thymiques cytolytiques sont Lyt-2^+ (21, 132) et que la majorité des cellules auxiliaires T_4^+ ont la capacité de sécréter une interleukine (IL-2) (22, 127). Par contre, une certaine corrélation peut être faite entre l'expression de Lyt-2 ou T_4 et la nature des antigènes du C.M.H. reconnus, classe I ou classe II respectivement (193, 194). Comme pour les clones Lyt-2^+, une partie des clones cytolytiques anti-Ia (T_4^+) est bloquée par un Ac anti-T_4. D'après ces résultats certains auteurs ont suggéré que ces molécules auraient un rôle stabilisateur dans l'interaction effecteurs/cibles, pour des clones de faibles affinités (147) et que le site d'interaction du marqueur sur la cellule présentatrice pourrait être l'antigène du C.M.H lui-même (63).

Si on étudie le rôle de la molécule LFA-1 on remarque qu'un Ac monoclonal dirigé contre ce marqueur inhibe toutes les fonctions lymphocytaires T quelle que soit la spécificité des clones.

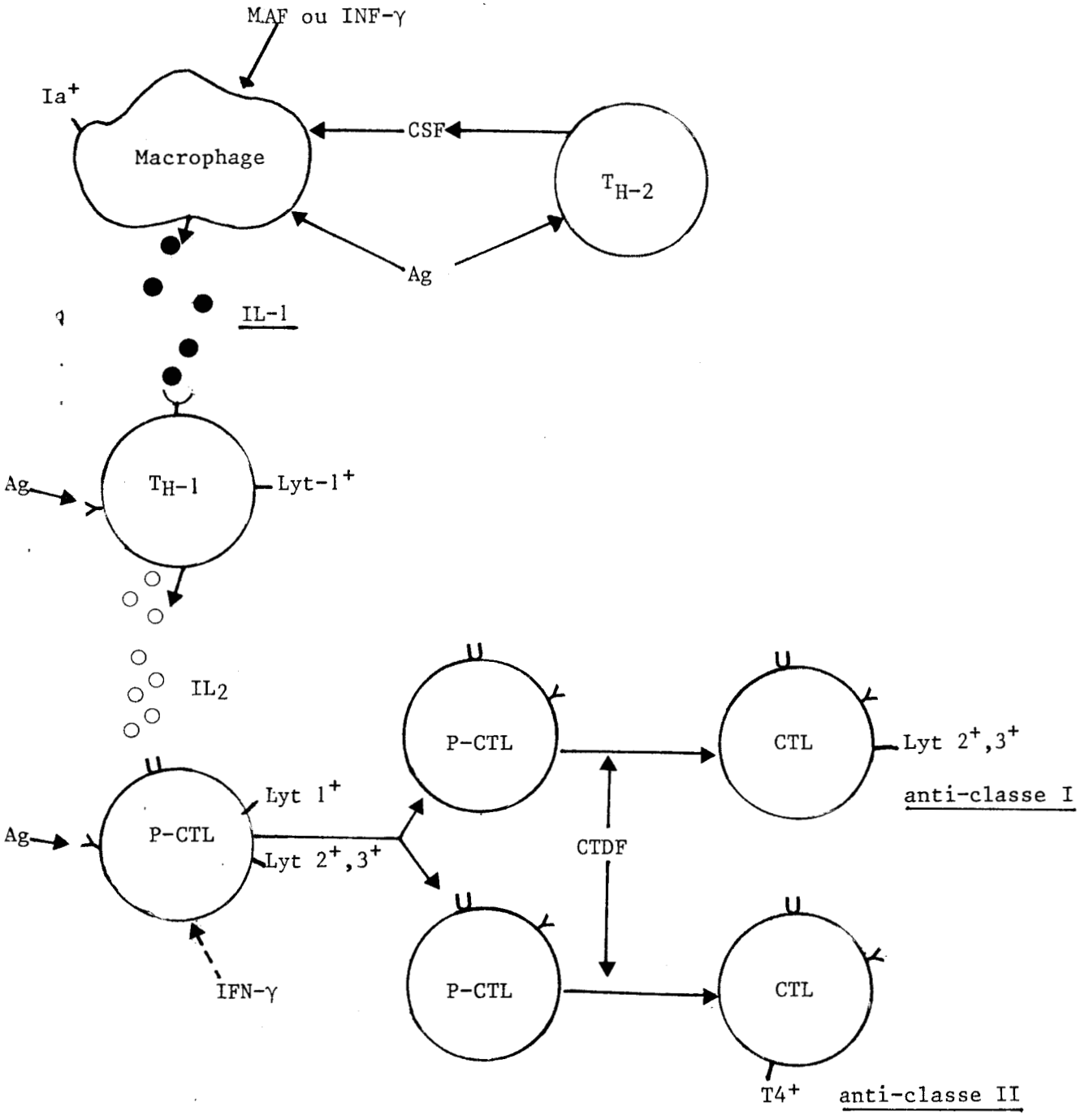
Enfin les Ac anti-Thy-1 stimulent la production d'interleukine 2 (157, 64). Il a été suggéré que Thy 1 pourrait être chez la souris l'équivalent de la molécule T_3 (64). Les anticorps anti-T_3 inhibent la cytolyse de clones T_4^+ et de clones T_8^+ (analogue humain de Lyt 2^+-3^+), ainsi que la prolifération de cellules T en réponse à des Ag solubles (157). La modulation de l'expression de T_3 par des Ac anti-T_3 fait apparaître une augmentation de la réponse proliférative Il-2 dépendante et fait disparaître la capacité de stimulation par l'antigène, suggérant une association membranaire entre la molécule T_3 et le récepteur spécifique de l'antigène (157).

D) FACTEURS SOLUBLES ET CELLULES IMPLIQUES DANS LA GENERATION D'EFFECTEURS CYTOTOXIQUES

L'induction des CTL est le résultat, non seulement d'interactions cellulaires, mais aussi d'interactions avec des facteurs solubles (149). La définition exacte de ces interactions est complexe et encore sujette à controverses aussi je vais tenter de les représenter d'une part en m'aidant du schéma, d'autre part, en définissant chacun des facteurs et son rôle supposé selon les résultats actuels. (Figure N° 15)

Figure N° 15

ROLE DES INTERLEUKINES DANS LA GENERATION D'EFFECTEURS CYTOTOXIQUES



Légende : récepteur pour IL-1
Y récepteur pour l'Ag
U récepteur pour IL-2
IL-1 interleukine-1
IL-2 interleukine-2
CSF colony stimulating factor
IFN γ interféron γ

1) Définition de l'Il-1 et du rôle de présentation de l'Ag par les macrophages

Les macrophages et aussi d'autres cellules exprimant les antigènes Ia (classe II du MHC) semblent avoir un rôle fondamental dans la présentation de l'Ag aux cellules T_A (200, 46). Au niveau des CTL, le rôle des macrophages pourrait aussi se limiter à l'induction des cellules T_A (100, 182, 183). Les macrophages armés de l'Ag, vraisemblablement stimulés par une cellule dite T_{A2} (130) sécrètent une interleukine Il-1 (97) qui aiderait à l'activation des cellules T_A (T_{A1}), notamment pour sécréter une autre interleukine Il-2. Les cellules T_{A2} pourraient stimuler les macrophages par l'intermédiaire d'une interleukine nommée Colony Stimulating Factor (voir plus loin) (CSF).

2) Les cellules T_A et l'Il-2

Le rôle de cette interleukine comme facteur de croissance pourrait être fondamental dans l'activation des p-CTL (202, 5) et aussi des lymphocytes B (219). L'association Ag-Macrophage et Il-1 produit la sécrétion de l'Il-2 par les cellules T_A (5, 202). Cette sécrétion peut aussi être obtenue en remplaçant l'Il-1 par du Phorbol Myristic Acetate (PMA), le signal donné par l'antigène serait toujours nécessaire dans ce cas. L'Il-2 agit sur les p-CTL (cellules dites activées, par exemple par l'Ag) en interagissant avec un récepteur spécifique inductible (47). Il est probable que les cellules T_A possèdent aussi un récepteur pour l'Il-2 (103). L'Il-2 est un facteur de croissance ; s'il est ou non un facteur de différenciation ou d'induction pour certaines fonctions reste encore à démontrer.

3) Le cytotoxic T cell différenciation factor : C.T.D.F. ou C.D.F.

La différenciation des P-CTL en CTL se ferait par l'intermédiaire d'un facteur auxiliaire plus tardif que l'Il-2 appelé "cytotoxic T cell différenciation" ou "CTDF" synthétisé par des cellules T (156, 204). L'existence de ce facteur est toutefois contestée.

D'autre part, la production de ces deux facteurs, Il-2 et le CTDF, est régulée par l'intermédiaire d'autres facteurs provenant de cellules auxiliaires.

4) L'interféron (IFN-γ) et le "macrophage activating Factor" (MAF)

90 % des clones T (cytolytiques ou non) secrètent l'IFN-γ et le MAF après stimulation antigénique ou mitogénique à des taux identiques (81). L'inhibition de l'activité MAF par un antisérum dirigé contre l'IFN-γ laisse penser qu'il s'agit de la même molécule (168, 154, 99). L'IFN-γ activerait également les cellules T en les rendant susceptibles à l'action de l'Il-2 (47).

5) Le "Colony stimulating factor" (CSF)

Ce facteur est capable d'induire la production d'Il-1 par le macrophage (130). En outre, différents auteurs ont démontré l'origine T du CSF qui peut être produit par des cellules spléniques (143), par des cellules de thymomes (72),par des hybrides T (166) ou par des cellules T clonées (167, 39).

E) APPORT DES CELLULES T CLONEES A LA DEFINITION DES INTERACTIONS CELLULAIRES

L'analyse des fonctions des cellules T au moyen de clones révèle l'hétérogénéité des populations cellulaires tant au niveau de leur spécificité antigénique que de leur fonction. Par exemple, certains clones cytolytiques produisent de l'IFN-γ (80) et d'autres lymphokines (80, 41) au contact de leurs cibles spécifiques, d'autres, produisent de l'Il-2 (81, 4, 65).

L'analyse de cellules T clonées modifie aussi le concept de populations à fonction auxiliaire ou cytotoxique dans la mesure où certains clones sont capables d'assurer plusieurs fonctions par l'intermédiaire des facteurs solubles qu'ils produisent (41, 81, 109).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

I - SOUCHES DE SOURIS UTILISEES

Les souris congéniques et recombinantes proviennent de l'animalerie de OLAC (Blackthorn, ANGLETERRE) ou de l'animalerie du CSEAL (Orléans, FRANCE). La liste des souris utilisées et des haplotypes correspondant est donnée dans le tableau ci-dessous. Les souris mutantes B6H-2^{bm1}, B6H-2^{bm3}, B6H-2^{bm4}, B6H-2^{bm5}, B6H-2^{bm6} et B6H-2^{bm8} proviennent de l'animalerie Max PLANCK (Institute Tübingen F.R.G.). A l'origine ces souris mutantes dérivent de C57BL/6 pour bm3 (38) de (C57BL/6 x BALB/c) F_1 pour bm1 et bm4 (8) et de C57BL/6Kh pour bm5, bm6 et bm8 (118).

Formes alléliques des régions génétiques du complexe H-2

Souris	K	Aβ	Aα	Eβ	Eα	S	D	L	Qa2	TLa	Qa1
CBA	k	k	k	k	k	k	k	k	b	b	b
BALB/C	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
CB20	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
B10.A (5R)	b	b	b	b	k	d	d	d	a	a	a
B10:MBR	b	k	k	k	k	k	q	q	a	a	a
C57BL/6 (B6)	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
C57BL/10 (B10)	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B 10.BR	k	k	k	k	k	k	k	k	a	a	a
B 10.A (4R)	k	k	k	k	b	b	b	b	a	b	b
CBA BR	q	q	q	q	q	q	q	q	b	b	b
B6 H-2^{bm1} (bm1)	bm1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B6 H-2^{bm3} (bm3)	bm3	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B6 H-2^{bm4} (bm4)	bm4	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B6 H-2^{bm5} (bm5)	bm5	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B6 H-2^{bm6} (bm6)	bm6	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B6 H-2^{bm8} (bm8)	bm8	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

II - LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux (Acm) utilisés dans notre étude sont résumés dans le tableau ci-dessous. Certains Acm utilisés ont une spécificité privée pour la molécule K^b, d'autres par contre reconnaissent plusieurs haplotypes H-2.

Propriétés des anticorps monoclonaux utilisés pour cette étude

Nom de l'hybridome	mode d'immunisation	Classe d'Ig	Réactivité avec les Ag	Références
K7-65	A/J avec 70Z/3	$\gamma 2a/\kappa$	K^b	68
K9-178	C_3HxA/J avec 70Z/3	$\gamma 2a/\kappa$	K^b	68
K10-56-1	SJL avec 70Z/3	$\gamma 2a/\kappa$	K^b	68
EH-144		$\gamma 2a/\kappa$	K^b	RAJAN T.V. (C.P)
Y3	BALB/C avec BALB/B	$\gamma 2b/\kappa$	K^b,k,q,r,s	75
5F1	B10D_2 avec EL4	$\gamma 2b/\kappa$	K^b,f,k	172
28.13.3	C3H avec C3HSW	μ/K	K^b,f	141
20.8.4	C3H avec C3HSW	$\gamma 2a/\kappa$	K^b,D^b	141
11.4.1	BALB avec CKB	$\gamma 2a$	K^k	139
10.2.16	CWB avec C3H	$\gamma 2a/\kappa$	Ia^k	139
B8.24.3	BALB/C avec EL4	$\gamma 1/\kappa$	K^b(r)	93
H35.89.9	rat avec H-2^b anti H-2^d	$\gamma 2b/\kappa$	LFA-1	146
H35.17.2	rat avec H-2^b anti H-2^d	$\gamma 2b/\kappa$	Lyt2-3	57
53.7.3	rat avec SJL	$\gamma 2a/\kappa$	Lyt1	101
GK1.5	rat avec SP2/0	$\gamma 2b$	T4	34
H129.19	rat avec A15.1.17	$\gamma 2a/\kappa$	T4	147

III - MILIEU DE CULTURE

A) MILIEU LIGNEE

Ce milieu est utilisé pour toutes les cultures cellulaires faites au cours de notre étude. Ce milieu de culture se fait à partir d'un milieu de base RPMI 1640 (poudre Gibco, Biocult - Glasgow Scotland) contenant tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des cellules (sucres, acides aminés, vitamines...). A ce milieu de base on ajoute du 2- mercaptoéthanol ($2x10^{-5}$ M Prolabo) de la glutamine (2mM, Gibco), du sérum de veau foetal (S.V.F. à 5 %, Eurobio, Paris, FRANCE) décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C, de l'acide N-2 hydroxyéthyl pipérazine -N'-2 éthane sulfonique (HEPES à 10 mM, Sigma St Louis USA), du pyruvate de sodium (100 mM, Gibco) et des antibiotiques (1000/ml de penicilline et 100 µg/ml de streptomycine, Eurobio).

B) Obtention d'un milieu conditionné contenant des facteurs de croissance

L'expansion des cellules T *in vitro* nécessite l'apport de facteurs de croissance parmi lesquels l'interleukine 2 (IL-2).

Un clone tumoral EL_4 clone 16 a été sélectionné par Mc DONALD (109) pour sa production d'IL_2. La stimulation de ce clone 16 par le β phorbol - 12 - myristate 13-acetate (PMA à $1,6 \times 10^{-8}$M, Sigma) (45) permet l'obtention d'un surnageant de culture contenant de l'IL-2 (SnC 16). Ce SnC 16 est testé sur un clone appelé CTL-L dont la croissance est dépendante d'IL-2.

METHODES

I - CELLULES UTILISEES

A) Préparation des cellules spléniques de souris

Pour chaque mise en culture de cellules spléniques de souris, ces dernières sont préparées de la façon suivante : les rates de souris sont prélevées stérilement dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) et dispersées sur un tamis de nylon. Les globules rouges sont lysés par du chlorure d'ammonium à raison d'un volume de NH_4 Cl 0,15 M pour un volume de RPMI 1640 contenant les cellules (environ 10 ml en tout pour une rate). La suspension cellulaire est centrifugée pendant 7 mn à 1800 rpm à 4°C. Les culots cellulaires sont resuspendus dans du milieu lignée. Les cellules sont comptées en Malassez et réparties à la concentration voulue pour les mises en culture.

B) Obtention des blastes par stimulation avec la concanavaline A (ConA)

Les cellules "T" de la rate cultivées pendant 24 heures avec la ConA (Sigma) deviennent blastiques et prolifèrent. Ces blastes sont utilisés comme cellules cibles dans les tests de cytotoxicité.

20×10^6 cellules spléniques de souris dans 20 ml de milieu lignée sont cultivées en présence de 2 µ g/ml final de ConA dans des flacons (Falcon 3013). L'incubation des cellules se fait à 37°C dans une atmosphère saturée en eau et contenant 5 % de CO_2 pendant 24 heures.

C) Obtention de CTL primaires

Au cours de notre étude deux populations de CTL primaires seront utilisées, une population cytotoxique spécifique de la molécule H-2K^b et une spécifique de H-2K^d.

1°) Obtention de CTL primaires spécifiques de H-2K^b

$5x10^6$ cellules spléniques de souris (CBAxBALB/C)F_1 (H-$2^{k/d}$) sont cultivées en présence de $2 x10^6$ cellules stimulantes de souris B10 (H-2^b) irradiées à 2500 rad. (source de cobalt, Gammacell Atomic Energy of Canada Inc). Des cellules irradiées sont métaboliquement actives mais sont incapables de proliférer. La culture de cellules a lieu en costar (Falcon 3047) dans un volume final de 2 ml à 37°C en atmosphère saturée en eau contenant 5 % de CO_2. Au bout de quatre jours cette culture est enrichie en cellules cytotoxiques spécifiques de la molécule K^b.

2°) Obtention de CTL primaires spécifiques de H-2K^d

$5x10^6$ cellules spléniques de souris B10A(5R) (K^b I-A^b I-E^k D^d) sont stimulées par $2x 10^6$ cellules spléniques de souris CB20 (H-2^d) irradiées. La culture se fait dans les mêmes conditions que précédemment. On obtient au bout de 4 jours, une culture enrichie en cellules cytotoxiques spécifiques de la molécule K^d.

D) Obtention de lignées cellulaires et de clones

1°) Etablissement de la lignée KB5 (1)

Des souris B10.BR (H-2^k) sont immunisées par voie intrapéritonéale avec $5x10^6$ cellules spléniques de souris B10 (H-2^b). Trois semaines plus tard les rates sont prélevées et passées sur colonne de nylon ce qui permet de récupérer principalement les cellules T (76). $20x10^6$ cellules non adhérentes sont mises en culture avec $20x10^6$ cellules spléniques de B10 (H-2^b) irradiées à 2500 rad dans un volume total de 20 ml de milieu lignée, dans des flacons de culture (Falcon 3013) (164). Ces cultures sont placées pendant 12 jours dans un incubateur à 37°C, en atmosphère saturée en eau contenant 5 % de CO_2. Les cellules sont ensuite récupérées et $5x10^6$ d'entre elles sont restimulées avec $20x10^6$ cellules stimulantes spléniques de B10.MBR (K^b, I^k, D^q) irradiées à 2500 rad.

A partir de la troisième stimulation $1x10^6$ cellules T sont restimulées chaque semaine avec $2 x10^6$ cellules spléniques de B10.MBR (K^b, I^k, D^q) irradiées à 2500 rad.

2°) Etablissement de la lignée BM (3)

Des souris CBA ($H\text{-}2^k$) sont immunisées par voie intrapéritonéale avec $3x10^6$ cellules tumorales EL4/SK qui expriment K^b, D^b. Trois semaines plus tard les cellules T (voir paragraphe précédent) sont stimulées par des liposomes reconstitués avec la molécule $H\text{-}2K^b$ (2) en présence de $2 x10^6$ cellules syngéniques irradiées à 2500 rad. A partir de la troisième stimulation, $1x10^6$ cellules T sont restimulées chaque semaine par $2 x10^6$ cellules spléniques de B10M Br (K^b I^k D^q) irradiées.

3°) Etablissement de clones T à partir des lignées KB5 et BM

Les clones de cellules T issus des lignées hétérogènes précédemment décrites (KB5 et BM) sont obtenus en utilisant la technique de dilution limite (selon la distribution de Poisson). Cette technique permet d'avoir statistiquement après plusieurs dilutions de la lignée, une cellule par puits qui va proliférer et donner naissance à un clone cellulaire.

100 µl des différentes dilutions de la lignée sont mises en culture en présence de $5x10^5$ cellules spléniques de souris B10.MBR (K^b I^k D^q) irradiées dans du milieu lignée contenant 5 % de SnC 16. Les cellules obtenues à partir des puits positifs sont mises en expansion avec $2x10^6$ cellules spléniques de B10·MBR irradiées. La restimulation des clones chaque semaine se fait dans les mêmes conditions que pour les lignées cellulaires.

