

Travaux Pratiques d'Immunogénétique 1998

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, d'étudier les conséquences de l'expression de l'antigène Mls-1 sur le répertoire T de la souris. Nous allons particulièrement étudier les souches DBA/2 (Mls-1^a) et C57BL/6 (Mls-1^b).

Caractéristiques génétiques des souris

Souris	H-2						IgH	Mls-1	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(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

Mise en évidence de l'expression de l'antigène Mls-1^a chez la souris DBA/2 et nature des cibles V β

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^a, 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 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

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 β 14 chez les souris C3H/HeJ :

Souris	Cellules T CD4 ⁺ exprimant V β 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

Ces expériences montrent que le phénotype de délétion est liée à la mère. Par différentes expériences d'adoption de souris nouveau-nés par des mères de souches 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 souche C3H/HeJ se

différencie de la souche B10.BR par la présence dans le lait d'un rétrovirus exogène de la famille des MMTV "*Mouse Mammary Tumor Virus*".

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.

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

Objectif des Travaux Pratiques

Nous vous proposons, lors de ces 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^a.

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 donnée 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.

Détermination de l'isotypie des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines de souris

N.B. : Cette deuxième partie est indépendante de la première partie des Travaux Pratiques. 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" (étape de purification des immunoglobulines par précipitation dans 18 % de sulfate de sodium) contenant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux de souris ont été préparées à partir d'ascites ou de sérums respectivement.

Nous vous proposons de :

1. Purifier les immunoglobulines contenues dans ces fractions sur des colonnes de DEAE cellulose échangeuses d'ions.
2. Réaliser une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS afin d'estimer la qualité des échantillons purifiés.
3. Effectuer un test ELISA qui 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-CD3-FITC
- 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 Phycocérythrine (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 TCR α^- , TCR 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/2 x C57BL/6) et F2(DBA/2 x C57BL/6).
- Marqueurs de taille.
- Sondes V β 8 et Mtv-7 radiomarquées au ^{32}P .

Souris

- F1(DBA/2 x C57BL/6)
- F2(DBA/2 x C57BL/6) :
 - 50 souris dont :
 - 13 mâles, 15 femelles de pelage noir
 - 6 mâles et 5 femelles de pelage agouti
 - 3 mâles et 4 femelles de pelage gris
 - 2 mâles et 2 femelles de pelage gris-jaune

Fractions "F18"

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

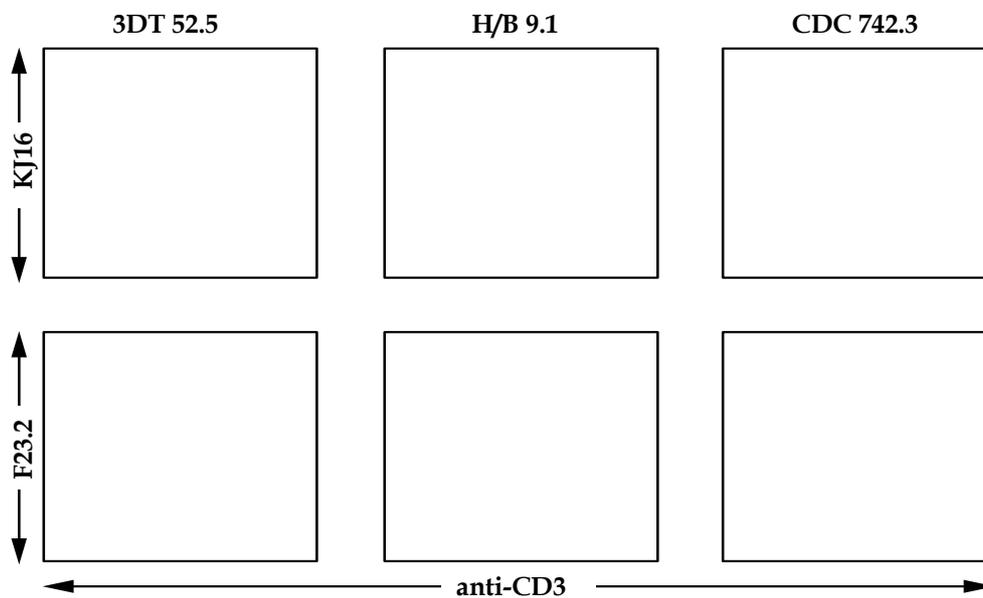
Anticorps

- 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
- 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)

Caractéristiques des hybridomes T

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

Spécificité des anticorps monoclonaux



Technique de Southern

Jour 1

Hydrolyse de l'ADN et électrophorèse

Il est nécessaire d'hydrolyser au moins 12 µg d'ADN de mammifère (génome 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 2 U/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 (20 ml glycérol, 5 g Ficoll, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8, 125 mg xylène cyanol, 125 mg bromophénol, qsp 50 ml).
- Chauffer les échantillons 10 minutes à 65°C.
- Faire migrer sur gel d'agarose de 0,8 % dans 1x TAE (4,84 g TRIZMA base, 1,15 ml acide acétique glacial, 0,38 g EDTA, qsp 1 l) + 1 µg/ml de bromure d'éthidium (BET) pendant la nuit (40 volts). *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.*
- Ne pas oublier de faire migrer, en même temps, les marqueurs de poids moléculaire (1 µg d'ADN du phage λ digéré par *HindIII*).

