

TRAVAUX PRATIQUES D'IMMUNOGENETIQUE 1997

MISE EN EVIDENCE D'UN PROCESSUS DE DELETION CLONALE AU NIVEAU DU REPERTOIRE T CHEZ LA SOURIS

Les antigènes Mls (Minor lymphocyte stimulating antigen) sont responsables de réactions lymphocytaires mixtes entre lignées de souris histocompatibles. Ces molécules sont considérées comme des super-antigènes 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 $V\beta$ reconnus par l'antigène Mls. Récemment, il a été montré que ces antigènes sont codés par des provirus inactifs intégrés dans le génome. Ces provirus appartiennent à une famille de virus induisant des tumeurs mammaires chez la souris (Mtv pour mammary tumor virus).

Nous vous proposons d'étudier les conséquences de l'expression de l'antigène Mls-1^a sur le répertoire T de la souris. Mls-1^a est codé par une région du provirus Mtv-7 intégré dans le génome de la souris DBA/2 mais absent du génome de la souris C57BL/6. Les cellules T exprimant un récepteur T reconnu par les anticorps KJ16 mais pas par les anticorps F23.2 sont capables de

répondre à cet antigène, 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.

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

Nous vous demandons 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^a. Pour cela, caractérisez le ou les segments de gène V β reconnus par Mls-1^a et déterminer le nombre minimum de gènes impliqués dans le phénomène de délétion étudié.

DETERMINATION DE L'ISOTYPIE DES CHAINES LOURDES ET LEGERES D'IMMUNOGLOBULINES DE SOURIS.

Cette deuxième partie est indépendante de la première partie des TP. Elle a pour objectif de vous initier à des techniques courantes d'immunochimie auxquelles se prête mal l'autre partie de ces travaux pratiques.

Des fractions dites "F18" contenant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux de souris ont été préparées à partir d'ascites ou de sérums respectivement.

Dans un premier temps, nous vous proposons de purifier les immunoglobulines contenues dans ces fractions sur des colonnes de DEAE cellulose échangeuses d'ions.

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS vous permettra ensuite d'estimer la qualité des échantillons purifiés.

Enfin, un test ELISA vous permettra de déterminer l'isotype des immunoglobulines que vous aurez purifiées.

ORGANISATION DE LA SEMAINE

1^{er} jour:

- Digestion enzymatique des ADN.
- Préparation du gel d'Agarose pour électrophorèse.
- Dépôt des échantillons sur le gel.
- Séparation des immunoglobulines sur DEAE et détermination de la concentration par spectrophotométrie à 280 nm.
- Préparation des protocoles expérimentaux pour la semaine.
- Mise en route des tests ELISA.

2^{ème} jour:

- Dénaturation et transfert de l'ADN sur membranes de nylon.
- Marquage des cellules avec des anticorps couplés avec des fluorochromes.
- Suite des tests ELISA.

3^{ème} jour:

- Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS.
- Suite et fin des tests ELISA.

4^{ème} jour:

- Analyse des articles.
- Analyse des résultats.

5^{ème} jour:

- Analyse des articles.
- Analyse de l'ensemble des résultats.

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-CD4-FITC

Anti-CD8-FITC

Anti-CD4-Biotine

F23.2-FITC

F23.2-Biotine

KJ16-Biotine

Ces deux derniers anticorps reconnaissent certains V β appartenant à la famille V β 8 du récepteur T.

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

-Acides Nucléiques:

ADN préparés à partir des hybridomes T 3DT52.5, H/B 9.1 et CDC 742.3.

ADN préparés à partir de cellules BW5147 (lymphome T α^- , β^- utilisé pour l'obtention des hybridomes).

ADN préparés à partir de foie ou de queue de souris BALB/c, DBA/2, C57BL/6, F1(DBA/2xC57BL/6) et F2(DBA/2xC57BL/6).

Marqueurs de taille.

Sondes V β 8 et Mtv-7 radiomarquées au ^{32}P .

