



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-lymphocytes T bovins

Moris, Philippe

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

PRODUCTION ET CARACTERISATION

D'ANTICORPS MONOCLONAUX

ANTI-LYMPHOCYTES T BOVINS

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

MORIS Philippe

1986 - 1987

Facultés Universitaires N.D. de la Paix

Departement d'Immunologie

Faculté des Sciences

Rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081-22.90.61

Télex 59222 facnam-b

Téléfax 081-23.03.91

PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS
MONOCLONAUX ANTI-LYMPHOCYTES T BOVINS.

MORIS PHILIPPE.

Résumé.

L'Immunologie bovine a une place importante à tenir dans la compréhension, la prévention et le contrôle des maladies du bétail. Cependant, de telles études sont limitées par le manque de réactifs (ou de techniques) fiables permettant d'identifier les sous-populations cellulaires impliquées dans les réactions immunitaires.

Le but de ce travail est de profiter des potentialités énormes offertes par les anticorps monoclonaux.

Nous avons ainsi entrepris la production et la caractérisation de réactifs monoclonaux spécifiques de lymphocytes T bovins. Les procédures d'immunisation et de screening sont décrites.

Parmi les techniques utilisées pour définir les spécificités des anticorps produits, citons: l'Immunofluorescence avec ou sans analyse au Fluorescence activated Cell Sorter (Facs IV Becton Dickinson), le double marquage en Immunofluorescence ainsi que des diverses méthodes Immunobiochimiques. (Immunoprécipitation Western blot...).

Enfin quatre anticorps monoclonaux constituent le fruit de ce mémoire, trois d'entre eux spécifient les lymphocytes T, le dernier reconnaît en plus les leucocytes polymorphonucléaires, les monocytes et les macrophages.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1987

Laboratoire de Microbiologie

Promoteur: Prof. A. DEPELCHIN.

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été effectués au Laboratoire de Microbiologie du Département Vétérinaire des Facultés Notre-Dame de la Paix sous la direction du Professeur A. DEPELCHIN.

Qu'il me soit permis de lui adresser mes remerciements pour tous les conseils prodigués au cours de cette année.

Ma gratitude va au Docteur J.J. LETESSON pour son aide précieuse et sa grande disponibilité.

Mes remerciements vont aussi aux Professeurs WATTIAUX (Biochimie), RONVEAUX (Cytologie), HEVESI (Chimie Organique), ainsi qu'au Docteur COPPE (Laboratoire Vétérinaire de Marloie) qui m'ont autorisé l'accès de leur laboratoire et pour leurs conseils.

Je ne peux oublier les membres du Laboratoire du Professeur DEPELCHIN pour leur aide quotidienne et spontanée; je pense à Madame LOSTRIE N., à Monsieur DIDEMBOURG Ch., à Mademoiselle ALBERT M.; et à Madame DIDEMBOURG POSS M.A. pour sa sympathie.

Que Monsieur le Professeur BONNIVER trouve ici l'expression de ma reconnaissance car, il m'a permis la manipulation du Facs sous les directives de Monsieur GREINERS que je remercie également.

Je tiens à remercier le Docteur GOURGE ainsi que le personnel de l'abattoir de Namur sans la collaboration desquels le présent travail n'aurait pû être mené à bien.

J'exprime également mes remerciements à Madame THIBAUT, à Messieurs DUBOIS et LOMBET pour leur assistance spontanée.

Un merci tout particulier à la famille DENET pour leur accueil toujours sympathique.

Que toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin soient assurées de mon entière gratitude.

1 INTRODUCTION

1	Préambule	1
2	Origine des cellules impliquées dans la réponse immunitaire	1
3	Hétérogénéité structurelle et fonctionnelle	2
3.1	<u>Discrimination des cellules B-T</u>	2
3.2	<u>Récapitulatif des anticorps monoclonaux les plus utilisés</u>	3
4	Différenciation des lymphocytes T humains et murins	3
4.1	<u>Cortex thymique</u>	3
4.2	<u>Médullaire thymique</u>	4
5	De la fonction à la structure	4
5.1	<u>Généralités</u>	4
5.2	<u>La reconnaissance de l'antigène.</u>	4
5.3	<u>Différenciation des lymphocytes.</u>	6
5.4	<u>Destruction des cellules cibles.</u>	6
5.5	<u>Correspondance entre le type de restriction (classe)</u>	7
6	Caractérisation des marqueurs de cellules T matures	7
7	Etat des connaissances chez le bovin.	8
8	But du travail.	8

2 MATERIEL ET METHODES

1	Préparation des cellules pour l'immunisation et le screen	9
1.1	<u>Les lymphocytes totaux.</u>	9
1.2	<u>Les polymorphonucléaires.</u>	9
1.3	<u>Les thymocytes</u>	9
1.4	<u>Les lymphocytes T.</u>	9
1.5	<u>Les lymphocytes B.</u>	10
1.6	<u>Les cellules adhérentes.</u>	10
2	Production d'anticorps monoclonaux.	11
2.1	<u>En théorie.</u>	11
2.2	<u>En pratique.</u>	12
3	Techniques immunohistologiques	13
3.1	<u>Immunofluorescence.</u>	13
3.2	<u>Double marquage.</u>	15
3.3	<u>Cytofluorimétrie.</u>	16
3.4	<u>Marquage sur coupe à congélation.</u>	17
4	Techniques immunologiques.	18
4.1	<u>Détermination de l'isotypie par ELISA en sandwich.</u>	18
4.2	<u>Inhibition de formation de rosettes AET.</u>	18
4.3	<u>Test de compétition pour un épitope.</u>	19
5	Techniques biochimiques et immunologiques.	19
5.1	<u>Généralités.</u>	19
5.2	<u>Electrophorèse et transfert sur nitrocellulose: West</u>	20
5.3	<u>Immunoprécipitation.</u>	21

