

## **Travaux Pratiques d'Immunologie Fondamentale 2001**

L'objectif de cette semaine de Travaux Pratiques est de vous familiariser avec certaines techniques couramment utilisées en immunologie mais surtout de mettre en œuvre une véritable démarche scientifique expérimentale : définition d'un problème, recherche de la méthode, mise en œuvre expérimentale, analyse des résultats, interprétation et discussion.

Deux thèmes indépendants sont abordés : le premier (*Mise en évidence d'un processus de délétion clonale au niveau du répertoire T chez la souris*) concerne le développement et la sélection des lymphocytes T ; le deuxième (*Etude de la réponse isotypique des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines chez différentes lignées de souris*) aborde la question de la mise en place du répertoire des lymphocytes B et la sélection du répertoire lors de la réponse immunitaire.

Ce polycopié donne, dans une première partie, une présentation de ces sujets qui doit vous conduire à poser des hypothèses auxquelles vous essaieriez de répondre. Dans la deuxième partie, vous trouverez une série de protocoles expérimentaux décrivant les techniques que vous pouvez mettre en œuvre. Il vous appartiendra de choisir parmi ces protocoles, en les adaptant éventuellement, afin de répondre aux questions posées.

Par conséquent, vous prendrez soin de tenir un cahier de manipulation dans lequel vous consignerez vos expériences. Ceci vous permettra finalement de rédiger un compte-rendu, dont le contenu est laissé à votre convenance. L'objectif du compte-rendu est de démontrer au lecteur votre capacité à aborder le problème, à poser des hypothèses, à mettre en œuvre des expériences pour tester ces hypothèses, à analyser et à discuter les résultats obtenus.

Le compte-rendu (*un C.R. par binôme*) ne devra pas dépasser 4 pages A4 (+ éventuellement 2 pages d'annexes, tableaux, figures, graphes...). Vous n'oublierez pas de répondre aux questions de l'**Annexe I** (*un questionnaire par personne*) que vous rendrez avec votre compte-rendu. Vous déposerez votre compte-rendu au secrétariat de Génétique (tour 42/43, 1<sup>er</sup> étage) **au plus tard le 15 mai à 17 heures**.

***Apportez une blouse (obligatoire) et votre matériel de dissection (si possible).***

## Thème n°1

### Mise en évidence d'un processus de délétion clonale au niveau du répertoire T chez la souris

#### *Les antigènes Mls*

Les antigènes Mls (Minor lymphocyte stimulating antigen) sont responsables de réactions lymphocytaires mixtes entre lignées de souris histocompatibles. Ces molécules sont considérées comme des superantigènes puisqu'elles sont capables de stimuler un grand nombre de cellules T exprimant à leur surface certains V $\beta$ . La présentation de ces antigènes aux cellules T nécessite l'intervention de molécules du CMH de classe II. D'autre part, l'expression d'un antigène Mls dans une lignée de souris entraîne chez celle-ci la délétion des cellules T exprimant les V $\beta$  reconnaissant l'antigène Mls.

Nous vous proposons, lors de ces Travaux Pratiques, de caractériser l'antigène Mls-1 et d'étudier les conséquences de son expression sur le répertoire T de la souris. Nous allons particulièrement étudier les lignées DBA/2 (Mls-1<sup>a</sup>) et C57BL/6 (Mls-1<sup>b</sup>).

#### *Caractéristiques génétiques des lignées de souris*

Lignée	H-2						IgH	Mls-1	Coloration du pelage
	K	A $\alpha$	A $\beta$	E $\alpha$	E $\beta$	D			
DBA/2	d	d	d	d	d	d	c	a	gris-jaune
C57BL/6	b	b	b	-	b	b	b	b	noire
F1(B6D2)	d/b	d/b	d/b	d/b	d/-	d/b	c/b	a/b	noire
B6.D2*	d	d	d	d	d	d	b	b	noire
BALB/c	d	d	d	d	d	d	a	b	blanche

\* B6.D2 est une lignée congénique d'haplotype H-2<sup>d</sup> (celui de la lignée DBA/2) sur fonds C57BL/6.

**Question 1 :** *Sachant que lorsque l'on croise entre elles des souris F1(B6D2) on obtient quatre types de couleur de pelage (cf. Annexe B), quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer la couleur du pelage des souris ?*

**Mise en évidence de l'expression de l'antigène Mls-1<sup>a</sup> chez la souris DBA/2 et nature des cibles V $\beta$**

Les cellules T exprimant un récepteur T reconnu par les anticorps KJ16 mais pas par les anticorps F23.2 sont capables de répondre à Mls-1<sup>a</sup>, comme l'indiquent les résultats présentés dans le tableau suivant, où des hybridomes T ont été testés pour leur production d'IL2 en réponse à des cellules spléniques irradiées de différentes lignées de souris. Pour la caractérisation des anticorps monoclonaux KJ16 et F23.2, se reporter à l'Annexe C.