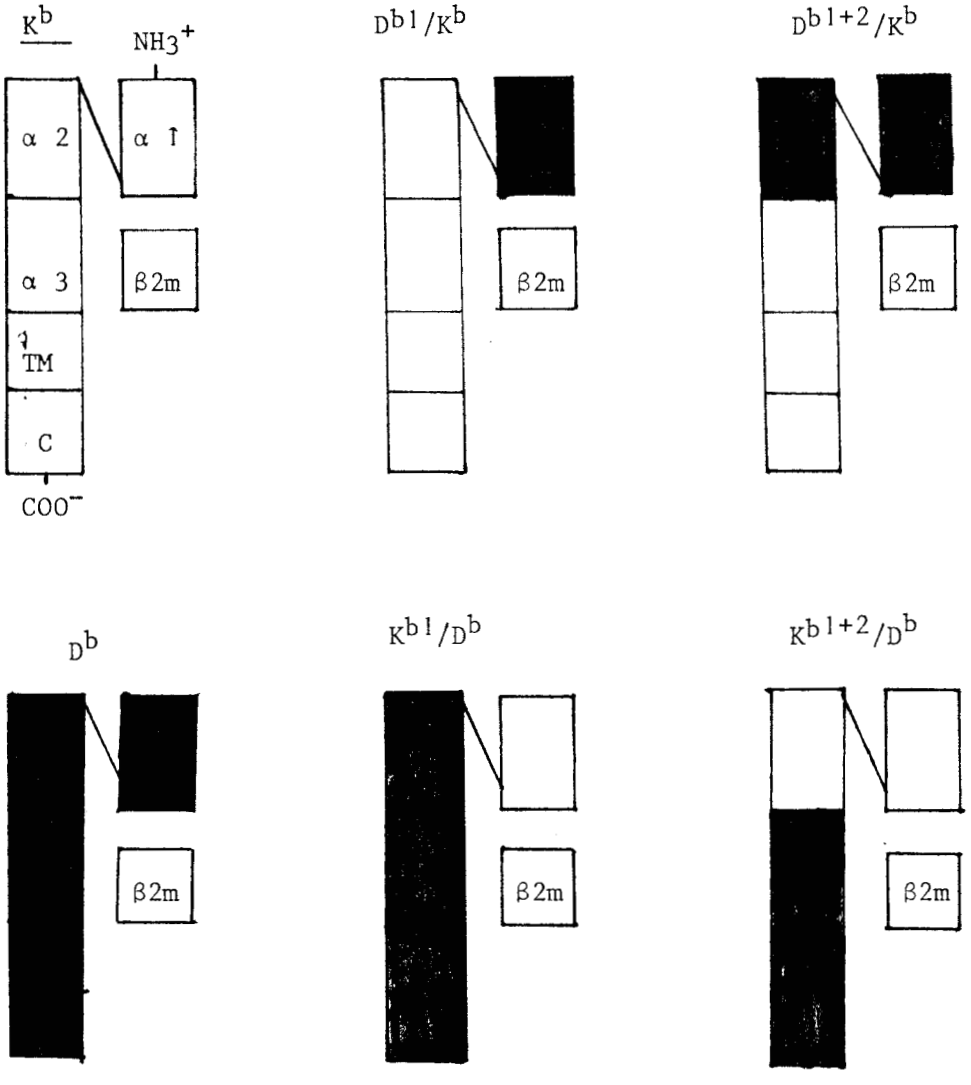
E) Obtention des variants de classe I

1°) A partir de la lignée R8 (NATHENSON et Collaborateurs)

Dans le but d'obtenir des cellules portant $H\text{-}2K^b$ muté NATHENSON et Coll ont dans un premier temps infesté des souris (BALB/C x C57BL/6)F_1 ($H\text{-}2^{d/b}$) par le virus d'Albelson (161). Ils obtiennent une lignée tumorale de cellules Pré B appelée R8. Dans un second temps après mutagénèse (153) de cette lignée R8, ils obtiennent différentes cellules qu'il faut isoler ; des cellules n'exprimant plus la molécule K^b, des cellules exprimant la molécule K^b native et des cellules exprimant la molécule K^b mutée. Après une sélection négative utilisant les anticorps monoclonaux additionnés de complément suivie d'une sélection positive utilisant les Acm couplés à la fluoresceïne, une série de mutants pour la molécule

Figure N° 16

Molécules hybrides classe I entre K^b et D^b exprimées à la surface de cellules L



Légende TM = transmembranaire

C = cytoplasmique

β2m = β2 microglobuline

K^b est obtenue. (Voir chapitre résultats).

2°) Hybrides de classe I exprimés par les cellules L

Disposant des gènes clonés pour les produits de classe I on peut par coupure avec des enzymes de restriction et ligation construire des gènes hybrides contenant des exons pouvant provenir des différentes molécules de classe I. Ceci a été effectué par (4) à partir des gènes H-$2K^b$ et D^b. Ces gènes sont transfectés dans des cellules L thymidine kinase négatives (cellules Ltk^-). On obtient une série de cellules exprimant soit les molécules K^b et D^b natives soit des molécules hybrides (voir figure 16).

II - TESTS CELLULAIRES

A) Test de prolifération cellulaire

Les tests de prolifération sont effectués en incubant ensemble en microplaque (Greiner) des cellules répondeuses (10^4 cellules T de lignées ou de clones) et des cellules stimulantes irradiées ($5x10^5$ cellules spléniques de souris d'haplotype H-2 différents). Ces tests permettent de déterminer la spécificité (cible antigénique) des cellules T. Au terme de 2 jours de culture l'intensité de la réponse proliférative est mesurée par l'incorporation de (^3H) thymidine (1 µ Ci/puits, Amsterdam International Ltd) par les cellules. Après 10 heures d'incubation le DNA est récolté sur filtre (Watman GF/C) et compté en scintillation liquide (liquide scintillant : LIPO-LUMA, Kontron analytique, FRANCE ; compteur β : intertechnique, FRANCE). Les résultats sont exprimés en moyenne et écart type des cpm obtenus dans les cultures effectuées en triple.

B) Test d'inhibition de prolifération cellulaire

1°) Par les anticorps monoclonaux

Dans ce cas le test de prolifération (voir paragraphe précédent) est effectué en présence de cellules stimulantes et d'anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes du C.M.H. de la cellule répondeuse ou de la cellule stimulante, ou spécifiques de marqueurs membranaires exprimés par des sous-populations cellulaires T. L'inhibition de la prolifération des cellules T est observée par une baisse d'incorporation de thymidine tritiée comparée à celle des cellules T en l'absence d'agent inhibiteur. Ceci indique que le marqueur reconnu par l'Acm est important pour la prolifération des cellules T.

Figure N° 17: Activité inhibitrice du méthotrexate au niveau de la synthèse des bases puriques

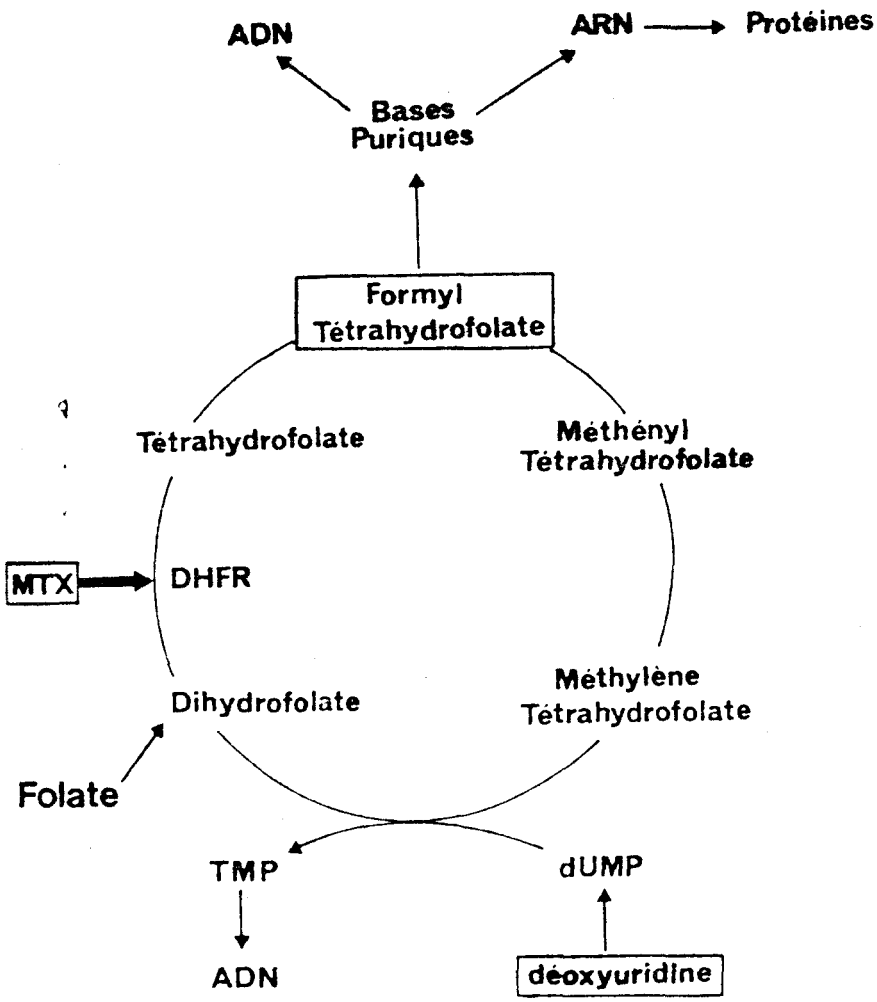


Figure 8 : Site d'action du méthotrexate (MTX = améthoptèrine) dans le cytoplasme cellulaire.
DHFR = Dihydrofolate réductase
dUMP = Déoxyuridine monophosphate
TMP = Thymidine monophosphate
ARN = Acide ribonucléique
ADN = Acide déoxyribonucléique

2°) Par un agent chimique : le méthotrexate (M.T.X)

Le méthotrexate (M.T.X) est une drogue inhibitrice de la synthèse des bases puriques (voir figure 17) nécessaire à la synthèse d'ADN et d'ARN. Cette drogue est donc un agent bloquant de la prolifération cellulaire. Dans notre étude, le M.T.X est encapsulé dans des liposomes ciblés par un anticorps monoclonal. La délivrance du M.T.X dans une cellule a lieu lorsque le liposome reconnaît sur la cellule son antigène cible correspondant à la spécificité de l'anticorps.

a) Préparation des liposomes couplés à la protéine A (Lip-PA)

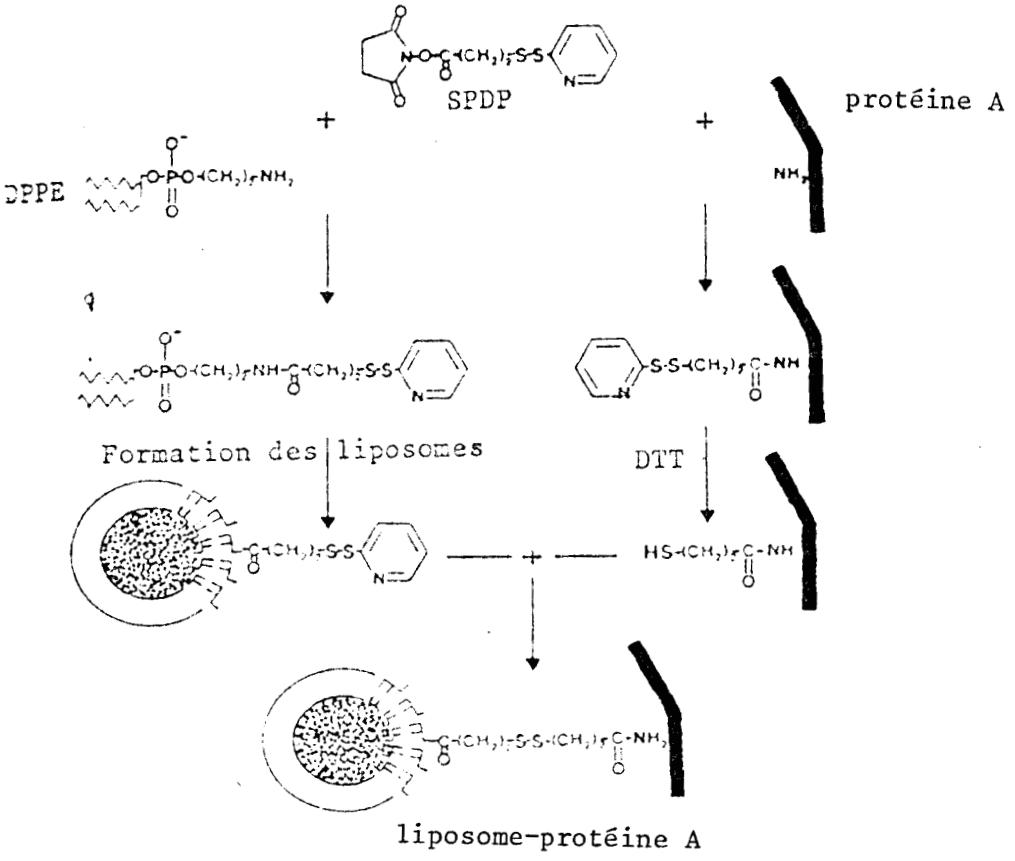
Les liposomes sont des vésicules artificielles composées d'une bicouche de phospholipides. Pour notre étude nous allons préparer des petits liposomes unilaméllaires par sonication dans lesquels le M.T.X. et un traceur fluorescent (carboxyfluoresceine : CF) seront encapsulés. La CF encapsulée nous permet de calculer la concentration de MTX dans les liposomes partant de l'hypothèse que le pourcentage d'encapsulation des deux produits est le même.

Les liposomes sont obtenus par un mélange de lipides. On mélange 12 µ moles (65 %) de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC ; Sigma), 6,4 µ moles (34 %) de cholesterol (Fluka)et 0,2 µ mole (1 %) de dipalmitoylphosphatidyl éthanolamine (DPPE : Calbiochem) modifié avec du N-hydroxysuccinimildyl-3-(2-pyridyl-dithio) propionate (SPDP : pharmacia). La phase liquide est évaporée sous flux d'azote à 50°C. Le film lipidique obtenu est lyophilisé quatre heures puis repris dans 3 ml d'une solution de $NaHCO_3$ (100 mM) CF(40 mM Kodak) MTX (20 mM, NIH-NCl). Les vésicules de grande taille multilamellaires se forment spontanément et celles de petite taille sont obtenues par sonication de la préparation sous flux d'azote à 50°C jusqu'à limpidité de celle-ci (environ 30 mn). Par filtration sur séphadex G50 équilibrée en tampon HEPES 10 mM, Nacl 145 mM PH. 7,45 (tampon L-Buffer PH 7,4), on sépare la CF et le MTX libre des liposomes. L'éluat obtenu est ultracentrifugé (5°C, 35K pendant 45 minutes). Les petits liposomes sont retrouvés dans le surnageant.

On peut conférer aux liposomes une spécificité soit indirectement en leur couplant de façon covalente la protéine A (extraite de staphyloccocus aureus, pharmacia) soit directement en couplant des anticorps monoclonaux. Dans notre étude nous utiliserons la protéine A qui est capable de fixer le fragment F_C de certaines classes d'immunoglobulines. La protéine A se fixe par l'intermédiaire d'un réactif bifonctionnel, le SPDP (207, 105). On a alors formation d'un pont disulfure entre le liposome et la protéine A (Voir figure 18).

Figure N° 18

: Représentation schématique du couplage covalent des protéines (anticorps monoclonaux et protéine A) aux liposomes préformés.



SPDP= N-hydroxysuccinimidyl-3(2-pyridyldithio)propionate
DPPE= dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine

DTT= dithiotréitol. Réduction à pH acide pour les anticorps et à pH neutre pour la protéine A.

Dans un premier temps il faut activer la protéïne A par le SPDP. La réaction se fait avec dix fois plus de moles de SPDP que de protéïne à substituer. A $1,2x10^{-5}$ m moles de protéine A (on ajoute en plus une quantité connue de protéïne A marquée à $1'^{125}$ Iode comme traceur. Ceci permet de calculer par la suite le pourcentage de protéïne A fixé aux liposomes) on ajoute sous agitation vigoureuse $1,2x10^{-4}$ m moles de SPDP. Après 30 mn à température ambiante, le mélange est filtré sur colonne G25 (PD-10 Pharmacia) équilibrée en tampon L-Buffer PH 8. Les fonctions thiols du SPDP une fois couplé sur les lysines de la protéine sont obtenues par une réduction à PH neutre par le dithiotreitol (DTT) L'excès de DTT est éliminé par filtration sur colonne G25 (PD-10 Pharmacia)

Dans un second temps il faut coupler la protéine A activée aux liposomes. La préparation de protéine est mélangée aux liposomes à volume égal et laissée 20 heures à 20°C dans l'obscurité. On sépare par filtration sur séphadex 4B les liposomes couplés de la protéïne A libre. Un aliquot de chaque fraction recueillie est testé pour sa radioactivité et sa fluorescence. Les deux paramètres doivent se retrouver dans les mêmes fractions. La radioactivité est mesurée au compteur γ (intertechnique FRANCE). On calcule le pourcentage de protéine A fixée aux liposomes (environ 40 à 50 %). La fluorescence de la CF est mesurée avant et après lyse du liposome par un détergent (Tritonx100 à 0,5 %). En effet,la CF à forte concentration (80 mM) autoinhibe sa fluorescence "phénomène de quenching" ; lors de la lyse du liposome la CF libérée est diluée dans le milieu ce qui permet de mesurer sa fluorescence réelle. Connaissant la quantité de CF dans les liposomes on calcule la concentration de MTX encapsulée. Les liposomes sont dialysés contre deux litres de tampons L-Buffer PH 7,45 pendant 48 heures et filtrés ensuite sur des filtres 0,45 m (millipore). Les liposomes ainsi préparés peuvent être gardés plusieurs mois à 4°C sans fuire.

b) Inhibition de l'incorporation de déoxyuridine tritiée par les cellules

Cette inhibition d'incorporation de deoxynuridine tritiée est liée à une inhibition de prolifération des cellules qui dépend de la délivrance de MTX par les liposomes.

Dans des microplaques de culture (Greiner) $2x10^5$ cellules sont incubées en présence d'1 µg d'Acm dans du milieu lignée pendant 30 mn à 4°C. On ajoute ensuite soit du MTX libre à plusieurs concentrations (500 nmol à10 nmol), soit du MTX encapsulé dans des Lip-PA, aux concentrations précédemment utilisées pour le MTX libre. Après une incubation de 3 à 4 heures à 37°C on ajoute 0,5 µCi d (^{3}H) déoxyuridine (New England Nuclear) par puits. Après 16 heures d'incubation à 37°C les cellules sont filtrées, lavées et comptées en scintillant.

liquide (compteur β intertechnique FRANCE) pour déterminer l'incorporation d'^{3}H. Les résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition de prolifération par rapport à un témoin cellulaire sans MTX.

C) TEST DE CYTOTOXICITE

Ce test permet de déterminer si les cellules des lignées ou de clones maintenues en culture ont la propriété de détruire (Lyser) une cellule cible exprimant l'antigène H-2 spécifique et marquée au ^{51} Chrome.

Le chromage des cellules cibles qui sont soit des blastes soit des cellules tumorales se fait pendant 1 heure à 37°C en présence de 0,3 mCi de ^{51} Chrome (^{51} $NaCRO_4$ commissariat à l'énergie atomique) dans un volume de 0,6 ml final contenant environ $20x10^6$ cellules. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans du RPMI 1640, 5 % SVF et resuspendues à la concentration de $2x10^5$ cellules:ml.

Le test de cytotoxicité se fait dans des microplaques à fond V (greiner) où l'on mélange 0,1 ml de cellules effectrices à des concentrations variables et 0,1 ml de cellules cibles marquées au ^{51}Cr. Après centrifugation à 400 rpm pendant 2 mn les plaques de culture sont incubées 4 à 5 heures à 37°C. Après centrifugation à 1000 rpm pendant 5 mn, 0,1 ml de surnageant de chaque puits est compté au compteur γ (intertechnique, FRANCE). Le pourcentage de ^{51}Cr relargué par les cellules cibles lorsqu'elles sont lysées par les cellules effectrices est calculé pour chaque puits de culture. Ceci est comparé au 100 % de relargage de ^{51}Cr (cpm maximum) défini pour chaque cellule cible incubée en présence d'HCl 1N. Le relarguage spontané (cpm minimum) de ^{51}Cr de chaque cellule cible est obtenu en incubant les cellules en présence de milieu.
Le pourcentage de lyse d'une cellule s'exprime donc de la façon suivante :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = 100 \times \frac{\text{cpm test} - \text{cpm minimum}}{\text{cpm maximum} - \text{cpm minimun}}$$

Les écarts types sont calculés sur trois échantillons, ils n'excèdent jamais 5 % et pour simplification ils ne sont pas indiqués.

D) TEST D'INHIBITION DE LA CYTOLYSE

Le blocage de la cytolyse peut se faire de deux manières :
1) en préincubant les cellules effectrices avec des cibles homologues qui ne sont pas radiomarquées au ^{51}Cr :
2) en préincubant avec des Acm qui peuvent reconnaître des déterminants antigéniques exprimés sur la cellule cible ou sur la cellule effectrice.

Après une préincubation pendant 10 mn à température ambiante des cellules effectrices avec des cibles froides ou des Acm à différentes concentrations on ajoute 0,1 ml de cibles marquées au ^{51}Cr. Les conditions expérimentales sont les mêmes que dans le paragraphe précédent.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la cytolyse par rapport à un témoin cellulaire sans inhibiteurs.

III - MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENTS MARQUEURS CELLULAIRES

La présence d'un marqueur, protéine membranaire exprimée à la surface des cellules,est révélée par une technique de fixation d'anticorps monoclonaux qui peut être directe si l'Acm est lui-même radiomarqué, ou indirecte lorsqu'on révèle la fixation de cet Acm par l'intermédiaire de la protéine A radiomarquée ou par un second anticorps marqué à la fluoresceine. Pour notre étude nous utiliserons que les méthodes indirectes.

A) Révélation par la protéine A radiomarquée

On utilise la protéine A car elle est capable de se fixer à un grand nombre de fragment FC d'immunoglobulines (IgG2a, IgG2b, IgG3 de la souris)

1°) Marquage de la protéine A

Le marquage de la protéine A se fait d'après la technique à la chloramine T de GREENWOOD (67). Il est réalisé sous agitation dans un tube à essais placé dans un cristallisoir contenant de la glace. L'iode radioactif (0,5 m Ci ^{125} d'iode sous forme d'iodure de sodium,(New. England Nuclear) est ajouté rapidement à la solution de protéine A (50 µl d'une solution à 2 mg/ml), puis 50 µl de la solution de chloramine T (à 1 mg/ml - Merck Munich ALLEMAGNE). Le tout est agité pendant 3 mn. 100 µl de métabisulfite de sodium (à 1 mg/ml Merck) et 20 µl d'iodure de sodium froid (à 10 mg/ml UCB Bruxelle BELGIQUE) sont ensuite ajoutés. La solution finale est ensuite déposée sur une colonne de séphadex G25 (PD-10 pharmacia) équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,1M-BSA à 1 % (PH 7,4) et éluée par ce même tampon. La protéine A est ensuite diluée avec le tampon phosphate afin d'obtenir 10 000 cpm par µl de solution.

2°) Le dosage radioimmunologique

Le dosage radioimmunologique s'effectue en microplaques à fond rond (Greiner) toujours dans le même milieu qui est un tampon phosphate de sodium 0,1M, BSA 0,1 % et azide 0,02 % (Merck). On met en incubation dans un volume final de 0,2 ml, $5x10^5$ cellules et 1 µg d'Acm pendant 30 mn à 4°C. Après trois lavages en tampon 100 µl de protéine A marquée (20 000 cpm) sont ajoutés et on laisse 45 mn à 4°C. Après trois lavages en tampon les cellules sont récupérées et comptées au compteur γ (intertechnique, FRANCE).

Les résultats des marquages effectués en double sont donnés en moyenne et écart types des cpm obtenus dans les puits.

B) Révélation par un second anticorps marqué à la fluoresceïne

1°) Préparation des cellules

$1x10^6$ cellules sont lavées dans du tampon phosphate de sodium 0,1M, BSA 0,1 % azide 0,02 % (PH 7,4) (ce tampon est utilisé tout le long de l'exprérience). 100 µl d'Acm (1 µg) sont ajoutés sur le culot cellulaire et laissés en contact 30 mn à 4°C. Au bout de trois lavages en tampon 50 µl d'Ac de mouton anti-Ig de souris marqués à la fluoresceïne (H+L, Institut Pasteur Production FRANCE dilué au 1/20 dans du tampon) sont ajoutés sur le culot et incubés 45 mn à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans du tampon.