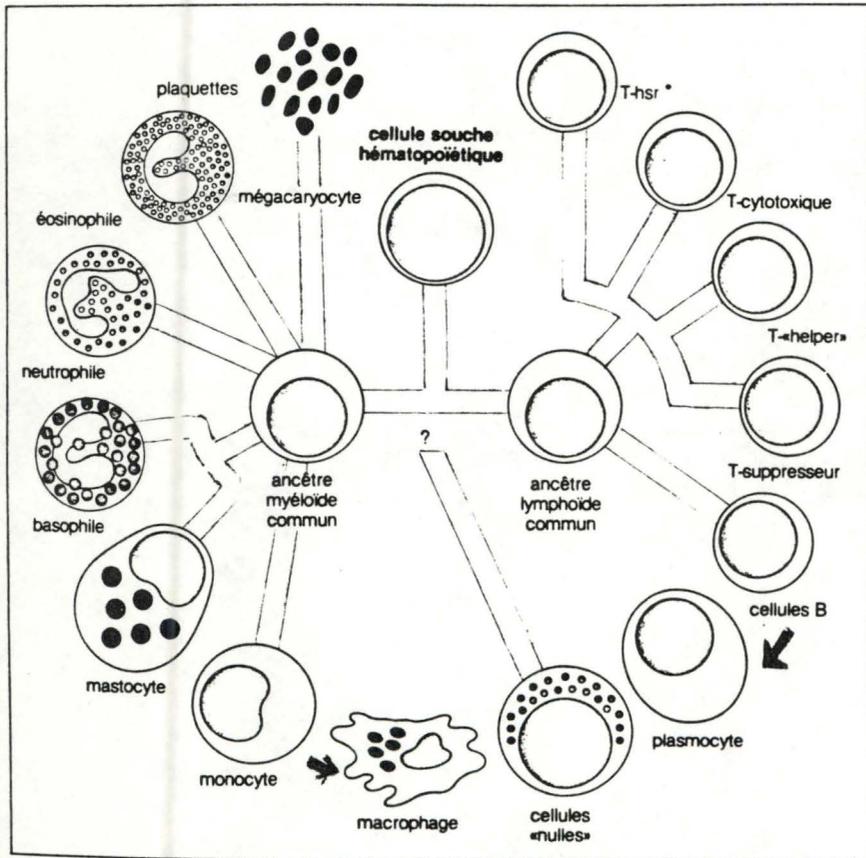
3. RESULTATS ET DISCUSSION

1	Caractéristiques des fusions.	25
2	Screening primaire.	25
	2.1 <u>Immunofluorescence.</u>	25
	2.2 <u>Caractéristiques des hybrides retenus.</u>	26
3	Screening secondaire.	26
	3.1 <u>Répartition cellulaire.</u>	26
	3.2 <u>Répartition tissulaire.</u>	32
	3.3 <u>Caractérisation des anticorps monoclonaux.</u>	33
	3.4 <u>Caractérisation immunobiochimique des antigènes.</u>	34

4. CONCLUSIONS

INTRODUCTION

1	Préambule	1
2	Origine des cellules impliquées dans la réponse immunita	1
3	Hétérogénéité structurale et fonctionnelle	2
	3.1 Discrimination des cellules B-T	2
	3.2 Récapitulatif des anticorps monoclonaux les plus uti	3
4	Différenciation des lymphocytes T humains et murins . . .	3
	4.1 Cortex thymique	3
	4.2 Médullaire thymique	4
5	De la fonction à la structure	4
	5.1 Généralités	4
	5.2 La reconnaissance de l'antigène.	5
	5.3 Différenciation des lymphocytes.	6
	5.4 Destruction des cellules cibles.	6
	5.5 Correspondance entre le type de restriction (classe	6
6	Caractérisation des marqueurs de cellules T matures . .	7
7	Etat des connaissances chez le bovin.	7
8	But du travail.	8



* hsr = hypersensibilité retardée

Fig. 1 Origine des cellules impliquées dans la réponse immunitaire. d'après Roitt (1985)

1 Préambule

Pour survivre et résister à l'invasion d'organismes pathogènes, les espèces les plus évoluées ont mis sur pied des systèmes de défense complexes. On distingue, d'une manière générale, les mécanismes constitutifs dont le développement n'est pas lié à l'introduction d'un agent extérieur et, les mécanismes adaptatifs qui requièrent la pénétration d'un antigène étranger pour stimuler leur formation.

Les mécanismes constitutifs sont non spécifiques. On y associe les cellules qui agissent comme éboueur: les monocytes, les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et les macrophages.

Les mécanismes adaptatifs sont, quant à eux, spécifiques; c'est-à-dire qu'à la suite de l'introduction d'un antigène, le mécanisme stimulé est spécifiquement dirigé contre cet antigène. Ces mécanismes sont le fait d'une classe cellulaire spécialisée: le système lymphocytaire. Ce dernier est activé grâce à une suite complexe de stimulations, d'interactions et d'inhibitions impliquant de nombreux genres cellulaires.

Il est donc intéressant de distinguer les différentes populations cellulaires entrant en jeu et de cerner leur rôle respectif afin de mieux comprendre ce phénomène compliqué que constitue la réponse immunitaire. Mais avant toute chose il faut savoir d'où proviennent ces cellules.

2 Origine des cellules impliquées dans la réponse immunitaire

Toutes ces cellules proviennent d'un ancêtre commun: la cellule souche pluripotente de la moelle osseuse, qui peut donner naissance à la lignée myéloïde, à la lignée érythroïde ou à la lignée lymphoïde (fig.1). Contrairement aux deux autres, la lignée lymphoïde ne subit pas la maturation de toutes ses cellules dans la moelle osseuse. Un premier stade de différenciation y est entrepris, qui oriente la cellule souche vers la lignée lymphoïde et même la prédestine à devenir un lymphocyte B ou T. A ce stade, les cellules prédéterminées à devenir des lymphocytes T sont libérées dans le sang et par cette voie gagnent un organe lymphoïde central ou primaire où vont s'opérer leur multiplication et leur différenciation finale. Cet organe est le thymus (fig.2).

Quant aux cellules devant se maturer en lymphocytes B, leur devenir est différent chez les oiseaux et les mammifères. Chez les oiseaux, ces cellules gagnent un organe primaire particulier: la bourse de Fabricius, où se maturent les lymphocytes B. Chez les mammifères, un équivalent anatomique de la bourse de Fabricius n'est pas décrit. Il semble bien que la moelle osseuse des mammifères soit un organe lymphoïde primaire, fonctionnellement identique à la bourse de Fabricius des oiseaux et que les lymphocytes B y accomplissent leur maturation.

Après leur différenciation dans ces organes centraux, les lymphocytes sont repris par la circulation sanguine et vont coloniser des organes lymphoïdes périphériques ou secondaires: les divers ganglions lymphatiques, la rate, les plaques de Peyer, le tissu lymphoïde des amygdales, du caecum, des sous-muqueuses (intestinales, respiratoires et génitales) et du tissu sous-cutané.