Hybridomes T	Marquage par fluorescence avec		Production d'IL2 en réponse aux cellules cibles de souris (en unités/ml)		
	KJ16	F23.2	DBA/2	C57BL/6	B6.D2
K16.1	+	-	810	10	10
K16.2	+	-	470	10	10
K16.3	+	-	270	10	10
K16.4	+	+	10	10	10
K16.5	+	+	50	10	10

**Question 2 : Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour rendre compte de ces observations ?**

**La piste des MMTV...**

Il y a quelques années, il a été mis en évidence un phénomène de délétion clonale "atypique" des cellules T exprimant V $\beta$ 14 chez les souris C3H/HeJ :

Souris	Cellules T CD4 <sup>+</sup> exprimant V $\beta$ 14 (%)
C3H/HeJ	2,8
B10.BR	8,1
C3H/HeJ x B10.BR	2,5
B10.BR x C3H/HeJ	6,8
C3H/HeJ x (B10.BR x C3H/HeJ)	1,8
(B10.BR x C3H/HeJ) x C3H/HeJ	7,0

**Question 3 : Qu'est-ce qu'un phénomène de délétion clonale ? Pourquoi le qualifie-t-on ici "d'atypique" ?**

Ces expériences montrent que le phénotype de délétion est lié à la mère. Par différentes expériences d'adoption de souris nouveau-nés par des mères de lignées différentes, les auteurs de cette étude ont montré une liaison du phénotype de délétion à un facteur transmissible par le lait. Il était par ailleurs connu que la lignée C3H/HeJ se différencie de la lignée B10.BR par la présence dans le lait d'un rétrovirus exogène de la famille des MMTV "*Mouse Mammary Tumor Virus*".

**Question 4 :** *Ces observations suggèrent que l'élément responsable de la délétion puisse être codé par une séquence rétrovirale Mtv. Pouvez-vous formuler d'autres hypothèses rendant compte de cette liaison à la mère du phénomène de délétion ?*

Les MMTV sont des rétrovirus induisant des tumeurs mammaires chez la souris. Curieusement, au début des années 80, les virologistes ont caractérisé, en plus des gènes typiques de rétrovirus *gag*, *pol* et *env*, une phase ouverte de lecture au niveau de la région LTR-5', appelée région *orf*, codant une chaîne polypeptidique de 320 acides aminés mais dont la fonction n'a pu être élucidée (cf. Annexe D).

On trouve dans le génome de la majorité des lignées de souris des intégrations rétrovirales, dénotée *Mtv*, mises en évidence par la technique de Southern avec une sonde dérivée de MMTV (cf. Annexe D). Ces intégrations, vestiges de multiples infections rétrovirales au cours de milliers d'années, se sont produites au hasard et sont en nombre variable suivant les lignées de souris ; elles sont inactives pour la plupart et héritées comme des caractères mendéliens.

### **Objectif**

Nous vous proposons, dans cette partie des Travaux Pratiques, de mettre en évidence à l'aide d'une étude génétique à partir de souris F2(DBA/2 x C57BL/6), les éléments intervenant dans le processus de délétion clonale de cellules T lié à l'expression de Mls-1<sup>a</sup>.

Au vu des données préliminaires ci-dessus, vous vous attacherez à émettre une ou plusieurs hypothèse(s) quant à la nature de ces éléments. En fonction des techniques proposées et des réactifs disponibles, vous mettrez au point un protocole afin de tester ces hypothèses.

*N.B. : Il s'agit ici de réaliser une étude génétique, qui suppose de disposer de données portant sur suffisamment d'individus pour pouvoir interpréter les résultats ; étant donné la durée limitée des Travaux Pratiques, il est fort probable que vous devrez accorder vos protocoles avec les autres binômes, partager le matériel et vos résultats.*

## Thème n°2

### Etude de la réponse isotypique des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines chez différentes lignées de souris

Chez la souris de laboratoire, cinq classes d'immunoglobulines (Ig) ont été décrites : IgM, IgG (quatre sous-classes : 1, 2a, 2b, 3), IgA, IgE et IgD. La chaîne lourde présente cinq isotypes qui déterminent la classe de l'Ig :  $\mu$ ,  $\gamma$  (quatre sous types : 1, 2a, 2b, 3),  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ . La chaîne légère présente deux isotypes :  $\kappa$  et  $\lambda$ , qui comptent respectivement pour 95 % et 5 % des Ig sériques.

Au niveau génomique, le locus des chaînes lourdes est composé de quelques centaines de segments géniques V, quinze segments D et quatre segments J fonctionnels. Le locus  $\kappa$  comporte un seul gène  $C\kappa$ , cinq segments géniques  $J\kappa$  et plus de deux cents segments géniques  $V\kappa$ . Le locus  $\lambda$  présente une organisation différente avec deux unités de recombinaison : la première comprenant les segments géniques  $V\lambda_2$  et  $V\lambda_x$  et deux répétitions  $J\lambda_2-C\lambda_2$  et  $\psi J\lambda_4-\psi C\lambda_4$  ; la seconde compte un seul segment génique variable appelé  $V\lambda_1$  et deux répétitions  $J\lambda_3-C\lambda_3$  et  $J\lambda_1-C\lambda_1$ . Les réarrangements V-J ont lieu préférentiellement au sein de chaque unité de recombinaison, ce qui conduit à la production de quatre chaînes  $\lambda$  majoritaires en sérologie :  $\lambda_1$ ,  $\lambda_3$  et  $\lambda_2$ ,  $\lambda_x$  codées respectivement par les réarrangements géniques V et J et l'association aux segments C suivants :  $V\lambda_1J\lambda_1-C\lambda_1$ ,  $V\lambda_1J\lambda_3-C\lambda_3$ ,  $V\lambda_2J\lambda_2-C\lambda_2$  et  $V\lambda_xJ\lambda_2-C\lambda_2$ . Ces quatre chaînes sont retrouvées au niveau sérique dans les pourcentages suivants : 60, 8, 16 et 16 %. Une très forte identité de séquence caractérise les différents segments de gènes (70 % entre  $C\lambda_1$  et  $C\lambda_2/C\lambda_3$ , 97 % entre  $C\lambda_2$  et  $C\lambda_3$ , 97 % entre  $V\lambda_1$  et  $V\lambda_2$ ), à l'exception de  $V\lambda_x$  qui ne présente que 49 % d'identité avec  $V\lambda_1/V\lambda_2$ .

