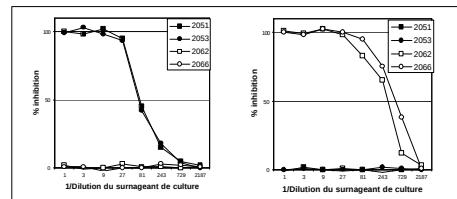


Utilisation des anticorps *in vitro* principes et techniques Applications

Adrien Six (adrien.six@upmc.fr)
Université Pierre et Marie Curie

octobre 2005



L'antigène AFP est d'abord immobilisé dans les puits de plaques de polystyrène. Ensuite, la capacité de fixation des anticorps anti-AFP marqués ^{125}I -n°2051 (A) et ^{125}I -n°2062 (B) est testée par compétition avec des dilutions en série au tiers du surnageant de culture des quatre lignées d'hybridomes sécrétant des anticorps anti-AFP (n°2051, n°2053, n°2062, n°2066). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la fixation de l'anticorps marqué sur l'AFP en l'absence de surnageant compétiteur.

Un test "sandwich" mis au point pour affiner cette étude est schématisé comme suit:

Phase solide ---- anti-AFP ... AFP ... anti-AFP*

Table 1 : Solid-phase radioimmunoassay of α -fetoprotein employing monoclonal anti-AFP antibodies*

Solid-phase anti-AFP	Radiolabelled anti-AFP							
	^{125}I -2051**				^{125}I -2062**			
	AFP (+)	AFP (-)	Δ cpm		AFP (+)	AFP (-)	Δ cpm	
2051	186	73	113	10,607	42	10,565	6,932	119
2053	214	83	131	11,321	64	11,457	6,894	127
2062	6,846	49	6,797	98	69	29	5,814	81
2066	6,934	52	6,882	101	74	27	5,986	88

*Four batches of monoclonal anti-AFP in solid-phase were incubated with 25 μl of a solution containing AFP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or 25 μl of buffer. The bound AFP was detected by radiolabelled mouse monoclonal anti-AFP (2051 or 2062) or rabbit anti-AFP. The count in the presence of AFP minus the count in the absence of AFP (Δ cpm) is the specific uptake of radiolabelled antibody by AFP.

**Five nanograms of γ -globulin (3×10^4 cpm) were used.
***Ten nanograms of γ -globulin (6×10^4 cpm) were used.

On effectue une modification de l'AFP en réduisant les ponts disulfures par du dithiotréitol (DTT). L'AFP ainsi modifiée est déposée sur une colonne de Séphadex G200. On récupère un seul pic (PM 70.000) quelle que soit la concentration de DTT utilisée. On étudie la reconnaissance de l'AFP modifiée par les anticorps monoclonaux.

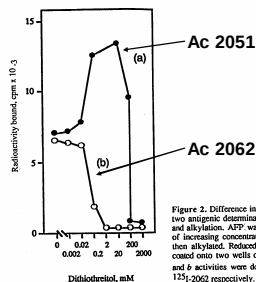


Figure 2. Difference in the susceptibility of the two antigenic determinants of AFP to reduction and alkylation. AFP was reduced in the presence of increasing concentration of dithiothreitol and then alkylated. Reduced and alkylated AFP was coated onto two wells of microtiter plate, and a and b activities were detected by ^{125}I -2051 and ^{125}I -2062 respectively. See Figure 1 for the key.

La reconnaissance par l'anticorps 2051 de l'AFP réduite et alkylée à une concentration de 2 mM de DTT est testée dans le dosage radioimmunologique "sandwich" en employant l'anticorps 2051 comme réactif insolubilisé et radiomarqué.

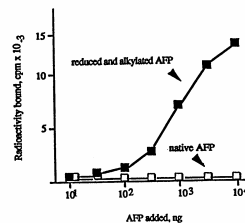


Figure 3. Reduced and alkylated AFP (solid squares), as well as native AFP (open squares), was subjected to the assay by a solid-phase radioimmunoassay employing monoclonal anti-AFP antibody 2051 both for coating wells and as radiolabelled reagent.

suite...