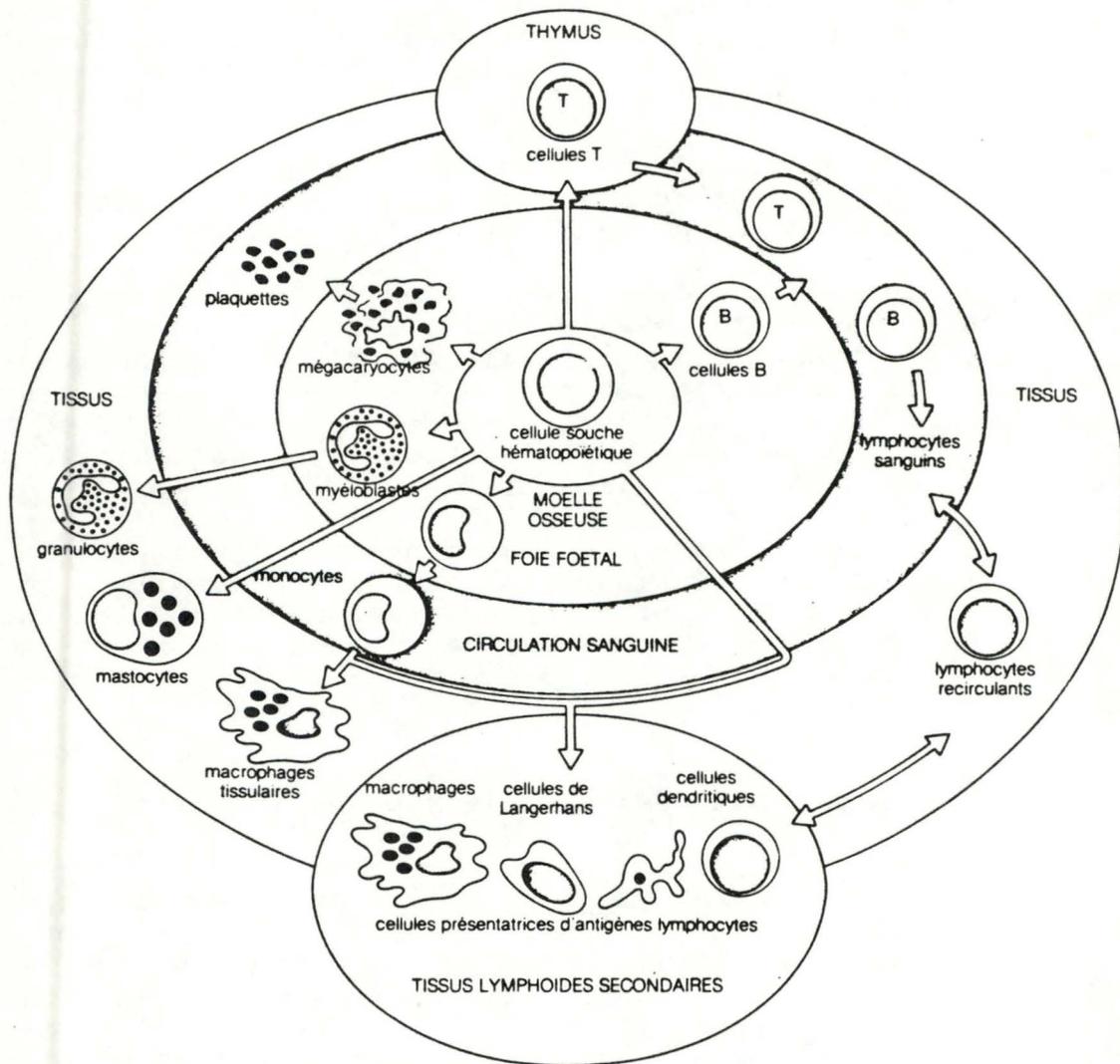


Fig. 2 Origine des cellules du système immunitaire.
d'après Roitt (1985)

Grâce à des marqueurs génétiques, on a reconnu que les cellules T se localisent à certaines aires définies des tissus lymphoïdes - aires dites thymo-dépendantes, aires paracorticales des ganglions lymphatiques, gaine périartériolaire de la rate et tissu interfolliculaire. Ces régions, lors d'une thymectomie prénatale, sont dépeuplées. Il existe d'autres aires des organes lymphoïdes qui ne sont pas colonisées par les cellules T. Elles ne sont pas désertées suite à l'ablation du thymus. Ces aires thymo-indépendantes sont les follicules de la rate, des ganglions lymphatiques, des plaques de Peyer, les cordons médullaires des ganglions lymphatiques. La situation unique des oiseaux permet la bursectomie qui opérée sur le poussin dans l'oeuf ou à l'éclosion provoque un dépeuplement de ces zones thymo-indépendantes.

Il y a donc au moins deux univers de lymphocytes intervenant dans l'immunité: l'un sous la dépendance du thymus, comprend les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire; l'autre, indépendant du thymus, est composé des lymphocytes B, aptes à se différencier en plasmocytes producteurs d'anticorps (MILLER et OSOBA, 1967).

3 Hétérogénéité structurelle et fonctionnelle

3.1 Discrimination des cellules B-T

On ne peut distinguer, sur base de leur morphologie, les lymphocytes B des T, mais au cours des années, différentes découvertes ont permis de les séparer de manière satisfaisante.

En 1970, COMBS et coll. rapportent que les globules rouges de mouton se lient spontanément à environ 60% des lymphocytes circulant chez l'homme, formant donc des rosettes d'érythrocytes. Cette population correspond aux cellules T. En effet, on note une absence d'immunoglobulines sur leur membrane et tous les thymocytes forment des rosettes.

Des essais ultérieurs pour mettre en évidence des sous-populations de lymphocytes, ont conduit à la découverte de récepteurs pour la partie Fc (partie cristallisable) de certaines immunoglobulines.

Selon BATSEN et coll. (1972), ces récepteurs sont propres aux cellules B uniquement. Quant à GUPTA et GOOD (1980), ils affirment que ces récepteurs sont spécifiques des lymphocytes T exclusivement.

Chez la souris, on dispose d'un antisérum réagissant avec un antigène Thy1, spécifique des cellules T (RAFF & OWEN, 1971). On pouvait penser que ce marqueur et le fait que les B se couvrent d'immunoglobulines, nous permettent de les distinguer. Mais pourtant, aucune de ces deux caractéristiques ne fournit un moyen absolu de différencier ces deux classes cellulaires. En effet, certaines cellules T portent si peu d'antigènes Thy1 qu'on les détecte comme Thy1-négatifs (MILLER & SPRENT, 1971) et BATSEN et coll. (1971) ont même trouvé des immunoglobulines sur des cellules T.

Les résultats de ces recherches illustrent les difficultés rencontrées dans l'identification des populations lymphocytaires.