2°) Lecture de la fluorescence

La fluorescence est mesurée sur un FACS (fluorescence activating cell sorter Epics V cell Sorter Coulter electronics Hialeah FL). Le pourcentage de cellules fluorescentes est compté sur 10 000 cellules. Les graphes (figure 20 p 36) donnent en ordonnée le nombre de cellules et en abscisse l'intensité de la fluorescence. La valeur moyenne de fluorescence ou RFI (relative Fluorescence intensity) pour un type de cellule est calculée avec l'équation suivante :

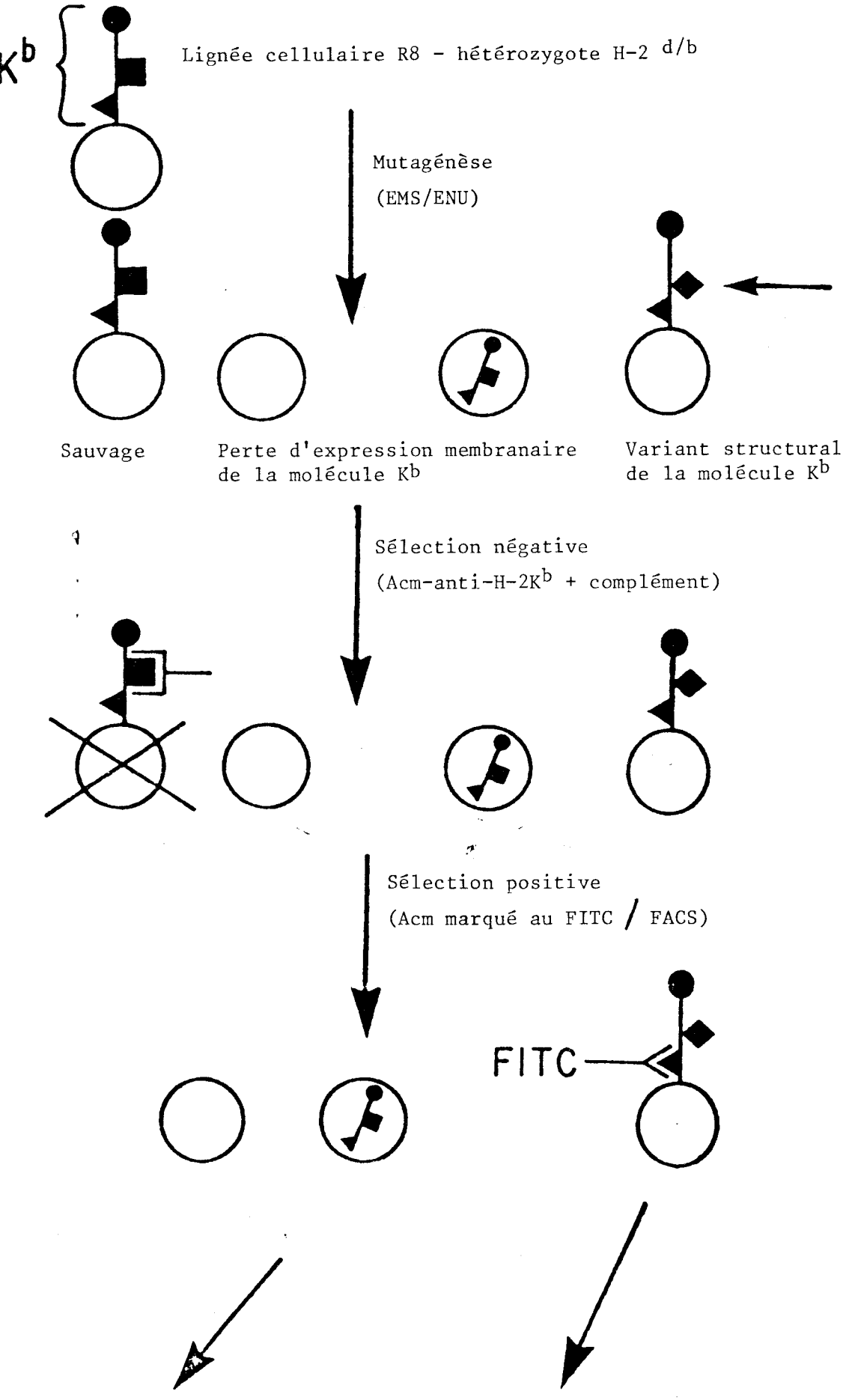
$$RFI = \frac{\sum_{i=0}^{255} Ni \times I}{\sum_{i=0}^{255} Ni}$$

où I = le canal de fluorescence choisi qui dépend des résultats obtenus avec les échantillons témoins (dans notre étude canal 20) et

Ni = nombre de cellules dans le canal choisi.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure N° 19 OBTENTION DE VARIANTS STRUCTURAUX DE LA MOLECULE K^b



I ETUDE DES RELATIONS ENTRE LES DETERMINANTS RECONNUS PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX ET PAR LES CELLULES T CYTOTOXIQUES

A) OBTENTION DE VARIANTS STRUCTURAUX DE LA MOLECULE K^b

Les clones de cellules tumorales exprimant des variations structurales au niveau de la molécule H-$2K^b$ sont obtenus à partir d'une lignée tumorale appelée R8. La lignée R8 est issue d'une tumeur induite chez des souris (BALB/c x C57B1/6)F1 par le virus Abelson (161) : elle est de type pré-B et d'haplotype hétérozygote (H-$2^{d/b}$).

1) Principe de la mutagénèse et de la sélection de variants de structure

La lignée R8 a été soumise à une mutagénèse chimique (NATHENSON et Coll) soit en présence d'éthyl méthane sulfonate (E.M.S. 500 mg/ml et $5x10^5$ cellules/ml), soit en présence d'éthyl nitroso urée (E.N.U. 0,2 mM pour $5x10^5$ cellules/ml) (155)

Après mutagénèse, parmi toutes les cellules mutantes obtenues, celles que l'on veut sélectionner sont celles qui continuent d'exprimer une molécule H-$2K^b$ membranaire, mais de structure altérée. Pour effectuer la sélection de ce type de mutants "de structure" de la molécule H-$2K^b$ on dispose de plusieurs Acm spécifiques d'épitopes distincts (68, 4) de la molécule H-$2K^b$. Les Acm utilisés dans notre étude sont représentés dans le tableau 4 où leurs réactivités sur les mutants spontanés H-$2K^{bm}$ sont également indiquées.

Tableau N° 4

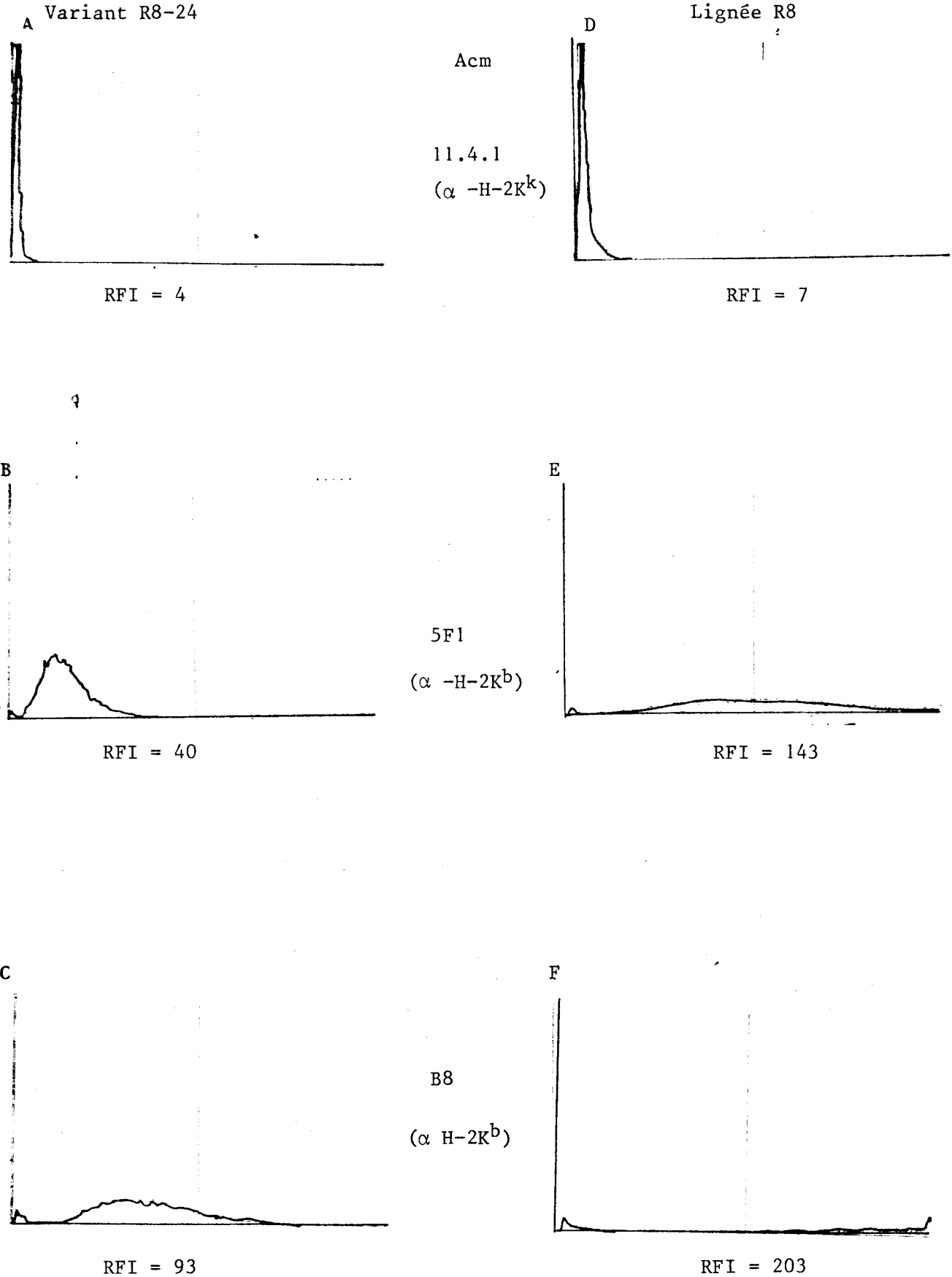
Réactivité des Acm sur les mutants spontanés H-$2K^{bm}$

	MUTANT	POSITION	SUBSTITUTION	EH-144	B8	K9-136	28-13-3	K9-178	5F1	Y3
α 1	bm8	23	Met→Ile							
		24	Glu→Ser							
	bm3	77	Asp→ ?							
		89	Lys→Ala							
α 2	bm5	116	Tyr→Phe							
	bm6	116	Tyr→Phe							
		121	Cys→Arg							
	bm1	152	Glu→Ala							
		155	Arg→Tyr							
		156	Leu→Tyr							
	bm4	158-173	?							

Le schéma de sélection en deux temps des mutants de structure au moyen de ces Acm est indiqué dans la figure 19 :

Figure N° 20

Analyse de fluorescence au FACS



1°) Une sélection négative par traitement de la population cellulaire ayant subi la mutagénèse par un Acm spécifique de H-2K^b suivie de la fixation de complément, élimine par lyse cellulaire les cellules portant une molécule H-2K^b non altérée (au moins pour le déterminant antigénique reconnu par cet Acm). Trois types de cellules échappent à cette sélection négative (voir schéma figure 19) : a) les cellules ne synthétisant plus de molécules H-2K^b, b) les cellules synthétisant une molécule H-2K^b dont la structure altérée ne permet plus une expression membranaire de la molécule et c) les cellules synthétisant une molécule H-2K^b de structure altérée et ayant conservé une expression membranaire.

2°) Afin de sélectionner des cellules de ce troisième type, on a recours à un procédé de sélection positive utilisant un Acm spécifique de la molécule H-2K^b, mais dirigé contre un déterminant antigénique distinct, non altéré par la mutagénèse. La fixation de cet Acm aux cellules peut être révélée par un anticorps spécifiques des Ig de souris préalablement couplé au fluorothiocyanate (FITC). Les cellules rendues fluorescentes par cette technique de "sandwich" peuvent être sélectionnées en utilisant un "trieur de cellules activées par la fluorescence" (FACS).

La liste des cellules "mutées (variants de R8) sélectionnées par ces procédés est donnée dans le tableau 6.

2- Réactivité des différents Acm anti H-2K^b sur les variants de structure de R8

L'analyse des cellules fluorescentes au F.A.C.S. nous permet non seulement de quantifier le pourcentage de cellules reconnues par l'Acm, donc présentant le déterminant antigénique mais aussi de donner le taux de fluorescence fixé par un type de cellules donné. Sur les figures 20 sont représentés les diagrammes obtenus pour ce genre d'étude. Ces six figures représentent la réactivité de trois Acm différents sur deux variants R8 et R8-24 . En abscisse, est représentée l'intensité de fluorescence et en ordonnée, le nombre de cellule. Le taux moyen de fluorescence (RFI) est donné pour un Acm et un clone cellulaire. La valeur du RFI dépend de la quantité de déterminants antigéniques reconnus par l'Acm et de l'affinité de cet Acm pour son déterminant. Dans la figure 20(A) l'Acm utilisé, est dirigé contre la molécule H-2K^k qui n'est pas présente à la surface du variant R8-24 (H-2$^{d/d}$). Le RFI obtenu est alors faible (RFI=4). Ceci représente un témoin négatif pour cette cellule. Dans la figure 20 B l'Acm utilisé (5F1) est dirigé contre le domaine α 2 de la molécule K^b. Il se fixe au variant R8-24 et on remarque que l'intensité du fluorescence est beaucoup plus forte que pour la figure précédente (RFI=93). Dans toutes les expériences les témoins positifs de fixation de l'Acm anti-Kb sont obtenus pour leur taux de fixation à la lignée mère R8 (Figure 20, EF). Les RFI sont alors très élevés, par contre (dans la figure 20 D) l'Acm 11.4.1 qui ne se fixe pas, donne toujours un RFI faible.

Tableau N° 5

RFI obtenus avec les différents variants de la lignée R8

		Acm spécifiques de la molecule :				
		K^b				K^k
	R8 variant	B8	K9-178	5 F 1	Y 3	11.4.1
	R8	216	181	143	208	11
	125	40	124	102	157	7
	24	93	84	40	71	4
	246	139	87	106	97	NT
α1	208	10	44	37	51	6
	136	NT	NT	NT	NT	NT
	187	64	141	129	146	5
	313	10	50	26	44	8
	205	NT	NT	NT	NT	NT
α1/α2	37	NT	NT	NT	NT	NT
	44	23	13	9	13	11
	8	NT	NT	NT	NT	NT
	9	160	22	145	173	8
	26	NT	NT	NT	NT	NT
α2	70	NT	NT	NT	NT	NT
	10	38	13	15	37	9
	14	60	48	32	4	5
	127	57	24	19	5	6
	103	NT	NT	NT	NT	NT
	150	19	10	9	16	11

a) Analyse par fluorescence des variants de structure de R8

Cette étude au FACS est faite pour les différents variants de la lignée R8. Les RFI obtenus pour chaque Acm et chaque cellules sont résumés tableau 7. Dans ce tableau les variants sont classés suivant la réactivité des Acm. Par exemple les variants qui semblent exprimer une molécule K^b altérée dans le domaine $\alpha 1$ donc qui ne sont plus reconnu par les Acm qui reconnaissent des déterminants antigéniques de ce domaine sont classés ensemble avec l'intitulé α 1 en face de la liste des différents variants (Tableau 5). On classe également ensemble les variants qui semblent avoir la molécule K^b altérée, à la limite des deux domaines $\alpha 1/\alpha 2$ ou dans le domaine $\alpha 2$.

Les cellules R8-103 et R8-150 qui n'expriment pas la molécule K^b à la surface membranaire (pas de sélection positive) ne sont pas reconnues par les Acm anti-K^b 'RFI $\leq$ 20). La lignée R8 fixe très bien les Acm anti-K^b et les RFI sont très élevés (> 50). Tous les variants R8 exprimant la molécule K^b altérée ont des RFI variables suivant l'Acm anti-K^b utilisé. D'une manière générale, les RFI obtenus avec les variants sont toujours inférieurs aux RFI obtenus avec la lignée R8. Dans le but de rendre plus clairs ces résultats nous les avons schématisés dans le tableau 8.

b) Schématisation des réactivités

Dans ce tableau (6) sont réunis nos propres résultats et les résultats obtenus par l'équipe de NATHENSON. Nous avons schématisé par une case blanche les fixations d'Acm aux variants correspondant à des valeurs de RFI inférieures à 20 % de celles obtenues pour le même Acm sur la cellule R8. Des valeurs de RFI comprise entre 20 et 50 % de celles sur les cellules R8 sont représentées par une case achurée. (Le déterminant antigénique semble être partiellement altéré mais est toujours plus ou moins bien reconnu par l'Acm). Enfin des cases noires représentent des fixations d'Acm donnant des valeurs de RFI supérieures à 50 % des valeurs de RFI sur R8. Tous les variants obtenus sont affectés pour un ou plusieurs déterminants antigéniques. Dans la majorité des cas les déterminants qui ne sont plus du tout reconnus par les Acm se trouvent localisés soit dans le premier, soit dans le second domaine de la molécule K^b. Les variants R8-44 et R8-10 font exceptions puisque la réactivité d'Acm dirigés contre des déterminants du premier ou du second domaine de la molécule sont également affectés.

3) Discussion

Le développement de variants de structure d'une lignée telle que R8 par une mutagénèse chimique suivie de sélection sur la base des réactivités sérologiques à donné lieu à un matériel complémentaire à celui que constituait déjà les mutants spontanés H-$2K^{bm}$ chez la souris. En effet ces derniers étant

Tableau N° 6

RESULTATS SCHEMATISES OBTENUS PAR FLUORESCENCE

(Sont résumés dans ce tableau les résultats obtenus par moi-même et ceux obtenus par l'Equipe de NATHENSON)

			α 1		α1/α2	α2			?
	R8 VARIANT	Acm Utilisé pour la sélection	EH-144	B8.24.3	K9.136	28.13.3	K9.178	5F1	Y3
	R8		■	■	■	■	■	■	■
α1	125	EH.144	□	▨	■	■	■	■	■
	24	"	□	■	■	■	■	■	■
	246	"	□	■	■	■	■	■	■
	208	"	□	□	■	■	▨	▨	▨
	136	"	□	■	□	■	■	■	■
	187	"	□	■	□	■	■	■	■
	313	"	□	□	□	▨	▨	▨	▨
α1/α2	205	K9.136	■	■	□	■	■	■	■
	37	"	▨	■	□	■	■	■	■
	44	"	□	▨	□	□	□	□	□
α2	8	28.13.3	■	■	■	□	■	■	■
	9	"	■	■	■	□	▨	■	■
	26	"	■	■	■	□	□	■	■
	70	"	■	■	■	□	□	■	■
	10	"	□	▨	▨	□	□	□	▨
?	14	Y3	■	■	■	■	▨	▨	□
	127	"	■	■	■	■	▨	□	□
	103	-	□	□	□	□	□	□	□
	150	-	□	□	□	□	□	□	□

Légende ■ RFI > 50

▨ RFI Compris entre 20 et 50

□ RFI < 20

détectés par rejet de greffe (mécanisme à médiation cellulaire T) fournissaient des modifications de structure auxquelles les cellules T semblaient particulièrement sensibles (137). La technique des variants somatiques est complémentaire aussi des approches consistant à obtenir des molécules de classe I (4) par manipulation génétique interchangeant des exons et donc des domaines entiers de la molécule. Dans notre cas l'inconvénient est que nous ne connaissons pas encore la nature exacte de l'altération au niveau de la molécule K^b, mais nous avons les moyens de la connaître en faisant la séquence des acides aminés ou la séquence des gènes des différents variants. Les variants obtenus étant nombreux et les mutations ayant introduit des altérations plus ou moins importantes pour la reconnaissance sérologique de la molécule K^b, ceux-ci devraient être utiles dans la détermination de la nature des déterminants de la molécule, importants pour la fixation des Acm d'une part et des cellules T de l'autre.

Il faut remarquer que lors de la mutagénèse de la lignée R8 il est possible que des variants avec une molécule K^b altérée au niveau du troisième domaine aient été obtenus. Ces variants ne peuvent pas être sélectionnés car il n'existe pas d'anticorps monoclonal dirigé contre le domaine $\alpha 3$ de H-$2K^b$. Ceci est probablement dû au fait que le domaine $\alpha 3$ est très peu polymorphe. Etant donné que les Ac sont obtenus à la suite d'une immunisation allogénique, ils sont dirigés contre les domaines les plus polymorphes qui présentent le plus de déterminants allogéniques. De même, il n'existe pas chez la souris de mutations spontanées qui interviennent au niveau du domaine $\alpha 3$ de la molécule K^b. Dans une interprétation de génération de mutations par un mécanisme de type "conversion génique" (voir p:12) on pourrait imaginer que si ce mécanisme se produisait entre deux exons correspondant aux domaines $\alpha 3$ de deux gènes différents, le résultat pourrait en être "silencieux" puisque les homologies de séquences au niveau de ces exons sont très grandes.

Pour étudier la réactivité des Acm sur les variants de R8 nous avons choisi un dosage par immunofluorescence par "sandwich" où le second Ac est marqué à la fluorescéine. Ceci nous permet de faire les analyses de fluorescence au FACS. Cette lecture nous donne plusieurs types de résultats : 1) le pourcentage de cellules positives pour un Ac donné, 2) et le taux moyen de fluorescence ou RFI. La variation du RFI est en fonction de deux paramètres, 1) la quantité de déterminants présents à la surface des cellules et 2) l'affinité d'un Ac donné pour son déterminant antigénique. La distribution du taux de fluorescence pour une population cellulaire au FACS permet de vérifier que la population est homogène et qu'il n'y a pas une distribution bimodale qui révèlerait l'existence éventuelle de "revertants" et la nécessité de recloner les cellules. Une distribution plurimodale n'est jamais apparue dans nos analyses.

Tableau N° 7

Spécificité des 2 lignées KB5 et BM

Cellules stimulantes					⋆ Incorporation de thymidine (^3H)	
Souris	H-2					
	K	I-A	I-E	D	KB5	BM
B10BR	k	k	k	k	238 ± 175	828 ± 508
B10	b	b	b	b	9797 ± 801	2410 ± 111
B10MBR	b	k	k	q	12480 ± 1080	6391 ± 470
CBA-Br	q	q	q	q	571 ± 177	430 ± 270
B10A(4R)	k	k	b	b	842 ± 106	613 ± 535

Légende : ⋆ Les résultats sont exprimés en cpm

1×10^4 cellules de la lignée KB5 ou BM sont stimulées par 5×10^5 cellules spléniques irradiées pt 48 H.

