Enseignement d'Immunologie
Septembre 2009

ET01 & ET02
Introduction aux techniques immunologiques
Exercices

DES de Biologie Médicale

Universités des Sciences de la Santé
CAMBODGE – LAOS

Avec la participation de l'Université Pierre et Marie Curie

Soutenu par :

Projet d'Appui à l'Enseignement Supérieur Médical en R.D.P. Lao

Projet d'Appui à l'Université des Sciences de la Santé au Cambodge

Fondation Mérieux au Cambodge et au Laos (Centre Christophe Mérieux)

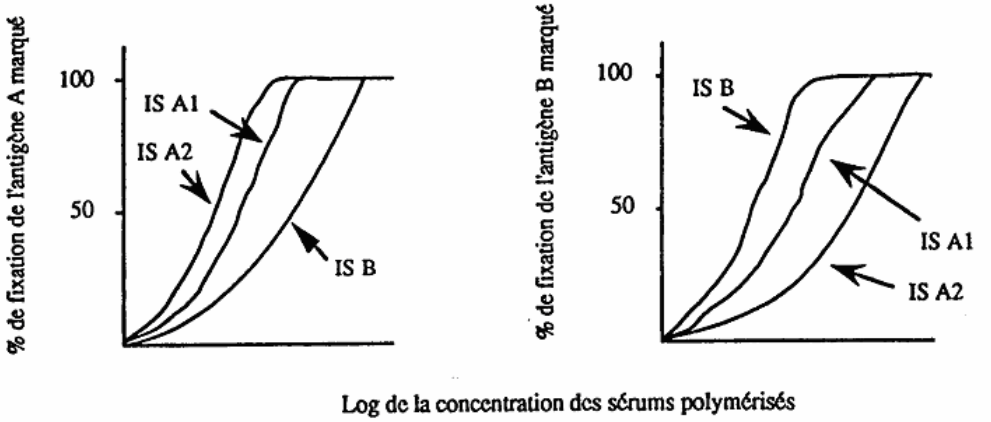
Introduction aux techniques immunologiques
Exercices

I.

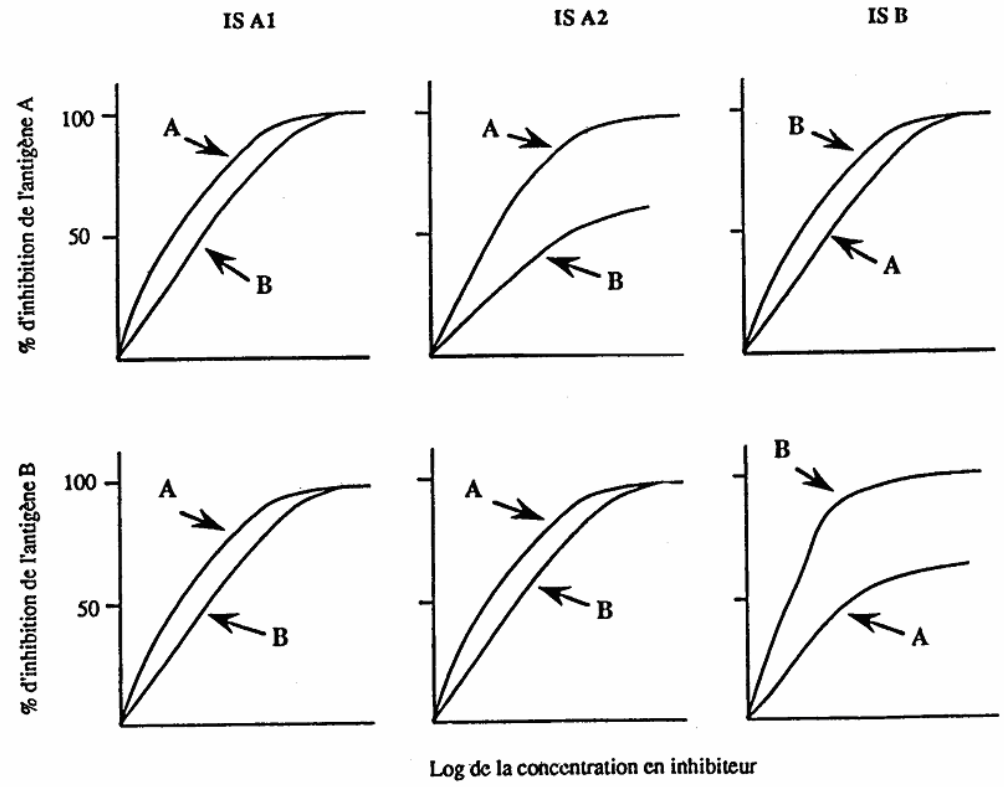
Des immunsérums sont préparés contre deux antigènes A et B:

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

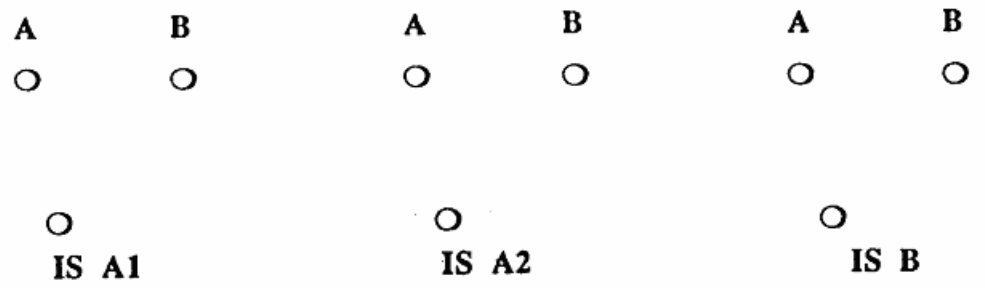
Ces trois immunsérums précipitent en milieu liquide les antigènes A et B. Les courbes de fixation des antigènes marqués sur les sérums insolubilisés sont les suivantes :



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



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



II.

Des cellules de poulet, issues du sang, sont injectées à des souris. Après plusieurs jours, les cellules spléniques de ces souris sont fusionnées avec un myélome non-sécréteur afin d'obtenir des hybridomes. Deux anticorps monoclonaux (A1 et A2), reconnaissant les lymphocytes T du poulet, sont particulièrement étudiés.

Les lymphocytes périphériques sont radiomarqués à leur surface. Les cellules sont ensuite lysées en présence de détergent afin de solubiliser les membranes. Des expériences d'immunoprécipitation sont réalisées avec les anticorps monoclonaux insolubilisés et les produits immunoprécipités sont traités ou non avec du dithiothréitol (DTT) puis analysés en SDS-PAGE (Figure 2) :

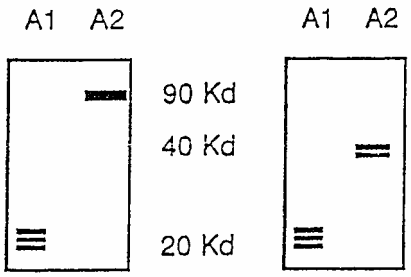


FIGURE 2

La même expérience est réalisée avec un détergent doux (Figure 3) :

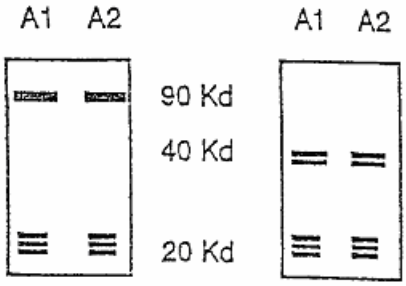


FIGURE 3

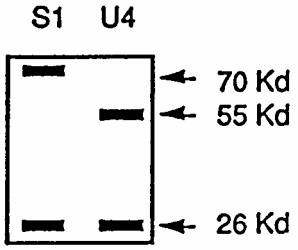
1. *Analysez ces résultats.*

III.

L'hybridome S1 a été obtenu en fusionnant les cellules d'un myélome non sécréteur avec les cellules spléniques d'une souris immunisée contre la phosphorylcholine (PC) couplé à de l'hémocyanine. S1 synthétise un anticorps d'isotype μ,κ. Après un nouveau clonage de l'hybridome S1, 30000 clones sont obtenus, l'un d'eux (U4) est particulièrement étudié.