LES MARQUEURS du LYMPHOCTE HUMAIN

(CD = cluster of differentiation)

CD	Poids moléculaire Kd	Nomenclature précédente	Cellules - Fonctions
CD1a	49	-	Thymocytes (cellules de Langerhaus)
CD1b	45	T6	Thymocytes
CD1c	43	T10	Thymocytes
CD2	50	T11	Cellules T (rosettes) [⊗]
CD3	20,26	T3	Cellules T
CD4	60	T4	Sous-pop. de T (récepteur classe 2 CMH) ^{⊗⊗}
CD5	67	-	Cellules T
CD6	120	T11	Cellules T
CD7	41	-	Cellules T
CD8	32	T8	Sous-pop. de T (récepteur classe 1 CMH) ^{⊗⊗}
CD9	24	-	pré-B, monocytes, plaquettes
CD10	100	-	pré-B
CD25	55	-	Cellules T (récepteur IL2)
CD26	105	-	Cellules T activés
CD27	55	-	Cellules T
CD28	44	-	Cellules T

⊗ - cfr. 1.5.4 -
 ⊗⊗ - cfr. 1.5.2 -

Cette liste est loin d'être exhaustive

Tableau 1

(Degos, 1987) et (Shaw, 1987)

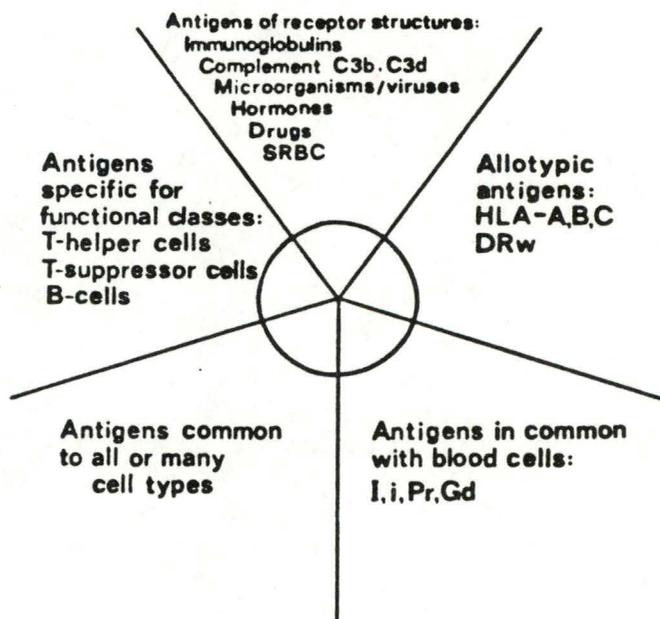


FIGURE 3 An illustration of some of the types of antigens to be found on the lymphocyte surface.

KOLHER G. et MILSTEIN C. (1975), en mettant au point la production d'anticorps monoclonaux, ont permis un énorme progrès dans la reconnaissance et le typage des populations cellulaires. Un anticorps monoclonal est un anticorps qui ne reconnaît qu'un épitope. Les scientifiques disposent à l'heure actuelle d'une foule d'anticorps monoclonaux qui leur permettent de différencier les classes cellulaires sur base de leurs protéines de surface. Ces études ont été menées surtout chez l'homme et la souris.

3.2 Récapitulatif des anticorps monoclonaux les plus utilisés.

Les anticorps, nommés au début de manière un peu aléatoire, ont été classifiés suivant une nouvelle nomenclature mise sur pied lors du " 3rd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens " (SHAW S. 1987)(tableau 1). Dans cette nouvelle classification, ce n'est plus l'anticorps mais la protéine reconnue qui est nommée; ceci a l'avantage d'éviter les redondances.

Ces anticorps monoclonaux constituent des outils très précieux pour mettre en lumière les étapes successives de différenciation des lymphocytes. Nous envisagerons le cas des lymphocytes T, ceux-ci faisant l'objet de ce mémoire. Nous allons décrire maintenant les étapes de maturation dans le thymus des lymphocytes chez l'homme et la souris, qui sont les mieux connues.

4 Différenciation des lymphocytes T humains et murins

4.1 Cortex thymique

Les précurseurs des cellules T de la moelle osseuse, appelés prothymocytes, migrent vers le thymus où ils sont maturés et deviennent fonctionnellement compétents. Ils sont dès lors exportés dans le système périphérique. On a pu montrer que de profonds changements des protéines de surface interviennent au cours des différentes étapes de maturation des cellules T sous l'influence d'un contact avec les cellules épithéliales qui synthétisent un (ou plusieurs) facteur(s) thymique(s).

La maturation des lymphocytes dans le thymus, se fait d'abord dans le cortex des lobules thymiques pour s'achever dans la médullaire d'où les cellules immunocompétentes sont envoyées dans la circulation.

Pour la souris, les premiers pas de différenciation depuis la cellule souche jusqu'au thymocyte sont associés à l'acquisition des antigènes de surface TL, Thyl et Ly1,2,3 (que l'on écrit également Lyt1,2,3) (REINHERZ & SCHLOSSMAN, 1980).

Chez l'homme, les premiers stades lymphoïdes dans le cortex thymique n'ont pas les antigènes des cellules matures mais portent des antigènes qu'ils partagent avec les cellules des lignées issues de la moelle osseuse (fig.3). Au cours du premier stade de différenciation, les thymocytes humains réagissent avec les anticorps monoclonaux anti-CD1c (T10) et T9 (MEUER & coll., 1982).

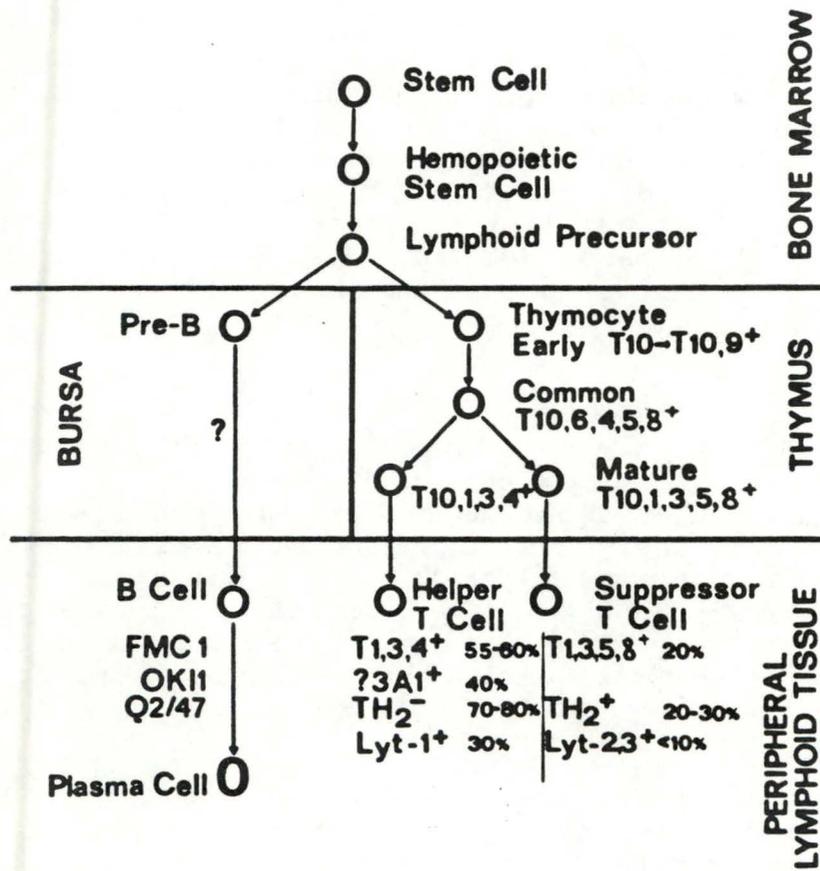


Fig. 4 Etapes de différenciation des lymphocytes B et T chez l'homme et la souris.