Ces ressources génétiques sont à l'origine du répertoire potentiel représenté par l'ensemble des Ig qui peuvent être produites en théorie par les différents mécanismes de recombinaison. Le répertoire disponible ou émergent succède au répertoire potentiel qui ne peut être entièrement représenté ; il englobe les spécificités Ig présentes sur les lymphocytes B circulants susceptibles d'entrer en contact avec l'antigène (Ag). Le répertoire réel issu du répertoire disponible est représenté par les spécificités Ig sélectionnées par les Ag et présentes dans la circulation.

Dans le cas d'une immunisation avec la phosphorylcholine (PC), on observe, chez la souris BALB/c, une réponse « canonique » caractérisée par l'idiotype T15 : toutes les immunoglobulines anti-PC sont reconnues par un anticorps anti-idiotypique anti-T15. T15 est un des premiers anticorps anti-PC caractérisés chez la souris. L'anticorps T15 utilise le segment  $V_H T15$ , un membre de la sous-famille  $V_{H1}$ . Plus généralement, on observe que les anticorps anti-PC sont reconnus par un anticorps anti- $V_H T15$ .

Il apparaît intéressant de pouvoir tester la capacité de réponse contre PC chez des souris génétiquement modifiées, présentant des répertoires potentiels restreints et en partie biaisés. Les lignées de souris étudiées sont les suivantes :

- BC8, souris de fonds génétique C57BL/6 (B6), congénique pour l'haplotype Ig-h<sup>a</sup> de la souris BALB/c ;
- B6.T15i *knock-in*, souris de fonds génétique B6, transgénique pour un gène de chaîne lourde V<sub>H</sub>T15 (V<sub>H1</sub>-D<sub>FL16.1</sub>-J<sub>H1</sub>) issu d'un hybridome S107 anti-PC (Ig-h<sup>a</sup>), inséré spécifiquement au niveau du locus de chaîne lourde d'Ig, ce qui a pour conséquence d'empêcher les réarrangements endogènes sur ce locus ;
- B6.T15i.Cκ<sup>-/-</sup>, souris de fonds génétique B6, invalidée pour le gène Cκ et transgénique pour le gène réarrangé de chaîne lourde V<sub>H</sub>T15 (cf. B6.T15i).

*Question 5 : Pourquoi prend-on la précaution de n'utiliser que des souris de fonds génétique C57BL/6 ?*

*Question 6 : Quel est le répertoire potentiel d'immunoglobulines chez les souris B6.T15i et B6.T15i.Cκ<sup>-/-</sup> ?*

Les souris ont été immunisées deux fois avec la PC-Thyroglobuline à J0 et J15 ; pour chaque lignée de souris, nous disposons de sérum correspondant à la réponse secondaire. Nous vous proposons d'étudier la réponse isotypique des chaînes lourdes et des chaînes légères des Ig anti-PC chez ces lignées de souris. La composition isotypique des Ig du sérum au cours de l'immunisation sera comparée à celle du sérum de souris non immunisées. Ces résultats seront comparés aux isotypes de chaînes lourdes et légères d'anticorps monoclonaux anti-PC.

*N.B. : Comme pour la première partie, il s'avérera sans doute nécessaire de coordonner vos expériences avec celles des autres binômes afin de pouvoir interpréter vos résultats.*

## **Annexe A : Organisation possible de la semaine**

### ***1<sup>er</sup> jour***

- Préparation des protocoles expérimentaux pour la semaine.
- 1<sup>ère</sup> série de PCR (journée).
- 2<sup>ème</sup> série de PCR (nuit).
- Préparation du gel d'agarose pour électrophorèse.
- Mise en route des tests ELISA.

### ***2<sup>ème</sup> jour***

- Analyse des produits de PCR sur gel d'agarose.
- Dissection, préparation des suspensions cellulaires et marquage des cellules avec des anticorps couplés avec des fluorochromes.
- Suite des tests ELISA.
- Suites des tests PCR (éventuellement).

### ***3<sup>ème</sup> jour***

- Suite et fin des tests ELISA du 1<sup>er</sup> jour.
- Suites des tests PCR (éventuellement).
- Suites des tests ELISA (éventuellement).

### ***4<sup>ème</sup> jour***

- Analyse d'articles.
- Suites des tests PCR (éventuellement).
- Suites des tests ELISA (éventuellement).
- Analyse des résultats.