Les cellules S1 ou U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S. Les immunoglobulines sécrétées sont précipitées par un sérum de lapin anti-κ, puis réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. L'autoradiographie de ce gel est présentée sur la **Figure 1** :

Figure 1



1. *Proposer au moins deux hypothèses pour expliquer ces résultats.*

La spécificité des immunoglobulines sécrétées par U4 est analysée par des tests d'hémagglutination. Une éventuelle activité anti-PC est recherchée vis-à-vis de la phosphorylcholine couplée aux globules rouges de mouton (PC-GRM). Les titres agglutinants obtenus sont présentés dans le **Tableau 1** :

Tableau 1

Surnageant de culture	GRM	PC-GRM	Hémagglutination de PC-GRM en présence d'un sérun amplificateur	
			Anti-IgM	Anti-IgG1
S1	0 *	7	7	7
U4	0	0	0	5

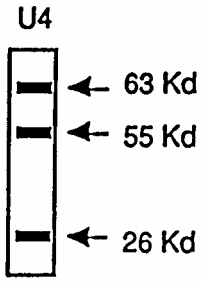
* Titre d'hémagglutination

2. *Ces nouvelles données permettent-elles d'étayer l'une des hypothèses formulées précédemment ?*

Les cellules U4 sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S, puis lysées. Les immunoglobulines ainsi synthétisées sont précipitées par un anti-κ, réduites et déposées sur un gel SDS de polyacrylamide. La **Figure 2** ci-dessous présente l'autoradiographie obtenue.

3. *Comment expliquer la présence des deux chaînes lourdes ? Est-ce compatible avec le caractère monoclonal des hybridomes ?*

Figure 2



N.B. : La séquence partielle NH2-terminale des deux chaînes lourdes est identique au VH de S1.

IV.

A partir de cellules isolées de moelle osseuse de souris, une lignée cellulaire est immortalisée par transfection avec le virus d'Abelson. Après six semaines de culture, la lignée C est clonée et trois sous-clones (C1, C2, C3) sont particulièrement étudiés. Un marquage direct des cellules avec des anticorps anti-isotypiques couplés à la fluorescéine donne les résultats suivants:

Anticorps couplés à la fluorescéine	Lignées cellulaires			
	C	C1	C2	C3
Anti-μ	-	-	+	-
Anti-κ	-	-	+	-

Ces lignées sont cultivées en présence de méthionine ^{35}S. Une expérience d'immunoprécipitation à l'aide d'anti-μ est réalisée à partir du lysat cellulaire de chaque lignée. L'immunoprécipité est réduit et alkylé puis déposé sur un gel d'électrophorèse en présence de SDS. Après migration, le gel est autoradiographié. L'autoradiographie est présentée sur la Figure 1.

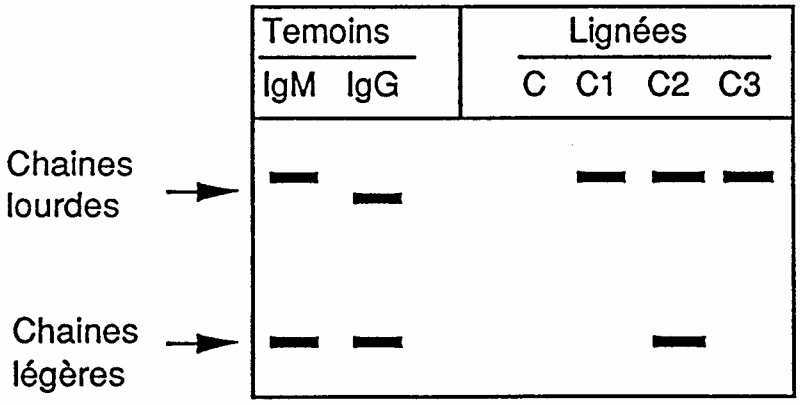


Figure 1

1. *Analyser les résultats.*

V.

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

Les souris B10.BR et mutantes sont immunisées contre l'ovalbumine (OVA). La production d'anticorps contre l'antigène est recherchée. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

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

1. *Commenter.*

Les cellules spléniques sont isolées à partir des deux types de souris. Grâce à un trieur de cellules, les cellules marquées avec un anticorps anti-IgM fluorescent sont séparées et utilisées dans les trois expériences décrites ci-dessous.