-Souris

F2(DBA/2xC57BL/6)

-Différentes "F18" préparées à partir d'ascites ou de sérums contenant des immunoglobulines.

-Anticorps:

anti-Ig de souris

anti-Ig M de souris marqués à la peroxydase

anti-Ig G1 de souris marqués à la peroxydase

anti-Ig G2a de souris marqués à la peroxydase

anti-Ig G2b de souris marqués à la peroxydase

anti-Ig G3 de souris marqués à la peroxydase

anti-Ig A de souris marqués à la peroxydase

anti-kappa de souris marqués à la peroxydase

anti-lambda de souris marqués à la peroxydase

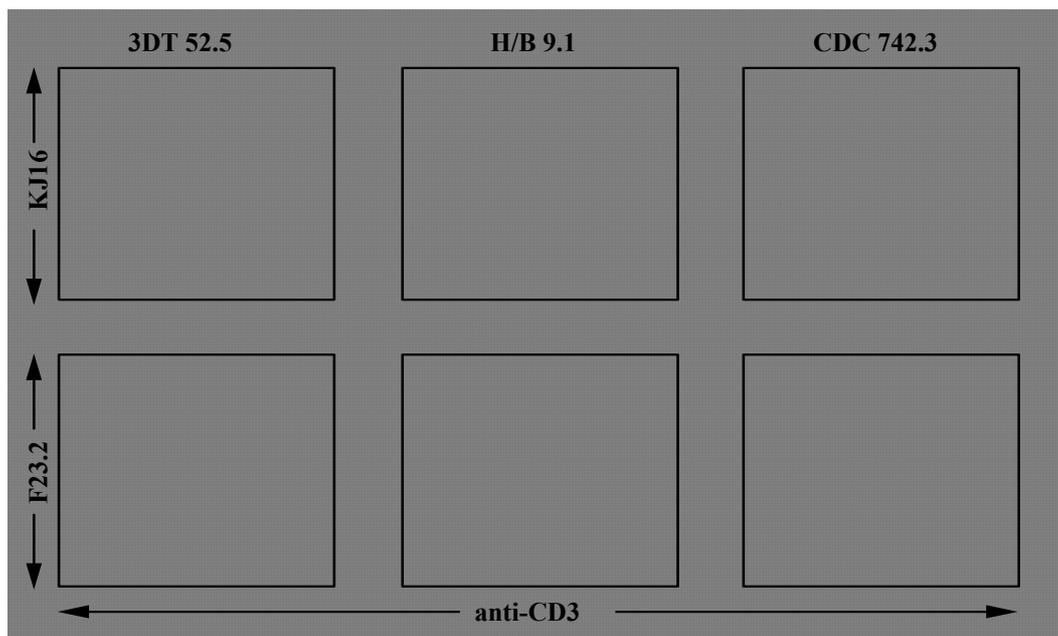
2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-sulfonic acid)

(= 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)

CARACTERISTIQUES DES HYBRIDOMES T

Nom de l'hybridome	Lignée d'origine	Spécificité
CDC 742-3	BALB/cxDBA/2	Lysozyme
H/B 9-1	BALB/c	Lysozyme
3DT52.5	BALB/c	H-2D ^d

SPECIFICITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

CARACTERISTIQUES GENETIQUES DES SOURIS

Souris	H-2						IgH	Mls	Coloration du pelage
	K	A α	A β	E α	E β	D			
DBA/2	d	d	d	d	d	d	c	a	gris-jaune
C57BL/6	b	b	b	b	-	b	b	b	noire
F1	d/b	d/b	d/b	d/b	d/-	d/b	c/b	a/b	noire
BALB/c	d	d	d	d	d	d	a	b	blanche

COMPOSITION DE LA F2(DBA/2xC57BL/6)

64 souris dont:

- 18 mâles et 12 femelles de pelage noir
- 8 mâles et 5 femelles de pelage agouti
- 7 mâles et 11 femelles de pelage gris
- 1 mâle et 2 femelles de pelage gris-jaune

TECHNIQUE DE SOUTHERN

Jour 1:

Hydrolyse de l'ADN et électrophorèse

Il est nécessaire d'hydrolyser au moins 12 µg d'ADN de mammifère (génomme haploïde d'environ 3.10^9 pb) pour pouvoir détecter une séquence unique.