Utilisation des anticorps in vitro – Principes et techniques

I. Vrai ou Faux ?

- **Vrai ou Faux :** Une molécule anticorps a un type donné de site anticorps.
- **Vrai ou Faux :** Différentes molécules d'anticorps peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Différents récepteurs T peuvent généralement se combiner à un antigène.
- **Vrai ou Faux :** Les immunoglobulines et les récepteurs des cellules T présentent des analogies structurales.
- **Vrai ou Faux :** Un haptène peut stimuler la production d'anticorps mais ne peut pas se combiner à des anticorps.
- **Vrai ou Faux :** La classe prédominante lors d'une réponse secondaire est IgM.
- **Vrai ou Faux :** Dans une immunoglobuline, la région "charnière" relie les chaînes légères aux chaînes lourdes.
- **Vrai ou Faux :** La région VH est deux fois plus longue que la région VL.
- **Vrai ou Faux :** Le site anticorps se compose principalement de la chaîne légère.
- **Vrai ou Faux :** Les molécules IgG1 et IgG2 sont définies par les différences de séquences en acides aminés dans les chaînes légères.
- **Vrai ou Faux :** Une cellule B peut présenter différentes molécules anticorps à sa surface.
- **Vrai ou Faux :** La spécificité des cellules T cytotoxiques est généralement restreinte aux antigènes d'histocompatibilité de classe II.
- **Vrai ou Faux :** Des facteurs génétiques autres que ceux liés aux gènes codant pour les immunoglobulines interviennent lors d'une réponse immunitaire.

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) :

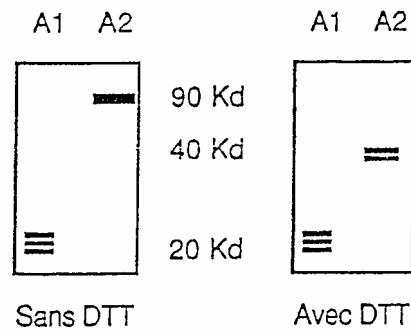


FIGURE 2

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

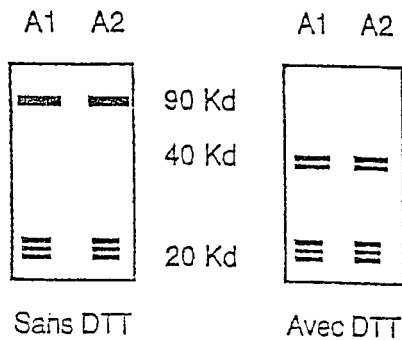


FIGURE 3

La capacité des anticorps A1 et A2 à stimuler les lymphocytes périphériques est analysée (Tableau I) :

Agent stimulant	Incorporation ³ H-thymidine (cpm)
A1	30 000
A2	25 000
ConA	200

1. Quelle est la spécificité des anticorps A1 et A2 ?

III.

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.

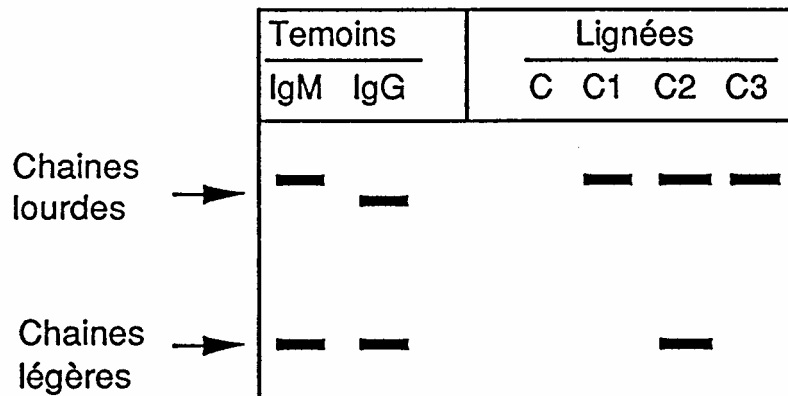


Figure 1

1. Analyser les résultats.

L'ADN de chaque lignée est préparé puis coupé par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI*. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse. Après migration, l'ADN est transféré sur des filtres de nitrocellulose. Trois sondes radioactives présentées sur la Figure 2 sont utilisées pour des expériences d'hybridation (technique de Southern)