### ***5<sup>ème</sup> jour***

- Analyse d'articles.
- Suites des tests PCR (éventuellement).
- Suites des tests ELISA (éventuellement).
- Analyse de l'ensemble des résultats.

## Annexe B : Produits biologiques disponibles

*N.B. Tous ces produits sont **chers et fragiles**. Prenez en soin, notamment en les conservant au froid (-20°C ou +4°C selon les produits).*

### ***Anticorps monoclonaux marqués***

- anti-IE-FITC
- Anti-CD3-FITC
- Anti-CD4-FITC
- Anti-CD8-FITC
- Anti-CD4-Biotine
- F23.2-FITC
- F23.2-Biotine
- KJ16-Biotine

Les anticorps couplés à la biotine peuvent être révélés par de la Streptavidine couplée à la Phycoérythrine (Strep-PE)

### ***Souris***

- F1(DBA/2 x C57BL/6)
- F2(DBA/2 x C57BL/6) :

66 souris dont :

- 18 mâles, 17 femelles de pelage noir
- 6 mâles et 6 femelles de pelage agouti
- 8 mâles et 7 femelles de pelage gris
- 2 mâles et 2 femelles de pelage gris-jaune

### ***Acides Nucléiques***

- ADN préparés à partir de foie ou de queue de souris BALB/c, DBA/2, C57BL/6, 38CH (dépourvue d'intégration Mtv), BALB.D2 (congénique de BALB/c pour Mtv7), F1(DBA/2 x C57BL/6) et F2(DBA/2 x C57BL/6).
- Marqueur de taille "100 bp ladder".
- Amorces spécifiques des séquences *orf* de *Mtv* : #102 (sens, universelle), #101 (anti-sens, universelle), Mtv-GrI, Mtv-GrII, Mtv-GrIII, Mtv-GrVII (anti-sens, spécifiques de groupes d'*orf*). Cf. Annexe E pour les détails.

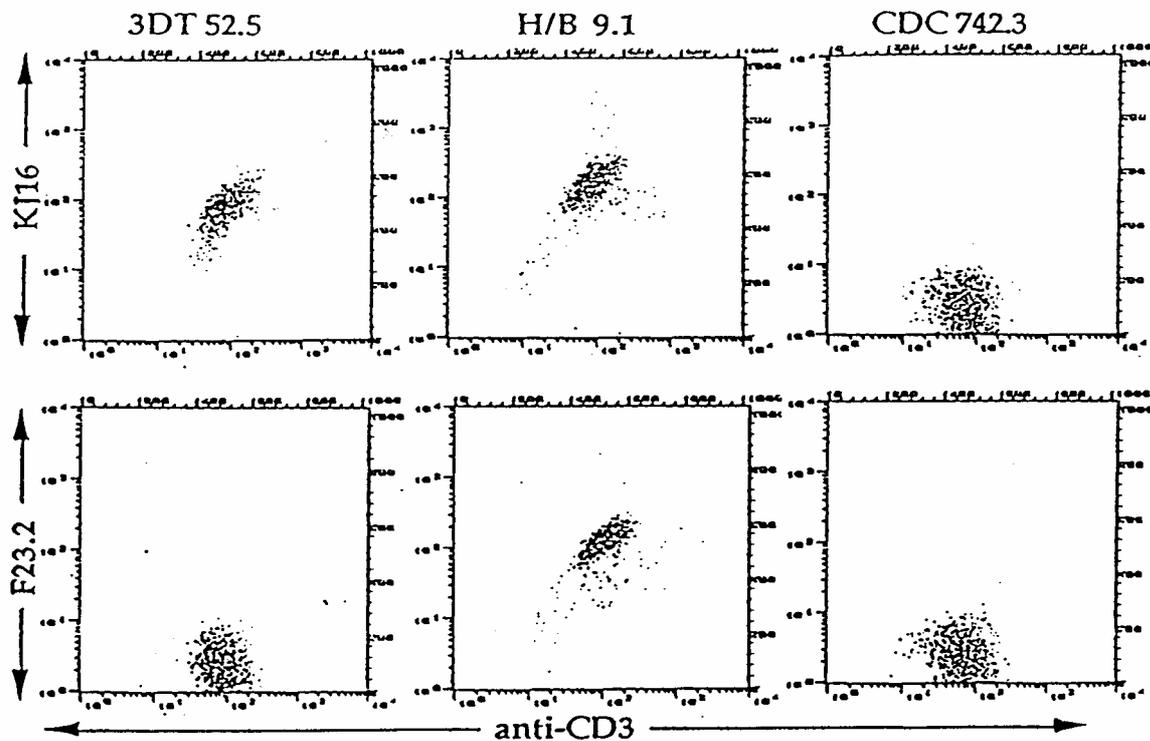
### ***Sérum et Anticorps***

- anti-Ig de souris
- anti-Ig M de souris couplés à la peroxydase
- anti-Ig G1 de souris couplés à la peroxydase
- anti-Ig G2a de souris couplés à la peroxydase
- anti-Ig G2b de souris couplés à la peroxydase
- anti-Ig G3 de souris couplés à la peroxydase
- anti-Ig A de souris couplés à la peroxydase
- anti-kappa de souris couplés à la peroxydase
- anti-lambda de souris couplés à la peroxydase
- Anticorps de référence d'isotypes IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, Ig-kappa et Ig-lambda à 100µg/ml.
- 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid)  
(= ABTS: substrat de la peroxydase. La réaction enzymatique correspondante conduit à la formation d'un produit coloré que l'on peut doser en mesurant la densité optique à 405 nm)
- Sérums de souris BC8, B6.T15i, B6.T15i.C $\kappa^{-/-}$  immunisées et non immunisées.
- Anticorps purifiés anti-PC (HOPC8) et anticorps purifié contrôle (MOPC315).
- Anticorps partiellement purifiés (« F18 ») HOPC8, MOPC511, TEPC15, MOPC167, MOPC603, CBBPC3, MOPC173.
- PC-SAB, phosphorylcholine couplée à la sérumalbumine bovine.