Expérience n°1 : Les cellules sont marquées à l'aide des anticorps monoclonaux anti-I-A^k ou anti-I-E^k couplés à un fluorochrome et analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont présentés sur la figure 1 :

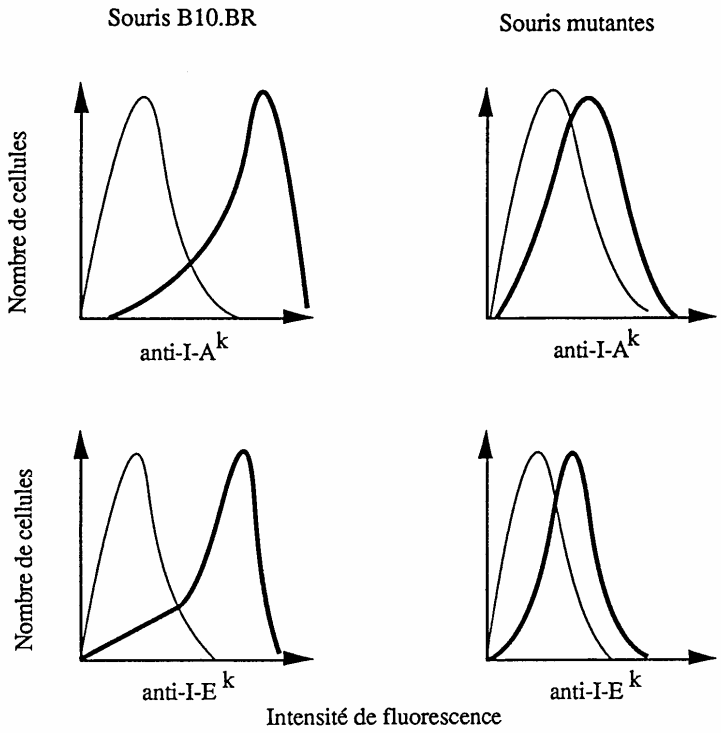


Figure 1 : Fluorescence des cellules spléniques IgM^+. Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'autofluorescence des cellules.

Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine ^{35}S puis lysées. Le lysat est incubé en présence de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé. Les produits immunoprécipités sont ensuite chauffés à 95°C puis déposés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Après migration électrophorétique, le gel est séché et autoradiographié. Les résultats sont présentés sur la figure 2 :

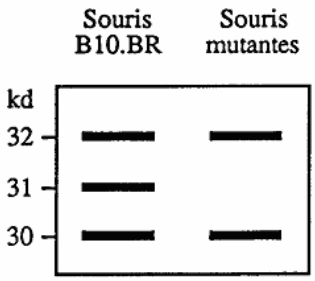


Figure 2 : Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

Expérience n°3 : Les cellules sont marquées à leur surface à l'aide de l'iode 125 puis lysées. La même expérience d'immunoprécipitation que ci-dessus est réalisée. Cependant, les échantillons immunoprécipités sont ou non chauffés à 95°C avant d'être déposés sur le gel. Les résultats sont présentés sur la figure 3 :

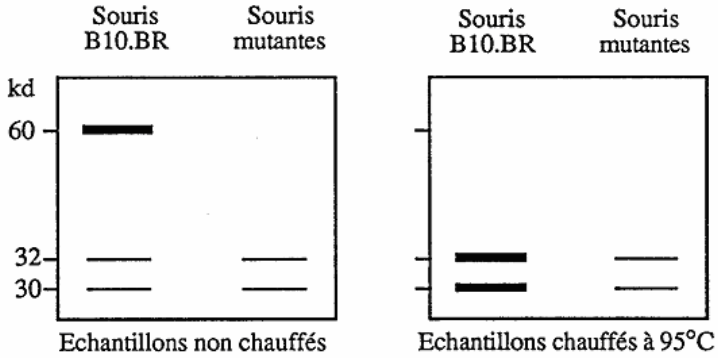


Figure 3 : Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

2. *Interpréter ces expériences en indiquant notamment pourquoi les cellules IgM$^+$ ont été sélectionnées.*

Deux hybridomes T (T1 et T2) obtenus contre le lysozyme de poulet sont testés pour leur capacité à produire de l'interleukine 2 (IL-2) en réponse à l'antigène. Celui-ci est présenté par des cellules spléniques provenant des deux types de souris. Les hybridomes T1 et T2 reconnaissent respectivement les peptides L46-61 et L112-129 présentés dans un contexte I-A^k. Les résultats sont résumés sur la figure 4 :