- Hydrolyser 12 µg d'ADN avec deux unités de l'enzyme de restriction choisie par µg d'ADN en présence de tampon adéquat (à utiliser au 1/10 du volume final) pendant 1 h.30 à 37°C. Ajouter 2U/µg supplémentaire et laisser continuer l'hydrolyse pendant 1 h.30.
- Arrêter la réaction en ajoutant 1/10 du volume final de solution de dépôt bleue (20ml glycérol, 5g Ficoll, 0,5M EDTA 0.2M pH 8, 125mg xylène cyanol, 125mg bromophenol, qsp 50ml).
- Chauffer les échantillons 10 minutes à 65°C.
- Faire migrer sur gel d'agarose de 0,8% dans 1xTAE (4,84g TRIZMA base, 1,15ml acide acétique glaciale, 0,38g EDTA qsp 1l) + 1 µg/ml de bromure d'éthidium (BET) pendant la nuit (40 volts). *Le BET est un produit toxique qui doit être manipulé avec précaution (port de gants), les déchets contenant du BET doivent être enveloppés sous plastique.*
- Ne pas oublier de faire migrer, en même temps, les marqueurs de poids moléculaire (ADN du phage λ digéré par HindIII: 1µg).

Jour 2:

- Photographier le gel en mettant un décimètre sur le côté.
- Marquer les poids moléculaires à l'encre à l'aide d'une seringue.

Dénaturation et transfert de l'ADN

a) Dépuration:

- Transférer le gel dans une cuvette et l'immerger dans une solution d'HCl (0,25N) pendant 15 minutes très précisément.

- Laver le gel avec de l'eau distillée.

b) Dénaturation:

- Immerger le gel dans une solution de 0,4M NaOH pendant 15 minutes à température ambiante.

c) Transfert:

- Couvrir l'appareil de transfert avec une feuille de papier Whatman 3MM préalablement trempée dans 0,4M NaOH, afin d'assurer l'étanchéité du système. Eliminer les bulles d'air entre l'appareil et le papier. Découper une feuille de nylon aux mêmes dimensions que le gel. *N.B. Il faut porter des gants et manipuler la feuille de nylon avec des pinces Millipore.* Imbiber la feuille de nylon dans 0,4M NaOH puis la déposer sur la feuille de Whatman. S'assurer de nouveau qu'il n'y a pas de bulles d'air. Faire glisser avec précaution le gel. *Eliminer toutes les bulles d'air entre le gel et la feuille de nylon à l'aide d'une pipette de 10 ml.* Déposer une feuille de Whatman de même taille que le gel sur celui-ci. Appliquer le vide pendant environ 2 heures, en imbibant le papier du dessus avec 0,4M NaOH (ne pas laisser sécher). Marquer la position des puits et des marqueurs de taille.

- Enlever la feuille de nylon, rincer dans 2xSSC, 2 fois 10 minutes.

- Envelopper la membrane dans un film de protection transparent puis fixer l'ADN sous lumière UV, 5 minutes.

Hybridation

- Une préhybridation est effectuée afin de diminuer la fixation non spécifique de la sonde radioactive

- Mettre le filtre dans un sac plastique

- Ajouter 0,2 ml/cm² d'une solution contenant (tampon préhybridation):

. 2xSSC

. 1% SDS

. 0,5% de poudre de lait

. 750 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé c-à-d préalablement porté à 100°C pendant 10 minutes, puis refroidi à 0°C pendant 5 minutes

- Eliminer du sac autant d 'air que possible puis le sceller
- Incuber pendant au moins 1 heure à 68°C sous agitation
- Enlever le mélange de préhybridation et le remplacer par un même volume de la solution suivante (tampon hybridation):

- . 2xSSC
- . 1% SDS
- . 0, 5% de poudre de lait
- . 500 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé
- + sonde radioactive $10 \cdot 10^6$ cpm dénaturée (même traitement que ci-dessus)

Incubation pendant la nuit à 68°C sous agitation.