## Annexe C : Caractérisation des anticorps F23.2 et KJ16

### *Spécificité des anticorps F23.2 et KJ16 vis-à-vis d'hybridomes T $\alpha\beta$*

Les anticorps F23.2 et KJ16 reconnaissent certaines chaînes TCR $\beta$ .



### *Origine des hybridomes T $\alpha\beta$ utilisés*

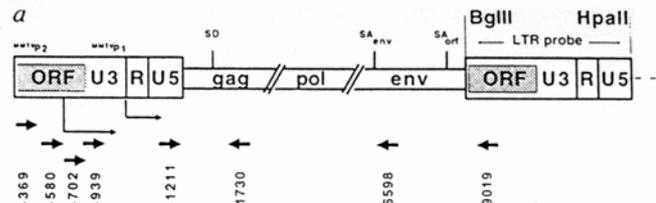
Nom de l'hybridome	Lignée d'origine	Spécificité
3DT52.5	BALB/c	H-2D <sup>d</sup>
H/B 9-1	BALB/c	Lysozyme
CDC 742-3	BALB/c x DBA/2	Lysozyme

## Annexe D : Structure et distribution des Mtv

### Structure schématique du provirus Mtv

Figure tirée de Günzburg, W. H., F. Helnemann, S. Wintersperger, T. Miethke, H. Wagner, V. Erfle, and B. Salmons (1993) Endogenous superantigen expression controlled by a novel promoter in the MMTV long terminal repeat. *Nature* 364:154.

FIG. 1 The U3 region of the MMTV LTR contains a novel promoter. a. Schematic representation of an MMTV provirus. Two MMTV LTRs consisting of the U3 region containing the ORF; the R and U5 region flanks the viral structural genes *gag*, *pol* and *env*. The position of the MMTV promoter and associated transcription initiation site (<sup>MMTV</sup>P1) are shown, as is the position of the novel promoter and initiation site (<sup>MMTV</sup>P2) identified here.



### Distribution des intégrations provirales Mtv chez 18 lignées de souris

Figure tirée de Frankel, W. N., C. Rudy, J. M. Coffin, and B. T. Huber (1991) Linkage of Mls genes to endogenous mammary tumour viruses of inbred mice. *Nature* 349:526.