Tableau N° 8

MARQUEURS PRESENTS A LA SURFACE DES CELLULES DES LIGNEES KB5 ET BM

Marqueurs	thy 1	LFA-1	Lyt 1	Lyt 2	T_4	K^k	K^b
Acm	J1J	H-35.89.9	53.7.3	H-35.17.2	GK1-5	11.4.1	pool Acm
KB5	+	+	-	+	-	+	-
BM	+	+	-	+	-	+	-

Légende : + présence du marqueur sur les cellules de la lignée BM ou KB5

- absence du marqueur sur les cellules de la lignée BM ou KB5

La signification des valeurs de RFI positives mais inférieures à 50 sur certains variants sera prise en considération lors de l'analyse des réactivités des cellules T cytotoxiques sur ces variants.

B) OBTENTION DES LIGNEES ET CLONES CYTOTOXIQUES

1) Obtention des deux lignées alloréactives KB5 et BM spécifiques de H-2K^b : marqueurs de différenciation et conditions de prolifération

La lignée KB5 a été obtenue à partir de souris B10Br (H-2^k) immunisées avec des cellules de rate de B10 (H-2^b) (1).

La lignée BM a été obtenue à partir de souris CBA/J (H-2^k) primées *in vivo* par des cellules tumorales EL4/SK (H-2^b) (3).

La stimulation *in vitro* au moyen de cellules B10MBR (K^b I^k D^q) irradiées, des cellules T purifiées à partir des rates de ces souris a permis d'établir des lignées polyclonales spécifiques de H-2K^b. La spécificité de ces cellules est vérifiée par un test de prolifération dont les résultats sont portés tableau 7 .

On observe une prolifération des cellules des lignées KB5 et BM quand celles-ci sont mises en culture en présence de cellules stimulantes exprimant la molécule K^b.

L'analyse des marqueurs présents à la surface des cellules de ces deux lignées est résumée tableau 8 . La présence de ces marqueurs de différenciation de sous-population lymphocytaire T a été mise en évidence par la fixation d'Acm dirigés contre ces marqueurs. Ces deux lignées KB5 et BM sont donc composées de cellules T thy 1$^+$, LFA-1$^+$, Lyt-2$^+$, T4$^-$. Ceci correspond au phénotype généralement observé pour des cellules T spécifiques d'antigènes de classe I du CMH (3, 147).

La fonction des marqueurs présents soit sur les cellules T de ces deux lignées soit sur les cellules stimulantes est analysée par des expériences d'inhibition de la prolifération. Ces inhibitions de prolifération des cellules de ces deux lignées T sont induites par la présence d'Acm. Les résultats sont portés tableau 9 .

Cette étude indique que la présence d'Acm dirigés contre les structures Lyt-2 des cellules T répondeuses inhibe la prolifération. Des Acm dirigés contre l'antigène de différenciation thy-1 sont sans effet, alors que les Acm dirigés contre la molécule LFA-1 (qui semble impliquée dans toutes les interactions cellulaires des cellules T (32)) sont également inhibiteur. Un mélange d'Acm dirigés contre les molécules I-A^k et I-E^k sont sans effet, de même que des Acm

Tableau N° 9

RESUME DES EFFETS D'INHIBITION DE LA PROLIFERATION SPECIFIQUE DE H-2 K^b DES LIGNEES KB5 ET BM EN PRESENCE D'ACM DIRIGES CONTRE LES MARQUEURS DE SURFACE DES CELLULES REPONDEUSES OU STIMULANTES

Marqueurs	thy 1	LFA-1	Lyt 1	Lyt 2	T_4	Ia^k	K^b	K^k
Acm	J1J	H-35.89.9	53.7.3	H-35.17.2	GK1-5	pool Acm	pool Acm	11.4.1
KB5	-	+	-	+	-	-	+	-
BM	-	+	-	+	-	-	+	-

Légende : + inhibition de la prolifération
- sans effet sur la prolifération

La prolifération de 1 x 10^4 cellules de la lignée KB5 ou BM stimulée par 5 x 10^5 cellules spléniques irradiées B10MBR (K^b I^k D^q) est inhibée ou non en présence de 1 µg d'Acm.

dirigés contre la molécule H-$2K^k$ des cellules répondeuses. Par contre un mélange d'Acm dirigés contre la molécule H-$2K^b$ des cellules stimulantes inhibe la prolifération des cellules répondeuses.

Ces deux lignées KB5 et BM sont donc composées de cellules T Lyt 2^+ $T4^-$ stimulables par l'alloantigène de classe I H-$2K^b$.

2) Obtention des clones cellulaires issus de KB5 et BM

a) Clones issus de la lignée KB5

Après culture en dilution limité de la lignée KB5 une série de clones ont été obtenus (1) dont deux sont utilisés pour notre étude : le clone N°1 = KB5-C1 et le clone N°20 = KB5-C20. Un test de prolifération cellulaire confirme la spécificité pour H-$2K^b$ de ces deux clones. Ces clones sont de phénotype thy 1^+, Lyt 1^- Lyt 2^+ $T4^-$ et expriment la molécule LFA-1.

b) Clones issus de la lignée BM

Après trois séries de clonage par culture en dilution limite de la lignée BM (voir matériels et méthodes) nous avons obtenus une série de clones intitulés comme suit :

- le clone N°5 issu du premier clonage de BM = BM1-5
- les clones N°2,3,6,9,12,17,20,22 issus du second clonage de BM = BM2-2, BM2-3, BM2-6, BM2-9, BM2-12, BM2-17, BM2-20, BM2-22
- les clones N°3 et 7 issus du troisième clonage de BM = BM3-3 et BM3-7.

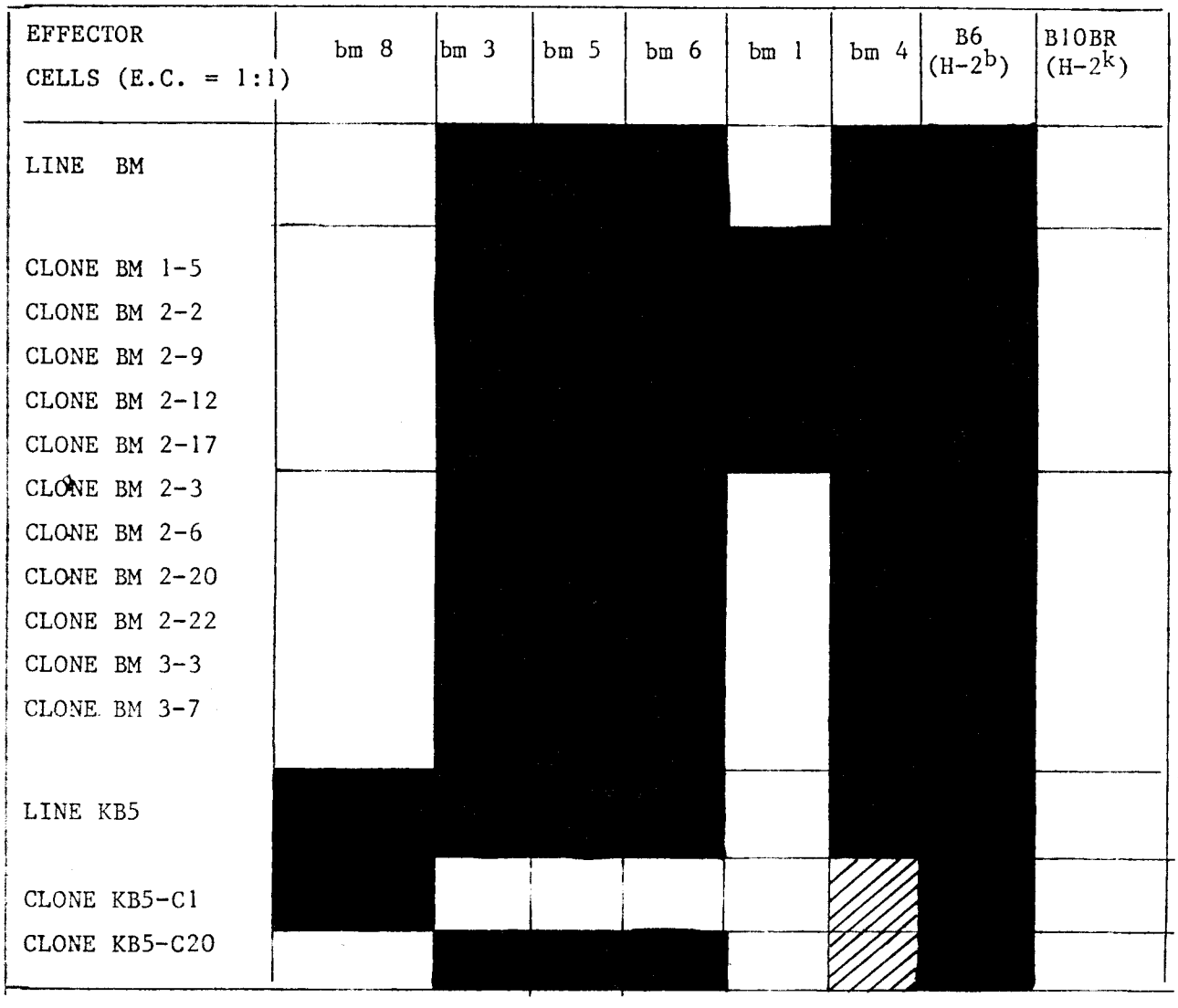
Un test de prolifération cellulaire confirme la spécificité H-$2K^b$ des clones obtenus. Ces clones sont également de phénotype thy 1^+, Lyt-2^+, $T4^-$, LFA 1^+.

3) Etude de la spécificité de l'activité cytolytique des lignées KB5 et BM et des clones issus de ces deux lignées

L'activité cytolytique de ces cellules est testée en utilisant comme cibles des cellules blastiques. Les résultats indiqués tableau 1 correspondent à un rapport effecteur/cible de 1 pour 1 (E/C=1 : 1). Les blastes sont obtenus à partir de cellules spléniques de souris B6 (H-2^b), B10BR (H-2^k) de souris mutantes bm 1 (H-$2K^{bm}$), bm4 (H-$2K^{bm4}$), bm3 (H-$2K^{bm3}$), bm5 (H-$2K^{bm5}$), bm6 (H-$2K^{bm6}$), bm8 (H-$2K^{bm8}$) incubés 24 heures en présence de ConA.

Tableau N° 13

ACTIVITE CYTOLYTIQUE DES LIGNEES BM et KB5 ET DES CLONES ISSUS DE CES DEUX LIGNEES



Légende : L'activité cytolytique est exprimée en % de cytolyse

= ■ >50 % de cytolyse

□ <20 % de cytolyse

▨ entre 20 et 50 % de cytolyse

L'étude comparative des réactivités des lignées polyclonales et des clones sur les mutants spontanés bm indique que leurs profils de réactivités sont différents (tableau 10). Les cases noires représentent une cytolyse supérieure à 50 %, une case hachurée, une cytolyse comprise entre 20 et 50 % et une case blanche une cytolyse inférieure à 20 %. Toutes les cellules de lignées et de clones sont cytotoxiques vis à vis des blastes de souris B6 ($H\text{-}2K^b$) et non vis à vis des blastes de souris B10BR ($H\text{-}2K^k$). Les cellules du mutant spontané bm8 ne sont lysées que par la lignée KB5 et le clone KB5-C1. On observe une réactivité sur les blastes issus de bm3, bm5 et bm6 pour toutes les cellules des lignées et des clones à l'exception de KB5-C1 qui est incapable de lyser ces trois cibles. Les blastes de la souris bm1 ne sont pas lysés par la lignée BM et KB5 ainsi que par quat quatre clones issus de la lignée BM et les clones issus de KB5. Cinq clones de BM sont capables de lyser les blastes de souris mutantes bm1. Enfin toutes les cellules des lignées et des clones sont capables de lyser les blastes bm4 avec un effet moindre pour les clones KB5-C1 et KB5-C20.

Ces tests de cytotoxicité confirment la spécificité $H\text{-}2K^b$ de ces deux lignées et des clones, cependant les réactivités distinctes de clone à clone sur les mutants spontanés $H\text{-}2\underline{K}^{bm}$ révèlent l'hétérogénécité des populations T spécifiques de $H\text{-}2K^b$. Ainsi, un certain nombre de clones issus de la lignée BM sont capables de lyser les cellules bm1 alors que la lignée en est incapable. Ces cellules cytolytiques vis à vis de bm1 devraient se trouver en minorité au sein de la lignée BM et ont été révélées lors du clonage.

D'autre part, les mutations bm3, bm4, bm5 et bm6 ne semblent pas introduire de modifications importantes au niveau de la molécule K^b du point de vue de la reconnaissance par les cellules T alors que du point de vue de la reconnaissance par les Acm (tableau 4) la mutation bm3 semble assez drastique pour la reconnaissance par des Acm qui reconnaissent le domaine $\alpha 1$ ainsi que la mutation bm4 pour la reconnaissance par des Acm qui reconnaissent le domaine $\alpha 2$.

Cette analyse de réactivité permet de mettre en évidence une absence de réactivité sur les cellules bm1 ($\alpha 2$) et bm8 ($\alpha 1$) simultanément pour la moitié des clones T étudiés. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par SHERMAN (172, 174), MELIEF (119) et ALBERT (1) ; c'est-à-dire que dans l'analyse de la fréquence des cellules T capables de reconnaître $H\text{-}2K^{bm}$ on remarque le plus

Tableau N° 11

REACTIVITE DE DEUX POPULATIONS DE CTL PRIMAIRES SUR LES VARIANTS ISSUS DE LA LIGNEE R8

		POPULATION DE CTL PRIMAIRES	
	R8 VARIANT	CBAxBALB/c α B10.A(5R) α H-2K^b	B10.A(5R) α CB20 α H-2K^d
	R8	100	100
	R8	100	100
	125	91	86
	24	70	93
α1	246	102	75
	208	32	59
	136	89	85
	187	72	87
	313	63	82
	205	69	67
α1/α2	37	81	76
	44	55	105
	8	109	102
	9	143	146
α2	26	68	NT
	70	56	75
	10	31	105
	14	71	115
?	127	75	89
	103	0	86
	150	0	75

Légende : Les chiffres indiquent le % d'activité cytolytique par rapport au témoin positif (100 %) qui est représenté par la lignée R8

souvent l'absence de réactivité sur bm1 et bm8. La mutation bm8 porte sur les acides aminés 23 et 24 du domaine α 1 et la mutation bm1 sur les acides aminés 152 155 et 156 du domaine α 2. En absence de notions précises sur la structure tridimentionnelle de la molécule H-2K^b il est impossible de savoir si ces deux mutations dans les domaines α 1 et α 2 respectivement pourraient entraîner un même changement de conformation au niveau de la molécule K^b qui affecterait la reconnaissance par un grand nombre de clones T.

Après avoir défini les différents paramètres utiles pour notre étude, il est possible maintenant d'étudier les déterminants de la molécule K^b reconnus par les cellules T sur les variants R8.

C) Utilisation des variants de structure de la lignée R8 comme cibles pour les CTL

1) Pour une population totale anti H-2K^b ou anti H-2K^d

Dans un premier temps nous avons testé l'activité de CTL primaires anti-H-2K^b sur les différents variants issus de la lignée R8 (H-2^b x H-2^d). Les résultats sont portés tableau 11. A la vue de ces résultats aucune différence significative n'est mise en évidence. Tous les variants de la lignée R8 sont reconnus par la population cytotoxique dirigée contre la molécule K^d qui représente un contrôle positif. Tous les variants, à l'exception des deux variants R8-103 et R8-150 qui ne présentent plus la molécule K^b à la surface membranaire, sont reconnus par la population CTL primaire dirigée contre la molécule K^b.

Ceci n'est pas étonnant quand on sait qu'une population cellulaire de ce type contient un nombre important de clones cellulaires différents qui peuvent reconnaître des déterminants différents au niveau de la molécule K^b. A la vue de ces résultats il s'est avéré nécessaire de faire une étude plus approfondie en utilisant non pas une population totale et hétérogène mais en utilisant des clones cellulaires bien définis.

2) Pour deux clones cytolytiques différents anti-H-2K^b

Deux clones cellulaires (KB5 C20 et BM1-5)de spécificités fines différentes ont été utilisés. Les résultats obtenus sont portés tableau 1[illegible]. Ils montrent des différences significatives de reconnaissance pour certains variants R8.

Tableau N° 12

REACTIVITE DE DEUX CLONES CYTOLYTIQUES SUR LES VARIANTS ISSUS DE LA LIGNEE R8

	R8 VARIANT	KB5 C20	BM 1-5
	R8	100	100
α1	125	* 34	125
	24	39	73
	246	68	112
	208	46	8
	136	137	75
	187	75	76
	313	12	43
α1/α2	205	73	54
	37	75	81
	44	14	83
α2	8	95	75
	9	73	75
	26	75	93
	70	133	77
	10	4	0
?	14	71	75
	127	10	116
	103	0	0
	150	0	0

Légende : * Les chiffres indiquent le % d'activité cytolytique par rapport au témoin positif (100 %) qui est représenté par la lignée R8

Les chiffres soulignés deux fois sont considérés comme négatifs (< 20%)

Les chiffres soulignés une fois sont considérés comme faibles (compris entre 20 et 50%)

Le clone KB5-C20 ne lyse pas le variant R8-313 (variant qui n'est plus reconnu par un Acm dont le déterminant antigénique se trouve dans le domaine α 1) R8-44 (α 1/α 2), R8 10 (α 2) et enfin R8-127 (variant qui n'est plus reconnu par l'Acm Y3 dont le déterminant antigénique n'a pas encore pu être situé au niveau de la molécule K^b).

Le clone BM1-5 ne lyse ni R8-208 (α 1) ni le variant R8-10 (α 2).

Cette étude faite sur deux clones permet de dégager les variants de R8 qui semblent avoir une altération de la molécule K^b telle que celle-ci n'est plus reconnue par les clones cytolytiques. Ces variants vont servir de cibles pour une série de clones plus étendue.

3) Réactivité de onze clones CTL spécifiques de H-$2K^b$ vis à vis de six variants de la lignée R8

Les clones cellulaires utilisés sont issus soit de la lignée BM soit de la lignée KB5. Les activités cytolytiques de ces différents clones sur les six variants sélectionnés sont portés tableau 13. Sont portés également sur ce tableau les résultats d'activité cytolytique de ces différents clones sur une cellule mutante bm1. De plus la réactivité sur bm1 nous a permis de classer ces clones en deux séries. Les cinq premiers clones indiqués sur le tableau sont capables de lyser la cellule portant H-$2K^{bm1}$ alors que les six autres en sont incapables.

A partir de ce tableau 15 plusieurs observations peuvent être faites. Le clone KB5-C1 ne reconnait aucun variant de R8 ni bm1. Le variant R8-208 n'est plus reconnu ni par le clone BM1-5, ni par le clone BM2-22. Ce dernier présente pourtant le même profil de réactivités cytotoxiques vis à vis des cellules mutantes K^{bm} que les trois clones BM2-6, BM2-3 et BM2-20 qui eux sont capables de lyser R8-208. Les mêmes profils de réactivités des clones sont observés pour les variants R8-313 et R8-44. C'est-à-dire qu'ils sont très bien lysés par les clones issus de BM et non par les clones issus de KB5. La réactivité des clones sur le variant R8-10 permet de distinguer deux groupes de clones T avec des réponses du tout ou rien. Il est à noter que les clones qui sont incapables de lyser les cellules mutantes exprimant H-$2K^{bm1}$ sont aussi incapables de lyser le variant R8-10 à l'exception de BM1-5.

Tableau N° 13

REACTIVITE DES CLONES CTL SPECIFIQUES DE H-2K^b VIS A VIS DE VARIANTS DE LA LIGNEE R8

CLONES SPECIFIQUES de K^b	VARIANTS						
	208/R8	313/R8	44/R8	10/R8	14/R8	127/R8	bml/R8
BM 1-5	[3]	43	83	[0]	75	116	46
BM 2-2	113	84	97	110	NT	79	73
BM 2-9	81	81	90	92	NT	82	74
BM 2-12	87	72	94	94	NT	75	33
BM 2-17	83	78	97	96	NT	81	44
BM 2-3	87	80	92	[6]	104	49	[10]
BM 2-6	88	70	84	[17]	83	35	[13]
BM 2-20	97	68	88	[3]	92	55	[6]
BM 2-22	[5]	77	87	[12]	93	49	[4]
KB5 C1	NT	NT	[0]	[0]	[0]	[0]	[4]
KB5 C20	46	[12]	[14]	[4]	71	[10]	[0]

Légende : Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité cytolytique vis à vis de R8 pour les variants qui sont issus de cette lignée et vis à vis de B6 pour le mutant spontané bml.

[x] : % d'activité cytolytique < 20 %

x : % d'activité cytolytique compris entre 20 et 50 %

Le variant R8-14 est reconnu par tous les clones testés à l'exception de KB5-C1. Le variant R8-127 n'est plus reconnu par KB5-C20, partiellement reconnu par quatre clones issus de BM (BM2-3, BM2-6, BM2-20, BM2-22) et bien lysé par tous les autres clones testés.

4) Discussion

Avant d'analyser les réactivités des cellules T sur les différents variants on peut dire que tous les variants de R8 sont lysés par une population CTL spécifiques de H-2K^d et que tous les clones utilisés pour notre étude sont spécifiques de la molécule K^b. Les deux variants R8-103 et R8-150 qui ont perdu l'expression membranaire de la molécule K^b ne sont plus reconnus par des CTL anti-K^b mais sont très bien lysés par des CTL anti-K^d.

Par la comparaison de la réactivité des Acm (tableau 6) avec la réactivité des deux clones CTL (tableau 12) sur l'ensemble des variants de R8, on observe que ce sont généralement les variants affectés pour la fixation d'Acm (RFI faible) qui ne sont plus reconnus soit par l'un, soit par les deux clones testés. Si la molécule K^b présente une structure altérée telle que la plupart des Acm ne s'y fixent plus ou encore si cette molécule se trouve exprimée à un taux peu élevé au niveau de la membrane cellulaire de ces variants, ces derniers ne seront plus reconnus par certains clones cytolytiques.

A l'exception de cette observation générale, aucune corrélation ne peut être formulée en ce qui concerne la perte d'un déterminant sérologique particulier et la perte de reconnaissance par des clones cytolytiques. On peut remarquer cependant que les six variants qui ont retenu notre attention parce qu'ils n'étaient plus lysés par l'un ou l'autre des clones CTL testés précédemment ont tous une molécule K^b altérée au niveau des épitopes reconnus par les Acm Y3 et 5F, et eux seuls. D'après les travaux d'HAMMERLING (68), 5F1 reconnaîtrait un épitope du second domaine de la molécule. Cet Acm ne reconnaît plus les molécules mutantes H-2K^{bm1} et H-2K^{bm4}. Les épitopes reconnus par Y3 n'ont pas encore été définis.