Jour 3:

Lavage et exposition des filtres:

- Laver le filtre trois fois avec une solution de 2xSSC, 0,1% SDS pendant 10 minutes à 68°C puis 3 fois, 30 minutes avec 0,1xSSC, 0,1% SDS à 68°C.
- Remettre le filtre sans le sècher dans un sac plastique.
- Déposer dans une cassette avec un film Kodak et un écran amplificateur.
- Mettre la cassette à -70°C. Révéler le film au bout de 1 à 3 jours

TECHNIQUE D'ANALYSE DES CELLULES PAR CYTOMETRIE DE FLUX

Pour obtenir les meilleurs marquages possibles, il est important de

- a) garder 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 dans une cellule de Malassez.

Marquage des cellules:

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

Les anticorps couplés au FITC (Fluorescein Isothiocyanate) donnent une fluorescence verte, le marquage des cellules se fait en une seule étape.

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^B) et un anticorps 2 couplé au FITC (Ac2^F) se réalise de la façon suivante:

- Transférer un volume contenant $5 \cdot 10^6$ cellules dans un tube Eppendorf.

- Centrifuger 10 secondes dans une microfugeuse et oter le surnageant.
- Remettre les cellules en suspension dans 30 μ l de BSS-SVF (BSS + 3% de sérum de veau foetal) contenant Ac1^B.
- Incuber 30 minutes à 4 C à l'obscurité.
- Laver les cellules: ajouter 0,5 ml de BSS-SVF puis centrifuger 10 secondes et oter le surnageant.
- Remettre les cellules en suspension dans 30 μ l de BSS-SVF contenant AC2^F + Strep-PE.
- Incuber 30 minutes à 4 C à l'obscurité.
- Laver 2 fois les cellules en BSS-SVF et 1 fois en PBS-SVF (Phosphate Buffer Saline + 3% 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.

ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS

Préparation des gels:

- Préparer le running gel 10% acrylamide 0,375M Tris (pH 8,8) 0,1% SDS:

. Acrylamide/bis acrylamide 30%	1,6 ml
. Trizma base 1,5M	0,8 ml
. Trizma HCl 1,5M	0,2 ml
. SDS 10%	40 μ l
. H ₂ O	1,4 ml

- Agiter puis ajouter 2 μ l Teemed puis 13,5 μ l de persulfate d'ammonium 10%

- Couler le gel puis ajouter délicatement à la surface 200 μ l H₂O

- Laisser polymériser 3/4 d'heure

- Préparer le stacking gel 5,14% acrylamide 0,135M Tris (pH 6,9) 0,1% SDS:

. Acrylamide/bis acrylamide 30%	0,43 ml
. Trizma base 1,5M	27 μ l
. Trizma HCl 1,5M	196,5 μ l
. SDS 10%	25 μ l
. H ₂ O	1,82 ml

- Agiter puis ajouter 1,5 μ l Teemed puis 9 μ l de persulfate d'ammonium 10%

- Retirer l'eau restante sur le running gel polymérisé puis couler le stacking gel.

Plonger le peigne dans le stacking gel en évitant de laisser la moindre bulle

- Laisser polymériser 3/4 d'heure.

Traitement des échantillons:

- 1 µg de protéines + 5 µl de tampon réducteur (10% glycérol, 3% SDS, 0,260M Tris pH 6,8, DTT 0,1M, bleu de bromophénol 0,002%). Compléter à 10 µl avec H₂O. Chauffer 3 minutes au bain-marie à 100°C.

Electrophorèse:

- Préparer 1 litre de tampon électrode
 - . 125 ml (8x)
 - . 10 ml SDS 10%
 - . H₂O qsp 1 litre (Attention à ne pas utiliser d'eau Millipore!)
- Migration 180 volts
- Arrêt de la migration juste après la sortie du bleu de bromophénol.