L'antigène CD1c, appelé aussi HTL, est analogue au TL murin; HTL, quoique présent sur les thymocytes, n'est plus présent sur les cellules T périphériques normales (TERHORST & coll., 1980) et donc la migration de ces lymphocytes dans la circulation semble associée à la perte de cet antigène.

L'étape de maturation suivante chez l'homme, provoque la perte de l'antigène T9 et lui fournit l'antigène spécifique des thymocytes défini par l'anticorps monoclonal anti-CD1b (T6) ainsi que les antigènes CD4 et CD8 (fig.4).

4.2 Médullaire thymique

Les thymocytes murins passant dans la médullaire deviennent TL négatifs, ils ont une concentration moindre de l'antigène Thy1 et voient une augmentation des antigènes H-2 (qui sont les produits du complexe majeur d'histocompatibilité -cfr. 1.5.1.b-chez la souris) (REINHERZ & SCHLOSSMAN, 1980). Ce dernier phénotype est virtuellement caractéristique de toutes les cellules T en voie de maturation mais certaines resteront à ce stade; elles serviront de lymphocytes amplificateurs des réponses immunitaires. On les retrouve dans le thymus et la rate. Ce sont les lymphocytes T1. Les autres, appelés T2, continuent leur différenciation et divergent en deux sous-populations majeures: les cellules Ly1 positives et Ly2,3 positives (EVANS & coll., 1977). Ces deux types cellulaires sont fonctionnellement distincts.

Dans la médullaire, les thymocytes humains perdent l'antigène CD1b et acquièrent CD2, CD3 et CD5. En perdant soit l'antigène CD4 soit le CD8, les cellules T se séparent en deux sous-populations CD8 positives et CD4 positives (REINHERZ & SCHLOSSMAN, 1981).

A ce stade l'immunocompétence est acquise, mais ne se développe pas avant que les lymphocytes ne soient exportés hors du thymus. C'est lors de cette migration dans le système périphérique que les antigènes CD1c disparaissent de la membrane des cellules T (MEUER & coll., 1982).

5 De la fonction à la structure

5.1 Généralités

L'identification de ce qui est étranger à l'organisme et la réaction immunitaire qui en découle, impliquent l'existence d'un système de discrimination du soi et du non-soi. On connaît aujourd'hui les bases cellulaires des réactions immunitaires; ces réactions se déroulent schématiquement en trois étapes:

- la reconnaissance des antigènes
- la différenciation des lymphocytes et
- la destruction de la cellule cible.

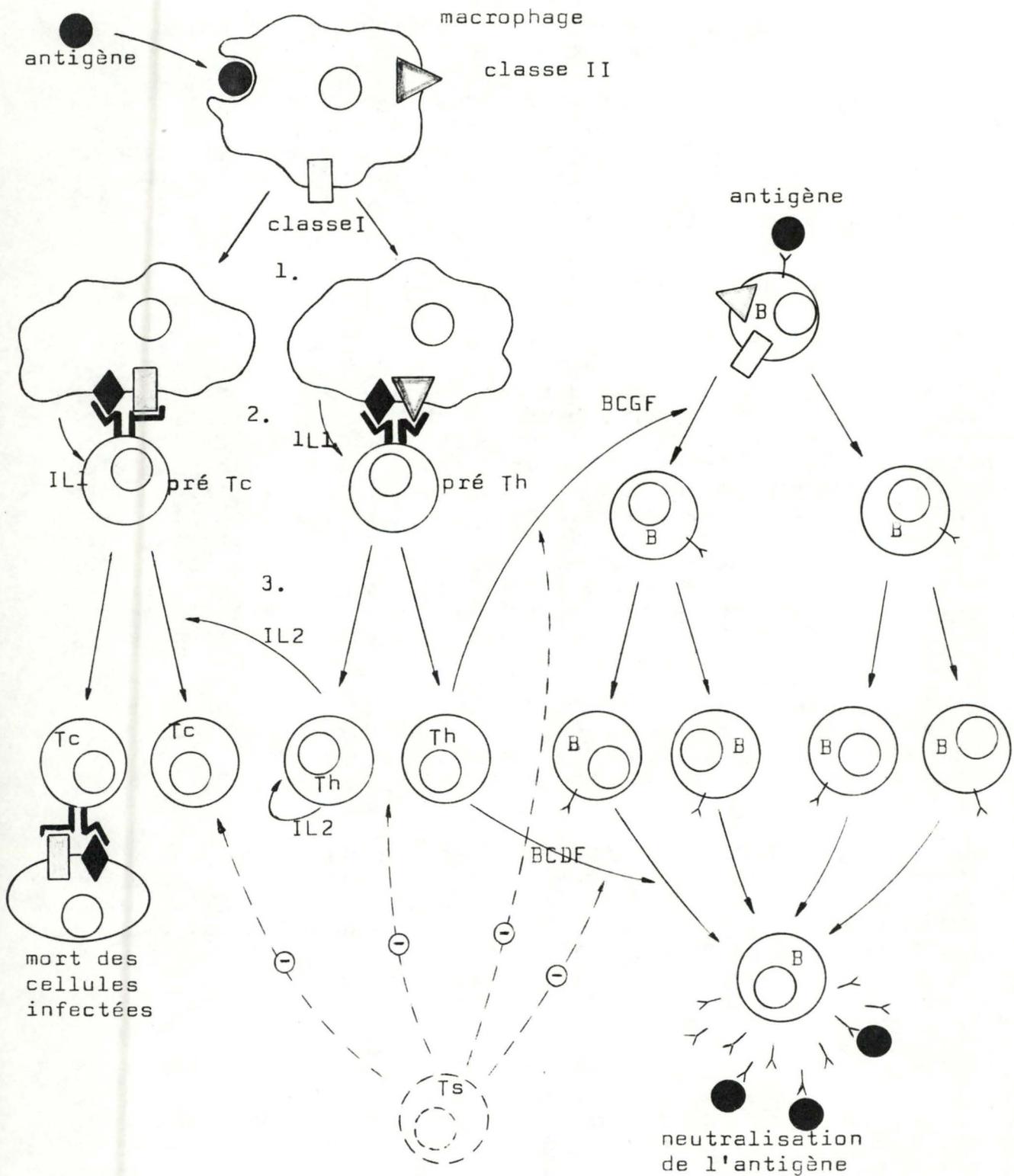


Fig. 5 Réponse immunitaire spécifique

- 1: présentation.
- 2: reconnaissance.
- 3: différenciation.