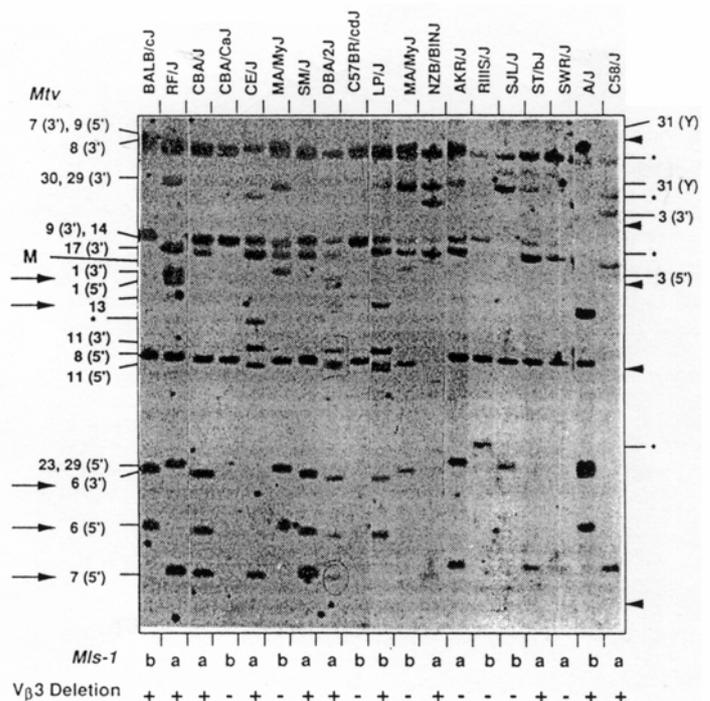


FIG. 2 Distribution of *Mtv* proviruses in 18 inbred strains of mice. *EcoRI* has often been used for identification of 5' and 3' MMTV-host DNA junction fragments<sup>2,8,9,36-38,39</sup>, but we found that certain proviruses could more readily be scored as *PvuII* fragments. Shown are genomic DNA from 18 inbred strains of mice, digested with *PvuII*, blotted and hybridized to a <sup>32</sup>P-labelled MMTV LTR probe<sup>39</sup> as previously described<sup>35</sup>. Also typed but not shown are DBA/1J, C3H/HeJ, C57BL/6J and C57/LJ. For many strains, fragment identity (at the left) was inferred by *PvuII* and *EcoRI* fragments co-migrating with those from strains analysed formally in a genetic cross (unpublished results). In most cases hybridization to a MMTV *env* probe (not shown) identified the 5' or 3' fragments. Unidentified or novel *Mtv* loci are marked with an asterisk. M; the novel *Mtv* of MA/MyJ mice. *Mtv-31* is Y-linked<sup>40</sup>. Arrows at the left show *Mtv-1*, *Mtv-6*, *Mtv-7* or *Mtv-13* fragments. Drawn below the autoradiograph is the *Mts-1* and *Vβ3* classification of these strains, compiled from several sources<sup>1,5,7,19</sup>. Numbers on the right are molecular size standards (kb): 23.5, 9.4, 6.6, 4.3 and 2.3, top and bottom.

## Annexe E : Technique d'amplification génique

*N.B. : Cette technique, communément appelée PCR (Polymerase Chain Reaction), ayant pour principe l'amplification d'une séquence d'ADN cible à l'aide d'une polymérase d'ADN thermostable et d'amorces oligonucléotidiques spécifiques, on prendra une précaution particulière à éviter les contaminations de matériel entre tubes sous peine de fausser irrémédiablement les résultats.*

### Choix des amorces

- Sur la base des séquences de Mtv disponibles dans les banques de séquences, sept groupes d'*orf* ont pu être identifiés. Des amorces spécifiques de groupe ont été dessinées. Leur utilisation permet d'amplifier spécifiquement les séquences *orf* appartenant à chaque groupe. Nous disposons d'amorces anti-sens spécifiques des groupes I, II, III et VII, toutes utilisées avec une amorce sens commune, appelée #102 .
- Les souris DBA/2 et C57BL/6 portent au moins une intégration Mtv appartenant aux groupes suivants :
 

DBA/2	II, III, VI, VII
C57BL/6	II, VI

### Préparation des tubes pour l'amplification

- Les réactions d'amplification sont réalisées dans des tubes de 0,5 ml dans un volume réactionnel de 50 µl. Les conditions optimales sont les suivantes :

	Stock	Final
Tampon enzyme	10 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM pour Mtv-GrI, II, VII, #101 2,5 mM pour Mtv-GrIII
dNTP	10 mM	0,2 mM
amorce sens	10 µM	0,6 µM
amorce antisens	10 µM	0,6 µM
<i>Taq</i> polymerase	5 U/µl	1 U/réaction
ADN génomique		5 µl soit environ 500 ng

- Pour chaque combinaison d'amorces, on pourra réaliser une solution commune, dite " master-mix ", que l'on répartira dans les microtubes avant d'y ajouter la matrice ADN.

- Couvrir le volume réactionnel avec deux gouttes d'huile minérale afin d'éviter l'évaporation.
- Les tubes sont alors disposés sur le thermocycleur (avec ceux des autres binômes) et sont incubés en suivant le programme suivant :
  1. Dénaturation à 94°C, 5 min
  2. 40 cycles comprenant
    - dénaturation à 94°C, 1 min
    - hybridation à 50°C, 1 min 30
    - extension à 60°C, 15 s
    - extension à 72°C, 1 min 30
  3. Extension à 72°C, 5 min

### ***Préparation des tubes pour l'amplification***

Les produits d'amplification sont analysés par migration électrophorétique sur gel d'agarose et coloration par le bromure d'éthidium :

- Préparer un gel d'agarose 1,5 % en tampon TAE 1X (4,84 g TRIZMA base, 1,15 ml acide acétique glacial, 0,38 g EDTA, qsp 1 l) contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium. *Le BET est un produit toxique (mutagène) qui doit être manipulé avec précaution (port de gants), les déchets contenant du BET doivent être enveloppés sous plastique.*
- Installer le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration.
- Déposer les échantillons : 5 µl de produit d'amplification + 2 µl de solution de dépôt (20 ml glycérol, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8, 125 mg bromophénol, qsp 50 ml). Ne pas oublier de faire migrer, en même temps, les marqueurs de poids moléculaire " 100 bp ladder " (100 ng par mm de largeur de peigne).
- Faire migrer à 60 V ; le colorant du tampon de dépôt migre comme un fragment d'environ 300 pb.
- Photographier le gel.

**Question 7 : Pour l'analyse des intégrations Mtv chez les souris F2, on aurait également pu utiliser la technique de Southern blot. Comment l'auriez-vous mise en œuvre ? Quels sont les avantages et les inconvénients des techniques PCR et Southern blot ?**

## **Annexe F : Technique d'analyse des cellules par cytométrie de flux**

*Vous trouverez une présentation théorique de la technique de cytométrie de flux à l'Annexe G.*

*N.B. : Pour obtenir les meilleurs marquages possibles, il est important de*

- a) conserver les cellules à 4°C autant que possible*
- b) après centrifugation et élimination du surnageant, remettre les cellules en suspension avant d'ajouter du tampon.*

### ***Préparation des cellules***

- Prélever le(s) organe(s) avec les instruments de dissection.
- Broyer dans du BSS (Balanced Salt Solution) avec un Potter.
- Transférer le broyat dans un tube de 15 ml, en complétant le volume avec du BSS.
- Laisser sédimenter 2-3 minutes puis transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Centrifuger 6 minutes à 1300 rpm.
- Oter le surnageant et remettre en suspension le culot de cellules dans 1 ml de BSS.
- Diluer 20 µl de suspension dans de l'éosine qui colore en rouge les cellules mortes et compter les cellules vivantes à l'aide d'une lame de Malassez.