Jour 2

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

Dénaturation et transfert de l'ADN

a) Dépuration

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

- Laver le gel avec de l'eau distillée.

b) Dénaturation

- Immerger le gel dans une solution de NaOH 0,5 N; NaCl 1,0 M pendant 45 minutes à température ambiante.
- Laver le gel avec de l'eau distillée.

c) Neutralisation

- Immerger le gel dans une solution de Tris 0,5 M (pH 7,4); NaCl 3,0 M pendant 45 minutes à température ambiante.

d) Transfert :

- Couvrir l'appareil de transfert avec une feuille de papier Whatman 3MM préalablement trempée dans de l'eau distillée, 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 de l'eau distillée 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.
- Marquer la position des puits et des marqueurs de taille.
- Envelopper la membrane dans un film de protection transparent puis fixer l'ADN sous lumière UV pendant 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):

- SSC 20x 75,0 ml (175,3 g NaCl, 88,2 g NaCitrates pour 1 l H₂O, ajusté à pH 7,0)
- SDS 10% 5,0 ml
- Denhardt's 50x 100,0 ml (5 g Ficoll, 5 g PolyVinylPyrrolidone, 5 g BSA (Fraction V) pour 500 ml H₂O)
- DNA saumon "soniqué" 2,5 ml (stock à 10 mg/ml)
- EDTA 0.5M 5,0 ml
- H₂O qsp 500 ml

- Eliminer du sac autant d'air que possible puis le sceller
- Incuber pendant au moins 1 heure à 65°C sous agitation
- Enlever le mélange de préhybridation et le remplacer par un même volume de tampon d'hybridation : Tampon hybridation + 10 % sulfate de dextran + sonde radioactive 10.10⁶ cpm dénaturée (10 min à 100°C).
- Incubation pendant la nuit à 65°C sous agitation.

Jour 3:

Lavage et exposition des filtres

- Laver le filtre avec une solution de 2x SSC, 0,1 % SDS pendant 10 min à température ambiante, puis 1x SSC, 0,1 % SDS pendant 10 min à température ambiante, puis 0,1x SSC, 0,1 % SDS pendant 30 min à 65°C.
- Remettre le filtre sans le sécher 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 cytométrie de flux

N.B. : 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 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^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 micro-centrifugeuse et ôter le surnageant.
- Remettre les cellules en suspension dans 30 μ l de PBS-SVF (PBS + 3 % de sérum de veau fœtal) contenant Ac1^B.
- Incuber 30 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 μ l de PBS-SVF contenant Ac2^F + Strep-PE.
- Incuber 30 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.

Purification des immunoglobulines monoclonales sur colonne de DEAE

Montage des colonnes

- Faire gonfler un peu de poudre de DEAE dans de l'eau.
- Monter les colonnes dans des seringues de 5 ml en les remplissant avec la suspension de DEAE 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 5 mM**, 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 :
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'éluion 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.

Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS

N.B. : L'acrylamide est un produit neurotoxique qui doit être manipulé avec précaution (port de la blouse et des gants) ; éviter les projections oculaires.

Préparation des gels

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

Acrylamide/bis acrylamide 40 %	1,0 ml
Trizma base 1,5 M	0,8 ml
Trizma HCl 1,5 M	0,2 ml
SDS 10 %	40,0 µl
H ₂ O	2,0 ml
- Agiter puis ajouter 2 µl TEMED puis 13,5 µl de persulfate d'ammonium 10 %.
- Couler le gel puis ajouter délicatement à la surface 200 µl H₂O.
- Laisser polymériser 3/4 d'heure.
- Préparer le "stacking gel" 5,1 % acrylamide 0,135 M Tris (pH 6,9), 0,1 % SDS :

Acrylamide/bis acrylamide 40 %	0,32 ml
Trizma base 1,5 M	27,0 µl
Trizma HCl 1,5 M	196,5 µl
SDS 10 %	25,0 µl
H ₂ O	1,93 ml
- Agiter puis ajouter 1,5 µl TEMED puis 9 µl de persulfate d'ammonium 10 %.
- Retirer l'eau restante sur le running gel polymérisé, couler le "stacking gel", puis plonger partiellement 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, 0,260 M Tris pH 6,8, DTT 0,1 M, 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 de migration :
 - 125 ml du tampon électrode 8x
 - 10 ml SDS 10%
 - H₂O qsp 1 litre
- Déposer les échantillons et effectuer la migration à 180 volts.

N.B. : Déposer éventuellement des contrôles.

- Arrêter la migration juste après la sortie du bleu de bromophénol.

Coloration

N.B. : mettre des gants et éviter de toucher le gel.

- Tremper le gel successivement dans les bains suivants :
 - 15 minutes dans 45 % d'éthanol, 10 % d'acide acétique
 - 2 fois 7 minutes dans 10 % d'éthanol, 10 % d'acide acétique
 - 5 minutes dans 0,0034 M de dichromate de potassium, 0,0032N d'acide nitrique
- Laver 2 x à l'eau distillée.
- Incuber 30 minutes dans une solution de nitrate d'argent (**attention très toxique**) à 100 mg/50 ml à préparer extemporanément.
- Rincer et développer dans 0,28 M Na₂CO₃ et 0,018 % formaldéhyde.
- Arrêter la réaction si nécessaire dans l'acide acétique à 2 %.
- Sécher le gel entre deux feuilles de cellophane.

Très important: Laver et ranger les cuves, les plaques, les "spacers" et le peigne.

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 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'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 450 µl **NaOH** 10 N. 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.

Très important : Ne pas oublier les contrôles!