Th - cellule T helper
 Tc - cellule T cytotoxique
 B - cellule B
 Ts - cellule T **sup**pressor

5.2 La reconnaissance de l'antigène.

A. Présentation

- - - - -

La rencontre des lymphocytes T avec l'antigène a lieu dans un ganglion drainant le site inflammatoire. Pour que cette reconnaissance ait lieu, il faut que l'antigène soit présenté aux lymphocytes précurseurs spécifiques. Certaines cellules sont dépêchées à cette tâche. Il s'agit des macrophages, des cellules dendritiques de la rate ou des ganglions et des cellules de Langerhans qui sont des cellules de la peau capables de migrer vers les ganglions lymphatiques, en emportant avec elles des motifs de l'antigène (HOEFESMIT & coll., 1982). Par des mécanismes mal connus, ces cellules APC (antigen presenting cells) savent trier le bon grain de l'ivraie et absorber l'antigène étranger.

Lors d'un contact avec un antigène étranger, les macrophages, cellules immunitaires non spécifiques sont les premiers à réagir. Ils ingèrent l'antigène, le dégradent et le découpent (fig.5). Les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques incorporent l'antigène par endocytose et, après l'avoir traité, le présentent aux lymphocytes spécifiques. On ne sait à l'heure actuelle si elles sont capables de dégrader ou non celui-ci. Ce n'est donc pas l'antigène intacte mais modifié qui est reconnu par les lymphocytes T.

B. Reconnaissance proprement dite

- - - - -

Les lymphocytes reconnaissent l'antigène uniquement si celui-ci est présenté en association à des molécules appartenant au soi: molécules de classe 1 et 2 du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Ces protéines marquent les cellules et permettent au système immunitaire d'identifier le soi du non-soi. Elles sont codées par des gènes groupés sur une région du génome que l'on appelle le CMH. Ces protéines elles-mêmes sont appelées protéines d'histocompatibilité (MARRACK & KAPPLER, 1986).

Diverses hypothèses concernant la présentation conjointe de l'antigène et des protéines du CMH ont été soulevées mais on ne peut pas encore trancher pour l'une ou pour l'autre (fig.6).

C. Restriction au CMH.

- - - - -

En fait, il existe deux types de lymphocytes intervenant lors de cette reconnaissance: les précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques (Tc) qui après activation tueront les cellules infectées et les lymphocytes T helper (Th), qui collaborent à la réponse de tous les lymphocytes lors de la réponse immunitaire (fig.5). Cette différence de fonction se traduit par des récepteurs de reconnaissance différents. Ainsi,

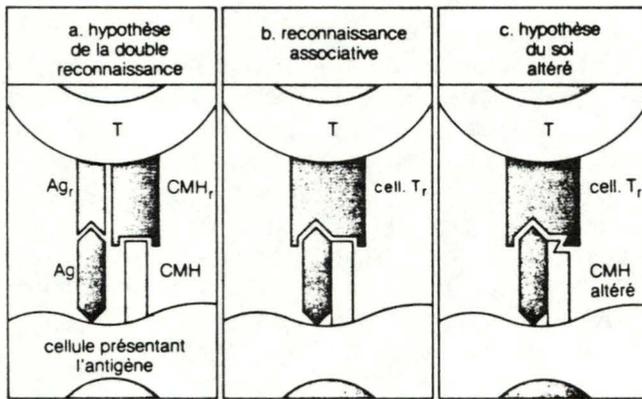


Fig. 6 Reconnaissance de l'antigène par les cellules T

r - récepteur

d'après Roitt (1985)

les précurseurs des Tc programmés contre un antigène ne reconnaissent celui-ci qu'en association avec une protéine d'histocompatibilité de classe 1. En revanche, les Th ne le reconnaissent qu'en association avec une molécule d'histocompatibilité de classe 2.

5.3 Différenciation des lymphocytes.

Tous les lymphocytes ayant fait cette double reconnaissance sont alors activés. Il peut s'agir de Th ou de précurseurs de Tc. A ce stade, des coopérations cellulaires apparaissent: macrophages-T, T-T et T-B (fig.5). Cependant, la réponse immunitaire ne se développerait pas si ces activations n'étaient poursuivies par la synthèse de divers facteurs de croissance et de différenciation: les interleukines (IL1 secrétées par les macrophages, IL2, BCDF et BCGF produites par les Th) qui induisent la prolifération et la maturation des populations de lymphocytes B et T activés.

5.4 Destruction des cellules cibles.

la réaction immunitaire parvient alors à sa phase effectrice. Les Tc tuent les cellules infectées mais pas les saines. Les lymphocytes B, activés par les Th, secrètent de grandes quantités d'anticorps qui neutralisent l'antigène en circulation. Enfin, une fois l'antigène étranger éliminé, les lymphocytes T suppresseurs (Ts) arrêtent la réponse en bloquant ou en diminuant l'activité des autres cellules du système immunitaire.

5.5 Correspondance entre le type de restriction (classe 1-2)

On peut donc résumer la situation comme ceci: bien que la plupart des cellules T reconnaissent l'antigène en association avec les produits du CMH, tous les lymphocytes T n'identifient pas les mêmes protéines du CMH. Les Tc reconnaissent en général l'antigène avec les produits de classe 1, qui sont exprimés à la surface de toutes les cellules nucléées, alors que les Th reconnaissent l'antigène en association avec les protéines de classe 2, exprimées par les APC, par les lymphocytes B de même que par les Th activés (Reinherz & coll., 1982) (Marrack & Kappler, 1986).

Il existe donc une corrélation étroite entre l'expression du CD4 chez l'homme et une restriction aux produits de classe 2, ainsi qu'entre l'expression du CD8 et une restriction aux produits de classe 1. On pense que les molécules CD4 et CD8 sont respectivement les récepteurs pour les glycopeptides de classe 2 et de classe 1 du CMH (Roitt & coll., 1986).