D'autres exemples montrent que CTL et Acm sont sensibles à des variations distinctes de structure de la molécule H-2K^b. Ainsi les variants R8-313 et R8-208 qui sont immunosélectionnés avec le même Acm l'un n'est plus reconnu par

le clone KB5-C20 et l'autre par le clone BM1-5. Pourtant, quand on regarde les RFI obtenus avec ces deux variants on remarque qu'ils ont le même profil sérologique. Les deux variants R8-44 et R8-10 qui présentent une molécule K^b altérée au point que la réactivité de tous les Acm testés se trouve diminuée, ne sont pas lysés de façon identique par les deux clones testés. R8-10 n'est plus reconnu par les deux clones cytolytiques alors que R8-44 est encore très bien lysé par le clone BM1-5. La même remarque peut être faite pour les deux variants R8-14 et R8-127 immunosélectionnés avec le même Acm et présentant le même profil sérologique mais R8-127 seulement n'est plus reconnu par le clone KB5-C20. Par ailleurs les variants qui ne semblent pas trop affectés du point de vue de la reconnaissance par les Acm sont très bien lysés par les deux clones KB5-C20 et BM1-5.

Quand on étudie la réactivité d'un plus grand nombre de clones sur les six variants sélectionnés R8-208, 313, 44, 10, 14 et 127 (tableau 13) et que l'on compare les résultats obtenus avec les valeurs de RFI pour différents Acm sur ces mêmes variants (tableau 6) les remarques suivantes peuvent être faites.

La réactivité du clone BM2-22 sur R8-208 est tout à fait surprenante. Ce clone a exactement les mêmes spécificités que les clones BM2-3, BM2-6 et BM2-20 sur les mutants K^{bm} et pourtant à l'exception de tous les autres il est incapable de lyser R8-208.

Les variants R8-313, 10 et 44, sont tous les trois fortement affectés du point de vue de la reconnaissance par les Acm. Ils ont des RFI en général faibles ou nuls. Ce qui n'empêchent pas que tous les clones issus de BM lysent les deux variants R8-313 et 44. Donc même si la plupart des Acm ne réagissent plus, ou faiblement avec la molécule H-$2K^b$ altérée de ces deux variants, la réactivité des cellules T est peu affectée par ces modifications. Cette observation met en évidence l'existence de déterminants antigéniques différents au niveau de la molécule K^b selon qu'ils interviennent dans les interactions avec des cellules T ou des Acm. Le variant R8-10 est reconnnu par les clones cytolytiques qui sont capables de lyser les cellules mutantes bm1 à l'exception du clone BM1-5. Pourtant le profil sérologique de bm1 est différent de celui de R8-10. Le variant R8-10 n'est plus reconnu par les Acm dont les épitopes se trouvent dans les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule K^b alors que le mutant bm1 dont la mutation ne porte que sur trois acides aminés du domaine α 2 est toujours reconnu par les Acm qui se fixent au domaine α 1 de la molécule K^b.

Il semblerait que cette mutation bm1 soit généralement assez drastique pour la reconnaissance par les CTL. En effet les travaux de MELIEF (119) semblent montrer que l'épitope de la molécule K^b altérée par la mutation bm1 semble indispensable pour la reconnaissance non seulement par les CTL alloréactives mais également par des CTL H-2 restreintes. On pourrait penser que la mutation induite au niveau de la molécule K^b de R8-10 soit aussi drastique que bm1.

Les variants R8-14 et R8-127 ont un profil sérologique à peu prés identique à l'exception de l'Acm 5F1 qui se fixe mieux sur R8-14 que sur R8-127, et pourtant la réactivité des clones cytolytiques est différentes sur ces deux variants. Le variant R8-127 n'est plus reconnu par KB5-C20 et est partiellement reconnu par les clones issus de BM qui sont incapables de lyser le mutant bm1.

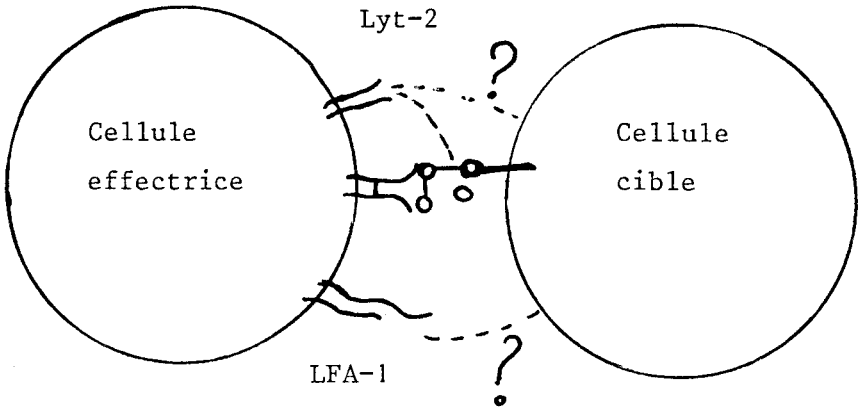
Donc les comparaisons entre les variants reconnus par les Acm et par les CTL laissent prévoir que les déterminants de la molécule K^b reconnus dans les deux cas sont différents. Tout récemment, les travaux de ALLEN (4) sur les cellules L($H\text{-}2^k$) exprimant après transfection au moyen de gènes hybrides des molécules hybrides de classe I entre la molécule K^b et D^b on aboutit aux résultats suivants.

Une cellule L qui exprime le premier domaine de K^b et les autres domaines de D^b (K^{b1}/D^b) est reconnue par les Acm anti-K^b qui se fixent aux épitopes du domaine α 1 de la molécule maisn'est pas lysée par des clones cytolytiques dirigés contre la molécule K^b. La même remarque est faite pour la cellule L qui exprime l'hybride (D^{b1}/K^b), c'est-à-dire que des Acm dirigés contre le domaine α 2 de la molécule K^b reconnaissent cette molécule hybride, mais des CTL anti-K^b sont incapables de lyser cette cellule. Par contre ces mêmes CTL sont capables de lyser les cellules L quand elles expriment soit la molécule K^b native, soit la molécule hybride possédant les deux premiers domaines K^b (K^{b1+2}/D^b). D'après ces résultats on peut également conclure que la majorité des déterminants reconnus par les Acm sont différents des déterminants reconnus par les CTL.

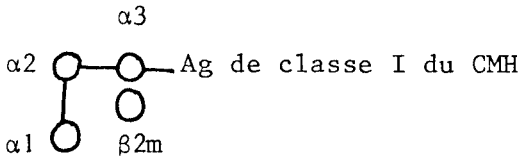
L'ensemble des résultats obtenus sur les variants R8 et sur les cellules L semblent montrer que la plupart des Acm reconnaissent un déterminant plus ponctuel formé de quelques acides aminés alors que la majorité des CTL reconnaissent des déterminants conformationnels obtenus à partir des deux premiers domaines de la molécule K^b. Ce changement de conformation pourrait être obtenu par la mutation d'un acide aminé n'appartenant pas à un déterminant reconnu par un Acm.

Figure N° 21

Schématisation de l'interaction effecteur-cible



Légende Récepteur spécifique de l'Ag



Par ailleurs, l'interaction d'un Acm avec les molécules du complexe H-2 présenté à la surface d'une cellule peut être étudiée. Le taux de fixation d'un Acm est fonction : 1) du nombre de sites actifs (1 ou 2) sur l'Acm capable de réagir avec l'antigène, 2) de la densité de déterminants antigéniques présents à la surface de la cellule et 3) de l'affinité de cet Acm pour son épitope . Cette affinité changera suivant que l'épitope de la molécule est plus ou moins altéré et peut être mesurée par des études de SCHATCHARD

Par contre, il n'existe pas de formule pour mesurer l'affinité entre cellules effectrices et cibles car le système de reconnaissance est beaucoup plus complexe que celui qui fait intervenir un anticorps (deux sites actifs) et un antigène H-2. Sur la figure 21 sont schématisées les interactions possibles qui peuvent intervenir entre un effecteur et une cible. Tout d'abord, le récepteur spécifique de l'Ag H-2 probablement formé de deux chaînes α et β peut intervenir dans la surface d'interaction entre l'effecteur et la cible. Ce récepteur peut interagir avec plusieurs molécules H-2 mais le nombre de molécules intervenant dans ces interactions n'est pas connu.

Par ailleurs, les travaux de plusieurs groupes (109) ont montré que d'autres glycoprotéines distinctes du récepteur spécifique de l'antigène participaient dans la stabilisation des intéractions entre effecteur et cible initiée par la reconnaissance antigène-récepteur spécifique. Pour les CTL de phénotype Lyt 2^+ $T4^-$, la molécule Lyt-2 interviendrait plus particulièrement pour les cellules dont les interactions spécifiques sont de "faibles affinité" (109). Le site d'intéraction de la molécule Lyt-2 avec la cible pourrait être sur un domaine non polymorphe de la molécule H-2 (le domaine $\alpha 3$ de la molécule K^b) de la cible, bien que ce point n'ait pas été démontré. Une autre molécule, LFA-1 (32) de la cellule effectrice interviendrait également dans la stabilisation de l'intéraction. La structure avec laquelle cette molécule pourrait interagir sur la cible n'est pas connue.

Afin d'évaluer si des différences "d'affinité" dans les intéractions entre les récepteurs spécifiques des CTL et les molécules H-$2K^b$ altérées des variants de R8, pouvaient être observées, nous avons fait deux types d'expérience. Les premières consistent à comparer les efficacités de compétition entre différentes cibles froides et une même cible radiomarquée. Les secondes utilisent les Acm

COMPETITION ENTRE CIBLES "FROIDES ET CIBLES "CHAUDES POUR LEUR INTERACTION AVEC

LE CLONE BM2-17

Figure N° 22 cible "chaude" R8

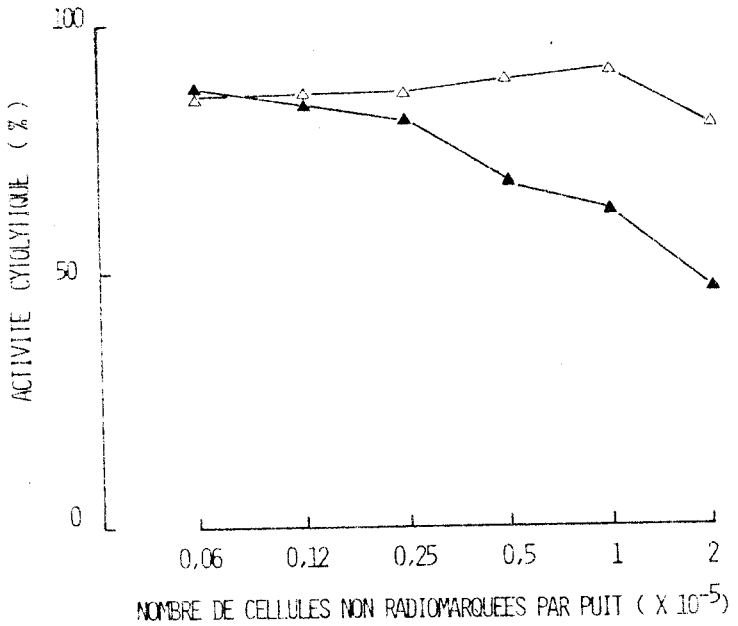
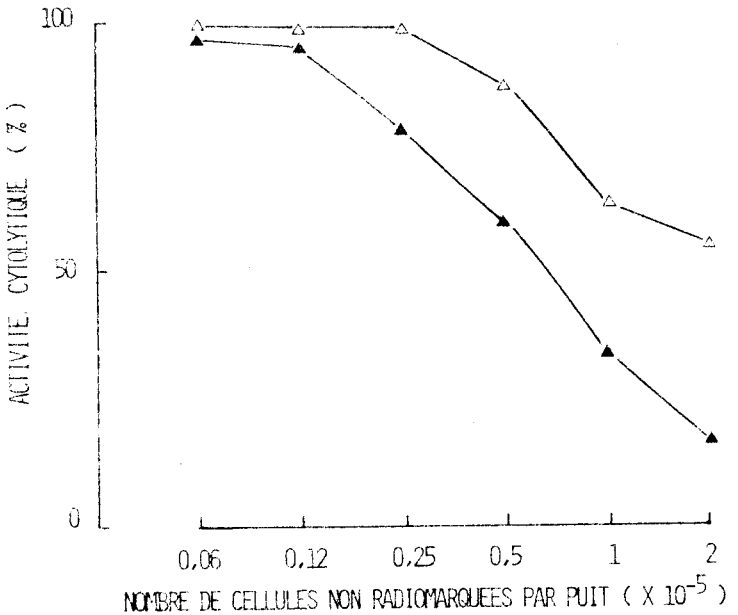


figure N° 23 cible "chaude R8-10



Légende : ▲ cible "froide" R8
△ cible "froide" R8-10

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité cytolytique obtenu en présence du clone BM2-17.
Le cent pour cent étant donné par le relargage de ^{51}Cr par le clone BM2-17 en présence de cellules "chaudes" seulement.

anti-Lyt-2 et anti LFA-1 dans des comparaisons de leur capacité à bloquer les intéractions entre un effecteur CTL et différentes cibles.

D) ANALYSE DES INTERACTIONS EFFECTEURS-CIBLES DANS LE CAS DU VARIANT R8-10

Dans un premier temps nous avons voulu comparer les affinités relatives du clone BM2-17 pour les cibles R8-10 et R8. Dans un second temps nous avons voulu tester si des intéractions entre effecteurs et cibles faisant intervenir des produits autre que le récepteur des cellules T sur l'effecteur et l'Ag H-2 sur les cibles pouvaient être mises en évidence en utilisant des Acm pendant la phase d'intéraction cytolytique.

1) Etude de l'affinité du clone BM2-17 pour les cellules cibles R8 et R8-10

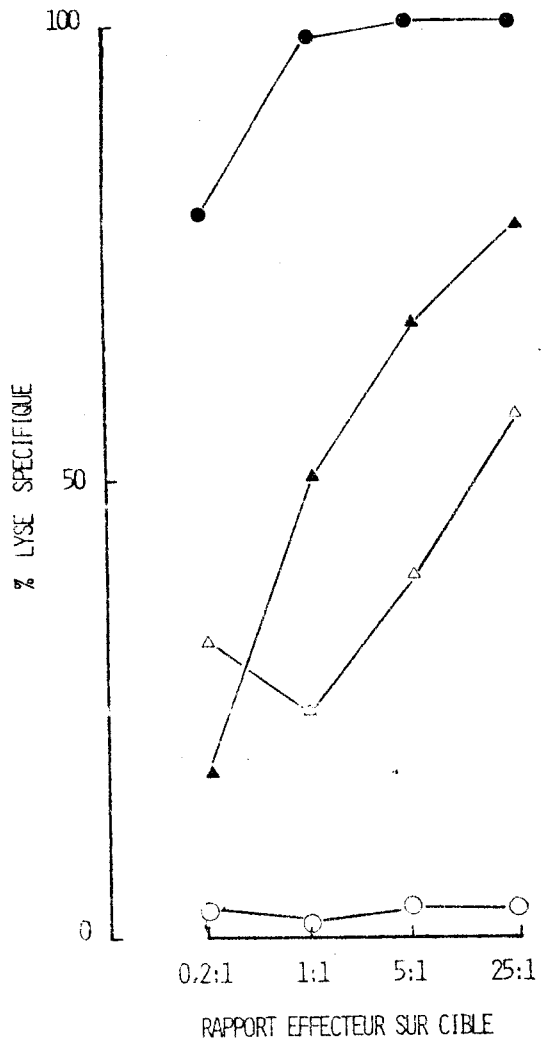
Le pourcentage d'activité cytolytique obtenu avec le clone BM2-17 sur les deux cibles R8 et R8-10 est identique nous pouvons à partir de ce matériel étudier les "affinités" relatives de l'effecteur pour sa cible. Pour se faire nous utilisons un test d'inhibition de la cytolyse en préincubant les cellules effectrices avec des cibles non marquées au ^{51}Cr. Après 10 mn on ajoute les cibles marquées au ^{51}Cr. on mesure ainsi la compétition entre cibles "froides" et cibles "chaudes" pour leur intéraction avec les CTL. Les résultats obtenus avec la cible R8 marquée au ^{51}Cr et déplacée par les cibles"froides" R8 et R8-10 sont représentés figure 22. Les résultats obtenus avec la cible R8-10 marquée au ^{51}Cr et déplacée par les cibles froides R8 et R8-10 sont portés figure 23.

Dans les deux figures 22 et 23, en abscisse sont portés les nombres de cellules "froides" ajoutées par puits pour 2 x 10^4 cibles "chaudes et en ordonnée le pourcentage d'activité cytolytique obtenu en présence du clone BM2-17. Le cent pour cent étant donné par le relargage de ^{51}Cr par le clone BM2-17 en présence de cellules "chaudes" seulement.

Dans la figure 22, nous remarquons qu'il est plus facile de déplacer la fixation du clone BM2-17 sur R8 * par la cellule R8 homologue non marquée que par la cellule R8-10.

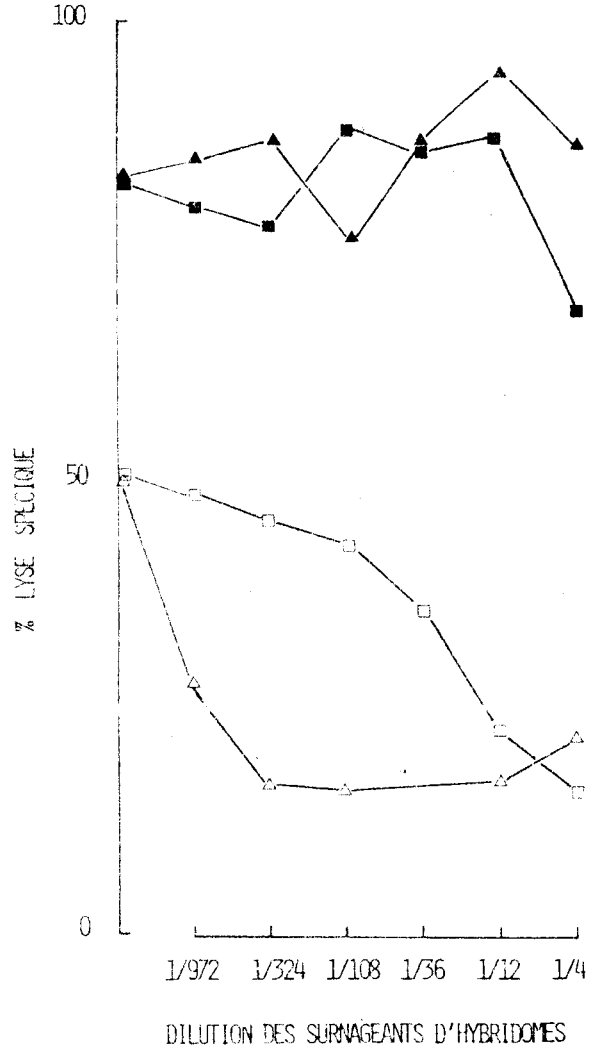
Dans la figure 23 le pourcentage de cytolyse de l'effecteur BM2-17 sur R8-10 * est inhibé beaucoup plus facilement quand on ajoute les cellules "froides" R8 que R8.10.

Figure N° 24 Lyse spécifique du clone BM3-3



égende : ● tumeur EL 4 ($H\text{-}2K^b$)
○ cellule L ($H\text{-}2K^k$)
▲ R8
△ R8-10

Figure N° 25 Inhibition de la cytolyse par les Acm αLyt-2 et αLFA-1



Légende : ▲ R8 + Acm αLyt-2
■ R8 + Acm αLFA-1
△ R8-10 + Acm αLyt-2
□ R8-10 + Acm αLFA-1

2) Etude de l'intéraction entre le clone BM3-3 et les cellules cibles R8 et R8-10

Après avoir étudié le pourcentage de lyse spécifique obtenu avec le clone BM3-3 sur les deux cellules cibles R8 et R8-10 nous allons par un test d'inhibition de la cytolyse étudier l'effet d'un Acm dirigé contre le marqueur Lyt-2 et d'un Acm dirigé contre le marqueur LFA-1.

Dans la figure 24 en abscisse est représenté le rapport effecteurs/cibles et en ordonnée. Le pourcentage de lyse spécifique obtenu avec le clone BM3-3. Un témoin positif de lyse est obtenu avec une cellule tumorale EL4 présentant la molécule K^b à sa surface membranaire. Un témoin négatif de lyse est obtenu en prenant comme cible une cellule "L" exprimant la molécule D^b à sa surface. Nous remarquons que le pourcentage de lyse par le clone BM3-3 est plus fort sur la cellule cible R8 que sur R8-10.

Dans la figure 25 sont représentés les tests d'inhibition de la cytolyse par des Acm αLyt-2 et α LFA-1. En abscisse on représente la dilution des surnageants d'hybridomes contenant au départ envirion 10 µg/ml d'Acm et en ordonnée le pourcentage de lyse par rapport à un témoin sans Acm par le clone BM3-3 sur les deux cellules cibles R8 et R8-10 pour un rapport effecteurs/cibles de 25 pour 1. L'Acm α Lyt-2 est H35-17.2 (57) et l'Acm LFA-1 est H35-89.9 (146

Nous remarquons que ni l'Acm α Lyt-2 ni l'Acm α-LFA-1 n'inhibent la cytolyse par BM3-3 sur R8 mais par contre ces deux Acm inhibent la cytolyse par le clone BM3-3 sur la cellule cible R8-10

3) Discussion

Les expériences d'inhibition dans les figures suggèrent que bien que la lyse spécifique des cellules R8 et R8-10 par le clone BM2-17 soit identique l'affinité de ce clone pour les deux cellules cibles n'est pas identique. L'affinité du clone BM2-17 pour la cellule R8 est plus grande que pour la cellule R8-10. Ces résultats obtenus avec les cellules effectrices vis-à-vis de leurs cibles sont à rapprocher des résultats obtenus avec un Acm vis à vis de déterminants présents sur deux cellules différentes. C'est-à-dire que le pourcentage de cellules fixant l'Acm au sein de deux populations clonées peut être le même mais l'affinité de cet Acm pour son épitope peut être différent. Cette différence nous est donnée dans ce cas par la valeur du RFI.

La figure montre qu'un Acm dirigé contre un déterminant de la cellule effectrice peut inhiber une cytolyse. En effet des Acm dirigés contre les marqueurs Lyt-2 et LFA-1 inhibent la cytolyse de R8-10 par le clone BM3-3 et non la cytolyse de R8 par ce même clone.

Ce résultat est à rapprocher de ceux obtenus par Mac DONALD (109) qui montre que le marqueur Lyt-2 semble intervenir dans la stabilisation des interactions effecteurs cibles de faible affinité. Dans notre cas nous voyons que l'affinité des effecteurs est probablement plus faible pour R8-10 que pour R8 · Si nous bloquons par un Acm le marqueur Lyt-2 présent à la surface des clones T ceci semble diminuer les forces d'intéractions entre l'effecteur et la cible comme le suggère la cytolyse moins efficace de R8-10 en présence de cet Acm.