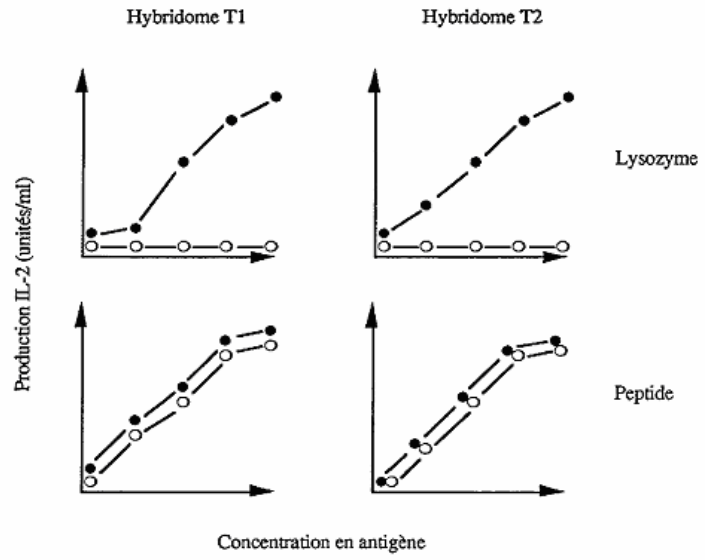


Figure 4 : IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).

3. *Décrire succinctement un test permettant de mesurer la production d'IL-2.*

Afin de mieux comprendre l'observation ci-dessus, les expériences suivantes sont réalisées.

Dans une première expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont marquées à leur surface à l'iode 125 et lysées. Avant immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k insolubilisé, les lysats sont incubés en présence du peptide L46-61. Les échantillons sont ensuite chauffés ou non comme précédemment et déposés sur gel de polyacrylamide.

Dans la seconde expérience, les cellules spléniques des souris B10.BR ou mutantes sont incubées en présence du peptide L46-61 marqué à l'iode 125 puis lysées. Une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-I-A^k est effectuée. L'échantillon immunoprécipité est déposé sur le gel de polyacrylamide sans chauffage. Les résultats sont présentés sur la figure 5 :

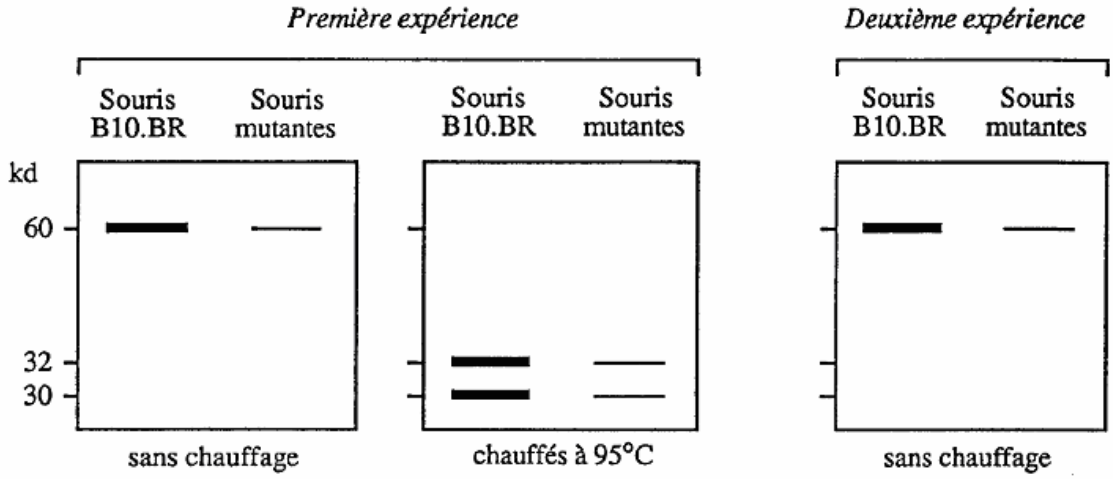


Figure 5 : Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A^k.

4. *Interpréter ces résultats en les corrélant avec ceux des expériences précédentes*

5. *Proposer un schéma simple rendant compte du défaut de présentation de l'antigène par les cellules de la souris mutante.*