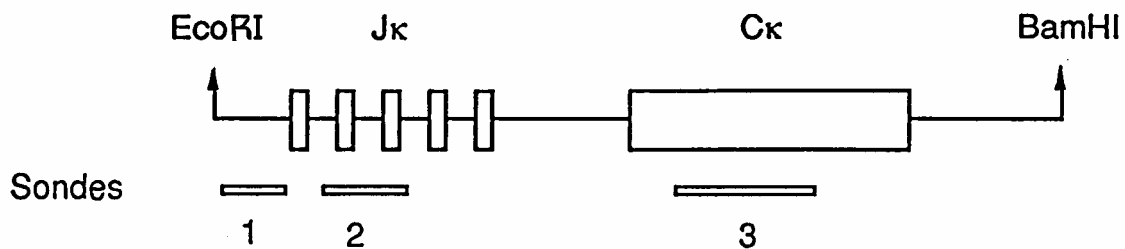


Figure 2

L'autoradiographie des filtres est présentée sur la Figure 3.

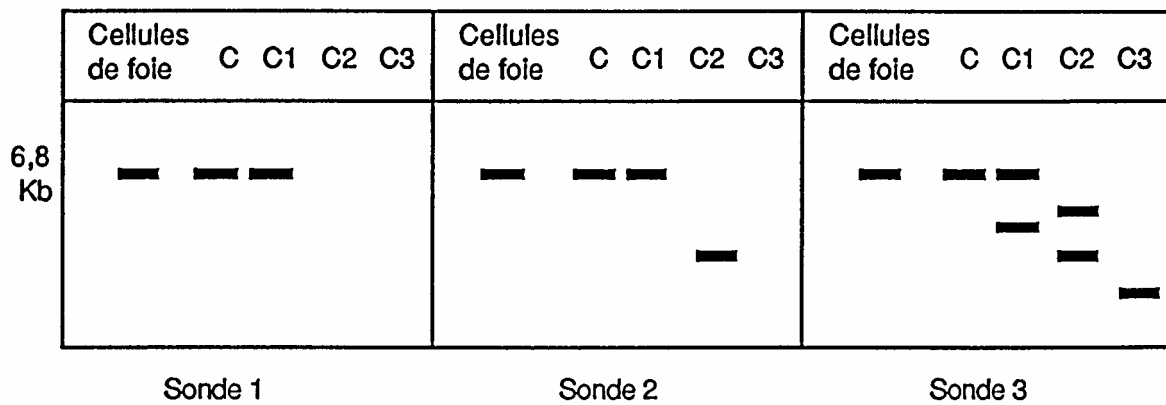


Figure 3

2. Etablissez une corrélation entre l'expression des chaînes d'immunoglobuline et la présence de bandes d'hybridation.

IV.

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 :

