

TP3B-3 : La spécificité de l'immunité adaptative**Matériel :**

- matériel pour le test d'Ouchterlony
- logiciels Rastop (ou logiciel en ligne Libmol), Anagène et leurs fiches techniques

L'immunité adaptative est déclenchée après l'immunité innée. Contrairement à l'immunité innée, elle présente une spécificité : les lymphocytes, cellules de l'immunité adaptative, ne reconnaissent qu'un antigène précis, spécifique d'un pathogène donné, contrairement aux cellules de l'immunité innée qui reconnaissent des molécules communes à différents pathogènes. **On cherche à comprendre comment les lymphocytes reconnaissent les antigènes.**

Activité 1 : Mise en évidence de la spécificité des récepteurs

- Pour montrer la spécificité des anticorps par rapport à des antigènes, on réalise l'expérience suivante : on possède le sérum d'un lapin qui a reçu plusieurs jours auparavant une injection d'une protéine antigénique (c'est-à-dire capable de provoquer une réaction immunitaire), l'albumine de sérum de bœuf (BSA), contre laquelle il s'est immunisé (il a développé des anticorps). On veut savoir si les anticorps anti-albumine de bœuf du lapin sont spécifiques de l'antigène, c'est-à-dire s'ils réagissent à l'albumine seule (spécificité) ou à d'autres molécules de structure proche, comme l'ovalbumine ou la lactalbumine (*générique*). **Réaliser l'expérience de précipitation des complexes immuns** (test d'Ouchterlony) :

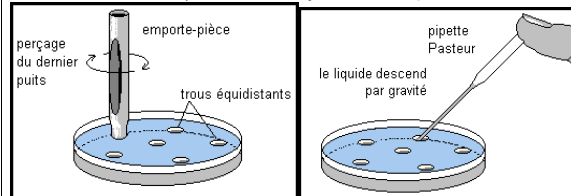
Test d'Ouchterlony : (voir le test en vidéo : <https://www.youtube.com/watch?v=zID991QLrnA>)

Matériel :

- Blouse, gants, lunettes de protection
 - Boîte de pétri gélosée
 - Emporte-pièce
 - Papier noir, gabarit de perçage
 - Compte gouttes
 - tubes ependorf avec des produits de substitution de: Sérum de lapin immunisé anti-BSA (S), albumine de sérum de bœuf =BSA (B), ovalbumine (H), lactalbumine (C), liquide physiologique (P)
- ATTENTION : les produits manipulés présentent certains risques. Pour des raisons de sécurité, ils ont été remplacés par des produits de substitution, mais ceux-ci peuvent être corrosifs et doivent être manipulés avec précaution.**

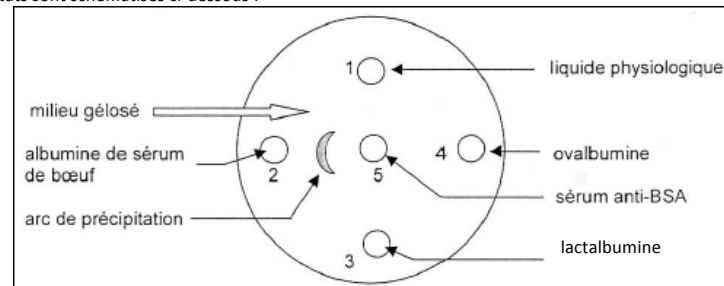
Protocole :

- Creuser des puits dans la gélose avec l'emporte-pièce en respectant le gabarit de perçage
- déposer au centre du puits central l'anticorps (sérum de lapin anti-BSA) et dans les puits périphériques les antigènes (! attention à ne pas déborder ni faire de bulles)



Les molécules diffusent dans toutes les directions dans le gel. La visualisation d'un complexe immun (*liaison d'un anticorps sur son antigène*) se traduit par la formation d'un arc de précipitation blanc après 20min visible sur un fond noir.