Nous pouvons conclure que le récepteur spécifique de l'alloantigène sur les clones T n'est pas le seul à permettre l'intéraction entre un effecteur et une cible mais que des marqueurs non spécifiques comme Lyt-2 et LFA-1 peuvent également faciliter ces intéractions.

Dans le cas de l'intéraction entre effecteur CTL et cible une perte de réactivité d'un clone CTL sur un variant de H-2K^b et la réactivité résiduelle d'un autre clone CTL sur ce même variant ne signifient pas nécessairement que ces deux clones CTL réagissent avec des épitopes différents de la molécule H-2K^b ; en effet, on peut imaginer que pour un même récepteur "antigène - spécifique", il y aura perte de réactivité au non suivant (1) le nombre de ces récepteurs disponibles et (2) le nombre d'autres glycoprotéines de stabilisation disponibles sur l'effecteur. Ces hypothèses pourront être testées plus directement en modulant l'expression de récepteur - antigène - spécifique sur les clones CTL au moyen d'Acm dirigés contre ces structures et en développant des variants de clones CTL exprimant des taux différents de glycoprotéines Lyt-2 ou LFA-1.

Tableau N° 14

FIXATION DES Acm ANTI-K^b ET ANTI-D^b SUR LES MOLECULES

HYBRIDES DE CLASSE I K^b/D^b

	Fixation de l'Acm (en cpm d^{125} iode fixés) sur les lignées cellulaires K^b/D^b						
Localisation du déterminant reconnu	Acm	K^b	D^b	D^{b1}/K^b	K^{b1}/D^b	D^{b1+2}/K^b	K^{b1+2}/D^b
$I\text{-}A^k$	10.2.16	291 (12)	276 (20)	235 (10)	232 (40)	258 (24)	201 (11)
K^k	11.4.1	2856 (120)	2432 (102)	2630 (98)	2628 (96)	2453 (140)	2812 (82)
K^{b2}	K9-178	2496 (112)	236 (21)	1048 (51)	331 (12)	204 (24)	3793 (121)
K^{b1}	20.8.4	2348 (102)	138 (50)	251 (12)	1486 (96)	256 (19)	2952 (88)
D^{b3}	28.14.8	246 (31)	3840 (120)	196 (21)	2646 (128)	148 (23)	2976 (96)
D^{b1}	B22.249.1	210 (13)	2644 (167)	968 (15)	198 (10)	1832 (96)	231 (21)

Légende: Les chiffres entre parenthèses indiquent les ecarts types.

II ETUDE DE L'ENDOCYTOSE DES MOLECULES H-2 DE CLASSE I MUTEES

A) OBTENTION ET CARACTERISATION SEROLOGIQUE DE MOLECULES HYBRIDES DE CLASSE I

Les molécules hybrides de classe I sont obtenues après manipulation génétique. Les exons provenant des gènes codant pour les molécules K^b et D^b permettent la contraction de ces gènes hybrides qui sont transfectés par la suite dans des cellules L ($H\text{-}2^k$). ALLEN et Coll. (4) ont établi six lignées de cellules L exprimant soit la molécule native D^b ou K^b soit les hybrides (voir figure 16) K^{b1}/D^b, D^{b1}/K^b, D^{b1+2}/K^b, K^{b1+2}/D^b.

Dans un premier temps nous avons testé la fixation d'Acm sur ces molécules hybrides (Tableau14). La fixation de l'Acm est révélée par la protéine A marquée à l'^{125} iode (la protéine A se fixe au fragment Fc des Ig G2a. Cette technique permet de déterminer le domaine de la molécule K^b ou D^b reconnu par les Acm. L'Acm 10.2.16 dirigé contre le déterminant de classe II $I\text{-}A^k$ ne se fixe pas aux cellules L ; il représente le témoin négatif. L'Acm 11.4.1 dirigé contre la molécule K^k par contre se fixe à toutes les cellules L ($H\text{-}2^k$) ; il représente notre témoin positif.

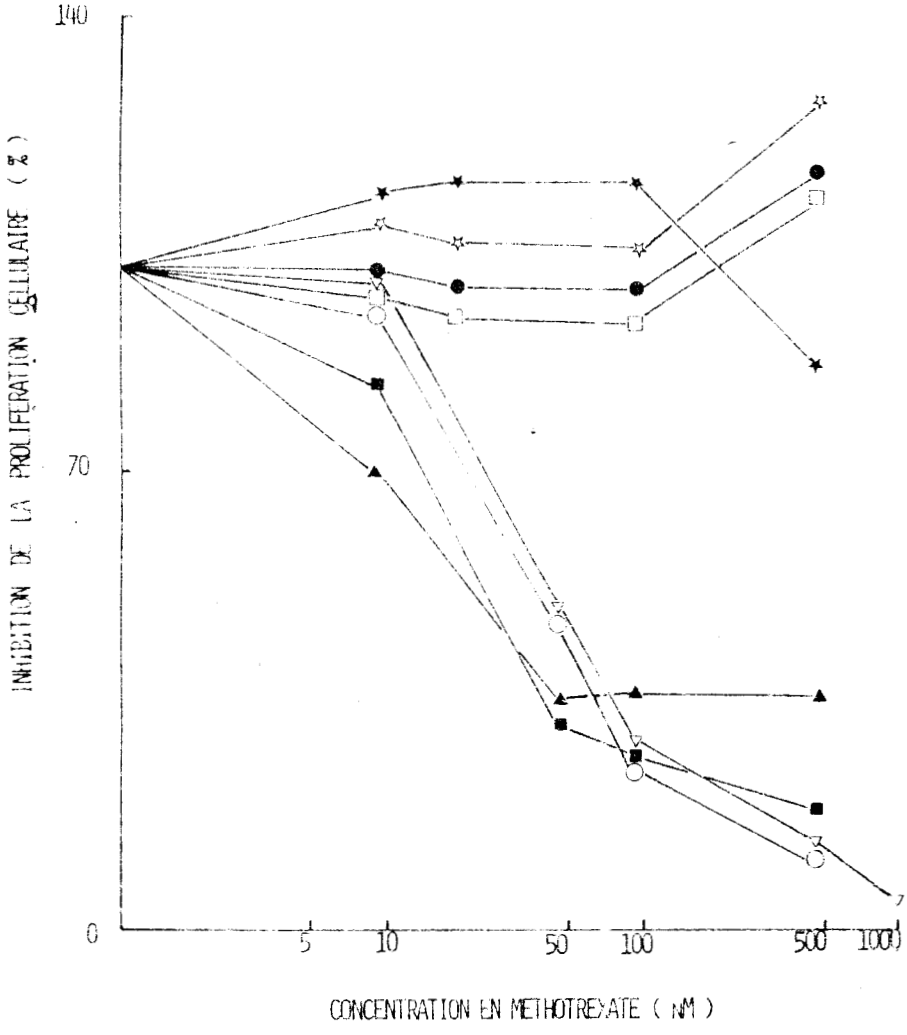
Les Acm K9-178 et 20.8.4 sont dirigés respectivement contre les domaines α 2 et α1 de la molécule K^b. Les Acm 28.14.8 et B22.249.1 sont dirigés respectivement contre les domaines α3 et α 1 de la molécule D^b.

Dans ce tableau nous pouvons remarquer que la fixation de l'Acm intervient dès que le domaine reconnu par cet Acm est présent au sein de la molécule hybride de classe I. Pour les Acm dirigés contre la molécule K^b il faut que les deux premiers domaines de la molécule soient présents pour que la fixation soit égale à celle obtenue sur la molécule native. La même remarque peut être faite pour B22.249.1 il se fixe bien sur la molécule native D^b, un peu moins sur l'hybride D^{b1+2}/K^b et encore un peu moins sur la molécule hybride D^{b1}/K^b, mais néanmoins il y a toujours fixation de l'Acm.

Après cette étude de fixation des différents Acm sur ces hybrides de classe I nous pouvons étudier l'endocytose de ces molécules H-2 hybrides.

Figure N° 26 : Internalisation des molécules de classe I mutées

Inhibition de la prolifération cellulaire d'une cellule L exprimant une molécule D^b



Les résultats sont exprimés en pourcentage d'incorporation de ^3H déoxyuridine par rapport à une cellule incubée sans inhibiteur

Légende : ✱- K7-67 (Acm αH-$2K^b$) ▲- 28.14.8 (Acm α H-$2D^b$)

☆- 20.8.4 (Acm αH-$2K^b$) ■- 11.4.1 (Acm α H-$2K^k$)

□- Liposome seul ▽- B22.149.1 (Acm α H-$2D^b$)

●- 10.2.16 (Acm α I-A^k) ○- MTX libre

B) ETUDE DE L'INTERNALISATION DES MOLECULES DE CLASSE I MUTEES

L'étude de l'internalisation des molécules hybrides K^b/D^b est faite grâce aux liposomes auxquels on a couplé la protéine A (voir Matériels et Méthodes). Ces liposomes renferment un inhibiteur de la prolifération cellulaire le méthotrexate (MTX). Les cellules hybrides sont incubées dans un premier temps avec différents Acm capables ou non de se fixer à la molécule K^b ou D^b. Dans un second temps on ajoute soit du MTX libre à des concentrations variables soit des liposomes - Protéine A renfermant du MTX. Lors de l'internalisation des molécules K^b/D^b, les liposomes fixés sur l'Acm par l'intermédiaire de la protéine A vont se retrouver dans le cytoplasme cellulaire.

Dans la figure est représentée, en abscisse la concentration de MTX (en nM) ajoutée dans les puits de culture que se soit à l'état libre ou encapsulée dans les liposomes, en ordonnée le pourcentage de prolifération cellulaire donné par rapport à une cellule incubée sans inhibiteur. Pour chaque Acm on obtient une courbe d'inhibition de prolifération. La cellule testée sur cette figure est une cellule témoin qui présente la molécule D^b native. On remarque que l'Acm irrelevant 10.2.16 (α I-A^k), les liposomes seuls, et les Acm dirigés contre la molécule K^b sont sans effet sur la prolifération cellulaire. Par ailleurs, le MTX libre, l'Acm anti-H-2^k (11.4.1) et les deux Acm dirigés contre la molécule D^b ont un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire. Donc pour chaque cellule testée et chaque Acm une courbe d'inhibition de la prolifération cellulaire est établie. Pour la simplification des résultats ces derniers seront résumés dans le tableau où l'on indique la concentration en MTX nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition de l'incorporation de (31.1) déoxyuridine (voir exemple sur la figure 26).

Dans ce tableau 15 nous remarquons que toutes les cellules L sont sensibles aux MTX libre. Les liposomes contenant du MTX, incubés seuls en présence des cellules n'ont aucun effet sur l'incorporation de déoxyuridine. Ceci correspond au fait qu'il n'y a pas relargage du MTX incorporé dans ces liposomes et que s'ils ne sont pas ciblés au moyen des Acm, les liposomes ne sont pas internalisés par ces cellules. Ceci est confirmé par l'absence d'effet inhibiteur en présence de liposomes - PA et d'un Acm contrôle (10.2.16 anti-I-A^k). Pour les autres Acm α H-$2K^b$ et α H-$2D^b$ la diminution d'incorporation de déoxyuridine suit le tableau de la fixation des Acm sur les cellules L. C'est-à-dire que dès que l'Acm est

Tableau N° 15

MESURE DE LA QUANTITE DE MTX EN mM FINAL PAR PUITS POUR OBTENIR 50 % D'INHIBITION DE L'INCORPORATION DE d (H^3) déoxyuridine.

Molécules hybrides exprimées sur les cellules L	MTX Libre	Liposomes seuls	10-2-16 $\alpha I\text{-}A^k$	11-4-1 αK^k	K9 178 αK^{b2}	20-8-4 αK^{b1}	28-14-8 αD^{b3}	B22-249-1 αD^{b1}
K^b	30	> 500	> 500	35	62	59	> 500	> 500
D^b	45	> 500	> 500	28	> 500	> 500	25	45
D^{b1}/K^b	80	> 500	> 500	50	110	> 500	> 500	90
K^{b1}/D^b	30	> 500	> 500	90	> 500	70	60	> 500
D^{b1+2}/K^b	110	> 500	> 500	70	> 500	> 500	> 500	80
K^{b1+2}/D^b	50	> 500	> 500	70	68	37	110	> 500

apable de se fixer sur la cellule ceci entraîne une incorporation de MTX par l'intermédiaire des liposomes -PA et ainsi une inhibition de la prolifération cellulaire.

On peut remarquer que quelles que soient les molécules hybrides exprimées à la surface des cellules L, l'internalisation de ces glycoprotéines se fait de la même façon. Les différences de concentrations de MTX entraînant une inhibition de 50 % de l'incorporation de déoxyuridine sont négligeables et non significatives. Ces résultats vont dans le même sens que ceux exposés par SEIDMAN (133) qui montre que le "Capping" des molécules de classe I (L^d dans ce cas) n'est pas affectée par l'élimination de la partie intracytoplasmique de la molécule. Dans notre cas nous pouvons dire que l'internalisation des molécules hybrides a lieu mais nous ne pouvons pas savoir si les cinétiques d'internalisation des différentes molécules sont les mêmes. Parmi les différences de structure entre les molécules H-$2K^b$ et H-$2D^b$, on peut remarquer la présence d'un troisième site de glycosylation au niveau du domaine α 3 de D^b. Ce site de glycosylation supplémentaire ne semble pas modifier la capacité de ces molécules à être internalisées.

Une molécule hybride composée des domaines α1 et α2 de H-$2K^b$ reliés aux domaines transmembranaire et intracytoplasmique en l'absence de domaine α3 décrite par ALLEN (communication personnelle) semblait particulièrement intéressante dans l'analyse du rôle possible du domaine α3 dans l'endocytose des molécules de classe I. Cependant il nous a été impossible de mettre en évidence la présence des domaines α1 et α2 sur les cellules que nous avons reçues. La question de savoir si une molécule de classe I peut avoir une expression membranaire en l'absence du domaine α3 n'est donc pas définitivement résolue.

CONCLUSIONS

CONCLUSION

La mutagénèse chimique de la lignée R8 qui altère la molécule K^b exprimée à la surface membranaire peut affecter précisément le site de reconnaissance de la cellule T sur la molécule K^b ou encore peut entraîner une modification de la conformation de la molécule K^b (par modification des charges, annulations de liaisons faibles) qui ne permet plus la reconnaissance par la cellule T. A la vue des différents résultats obtenus lors de l'étude de la reconnaissance de la molécule K^b altérée soit par les Acm soit par les clones T plusieurs conclusions peuvent être faites.

Les variants de R8 sélectionnés présentent des mutations au niveau des domaines externes $\alpha 1$ ou et $\alpha 2$ de la molécule K^b. L'étude des épitopes sérologiques montrent que les mutations au niveau de la molécule K^b peuvent changer la structure d'une région antigénique particulière de la molécule sans perturber les autres régions antigéniques permettant la fixation de certains des Acm spécifiques de H-$2K^b$. La plupart des Acm pourraient se fixer à un épitope formé de quelques acides aminés sur la molécule K^b.

Pour la définition des sites de reconnaissance de la molécule K^b par les CTL on a développé un certain nombre de clones T cytotoxiques. D'après les résultats obtenus avec ces CTL sur les mutants spontanés de la molécule K^b on peut dire que différents clones ont des spécificités fines différentes pour des déterminants de H-$2K^b$. Par exemple, un certain nombre d'entre eux sont capables de lyser des cellules mutantes K^{bm1} et d'autres non. A partir de ce matériel, il nous a été possible d'amorcer l'étude des sites de reconnaissance des CTL sur la molécule K^b en comparaison avec les épitopes reconnus par les Acm.

Parmi les variants R8 analysés différents profils sont apparus :

1) Il y a une majorité de mutations qui affectent sélectivement certains épitopes définis par des Acm, sans modifier la reconnaissance par la cellule T.

2) Quelques mutations affectent certains épitopes définis par des Acm et certains épitopes définis par les cellules T sans qu'il y ait identité des épitopes en cause.

3) Et enfin, une mutation semble affecter la fixation de la plupart des Acm et la réaction avec la plupart des cellules T à l'exception cependant d'une série de clones T.

Il semblerait, à la vue de ces résultats que les CTL alloréactifs anti-K^b ne reconnaissent pas les mêmes déterminants antigéniques que ceux qui sont définis par les Acm. Mais ces résultats ne nous permettent pas de définir précisément les sites d'interactions pour les CTL. De plus, il semblerait que l'étude des intéractions entre CTL et alloantigènes H-2 sont plus complexes qu'une intéraction Acm-H-2 étant donné que la structure du récepteur spécifique de l'alloantigène sur les clones T n'est pas le seul paramètre influençant "l'affinité d'une intéraction entre CTL et cellule cible. L'"affinité" de cette intéraction dépend probablement également de la densité des récepteurs ainsi que de marqueurs non spécifiques comme Lyt-2 et LFA-1 intervenant dans la stabilisation de ces intéractions.

Ce type d'étude, complétée par l'analyse de la séquence des gènes mutes et d'une évaluation des changements introduits dans la structure tri-dimentionnelle des molécules mutantes devrait permettre de localiser les sites de réactivités des cellules T et des Acm sur les alloantigènes classe I.

L'analyse des paramètres (structure et densité d'expression du récepteur spécifique, expression d'autres structures membranaires de stabilisation) influençant "l'affinité" de ces intéractions peut être abordée par l'utilisation de variants d'un clone T cytolytique donné. Il faut remarquer qu'une étude directe de l'intéraction entre les Ag-H-2 purifiés et couplés aux liposomes avec ces clones T s'est avérée impossible ((3) et ALBERT F. et BOYER C. communication personnelle). Il est probable que les intéractions directes entre H-2 et récepteur des cellules T soient de faible affinité.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALBERT F., BUFERNE M., BOYER C., SCHMITT-VERHULST A.M. (1982)
Interactions between MHC - encoded products and cloned T-cells
I - Fine specificity of induction of proliferation and lysis
Immunogenetics 16 : 533-549.

2. ALBERT F., BOYER C., LESERMAN L. and SCHMITT-VERHULST A.M. (1983)
Immunopurification and insertion into Liposomes of mative and mutant H-$2K^b$ quantification by solid phase radioimmunoassay
Mol. Immunol. 20 : 655-667.

3. ALBERT F., BOYER G., BUFERNE M., SCHMITT-VERHULST A.M. (1984)
Interaction between MHC-encoded products and cloned T cells
II - Analyses of physiological requirements indicate two different pathways of stimulation by class I alloantigens.
Immunogenetics 19 : 279-294.

4. ALLEN H., WRAITH D., PALA P., ASKONAS B., FLAVELL R.A.(1984)
Domain interactions of H-2 class I antigens alter cytotoxic T-cell recognition sites
Nature 309 : 279-281.

5. ANDRUS L., PROWOSE S.J., LAFFERTY K.J. (1980)
Interleukin 2 production by T cells : triggering of T cell activation and lymphokine release
Behring inst. Mitt 67 : 61-67

6. BACH F.H., SEGALL M., STOUBERZIER K., SONDEL P.M., ALTER B., BACH M.L.(1973)
Cell mediated immunity : Separation of cells involved in regnitive and destructive phase
Science 180 : 403-406.

7. BACH F.H., BACH M.L., SONDEL P.M. (1976)
Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation
Nature 259 : 273-281

8. BAILEY D.W., KOHN H.I. (1965)
Inherited histocompatibility changes in progeny of irradiated and unirradiated imbred mice
Genet. Res. 6 : 330-340.

9. BAUM L.L., PILARSKI L.M. 1978)
In vitro generation of antigen specific helper T cells that collaborate with cytotoxic T cell precursors
J. Exp. Med. 148 : 1579-1591.

10. BENACERAFF B., and GERMAIN R.N. (1978)
The immune response genes of the major histocompatibility complex
Immunol. Rev. 38 : 33-117

11. BEVAN.M.J. (1975)
Alloimmune cytotoxic T cells: evidence that they recognize serologically-defined antigens and bear clonally restricted receptors.
J.Immunol. 114 : 316 - 323

12. BOYSE E.A., MIYAZAWA M., AOKI T., OLD L.J. (1968)
Ly-A and Ly-B : Two systems of lymphocyte iso-antigens in the mouse
Proc. Roy. Soc. B. 178 : 175-182.

13. BOYSE E.A., ITAKURA T., STOCKERT E., IRITANI C.A., MIURA M. (1971)
Ly-C : a third specified alloantigen expressed only on thymocytes and lymphocytes
Transplant 11 : 351-353.

14. BRACIALE T.J. (1977)
Immunologic recognition of influenza virus-infected cells
II : Expression of influenza A matrix protein on the infected cell surface and its role in recognition by cross-reactive cytotoxic T cells
J. Exp. Med. 146 : 673-689.

15. BRUNNER K.T., CEROTTINI J.C. (1971)
Cytotoxic lymphocytes as effector cells of cell mediated immunity
In progress in immunology, ed. B. AMOS : 385-398 New-York : Academic.

16. BURAKOFF S.J., GERMAIN R.N., DORF M.E. and BENACERRAF B. (1976)
Inhibition of cell-mediated cytolysis of trinitrophenyl derivatized target cells by alloantisera directed to the products of the K and D loci of the H-2 complex
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73 : 625-629

17. CAMI B., BREGEGENE F., ABASTADO J.P., KOULILSKY P. (1981)
Multiple sequences related to classical histocompatibility antigens in the mouse genome
Nature 291 : 673-675

18. CANTOR H., ASOFSKY R. (1970)
Synergy among lymphoid cells mediating the graft - VS - host response.
II - Synergy in graft - VS - host reactions produced by BALB/c lymphoïd cells of different anatomic origins
J. Exp. Med. 131 : 235-248

19. CANTOR H., SIMPSON E. (1975)
Regulation of the immune response by subclasses of T lymphocytes.
I - Interaction between pré-Killer T cells and regulatory T cells obtained fromperipheral lymphoïd tissues of mice
Eur. J. Immuno. 5 : 330-336.

20. CANTOR H., BOYSE E.A.(1975)
Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens.
II - Cooperation between subclasses of Ly^+ cells in the generation of Killer activity
J. Exp. Med. 141 : 1390-1399.

21. CEREDIG R., GLASEBROOK A.L. and Mac DONALD H.R. (1982)
Phenotypic and functional properties of murine thymocytes
J. Exp. Med. 155 : 358-379.

22. CEREDIG R., DIALYNAS D.P., FITCH F.W and Mac DONALD H.R. (1983)
Precursors of T cell growth factor producing cells in the thymus
J. Exp. Med. 158 : 1654-1674.

23. CEROTTINI J.C., NORDIN A.A., BRUNNER K.T. (1970)
Specific in vitro cytotoxicity of thymus derived lymphocytes sensitized to alloantigens
Nature 228 : 1308-1312.

24. CEROTTINI J.G. and BRUNNER R.T. (1974)
Cell mediated cytotoxicity allograft rejection and tumor immunity
Adv. Immunol. 18 : 67-132.