### ***Marquage des cellules***

On dispose d'anticorps couplés à deux types de molécules :

1. Les anticorps couplés au FITC (Fluorescein Isothiocyanate) donnent une fluorescence verte, le marquage des cellules se fait en une seule étape.
2. Les anticorps couplés à la biotine doivent être révélés par de la streptavidine-phycoérythrine (Strep-PE) qui donne une fluorescence rouge. Le marquage des cellules par ces anticorps se fait donc en deux étapes.

Le marquage double d'un échantillon cellulaire par un anticorps 1 biotinylé (Ac1<sup>B</sup>) et un anticorps 2 couplé au FITC (Ac2<sup>F</sup>) se réalise de la façon suivante :

- Transférer un volume contenant  $2 \cdot 10^6$  cellules dans un tube Eppendorf.
- Centrifuger 10 secondes dans une micro-centrifugeuse et ôter le surnageant.
- Remettre les cellules en suspension dans 30 µl de PBS-SVF (PBS + 2 % de sérum de veau fœtal) contenant Ac1<sup>B</sup> et Ac2<sup>F</sup>.

- Incuber 20 minutes à 4°C à l'obscurité.
- Laver les cellules : ajouter 0,5 ml de PBS-SVF puis centrifuger 10 secondes et ôter le surnageant.
- Remettre les cellules en suspension dans 30 µl de PBS-SVF contenant Strep-PE.
- Incuber 20 minutes à 4°C à l'obscurité.
- Laver 2 fois les cellules en PBS-SVF.
- Remettre les cellules en suspension dans 0,5 ml de PBS-SVF et transférer dans un **tube Falcon** de 4 ml. Boucher les tubes et conserver les échantillons à 4°C à l'obscurité jusqu'à l'analyse au FACS.

*Rem. : Les anticorps marqués ont été préalablement testés afin de déterminer la dilution optimale à utiliser pour les expériences.*

## Annexe G : Présentation de la technique de cytométrie de flux

### Historique

La cytométrie en flux est une technique d'analyse et de tri qui dérive des appareils de numération cellulaire. Le 1<sup>er</sup> appareil a été conçu en 1934 par A. Moldavan à Montréal. En 1949, W. Coulter a mis au point un appareil permettant de compter des cellules et de mesurer leur taille par la variation de résistivité du courant liquidien. En 1969, le laser est utilisé comme source lumineuse car il permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation et une stabilité du chromatisme. Depuis, les cytomètres n'ont cessé d'évoluer et cette technologie a connu un grand essor ces 20 dernières années.

Cette technique permet de faire simultanément l'analyse quantitative de plusieurs paramètres sur des éléments en suspension : cellules, levures, bactéries ou constituants cellulaires (noyaux, mitochondries, chloroplastes, chromosomes...). Un grand nombre d'éléments peut être analysé ce qui apporte précision et représentativité aux résultats. Avec les analyseurs-trieurs, on peut en outre séparer physiquement les éléments analysés en populations selon les propriétés mesurées.

### Principe

La suspension cellulaire à analyser est injectée sous pression au centre d'une gaine liquide. Les cellules vont être hydrodynamiquement contraintes de s'y centrer et traverser ensuite le faisceau laser focalisé sur l'axe du jet (cf. Figure). Après interception de la lumière incidente, la cellule réémet une partie de la lumière reçue dans diverses directions sous forme de signaux représentatifs de :

- propriétés physiques : taille et granulosité (cas de la lumière diffusée dans l'axe (*forward scatter*) et à 90°C (*side scatter*) ;
- propriétés biologiques liées à l'émission de fluorescence par un ou plusieurs fluorochromes préalablement fixés sur la cellule. Les fluorescences émises sont séparées par un réseau de miroirs dichroïques et de filtres.

Les photons émis sont amplifiés et transformés en impulsions électriques par les photomultiplicateurs, puis numérisés pour être utilisés par l'unité informatique qui les représentera sous forme d'histogrammes de distribution de fréquence, où l'abscisse représente l'amplitude du paramètre (exprimée en unités arbitraires ou canaux) et l'ordonnée le nombre d'événements par canal. Pour chaque histogramme, les statistiques correspondantes sont établies automatiquement : nombre et % de cellules, mesure de l'intensité et de la moyenne de fluorescence. L'intensité de chaque signal peut être corrélée avec des propriétés cellulaires.

Certains cytomètres en flux "trieurs" peuvent également séparer physiquement la suspension initiale en populations de cellules selon les critères choisis par l'expérimentateur. La pureté des fractions triées est de l'ordre de 99% et la vitesse peut atteindre 10000 décisions de tri par seconde. En tri, la veine liquide est fractionnée en une succession de gouttelettes par vibration d'un quartz piézo-électrique. Pour chaque événement correspondant aux spécifications souhaitées, l'ordinateur envoie un ordre de charge électrique avant que la goutte ne se détache et soit ainsi déviée pour être collectée. La collecte peut se faire en tubes, dans des microplaques (clonage), sur filtres d'hybridation en nitrocellulose (biologie moléculaire).