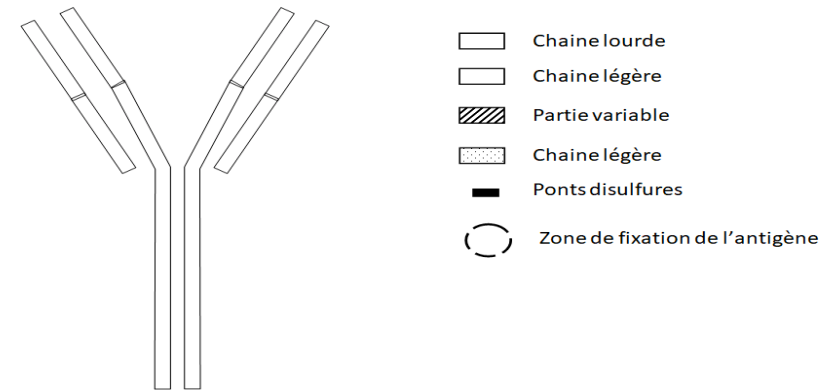
Les résultats sont schématisés ci-dessous :



- Exploitez les résultats pour mettre en évidence la spécificité des anticorps.

Activité 2 : visualisation de la structure des récepteurs et de leur antigène

- A l'aide du logiciel Rastop (ou du logiciel en ligne Libmol <https://www.libmol.org/>) et de sa fiche technique (https://libmol.org/docs/FT_Libmol.pdf), ouvrir les fichiers de molécules indiqués dans le protocole, puis mettre en valeur la structure d'un anticorps (produit par les lymphocytes B) et d'un récepteur de lymphocyte T à l'aide des informations ci-dessous. **Légendez** votre production (ou voir résultat doc 3 p. 365).
- Comparer la structure de 2 récepteurs différents spécifiques d'antigènes différents (igg-multiples.edi) grâce au logiciel Anagène (comparer les chaînes légères ou L entre elles et les chaînes lourdes ou H entre elles pour les anticorps, et pour les récepteurs T, les chaînes α entre elles et les chaînes β entre elles) et repérer la partie variable et la partie constante de chaque chaîne (voir résultats doc 4p. 365). **Expliquez l'origine de la spécificité des récepteurs de l'immunité adaptative** à partir de vos résultats et des documents 1, 3 et 4 p.366-7.
- Compléter le schéma en bas de cette page en colorant les différentes parties :

**Schéma simplifié d'un anticorps****Protocole : Étude des récepteurs des cellules de l'immunité adaptative avec Rastop ou Libmol**

Ouvrir le logiciel Rastop, ou le logiciel en ligne Libmol. On étudie 3 molécules :

- IGGTOTAL.pdb (sur Libmol, chercher « Immunoglobuline » et prendre l'un des 2 fichiers proposés au choix) : Immunoglobuline G (IgG) = **protéine d'anticorps complète, fixée** sur la membrane plasmique du lymphocyte B, ou **circulante**. Elle est constituée de :
 - 2 chaînes **légères** qui sont des chaînes courtes (sur le fichier Rastop : chaînes M et L)
 - et de 2 chaînes **lourdes** qui sont des chaînes longues (sur le fichier Rastop : chaînes H et I) dont la partie constante (la base du « Y ») est fixée dans la membrane plasmique.
 - D'une chaîne glucidique (sur Rastop : chaîne C) qui ne sera pas étudiée ici.
 - de **ponts disulfures** qui relient les différentes chaînes entre elles, ce sont des liaisons fortes entre les atomes de soufre qui stabilisent la structure.
- IGG-LYS (sur Libmol, chercher « Anticorps anti-lysozyme ») : détail du site de fixation de l'anticorps lié à son antigène, le lysozyme
- 1J8H : récepteur T porté par un lymphocyte T (chaînes D et E) associé à un peptide viral du virus de la grippe (chaîne C) présenté dans le sillon d'une molécule du CMH porté par la cellule présentatrice de l'antigène (chaîne A et B)