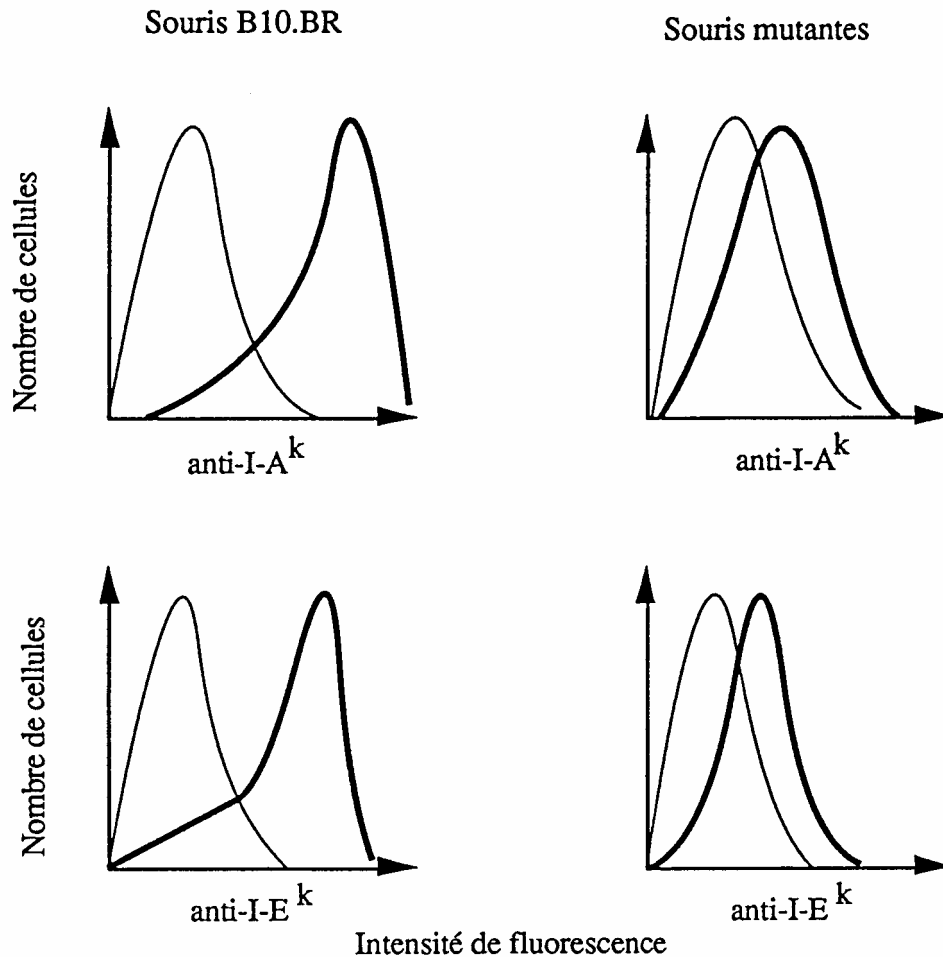


Figure 1 : Fluorescence des cellules spléniques IgM⁺. Les courbes présentées en trait fin correspondent à l'autofluorescence des cellules.

Expérience n°2 : Les cellules sont cultivées *in vitro* en présence de cystéine et de méthionine ³⁵S 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 :

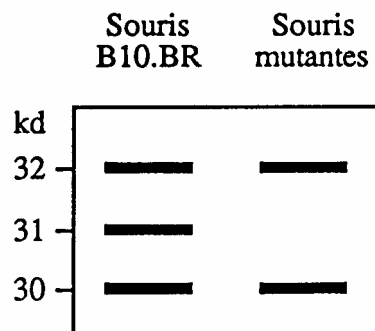


Figure 2 : Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

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 :

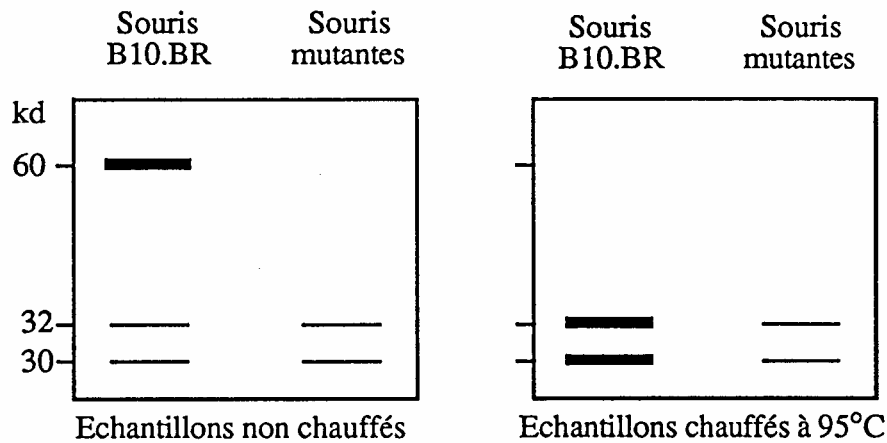


Figure 3 : Analyse par SDS-PAGE des protéines immunoprécipitées par anti-I-A^k.