### **Applications**

Les paramètres mesurables par cette technique sont nombreux. En fonction des fluorochromes utilisés, les applications peuvent être subdivisées en deux groupes :

- Analyse de constituants ou compartiments cellulaires : ADN (viabilité, cycle, synthèse, caryotype en flux), ARN, protéines, expression d'antigènes membranaires ou intracellulaires, mitochondries...
- Analyse d'activités cellulaires : réponse précoce à une stimulation (modification du pH, flux ioniques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ )...), mesure d'activités enzymatiques, potentiel membranaire.

Cette technique présente donc le double avantage d'être analytique et préparative ; elle se caractérise par sa rapidité et la possibilité de mesurer simultanément plusieurs paramètres sur une même cellule. Elle définit également la variation et la distribution de la propriété étudiée, permettant l'identification de sous-populations et l'estimation de la population moyenne. Elle trouve ses applications en immunologie, en oncologie et cytogénétique, mais aussi en microbiologie et hydrobiologie, ainsi qu'en biologie végétale.

## Annexe H : Test ELISA

- Utiliser les plaques ELISA de 96 puits.
- Déposer 50 µl/puits de solution à 2,5 µg/ml d'anticorps anti-Ig de souris ou 50 µl/puits de solution à 5 µg/ml de PC-SAB dilués dans du **PBS**. Laisser une nuit à 4°C en atmosphère humide.

*Question 8 : Pourquoi utilise-t-on ici de la PC-SAB alors que les souris ont été immunisées avec de la PC-Thyroglobuline ?*

- Vider et laver 3 fois les plaques avec du **PBS-0,05 % Tween**.
- Déposer 200 µl/puits de **PBS-1 % SAB**. Laisser pendant au moins 1 heure en atmosphère humide à température ambiante afin de saturer les sites restés libres.
- Vider les plaques. Les retourner sur des mouchoirs afin d'éliminer l'excès de tampon.
- Déposer 50 µl/puits de plusieurs dilutions de l'Ig à tester en commençant à 1 µg/ml pour la dilution la plus concentrée ou plusieurs dilutions de sérum à tester en commençant au 1/250. Réaliser les dilutions dans des tubes de 6 ml avec du **PBS-1 % SAB**. Couvrir les plaques et laisser une nuit à 4°C en atmosphère humide.
- Vider et laver 3 fois les plaques avec du **PBS-0,05 % Tween**.
- Déposer 50 µl/puits d'anticorps anti-isotypes couplés à la peroxydase dilués au 1/1000 dans du **PBS-1 % SAB**. Couvrir les plaques et laisser pendant 1 heure en atmosphère humide à température du laboratoire.
- Préparer la solution de substrat extemporanément que l'on conservera à l'obscurité : dissoudre 574 mg d'acide citrique dans 50 ml d'eau distillée. Ajuster à **pH 4** avec 450 µl **NaOH 10 N**. Ajouter à 10 ml de cette solution 0,2 ml de **solution ABTS** (15 mg ABTS / 1 ml H<sub>2</sub>O) et 10 µl de **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %**.
- Vider et laver **5 fois** les plaques avec du **PBS-0,05 % Tween**.
- Déposer 50 µl/puits de la solution de substrat et attendre l'apparition du produit coloré. Pour arrêter la réaction, ajouter 50 µl/puits de SDS 5 % et conserver la plaque à l'obscurité.
- Mesurer la densité optique des puits à 405 nm avec le lecteur de plaques ELISA mis à votre disposition.

***N.B.** : On réalisera les dosages en duplicata. Ne pas oublier les contrôles !*

## Annexe I : Questionnaire

**Nom :**

**Prénom :**

**n° binôme :**

Question 1 : Sachant que lorsque l'on croise entre elles des souris F1(B6D2) on obtient quatre types de couleur de pelage (cf. Annexe B), quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer la couleur du pelage des souris ? .....2

Question 2 : Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour rendre compte de ces observations ? .....3

Question 3 : Qu'est-ce qu'un phénomène de délétion clonale ? Pourquoi le qualifie-t-on ici "d'atypique" ? .....3

Question 4 : Ces observations suggèrent que l'élément responsable de la délétion puisse être codé par une séquence rétrovirale Mtv. Pouvez-vous formuler d'autres hypothèses rendant compte de cette liaison à la mère du phénomène de délétion ? .....4

Question 5 : Pourquoi prend-on la précaution de n'utiliser que des souris de fonds génétique C57BL/6 ? .....6

Question 6 : Quel est le répertoire potentiel d'immunoglobulines chez les souris B6.T15i et B6.T15i.Ck<sup>-/-</sup> ? .....6

Question 7 : Pour l'analyse des intégrations Mtv chez les souris F2, on aurait également pu utiliser la technique de Southern blot. Comment l'auriez-vous mise en œuvre ? Quels sont les avantages et les inconvénients des techniques PCR et Southern blot ? ..... 13

Question 8 : Pourquoi utilise-t-on ici de la PC-SAB alors que les souris ont été immunisées avec de la PC-Thyroglobuline ? ..... 18