Rastop	Libmol
- sélectionner chaque chaîne étudiée avec l'icône « sélectionner une chaîne » puis choisir l'affichage le plus adapté : choisir un affichage discret des atomes pour voir les liaisons (n'importe quel affichage sauf sphères VDW ; le menu Rubans > Afficher donne un bon résultat) - menu Liaisons > Ponts disulfures > Afficher - menu Liaisons > Ponts disulfures > Type > Bâtonnets et rentrer dans la fenêtre un chiffre élevé (ex : 250). - Dans la palette de couleurs, choisir dans la liste déroulante « Ponts disulfures » et choisir une couleur - Sélectionner les acides aminés faisant partie de la zone variable repérée dans avec le logiciel Anagène ci-dessous avec l'éditeur d'expression (icône ABC > taper les n° des acides aminés), et les mettre en évidence avec Rastop	- Dans l'onglet <u>Fichiers</u>, ouvrir l'une des 3 molécules ci-dessus (il n'est possible d'étudier qu'une seule molécule à la fois avec ce logiciel) : - o ligne <u>Rechercher dans la librairie de molécules</u>, entrer le nom de la molécule (<u>immunoglobuline</u> ou <u>anti-lysozyme</u>) - o ou ligne <u>Rechercher dans la Protein Data Bank</u>, entrer l'indicatif de la molécule étudiée (1J8H) - dans l'onglet <u>Commande</u>, descendre à la ligne : - o <u>Représenter</u>, choisir la représentation la plus adaptée - o <u>Colorer</u>, cliquer sur <u>Chaines</u> : la légende des couleurs s'affiche en bas à gauche de l'écran, avec les noms des chaînes lorsque vous survolez l'initiale avec la souris - o Sur la molécule d'anticorps globale, sélectionner les acides aminés faisant partie de la zone variable repérée dans avec le logiciel GenieGen2 ci-dessous en cliquant sur la loupe en face de la ligne <u>Sélectionner</u>, taper les n° des acides aminés, et les mettre en évidence - Dans l'icône <u>Réglages</u> (dans le coin supérieur droit de l'écran), sélectionner <u>Afficher les ponts disulfures</u>. Ils apparaissent sous forme de barres jaunes épaisses. - Faire une capture d'écran lorsque vous êtes satisfait de l'apparence - Recommencer avec les autres molécules

Protocole : Comparaison des récepteurs des cellules de l'immunité adaptative avec Anagène ou GenieGen2

Avec Anagène	avec GenieGen2 :
Comparer la structure de 2 récepteurs différents spécifiques d'antigènes différents : • Ouvrir (igg-multiples.edi) grâce au logiciel Anagène • comparer les chaînes légères (L) entre elles et les chaînes lourdes (H) entre elles pour les anticorps ; • comparer les chaînes A entre elles et les chaînes B entre elles pour les récepteurs T. • repérer les zones constantes et les zones variables	logiciel en ligne https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/geniegen2/ Fiche technique : https://cosphilog.fr/geniegen2/ft-geniegen2.pdf • Ouvrir le fichier téléchargé igg-multiples.edi depuis l'écran d'accueil <u>OÙ</u> chercher le mot-clé « immuno », et choisir le pack de séquence <u>Diversité des anticorps (chaînes légères)</u>, qui correspond aux chaînes légères de différents anticorps = immunoglobulines chez un même individu, puis cliquer sur le bouton en bas <u>Charger ces séquences</u> • repérer les zones constantes et les zones variables • Ouvrir la banque de séquence : fichier > ouvrir la banque de séquences, dans « <u>Dossiers pédagogiques externes</u>, sélectionner <u>Séquences de 8 chaînes lourdes d'individus différents</u>. • Sélectionner les chaînes légères (L) seules, puis les chaînes lourdes (H) seules, et repérer de même les zones constantes et les zones variables.