25. CHAPLIN D.D., WOODS D.E., WHILEHEAD A.S., GOLDBERGER G., COLTEN H.R., SEIDMAN J.G.(1983)
Molecular map of murine S region
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 6947-6951.

26. COHEN L., HORVE M. (1973)
Sinergism between subpopulations of thymus derived cells mediating the proliferative and effector phases of the mixed lymphocyte reaction
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 2707-2710.

27. COLIGAN J.E., KINDT T.J., VEHARA H., MARTINKO J., NATHENSON S.G. (1981)
Primary structure of a murine transplantation antigen
Nature 291 : 35-39.

28. Condition for T cell activation (1977)
Immunological Rev 35 .

29. COOLEY M.A., SCHMITT-VERHULST A.M. (1979)
Specific helper T cells permit differentiation of thymic anti-self-trinitrophenyl cytotoxic precursor cells.
J. Immunol. 123 : 2328-2336.

30. COOLEY M.A., SCHMITT-VERHULST A.M.(1982)
Studies on T helper cells and the specificity of their soluble products for induction of cytotoxic T cells directed against trinitrophenyl modified self.
Cell. Immunol 67 : 287-298.

31. DAVIGNON J.L., GUIMEZANES A., SCHMITT-VERHULST A.M. (1983)
Clonal analysis of H-2K^{b} + TNP recognition by T cells using H-2K^{bm} mutants and H-2K^{b} specific monoclonal antibodies
J. Immunol. 131 : 1073-1079.

32. DAVIGNON D., MARTZ E., REYNOLDS T., KURZINGER K. and SPRINGER T.A. (1981)
Lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 7489-7496

33. DIALYNAS D.P., LOKEN M.R., GLASEBROOK A.L., FITCH F.W. (1981)
Lyt-2^{-}/Lyt-3^{-} variants of a cloned cytolytic T cell line lack an antigen receptor functional in cytolysis
J. Exp. Med. 153 : 595-604.

34. DIALYNAS D.P., QUAN Z.S., WALF K.A., PIERRES A., QUINTANS J., LOKEN M.R., PIERRES M. and FITCH F.W. (1983)
Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by a monoclonal antibody GK 1.5 : Similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule
J. Immunol. 131 : 2445-2451.

35. DOHERTY P.C., BLANDEN R.V. and ZINKERNAGEL R.M. (1976)
Specificity of virus-immune effector T cells for H-2K or H-2D compatible interactions : implications for H-antigen diversity
Transplant. Rev. 29 : 89-124.

36. DUTTON R.W. (1966)
Spleen cell proliferation in response to homologous antigens studied in congenic resistant strains of mice
J. Exp. Med. 123 : 665-671.

37. EFFROS R.B., DOHERTY P.C., GERHARD W., BENNINK J. (1977)
Generation of both cross-reactive and virus-specific T-cell populations after immunization with serologically distinct influenza A viruses
J. Exp. Med. 145 : 557-568.

38. EGOROV I-K, BLANDOVA Z.K. (1968)
The genetic homogenicity of the inbred mice bred at the stolbovy farm. II - Skin grafting test
Gneticka 12 : 63-69.

39. ELY J.P., PRYSTOWSKY M.B., EISENBERG L., QUINTANS J., COLDDWASSER E., GLASEBROOK A.L. and FITCH F.W. (1981)
Alloreactive cloned T cell line. V - Differential kinetics of IL_2, C.S.F. and BCSF release by a cloned T amplifier cell and its variant
J. Immunol. 127 : 2345-2349.

40. ENGERS H.D., THOMAS K., CEROTTINI J.C., BRUNNER K.T. (1975)
Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. V - response of normal and immune mouse spleen cells to subcellular alloantigen
J. Immunol. 115 : 356-360.

41. ENGERS H.D., GLASEBROOK A.L., SORENSON G.D. (1982)
Allogeneic tumor rejection by the intravenous injection of Lyt-2^+ cytolytic T lymphocytes clones
J. Exp. Med. 156 : 1280-1286.

42. ENNIS F.A., MARTIN W.J. and VERBONITZ M.W. (1977)
Hemagglutinin-specific cytotoxic T response during influenza infection
J. Exp. Med. 146 : 893-898.

43. EVANS G.P., MARGULIES O.H., SHYBIND B., SEIDMAN T.G. and OZATO K. (1982)
Exon shuffling mapping polymorphic determinants on hybrid mouse transplantation antigens
Nature 300 : 755-757.

44. EVANS G.A., MARGULIES O.H., CAMERINI-OTERO R.D., OZATO K., SEIDMAN J.G. (1982)
Structure and expression of a mouse major histocompatibility antigen gene, $H\text{-}2L^d$
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 1994-1998.

45. FARRAR J.J., FULLER-FARRAR J., SIMON P.L., HILFIKER M.L., STADLER B.M., FARRAR W.L. (1980)
Thymoma production of T cell growth factor (IL-2)
J. Immunol. 125, 2555-2558.

46. FARRAR W.L., MIZEL S.B. and FARRAR J.J. (1980)
Participation of lymphocytes activating factor (Interleukin 1) in the induction of cytotoxic T cell responses
J. Immun. 124 : 1371-1377

47. FARRAR J.J., BENJAMIN W.R., HILKIFER M.L., HOWARD M., FARRAR W.L. and FULLER-FARRAR J. (1982)
The biochemistry, biology and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody forming B cell responses
Immunol. Rev. 63 : 129-166.

48. FINBERG R., WEINER H.L., FIELDS B.N., BENACERRAF B. and BURAKOFF S.J. (1979)
Generation of cytolytic T lymphocytes after reovirus infection : Role of S1 gène
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 442-446.

49. FINBERG R., GREENE M.I., BENACERRAF B., BURAKOFF S.J. (1979)
The cytolytic T lymphocyte response to trinitrophenyl modified syngeneic cells. I - Evidence for antigen-specific helper T cells
J. Immunol. 123 1205-1209.

50. FISHER LINDAHL K. (1983)
Polymorphism and expression of Q ed.
Transplantation Proceeding, 15 : 2042-2044.

51. FLAHERTY L. (1981)
The role of the major histocompatibility complex in immunology
(M. Dorf ed.) : 33-55 Garland STPM Press New-York.

52. FORMAN J., KLEIN J.(1975)
Analysis of H-2 mutants : Evidence for multiple CML target specificities controlled by the H-$2K^b$ gene
Immunogenetics 1 : 469-481.

53. FORMAN J. (1979)
Effect of an H-2 mutation on cytotoxic T cell recognition. Specific antigen can determine the pattern of H-2 restriction
Immunogenetics 8 : 487-498.

54. GIORGI J.V., ZAWADSKI J.A., WARNER N.L. (1982)
Cytotoxic T lymphocytes lines reactive against murine plasmocytoma antigens : dissociation of cytotoxicity and Lyt-2 expression
Eur. J. Immunol. 12 : 831-837.

55. GLASEBROOK A.L., FITCH F.W. (1980)
Alloreactive cloned T cell lines : I - Interactions between cloned amplifier and cytolytic T cell lines
J. Exp. Med. 151 : 876-895.

56. GODING J.W. (1981)
Evidence for linkage of murine B_2-Microglobulin to H-3 and Ly-4
J. Immunol. 126 1644-1646.

57. GOLSTEIN P., GORIDIS C., SCHMITT-VERHULST A.M. (1982)
Lymphoid cell surface interaction structures detected using cytolysis-inhibiting monoclonal antibodies
Immunol. Rev. 68 : 5-36

58. GORDON R.D., SIMPSON E., SAMELSON L.E. (1975)
In vitro cell mediated immune responses to the male specific (H-Y) in mice
J. Exp. Med. 142 : 1108-1120.

59. GORER P.A., LYMAN S. and SNELL G.D. (1948)
Studies on the genetic and antigenic basis of tumour transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and "fused" in mice
Proc. R. Soc. London Ser. B. 135 : 499-513.

60. GORER P.A. (1936)
The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera
Bn. J. Exp. Pathol 17 : 42-50.

61. GORER P.A. and MIKULSKA Z.B. (1959)
Some further data on the H-2 system of antigens
Proc. Roy. Soc. (London) B 151 : 57-69.

62. GOVAERTS A. (1960)
Cellular antibodies in kidney homotransplantation
J. Immunol. 85 : 516-520.

63. GREENSTEIN J.L., KAPPLER J., MARRACK P. and BURAKOFF S.J. (1984)
The role of $L3T_4$ in recognition of Ia by a cytotoxic H-$2D^d$ - specific T cell hybridoma
J. Exp. Med. 159 : 1213-1224.

64. GUNTER K.C., MALEK T.R., SHEVACH E.M. (1984)
T-cell activating properties of an anti-thy-1 monoclonal antibody-Possible analogue to OKT3/Leu-4
J. exp. Med. 159 : 716-730.

65. GUERNE P.A., PIGUET P.F. and VASSALI P.(1984)
Production of interleukin 2, interleukin 3 and interferon by mouse T lymphocyte clones of Lyt-2^+ and 2^- phonotype
J. Immunol. 132 : 1869-1871.

66. GUIMEZANES A., SCHMITT-VERHULST A.M. (1983)
Anti-Lyt-1 monoclonal antibody inhibits induction of anti-self-TNP but not of alloreactive cytotoxic T lymphocytes
J. Immunol. 130 : 1540-1544.

67. GREENWOOD F.C., HUNTER W.M., GLAVER J.S. (1963)
The preparation of ^{131}I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity
Biochm. J. 89 : 114-123.

68. HÄMMERLING G.J., RÜSCH E., TADA N., KIMURA S. and HÄMMERLING U. (1982)
Localization of allodeterminants on H-$2K^b$ antigens determined with monoclonal antibodies and H-2 mutant mice
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 4737-4741.

69. HASKINS K., KUBO R., WHITE J., PIGEON M., KAPPLER J.W., MARRACK P. (1983)
The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells
I. Isolation with a monoclonal antibody
J. Exp. Med. 157 : 1149-1169.

70. HÄYRY P., DEFENDI V. (1970)
Mixed lymphocyte cultures produce effector cells : Model in vitro for allograft rejection
Science 168 : 133-135.

71. HENKART P.A., SCHMITT-VERHULST A.M., SCHEARER G.M. (1977)
Specificity of cytotoxic effector cells directed against trinitrobenzene sulfonate - modified syngeneic-cells. Failure to recognize cell-surface bound trinitrophenyl-dextran
J. Exp. Med. 146 1068-1078.

72. HERRMANN S.H., MESCHER M.F. (1981)
Secondary T lymphocyte stimulation by purified H-$2K^k$ in liposomes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 2488-2492

73. HILFIKER M.L., MOORE R.N., FARRAR J.J. (1981)
Biologic properties of chromatographically separated murine thymoma - derived interleukin 2 and colony - stimulating factor
J. Immunol. 127 : 1983-1987.

74. HOOD L., STEINMETZ M. and MALISSEN B. (1983)
Genes of the major histocompatibility complex of the mouse
Ann. Rev. Immunol. 1 529-568.

75. JONES B. and JANEWAY C.A. (1981)
Cooperative interaction of B lymphocytes with antigen-specific helper T lymphocytes is MHC restricted
Nature 292 : 547-549.

76. JULIUS M.H., SIMPSON E. and HERZENBERG L.A. (1973)
a rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes
Eur. J. Immunol. 3 : 645-649.

77. KANAGAWA O. (1983)
Three different signals are required for the induction of cytolytic T lymphocytes from resting precursors
J. Immunol. 131 : 606-610.

78. KAPPLER J., KUBO R., HASKINS K., WHITE J., MARRACK P. (1983)
The mouse T cell receptor : comparison of MHC-restricted receptors on two T cell hybridomas
Cell. 34 : 727-737.

79. KAUFMANN Y. (1982)
Lyt-2 negative and T cell growth factor dependent cytotoxic T lymphocyte hybridomas
In advances in experimental medecine and biology edited by W.R. Clark and P. Golstein 146 : 435-446.

80. KELSO A., GLASEBROOK A.L., KANAGAWA O., BRUNNER K.T. (1982)
Production of macrophage activating factor by T lymphocytes clones and correlation with other lymphokine activities
J. Immunol. 129 : 550-556.

81. KELSO A., GLASEBROOK A.L. (1984)
Secretion of interleukin 2, Macrophage-activating factor interferon and colony-stimulating factor by alloreactive T lymphocyte clones
J. Immunol. 132 : 2924-2931.

82. KIMBALL E.S., COLIGAN J.E. (1983)
Structure of class I major histocompatibility antigens
Contemporary topics in molecular immunology 9 : 1-87.

83. KLEIN J. and SHREFFLER D.C. (1971)
The H-2 model for major histocompatibility systems
Transplant. Rev. 6 : 3-29.

84. KLEIN J., HAUPTFELD M. and HAUPFELD V. (1974b)
Evidence for a third Ir-Associated histocompatibility region in the H-2 complex of the mouse
Immunogenetics 1 : 45-56.

85. KLEIN J. (1975)
Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. Principales of immunogenetics Applied to a single system
Springer - Verlag, New-York.

86. KLEIN J., GFIB R., CHIANG C., HAUPTFELD V. (1976)
Histocompatibility antigens controlled by the I region of the murine H-2 complex I - Mapping of H-2A and H-2C loci
J. Exp. Med. 143 : 1439-1452.

87. KLEIN J., FLAHERTY L., VANDEBERG J.L. and SHREFFLER D.C. (1978)
H-2 haplotypes, genes, Regions and antigens : First listing
Immunogenetics 6 : 489-512.

88. KLEIN J. (1978)
H-2 mutations : their genetics and effect on immune functions
Adv. Immunol. 26 : 55-146.

89. KLEIN J. (1979)
The major histocompatibility complex of the mouse
Science 203 : 516-521.

90. KLEIN J., FIGUEROA F. (1981)
Polymorphism of the mouse H-2 loci
Immunol. Rev. 60 : 23-57.

91. KLEIN J. (1982)
The major histocompatibility complex
Immunology. The science of self-monself dic orimination
chapter 8 : 270-309.

92. KLEIN J., FIGUEROA F. and DAVID C.S. (1983)
H-2 haplotypes, genes and antigens : second listing. II - The H-2 Complex
Immunogenetics 17 : 553-596.

93. KÖHLER G., FISHER LINDAHL K., HEUSSER (1981)
In the immune system eds. Streinbergh and Pefkovito I.
(Karger Basel) 2 , 202-208.

94. KOHN H.I., KLEIN J., MELVOLD R.W., NATHENSON S.G., PIOUS D., SHREFFLER D. (1978)
The first H-2 mutant workshop
Immunogenetics 7 : 279-294.

95. KVIST S., BREGERERE F., RASK L., CAMI B., GAROFF H., DANIEL F. et al. (1981)
cDNA clone coding for part of a mouse $H\text{-}2^d$ major histocompatibility antigen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 2772-2776.

96. KVIST S., ROBERTS L. and DOBBERSTEIN B. (1983)
Mouse histocompatibility genes : structure and organisation of a K^d gene
The EMBO Journal 2 : 245-254.

97. LACHMAN L.B., HACKER M.P., BLYDEN G.T. and HANDSCHUMACHER R.E. (1977)
Preparation of lymphocyte-activating-factor from continuous murine
macrophage cell lines
Cell. Immunol. 34 : 416-419.

98. LALANNE J.L., BREGEGERE F. DELARBRE C., ABASTADO J.P., GACHELIN G.,
KOURILSKY P. (1982)
Nucleic. Acids. Res. 10 : 1039-1049.

99. LANDOLFO S., COFANO F., GRIBAUDO G., PRAT M. (1984)
Monoclonal antibodies against mouse γ interferon inhibit macrophage
activation : MAF inhibition by anti IFN- γ antibodies

100. LARSSON E.L., ISCOVE N.N. and COUTINHO A. (1980)
Two distinct factors are required for induction of T cell growth
Nature 283 : 664-666.

101. LEDBETTER J.A. and HERZENBERG L. (1979)
Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens
Immunol. Rev. 47 : 63-90.

102. LEES R.K., Mac DONALD H.R., SINCLAIR N.R. (1977)
Inhibition of clone formation as an assay for T cell-mediated cytotoxicity
short-term kinetics and comparison with ^{51}Cr release
J. Immunol. Methods 16 : 233-244 .

103. LEFRANCOIS L., KLEIN J.R., PAETKAU V., BEVAN M.J. (1984)
Antigen-independent activation of memory cytotoxic T cells by interleukin 2
J. Immunol. 132 : 1845-1850.

104. LEVEY R.H. (1974)
Cellular aspects of transplantation immunity. In mechanisms of cell - mediated immunity. Ed. R.T. Mc Cluskey, S. Cohen, pp 257-287 New-York : Wiley

105. LESERMAN L.D., WEINSTEIN J.N., MOORE J.J. and TERRY W.D.(1980)
Specific interaction of myeloma tumor cells with hapten-bearing liposomes containing methotrexate and carboxyfluorescein
Cancer Res. 40, 4768-4774.

106. LEVY R.B., SHEARER G.M. (1982)
Cell-mediated lympholysis responses against autologous cells modified with haptenic sulfhydryl reagents. IV Self - determinants recognized by wild type anti-H-$2K^b$ and H-$2D^b$ - restricted cytotoxic T cells specific for sulfhydril and aminoreactive haptens are absent incertain H-2 mutant strains
J. Immunol. 129 : 1525-1529.

107. LINDAHL K.F. and BACH F.H. (1975)
Human lymphocytes recognise mouse alloantigens
Nature 254 : 607-609.

108. Mac DONALD H.R., THIERRESSE N., CEROTTINI J.C. (1981)
Inhibition of T-cell mediated cytolysis by monoclonal antibodies directed against Lyt-2 : heterogeneity of inhibition at the clonal level
J. Immunol. 126 : 1671-1675.

109. Mac DONALD H.R., GLASEBROOK A., KELSO A., ZUBLER R.H.(1982)
Heterogeneity of lymphokine production by murine T - lymphocyte clones
Ann. Immunol. 133 D : 171-179.

110. MALISSEN M., MALISSEN B. et JORDAN B.R. (1982)

Proc. Natr. Acad. Sci. USA 79 893-897

111. MALOY W.L., COLIGAN J.E. (1982)
Primary structure of the H-$2D^b$ alloantigen. II - additional amino acid sequence information, focalization of a third site of glycosylation and evidence for K and D region specific sequences
Immunogenetics 16 : 11-22.

112. MARGULIES D.H., EVANS G.A., FLAHERTY L. and SEIDMAN J.G. (1982)
H-2 like genes in the TLa region of mouse chromosome 17
Nature 295 : 168-170.

113. MATZINGER P. BEVAN M.J. (1977)
Hypothesis : Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigen ?
Cell. Immunol. 29 : 1-5.

114. Mc DEVITT H.O., DEAK B.D., SHREFFLER D.C., KLEIN J., STIMPFLING J.H. and SNELL G.D. (1972)
Genetic control of immune response mapping of Ir-1 locus.
J. Exp. Med. 135 : 1259-1278.

115. Mc DEVITT H.O. (1978)
"Ir genes and Ia antigens"
Academic Press, New-York.

116. Mc KENZIF I.F.C., POTTER T. (1979)
Murine lymphocyte surface antigens
Adv. Immunol. 27 : 179-338

117. MACHY P., BARBET J. and LESERMAN L (1982)
Differential endocytosis of T and B lymphocyte surface molecules evalued with antibody-bearing fluorescent liposomes containing methotrexate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 4148-4152.

118. MELIEF C.J.M., SCHWARTZ R.S., KOHN H.I.,MELVOLD R.W. (1975)
Dermal histocompatibility and in vitro lymphocyte reactions of three new H-2 mutants
Immunogenetics 2 : 337-348

119. MELIEF C.M.J., VAN DER MEULEN M.Y., POSTMA P. (1977)
CML typing of serologically identical H-2 mutants
Imm-nogenetics 5 : 43-56.

120. MELIEF C. (1983)
Remodelling the H-2 map.
Immunology Today 4 : 57-61

121. MELLOR A.L., WEISS E.H., RAMACHANDRAN K. and FLAVELL R.A. (1983)
Apotential donor gene for the bm1 gene conversion event in the C57BL mouse
Nature 306 : 792-795.

122. MELLOR A.L., WEISS E.H., KRESS M., JAY G., FLAVELL R.A. (1984)
A non polymorphic class I gene in the murine major histocompatibility complex
Cell. 36 : 139-144.

123. MELVOLD R.W., KOHN H.I., DUNN G.R. (1982)
History and genealogy of the H-$2K^b$ mutants from the C57BL/6Kh colony
Immunogenetics 15 : 177-185.

124. MESCHER M.F. (1982)
The interaction of M.H.C. antigens with the plasma membrane and the other cellular components : In
Histocompatibility antigens : structure and function (receptors and recognition series B 14 eds Parham P. et Strominger J. p 55 Chapman and Hall.

125. MICHAELSON J., BOYSE E.A., CHORNEY M., FLAHERTY L., FLEISSNER E., HÄMMERLING V., REINV CH C., ROSENSON R., SHEN F.W. (1984)
The biochemical genetics of the Qa-TLa Region
Transplantation Proceeding 15 : 2033-2038.

126. MICHAELSON J. (1981)
Genetic polymorphism of 2-microglobulin (B2m) Mass to the H-3 Region of chromosome 2
Immunogenetics 13 : 167-171.

127. MILLER R.A. and STUTMAN O. (1982)
Enumeration of Il-2 secreting helper T cells by limiting dilution analysis, and demonstration of unexpectedly high levels of Il-2 production per responding cell
J. Immunol. 128 : 2258-2264.

128. MITCHISON N.A. (1954)
Passive transfer of heterozygous tumors as material for the study of cell heredity.
Proc. R. Phys. Soc. 250 : 45-48.

129. MÖLLER G., SJÖBERG O., ANDERSSON J. (1972)
Mitogen-induced lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro : effect of mitogens selectively activating T or B cells
Eur. J. Immunol. 2 : 586-592.

130. MOORE R.N., OPPENHEIM J.S., FARRAR J.J., CARTER C.S., WAHEED Jr. A., SHADDUCK R.K(1980
Production of lymphocyte - activating factor (Interleukin 1) by macrophages activated with colony-stimulating factors
J. Immunol. 125 : 1302-1305.

131. MOORE K.W., SHER B.T., SUN Y.H., EAKLE K., HOOD L. (1982)
"DNA sequence of a gene encoding a BALB/c mouse L^d transplantation antigens
Science 215 : 679-682.

132. MORETTA A., PANTALEO G., MORETTA L., MINGARI M.C. and CEROTTINI J.C. (1983)
Quantitative assessment of the pool size and subset distribution of cytolytic T lymphocytes within Human resting or alloactivated peripheral blood T cell populations.
J. Exp. Med.. 158 : 571-585.

133. MURRE C., REISS C., BARNABEN C., CHEN L., BURAKOFF S. and SEIDMAN J. (1984)
Construction, expression and recognition of an H-2 molecule lacking its caboxyl terminus
Nature 307 : 432-436.