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 :

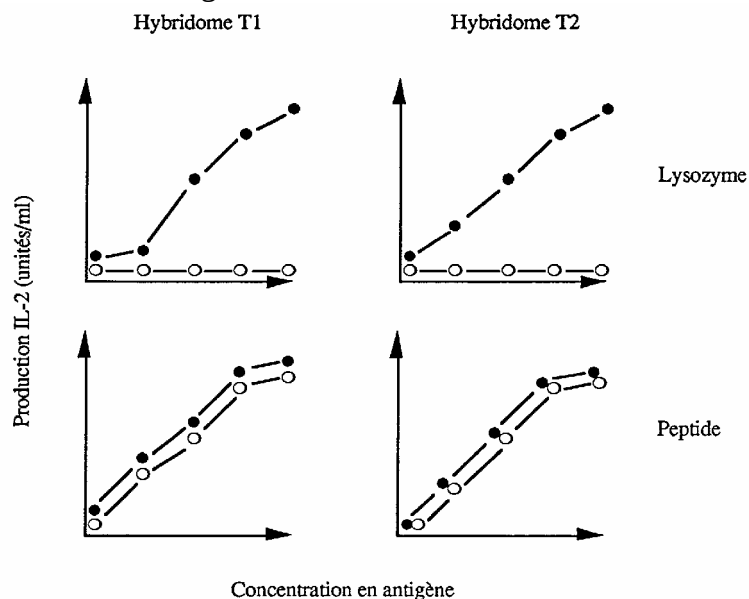


Figure 4 : IL-2 produite après stimulation des hybridomes T1 et T2 par des cellules spléniques de souris B10.BR (●) ou mutantes (○) en présence de lysozyme (en haut) ou du peptide correspondant (en bas).

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 :

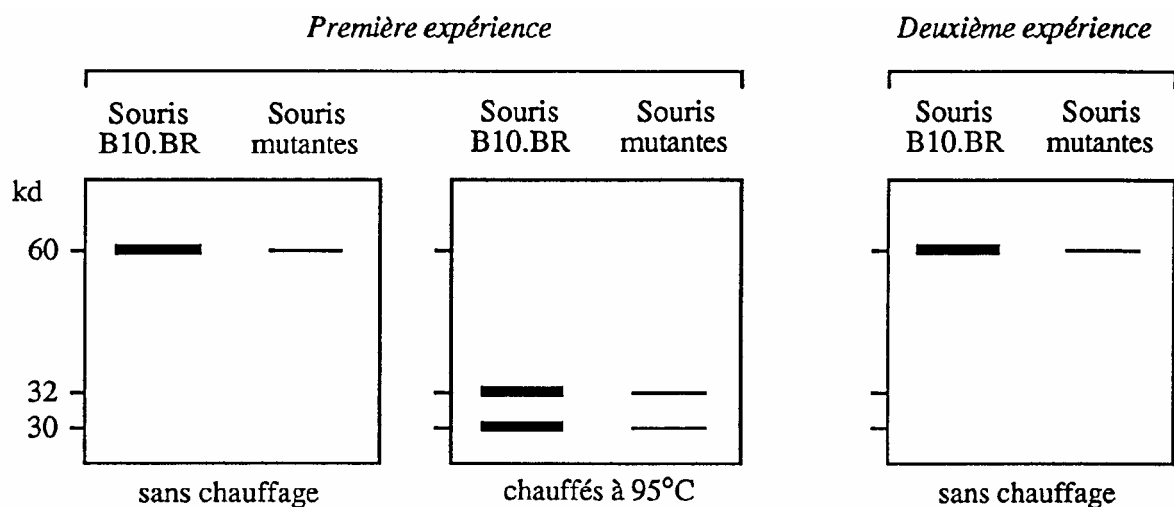


Figure 5 : Analyse en SDS-PAGE des échantillons immunoprécipités par l'anticorps anti-I-A^k.

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.*