Coloration: (*mettre des gants et éviter de toucher le gel*)

- . 15 minutes dans 45% d'éthanol, 10% d'acide acétique
- . 2x7 minutes dans 10% d'éthanol, 10% d'acide acétique
- . 5 minutes dans 0,0034M de dichromate de potassium, 0,0032N d'acide nitrique
- Laver 2x à l'eau distillée
- 30 minutes dans une solution de nitrate d'argent (*attention très toxique*) à 100 mg/50 ml à préparer extemporanément
- Rinçage et développement dans 0,28M Na₂CO₃ et 0,018% de formaldéhyde
- Arrêt de la réaction si nécessaire dans acide acétique 2%
- Eventuellement, sécher le gel entre deux feuilles de cellophane
- *Très important: ne pas oublier de laver et ranger les cuves, les "spacers" et le peigne.*

PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES MONOCLONALES SUR COLONNE DE DEAE

-Montage des colonnes:

Faire gonfler un peu de poudre de DE52 dans de l'eau.

Monter les colonnes dans des seringues de 5 ml en les remplissant avec la suspension de DE52 jusqu'à environ 0,75 ml de hauteur.

Ne jamais laisser sécher les colonnes!

Laver les colonnes avec 20 ml de tampon **KK2 5 mM pH8**.

-Dépôt des échantillons:

Dès que le haut de la colonne est vidé du tampon KK2 5mM, déposer lentement 500 µl de l'échantillon de F18 (veiller à en conserver 10 µl). Laisser descendre l'échantillon dans la colonne, puis laver avec 7 x 1 ml de tampon **KK2 5 mM**. Récolter l'effluent par fractions de 1 ml.

-Elution:

La colonne de DEAE cellulose est une colonne échangeuse d'ions. Eluer la colonne avec des tampons KK2 de molarité croissante: laver la colonne avec

7 x 1 ml de tampon **KK2 10 mM pH8** puis

7 x 1 ml de tampon **KK2 25 mM pH8** puis

7 x 1 ml de tampon **KK2 50 mM pH8**.

Conserver les éluats dans des tubes à hémolyse contenant des fractions d'environ 0,5 ml.

-Déterminer la concentration des anticorps contenus dans les fractions récupérées au cours de l'élution en présence de tampon **KK2 25 mM pH8** par spectrophotométrie à 280 nm, sachant qu'une solution contenant 1 mg/ml d'immunoglobulines donne une D.O. d'environ 1.4.

TEST ELISA

- Utiliser les plaques ELISA de 96 puits.
- Déposer 50 µl/puits de solution à 2,5 µg/ml d'anticorps anti-immunoglobulines de souris dilués dans du **PBS**. Laisser une nuit à 4°C en atmosphère humide.
- 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 du laboratoire afin de saturer les sites restés libres.
- Vider les plaques. Les retourner sur des mouchoirs en papier afin d'éliminer l'excès de tampon.
- Déposer 50 µl/puits de plusieurs dilutions de l'immunoglobuline à tester en commençant à 50 µg/ml pour la dilution la plus concentrée. Réaliser les dilutions dans 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 couplés à la peroxydase dilués au 1/500 dans du **PBS-1% SAB**. Couvrir les plaques et laisser pendant 1 heure en atmosphère humide à température du laboratoire.
- Pendant ce temps, préparer la solution de substrat qui doit être faite extemporanément: dissoudre 574 mg d'acide citrique dans 50 ml d'eau distillée. Ajuster à **pH 4** avec **NaOH** (450 µl de NaOH 10N / 50 ml). Ajouter à 10 ml de cette solution 0,2 ml de **solution ABTS** (15 mg ABTS / 1 ml H₂O) et 10 µl de **H₂O₂ 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 10% et conserver la plaque à l'obscurité.
- Mesurer la densité optique des puits à 405 nm avec le lecteur d'ELISA mis à votre disposition.
- Ne pas oublier les contrôles!*