134. NABHOLZ M., YOUNG H., RYNBEEK A., BOCCARDO R., DAVID C.S., MEO T., MIGGIANO V. SHREFFLER D.C. (1975)
I region associated determinants : expression on mitogen stimulated lymphocytes and detection by cytotoxic T cells
Eur. J. Immunol. 5 : 594-599.

135. NABHOLZ M., MIGGIANO V.C. (1977)
The biological significance of the mixed leukocyte reaction. In B and T cells in immune recognition, ed. F POOR G., F. ROELANTS. pp. 261-289 New-York Wiley.

136. NAGY Z., ELLIOTT B.E., and NABHOLZ M. (1976)
Specific binding of K and I region products of the H-2 complex to activated thymus-derived (T) cells belonging to different Ly subclasses
J. Exp. Med. 144 : 1545-1553.

137. NAIRN R., YAMAGA K., NATHENSON S.G. (1980)
Biochemistry of the gene products from murine M.H.C. mutants
Ann. Rev. Genet 14 : 241-277.

138. NAKAYAMA E., SHIKU H., STOCKERT E., OETTGEN H.F., OLD L.J. (1979)
cytotoxic T cells : Lyt phenotype and blocking of killing activaty by Lyt antisera
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 1977-1981.

139. OI V.T., JONES P.P., GODING J.W., HERZENBERG L.A. (1978)
Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2 and Ia antigen
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 115-129.

140. OZATO K., HENNEY C.S. (1978)
Studies on lymphocyte-mediated cytolysis . XII - Hapten-transfered to cell surfaces by interaction with liposomes is recognized by antibody but not hapten specific H-2 restricted cytotoxic T cells
J. Immunol. 121 : 2405-2412.

141. OZATO K., SACHS S. (1981)
Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens
J. Immunol. 126 : 317-321.

142. OZATO K., EVANS G.A., SHYKIND B., MARGULIES D.H., SEIDMAN J.G. (1983)
Hybrid H-2 histocompatibility gene products assign domains recognized by alloreactive T cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 2040-2048.

143. PARKER J.W., METCALF S.(1974)
Production of colony-stimulating factor in motogen-stimulated lymphocyte cultures
J. Immunol. 112 : 502-510.

144. PEASE L.R., SCHULZE D.H., PFAFFENBACH G.M., NATHENSON S.G. (1983)
Spontaneous H-2 mutants provide evidence that a copy mechanism analogous to gene conversion generates polymorphism in the major histocompatibility complex
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 242-246.

145. PIERRES A., SCHMITT-VERHULST A.M., DEVAUX C., GOLSTEIN P., BIRNBAUM D., GORIDIS C., PIERRES M. (1982)
Cytolytic T cell clones against H-2.I- region products an analysis using monoclonal antibodies against Ia, Lyt-2 and P-49-180 cell surface antigens
Mechanisms of cell mediated cytotoxicity, W. Clark and P. Golstein eds. Plenum Pub. Corp. pp : 505-519.

146. PIERRES M., GORIDIS C. and GOLSTEIN P. (1982)
Inhibition of murine T-cell-mediated cytolysis and T cell proliferation by a rat monoclonal antibody immunoprecipitating two lymphoïd cell surface polypeptides of 94000 and 180000 molecular weight
Eur. J. Immunol. 12 : 60-69.

147. PIERRES A., NAQUET P., VAN AGTHOVEN A., BEKKHOUCHA F., DENIZOT F., MISHAL Z. SCHMITT-VERHULST A.M., PIERRES M. (1984)
A rat anti-mouse T4 monoclonal antibody (H-129-19) inhibits the proliferation of Ia - reactive T cell clones and delineates two phenotypically distinct ($T4^+$, Lyt $2\text{-}3^-$ and $T4^-$ Lyt $2,3^+$) subsets amongy anti-Ia cytolytic T cell clones
J. Immunol. 132 : 2775-2782.

148. PILARSKI L.M.A. (1977)
Requirement for antigen specific helper T cells in the generation of cytotoxic T cells from thymocyte precursors
J. Exp. Med. 145 : 709-725.

149. PLATE J.M.D. (1976)
Soluble factors substitute for T-T cell collaboration in generation of T-Killer lymphocytes
Nature 260 : 329-331.

150. PFIZENMAIER K., STARZINSKI-POWITZ A., RÖLLINGHOFF M., FALKE D. and WAGNER H (1977)
T cell-mediated cytotoxicity against herpes simplex virus-infected terget cells
Nature 265 : 630-632.

151. PLOEGH H.L., ORR H.T., STROMINGER J.L. (1981)
Major histocompatibility antigens : the human (HLA-A-B-C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules
Cell 24 : 287-299

152. PLOEGH H.L., ORR H.T., STROMINGER J.L. (1980)
Molecular cloning of a human histocompatibility antigen cDNA fragment
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 6081-6085.

153. POTTER T.A., PALLADINO M.A., WILSON D.B., RAJAN T.V. (1983)
Epitopes on H-2D^d somatic cell mutants recognized by cytotoxic T cells
J. Exp. Med. 158 : 1061-1076.

154. PRAT M., GRIBAUDO G., COMOGLIO P.M., CAVALLO G., LANDOLFO S. (1984)
Monoclonal antibodies against murine γ interferon
Proc. Natl. Acad. Sci. 81 :4515-4519.

155. RAJAN T.V. (1977)
H-2 antigen variants in a cultured heterozygous mouse leukemia cell line
Immunogenetics 4 : 105-115.

156. RAULET D.H., BEVAN M.J. (1982)
A differentiation factor required for the expression of cytotoxic T cell function
Nature 296 : 754-757.

157. REINHERZ E.L., MEUER S.C., FITZGERALD K.A., HUSSEY R.E., LEVINE H., SCHLOSSMAN S.F. (1982)
Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex.
Cell. 30 : 755-743.

158. REYES A.A., SCHÖLD M., WALLACE R.B. (1982)
The complete amino acid sequence of the murine transplantation antigen H-2D^b as deduced by molecular cloning
Immunogenetics 16 : 1-9 (1982)

159. ROBINSON P.J., LUNDIN L., SEGE K., GRAF L., WIGZELL H., PETERSON P.A. (1981)
Location of the mouse β_2-Microglobulin gene B2m determined by linkage analysis
Immunogenetics 14 : 449-452.

160. ROSENAU W., MORTON D.L. (1966)
Tumor-specific inhibition of growth in methyl cholantrene - induced Sarcomas in vivo and in vitro by sensitized isologous lymphoid cells
J. Nat. Cancer. Inst. 36 : 825-836.

161. ROSENBERG N and BALTIMORE D. (1976)
A quantitative assay for transformation of bone marrow cells by Abelson murine Leukemia virus
J. Exp. Med. 143 : 1453-1463.

162. SACHS D.H. (1984)
The major histocompatibility complex fundamental immunology
edited by W.E. Paul
Raven press, New-York : 303-346.

163. SCHMITT-VERHULST A.M., SACHS D.H. and SHEARER G.M. (1976)
Cell-mediated lympholysis of trinitrophenyl modified autologous lymphocytes. Confirmation of genetic control of response to trinitrophenyl-modified H-2 antigens by use of anti-H-2 and anti-Ia antibodies
J. Exp. Med. 143 : 211-217.

164. SCHMITT-VERHULST A.M., PETTINELLI C.B., HENKART P.A., LUNNEY J.K., SHEARER G.M(197
H-2 restricted cytotoxic effectors generated in vitro by the addition of trinitrophenyl-conjugated soluble proteins
J. Exp. Med. 147 : 352-368.

165. SCHMITT-VERHULST A.M., ALBERT F., GUIMEZANES A., BUFERNE M. (1981)
Antigenic and genetic parameters in the stimulation and in the lytic phases of anti-hapten + self cytotoxic T cells and their derived clones : role of the T helper cell
Journal of supramolecular structure and cellular Biochemistry 16 : 359-370.

166. SCHRADER J.W., ARNOLD B., CLARK-LEWIS I., (1980)
A ConA-stimulated T-cell hybridoma releases factors affecting haematopoetic colony-forming cells and B-cell antibody responses
Nature 283 : 197-199.

167. SCHREIER M.H., ISCOVE N.N. (1980)
Haematopoetic growth factors are released in cultures of H-2-restricted helper T cells accessory cells and specific antigen
Nature 287 : 228-230.

168. SCHULTZ R.M., KLEINSCHMIDT W.J. (1983)
Functional identity between murine γ interferon and macrophage activating factor
Nature 305 : 239-240.

169. SHEARER G.M. (1974)
Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl modified syngeneic lymphocytes
Eur. J. Immunol. 4 : 527-533.

170. SHEARER G.M., and SCHMITT-VERHULST A.M. (1977)
Major histocompatibility complex restricted cell-mediated immunity
J. Immunol. 25 : 55-91.

171. SHERMAN L.A. (1980)
Dissection of the B10D2 anti-H-$2K^b$ cytolytic T lymphocyte receptor repertoire
J. Exp. Med. 151 : 1386-1397.

172. SHERMAN L.A. and RANDOLPH C.P.(1981)
Monoclonal anti-H-$2K^b$ antibodies detect serological differences between H-$2K^b$ mutants
Immunogenetics 12 : 183-186.

173. SHERMAN L.A. (1981)
Mutationally derived H-2 antigenic differences as defined by citolytic T lymphocyte clones
J. Immun. 127 : 1259-1260.

174. SHERMAN L.A. (1982)
Recognition of conformational determinants on H-2 by cytolytic T lymphocytes
Nature 297 : 511-513.

175. SHIKU H., TAKAHASHI T., BEAN M.A., OETTGON H.F. (1976)
Ly phenotype of cytotoxic T cells for syngeneic tumor
J. Exp. Med. 144 : 1116-1120.

176. SHINOHARA N., SACHS D.H. (1981)
Mouse alloantibodies capable of blocking cytotoxic T cell function.
III - Studies of the mechanism of blocking CML by anti-Lyt-2 antibodies
J. Immunol. 127 : 1575-1578.

177. SIMON M.M., EICHMANN K. (1980)
T cell subsets participating in the generation of cytotoxic T cells
Springer.Sem. Immunopathol. 3 : 39-62.

178. SIMPSON E. and GORDON R.D. (1977)
Responsiveness to H-Y antigen, Ir gene complementation and target cell specificity
Immunol. Rev. 35 : 59-75.

179. SIMPSON E., MOBRATON L., CHANDLER P., HETHERINGTON G., HURNE M., BRUNNER C., BAILEY D. (1978)
Cross reactive cytotoxic responses H-2 restricted are more specific than anti-H-2 responses
J. Exp. Med. 148 : 1478-1487.

180. SIMPSON E. (1982)
The role of H-Y as minor transplantation antigen
Immunology Today 3 : 97-106.

181. SHREFFLER D.C. and DAVID C.S. (1975)
The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region : Genetic variations, function, and organization.
Adv. Immunol. 20 : 125-195.

182. SMITH K.A., LACHMAN L.B., OPPENHEIM J.J. and FAVATA M.F. (1980a)
The functional relationship of the interleukins
J. Exp. Med. 151 : 1551-1556.

183. SMITH K.A., GILBRIDE K.J. and FAVATA M.F. (1980b)
Lymphocyte activating factor promoted T-cell growth factor production by cloned murine lymphoma cells.
Nature 287 : 853-855.

184. SNELL G.D. (1948)

J. Genetics 49 : 87-108.

185. SNELL G.D. (1953)
The genetics of transplantation
J. Nat. Cancer Inst. 14 : 691-700.

186. SOLOSKI M.J., UHR J.W., FLAHERTY L., VITETTA E.S. (1981)
Qa-2, H-2K and H-2D alloantigens envolved from a common ancestral gene
J. Exp. Med. 153 : 1080-1093.

187. SOLOSKI M.J., UHR J.W. and VITETTA E.S.(1982)
Primary structural studies of the Qa-2 alloantigen : implications for the evolution of the MHC
Nature (London) 296 : 759-761.

188. SOOD A.K., PEREIRA D., WEISSMAN S.M. (1981)
Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B by use of an oligodeoxynucleotide primer
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 616-620.

189. STEINMETZ M., FRELINGER J.G., FISHER D et al. (1981)
Three cDNA clones encoding mouse transplantation antigens : homology to immunoglobulin genes
Cell. 24 : 125-134.

190. STEINMETZ M., MOORE K.W., FRELINGER J.G., SHER B.T., SHER F.W., BOYSE E.A. and HOOD L. (1981 b)
A pseudogene homologous to mouse transplantation antigens : Transplantation antigens are encoded by eight exons that correlate with protein domains
cell. 25 : 683-692.

191. STEINMETZ M., WINOTO A., MINARD K. and HOOD L. (1982)
Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens
Cell. 28 : 489-498.

192. STROMINGER J.L., ORR H.T., PARHAM P., PLOEGH H.L., MANN D.L., BILOFSKY H.A., SAROFF T.T., WU et KABAT E.A.(1980)
An evaluation of the significance of amino acid sequence homologies in human histocompatibility antigens (HLA-A et HLA-B) with immunoglobulins and other proteins, using relatively short sequences
Scand. J. Immunol. 11 : 573-592.

193. SWAIN S.L. (1981)
Significance of Lyt phenotypes : Lyt 2 antibodies block activities of T cells that recognize class I major histocompatibility complex antigens regardless of their function
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 7101-7105.

194. SWAIN S.L. (1983a)
T cell subsets and the recognition of MHC class
Immunol. Rev. 74 : 129-142.

195. TSE D.B. and PERNIS B. (1984)
Spontaneous internalization of class I major histocompatibility complex molecules in T lymphoid cells
J. Exp. Med. 159 : 193-207.

196. VOHR H.W., HOLTKAMP B., RAJEWSKY K. (1983)
Somatic H-$2K^k$ variants reveal nonidentity of serological and cytotoxic T-cell-defined K^k determinants.
Eur. J. Immunol. 13 : 846-851.

197. VON BOEHMER H. and HAAS W (1981)
H-2 restricted cytolytic and noncytolytic T cell clones : Isolation, specificity and functional analysis
Immun. Rev. 54 : 27-56.

198. WAGNER H., FELDMAN M., BOYSE W. and SCHRADER J.W. (1972)
Cell mediated immune response in vitro. III - requirement for macrophage in cytotoxic reactions against cell bound and subcellular alloantigens
J. Exp. Med. 136 : 331-340.

199. WAGNER H., RÖLLINGHOFF M., NOSSAL C.J.V. (1973)
T-cell mediated immune response in vitro
Transplant. Rev. 17 : 3-36.

200. WAGNER H., ROLLINGHOFF M., NOSSAL G.J.V. (1973)
T cell mediated immune responses induced in vitro : a probe for allograft and tumor immunity
Transplant. Rev. 17 : 3-36.

201. WAGNER H., GOTZE D., PTSCHELINZEW L., ROLLINGHOFF M. (1975)
Induction of cytotoxic T lymphocytes against I - region coded determinants : in vitro evidence for a third histocompatibility locus in the mouse
J. Exp. Med. 142 : 1477-1487.

202. WAGNER H. and M. RÖLLINGHOFF (1978)
T-T cell interactions during in vitro cytotoxic allograft responses. I - Soluble products from activated Ly 1^+ T cells trigger autonomously antigen primed Ly 23^+ T cells to cell proliferation and cytotoxic activity
J. Exp. Med. 148 : 1523-1538.

203. WAGNER H., ROLLINGHOFF M., PFIZENMAIER K., HARDS C., JOHNSCHER G. (1980)
T-T cell interactions during in vitro cytotoxic T lymphocytes (CTL) responses. II - Helper factor from activated Lyt 1^+ T-cell is rate limiting i) in T-cell responses to an immunogenic alloantigen ii) in thymocyte responses to allogeneic stimulator cells and iii) recruites allo or H-2 restricted CTL precursors from Lyt-123^+ T subset
J. Immunol. 124 : 1058-1067.

204. WAGNER H., HARDT C., ROUSE B.T., RÖLLINGHOFF M., SCHEURICH P. and PFIZENMAIER K. (1982)
Dissection of the proliferative and differentiative signals controlling murine cytotoxic T lymphocyte responses
J. Exp. Med. 155 : 1876-1881.

205. WEAVER J.M., ALGIRE G.H., PREHN R.T. (1955)
The growth of cells in vivo in diffusion chambers II - The role of cells in the destruction of homografts in mice
J. Nat. Cancer. Inst. 15 : 1737-1758.

206. WEISS E., GOLDEN L., ZAKUT R., MELLOR A., FAHRNER K., KVIST S. and FLAVELL R.A. (1983)
The DNA sequence of the H-$2K^b$ gene : Evidence for gene conversion as a mechanism for the generation of polymorphism in histocompatibility antigens
the EMBO journal 2 pp 453-462.

207. WEINSTEIN J.N., BLUMENTHAL R., SHARROW S.O. and HENKART P.A. (1978)
Antibody mediated targeting of liposomes : binding to lymphocytes does not ensure incorporation of vesicle contents into the cells
Biochm. Biophys. Acta 509, 272-288.

208. WETTSTEIN P.J. (1982)
H-2 effects on cell-cell interactions in the response to single non H-2 alloantigens. V - Effects on H-$2K^b$ mutations on presentation of H_4 and H3 alloantigens
J. Immunol. 128 : 2629-2633.

209. WILLIAM A. (1984)
The immunoglobulin superfamily takes shape
Nature 308 : 12-13 .

210. WILSON D.B., BILLINGHAM R.E.(1967)
Lymphocytes and transplantation immunity
Adv. Immunol. 7 : 189-273.

211. WINOTO A., STEINMETZ M. et HOOD L. (1983)
Genetic mapping in major histocompatibility complex by restriction enzyme site polymorphisms : Most mouse chass I gene map to TLa complex
Proc. Natn. Acad. Sci. USA 80 : 3425-3429.

212. XIN J.H., KVIST S., DOBBERSTEIN B. (1982)
Identification of an H-$2K^d$ gene using a specific cDNA probe
EMBO J. 1 : 467-471.

213. WITTE O.N., ROSENBERG N. and BALTIMORE D. (1979)
"A normal cell protein cross-reactive to the major Abelson murine leukaemia virus gene product.
Nature 281 : 386-398.

214. YOKOYAMA K., STOCKERT E., OLD L.J. and NATHENSON S.G. (1981)
Structural comparisons of TL antigens derived from normal and leukemia cells of TL^+ and TL^- strains and relationship to genetically linked H-2 major histocompatibility complex products
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 7078-7082.

215. YOKOYAMA K., NATHENSON S.G. (1983)
Intramolecular organization of class I H-2 MHC antigens ; localization of the alloantigenic determinants and the β_2m binding site to different regions of the $H\text{-}2K^b$ glycoprotein
J. Immunol. 130 : 1419-1425.

216. ZINKERNAGEL R.M. and DOHERTY P.C. (1974)
Restriction of in vitro T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomoningitis within a syngeneic or semiallogeneic system
Nature 248 : 701-702.

217. ZINKERNAGEL R.M. and KLEIN J. (1977)
H-2 associated specificity of virus-immun cytotoxic T cells from H-2 mutant and wild-type mice : M 523 ($H\text{-}2K^{ka}$) and M505 ($H\text{-}2K^{bd}$) Do M504 ($H\text{-}2D^{da}$) and M506 ($H\text{-}2K^{fa}$) do not crossreact with wild-type H-2K or H-2D
Immunogenetics 4 : 581-590.

218. ZINKERNAGEL R.M., DOHERTY P.C. (1979)
M.H.C. restricted cytotoxic T cells : studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity, function and responsiveness
Adv. Immunol. 27 : 51-177.

219. ZUBLER R.H., LOWENTHAL J.W., ERARD F., HASHIMDO N., DEVOS R., Mac DONALD H.R. (1984)
Activated B cells express receptors for and proliferate in response to pure interleukin 2.
J. Exp. Med. 160 : 1170-1183

220. REIF A.E. and ALLEN J.M. (1966)
Mouse thymic isoantigens
Nature 209 : 521-524.

221. KÖHLER G. and MILSTEIN C. (1975`)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of prédéfined specificity
Nature 256 : 495-497

Mots clés : Cellule T ; cytotoxicité ; antigène du système majeur d'histocompatibilité murin (H-2) ; anticorps monoclonaux ; mutants spontanés au H-2 ; mutants induits au H-2 ; liposomes.

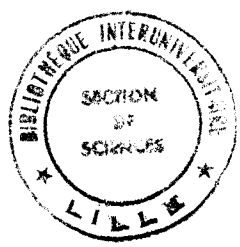
Résumé

Les produits codés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH appelé H-2 chez la souris) sont responsables des rejets de greffe de tissus allogéniques par la stimulation de réactions d'immunité cellulaire spécifiques d'alloantigènes H-2. La production d'anticorps spécifiques des alloantigènes H-2 peut également être détectée dans le sérum des souris greffées.

Les alloantigènes H-2 dit de "classe I", antigènes ubiquitaires à la surface des cellules et spécifiquement reconnus par les effecteurs T cytolytiques (CTL) sont des glycoprotéines constituées de deux chaînes polypeptidiques associées de façon non covalente (45 KD et 12 KD respectivement). La chaîne lourde présente une structure en "domaine" ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) dont la séquence primaire a été déterminée pour certaines des formes alléliques.

Dans le but de définir la localisation des déterminants antigéniques intervenant dans les reconnaissances "sérologiques" et "cellulaires " (cellules T) respectivement, nous nous sommes intéressés à un alloantigène du système murin la molécule H-$2K^b$.

Nous disposons dans ce système de lignées de souris exprimant des formes altérées (H-$2K^{bm}$, deux ou trois acides aminés dans des positions connues) de la molécule H-$2K^b$ par suite de mutations spontanées. Des anticorps monoclonaux (Acm) spécifiques de la molécule H-$2K^b$ ont une réactivité intacte ou altérée selon l'Acm et selon le mutant H-$2K^{bm}$ analysé.

Notre travail a consisté à utiliser des variants de lignées cellulaires exprimant après mutagénèse et immunosélection au moyen d'anticorps monoclonaux des molécules H-$2K^{bv}$ altérées dans la structure de déterminants "sérologiques" définis. Nous avons stimulé *in vitro* des populations de cellules T alloréactives spécifiques de H-$2K^b$ et en avons dérivé des clones T monospécifiques.

Nous discutons dans ce travail la comparaison des réactivités des cellules T monospécifiques et des anticorps monoclonaux spécifiques de H-$2K^b$ sur les mutants H-$2K^{bm}$ et H-$2K^{bv}$. Il semblerait que les CTL alloréactifs anti-K^b ne reconnaissent pas les mêmes déterminants antigéniques que ceux qui sont définis par les Acm. De plus les intéractions entre CTL et cellule cible semblent faire intervenir non seulement le récepteur spécifique de l'alloantigène sur les clones T mais probablement également des marqueurs non spécifiques des cellules T.