Dans son étude sur les lymphocytes T murins, SUSAN SWAIN (1981) remarque également que le phénotype Ly est en relation directe avec les classes du CMH.

Ly2 semble en corrélation avec la spécificité de la cellule T pour les produits de classe 1

Le phénotype Ly1 traduit une spécificité pour les protéines de classe 2.

Table 2. Distribution and properties of two subpopulations of bovine T lymphocytes

Lymphoid compartment	Property	T-lymphocyte population	
		IL-A11/A12 ⁺ , IL-A17 ⁻	IL-A11/A12 ⁻ , IL-A17 ⁺
Peripheral blood mononuclear cells	Percentage positive	30	20
	Proliferation to ^a :		
	Con A	+++	-
	PHA	+++	-
	alloantigens	+++	-
Lymph node	Percentage positive	40	20
	Localization	Mainly paracortex	Mainly paracortex
Thymus	Percentage positive	70	70
	Localization	Majority cortical lymphocytes and subpopulation in medulla	Majority cortical lymphocytes and subpopulation in medulla

^a the cell populations were purified using a FACS II (Becton-Dickinson, Sunnyvale, Ca) and assayed in the absence of exogenous growth factors

d'après Morrisson (1986)

Mais il faut émettre certaines réserves quant à cette affirmation. En effet, DIALYNAS (1981) a découvert un anticorps monoclonal qui reconnaît une molécule désignée L3T4a (52 Kda). Elle est exprimée sur les cellules T correspondant au phénotype Ly1. Des expériences ont montré que L3T4a est en relation avec les produits de classe 2 du CMH .

De telles exceptions ont été découvertes chez l'homme également. Aussi bien qu'il existe une association évidente entre l'expression des antigènes des sous-populations de cellules T et la spécificité pour les produits du CMH, l'association peut ne pas être complète.

6 Caractérisation des marqueurs de cellules T matures

Chez la souris, Thy1 (19-35 Kda) est une glycoprotéine exprimée par toutes les cellules T de souris. La plupart des lymphocytes T humains porte trois glycoprotéines de surface CD2, CD5 et CD3. CD2 est le récepteur pour les érythrocytes du mouton (50-55 Kda), CD3 spécifie une glycoprotéine (20 Kda) impliquée dans l'activation de la cellule T. La fonction de la molécule dénommée CD5 est inconnue.

Certains marqueurs sont spécifiques de sous-populations. Les cellules Th expriment un antigène Ly1 (55 kda), équivalant à la molécule CD4 (60 Kda) chez l'homme. Ces protéines de surface semblent impliquées dans la reconnaissance de l'antigène par les cellules T en association avec les produits de classe 2 du CMH.

Les antigènes murins Ly2,3 (35 Kda) analogues aux glycoprotéines des cellules Tc/Ts humaines nommées CD8 (32 Kda) semblent permettre à ces cellules de reconnaître l'antigène en association avec les produits des gènes de classe 1 du CMH.

7 Etat des connaissances chez le bovin.

Cette partie est basée sur l'article de MORRISSON et coll. (août 1986) qui constitue le seul document récent traitant directement du problème des sous-classes de lymphocytes T chez le bovin en termes d'anticorps monoclonaux. Morisson dispose de trois anticorps identifiant deux sous-populations de cellules T bovines.

Plus de la moitié des lymphocytes T périphériques réagissent avec les anticorps monoclonaux ILA11 et ILA12, ceux-ci reconnaissent des molécules de 52 -54 Kd. La majorité des cellules restant, sont détectées par ILA17 via des molécules de 34-35 Kd.

Suivant Morisson, ces découvertes et la distribution tissulaire, reprise dans le tableau 2, des cellules réagissant avec ces anticorps, suggèrent que les molécules reconnues par ILA11-ILA12 et ILA17 sont analogues à celles définies chez l'homme respectivement par CD4 et CD8.

L'équipe de ROSSI (1986) a fabriqué un anticorps, appelé MAB15, qui reconnaît les cellules T, ainsi que les éosinophiles et les neutrophiles, mais qui ne réagit pas avec les monocytes et les cellules B.

8 But du travail.

Un des domaines de l'immunologie vétérinaire contemporaine est la caractérisation des mécanismes régulateurs de la réponse immunitaire et le rôle de cette régulation dans la prévention des maladies.

Il est maintenant évident chez la souris, le rat et l'homme que l'interaction des Th et des Ts régule l'intensité des réponses immunitaires (KATZ & BENACERRAF, 1975). Le mauvais fonctionnement de ces cellules peut être associé à diverses maladies. Par exemple, l'absence de cellules Ts chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminés, indique un rôle possible de ces cellules dans l'homéostasie normale de la réponse immunitaire chez l'homme (VEYS & coll., 1980).

Nous allons lors de ce travail tenter de produire et sélectionner des anticorps monoclonaux spécifiques de populations ou de sous-populations de lymphocytes T bovins. Ceci permettra de suivre l'évolution de ces diverses populations chez un animal sain et chez un malade.

L'obtention de réactifs monoclonaux spécifiques de lymphocytes T bovins compléterait utilement la batterie des anticorps déjà caractérisés; batterie finalement très peu étendue lorsqu'on considère celle dont disposent les chercheurs étudiant l'homme ou la souris.

MATERIEL ET

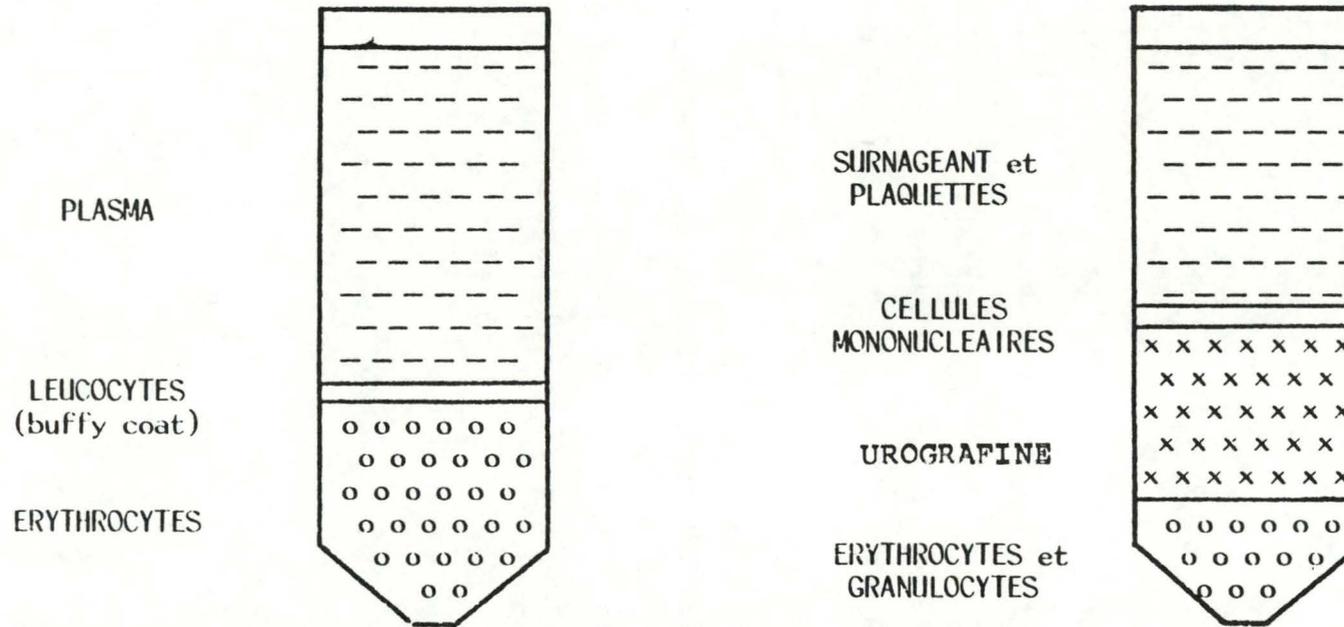
METHODES

1	Préparation des cellules pour l'immunisation et le screen	9
1.1	<u>Les lymphocytes totaux.</u>	9
1.2	<u>Les polymorphonucléaires.</u>	9
1.3	<u>Les thymocytes</u>	9
1.4	<u>Les lymphocytes T.</u>	10
1.5	<u>Les lymphocytes B.</u>	10
1.6	<u>Les cellules adhérentes.</u>	10
2	Production d'anticorps monoclonaux.	11
2.1	<u>En théorie.</u>	11
2.2	<u>En pratique.</u>	12
3	Techniques immunohistologiques	14
3.1	<u>Immunofluorescence.</u>	14
3.2	<u>Double marquage.</u>	15
3.3	<u>Cytofluorimétrie.</u>	16
3.4	<u>Marquage sur coupe à congélation.</u>	17
4	Techniques immunologiques.	18
4.1	<u>Détermination de l'isotypie par ELISA en sandwich.</u>	18
4.2	<u>Inhibition de formation de rosettes AET.</u>	19
4.3	<u>Test de compétition pour un épitope.</u>	19
5	Techniques biochimiques et immunologiques.	20
5.1	<u>Généralités.</u>	20
5.2	<u>Electrophorèse et transfert sur nitrocellulose: West</u>	20
5.3	<u>Immunoprécipitation.</u>	22

fig. 7 Disposition et constitution des différentes couches après centrifugation :

A. du sang périphérique bovin total à 1500 g
pendant 15 minutes .

B. d'une fraction enrichie en leucocytes
(buffy coat) sur gradient discontinu de
densité pendant 30 minutes avec une
force de 400 g à l'interface .



Composition du PBS (Phosphate buffered Saline)

KH_2PO_4	(Merck)	0,2 g	
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	(Merck)	1,44 g	
NaCl	(Merck)	8 g	
KCl	(Merck)	0,2 g	
H_2O		1000 ml	mettre à pH 7,4

Composition du mélange Ficoll-Urografine

Ficoll 400	(Pharmacia fine chemical)	7,65 g	
Urografine 76 6	(Schering)	19 ml	
			mettre à la densité 1.077 avec Urografine

NH_4Cl	(Merck)	0,16 M	
H_2O			mettre à pH 7,2

1 Préparation des cellules pour l'immunisation et le screening.

1.1 Les lymphocytes totaux.

Le sang périphérique bovin est recueilli soit lors de l'abattage de l'animal, en profitant de la section de la veine jugulaire; soit dans une exploitation agricole par ponction jugulaire. Le sang est alors récolté dans un récipient contenant un agent anticoagulant. Nous avons utilisé l'EDTA (éthylène diamine tétraacétate de sodium) dans la proportion approximative de 1,5 mg par ml de sang. On répartit le sang en tubes de 50 ml à fond conique pour le centrifuger à 15000 g pendant 15 min.

On récolte la couche de leucocytes, encore appelée "Buffy coat", couvrant le culot de globules rouges (fig.7). Celui-ci est dilué deux fois au minimum en PBS.

On utilise ensuite la centrifugation sur gradient discontinu, obtenu grâce au ficoll et à l'urografine (fig.7). On dépose délicatement 20 ml de la suspension cellulaire sur 15 ml du mélange ficoll-urographine de densité 1,077 (SPOONER & coll., 1978).

Après une centrifugation de 1000 g pendant 25 min., on récolte l'anneau de cellules mononucléées à la surface du ficoll (fig. 7). On additionne de PBS la suspension cellulaire que l'on soumet à une centrifugation de 200 g pendant 10 minutes.

Les leucocytes mononucléés sont dès lors lavés trois fois en PBS par centrifugation à 200 g pendant 10 minutes. On les dénombre sur lame de Thoma et ils sont resuspendus à concentration adéquate.

1.2 Les polymorphonucléaires.

Le sang est traité de la même manière que lors de la préparation des lymphocytes. Mais, le plasma, le buffy coat et le tiers supérieur du culot d'érythrocytes sont éliminés. Le restant du culot est resuspendu dans une solution de chlorure d'ammonium 0,75% ce qui élimine les globules rouges. Les polymorphonucléaires (PMN) sont lavés au PBS à 200 g pendant dix minutes et resuspendus à concentration voulue.

1.3 Les thymocytes

Suivant la technique décrite pour la souris (HUDSON & HAY, 1976), un fragment de thymus de veau récolté à l'abattoir est homogénéisé en PBS au moyen d'un potter. Après filtration grossière sur gaze et plusieurs lavages en PBS, la préparation cellulaire est déposée sur ficoll et traitée comme les lymphocytes.

Colonne (Vel) 21 cm diam. 18 mm

Composition du RPMI minimum

RPMI 1640	(Gibco)	1 flacon en poudre
NaHCO ₃	(Merck)	0,85 g
HEPES	(Gibco)	4,77 g
Na pyruvate 100 mmol	(Gibco)	10 ml
Penicilline - Streptomycine	(Gibco)	10 ml
Eau ultra pure		1000 ml

Composition du RPMI 10 % FCS

RPMI minimum	900 ml
FCS décomplémenté	100 ml

Boîte de Petri en polystyrène (Vel) 35/10 mm
Ovalbumine (Fluka)

Ravocaïne (PSYPHAC)
Flacon de 500 ml (Gibco)

1.4 Les lymphocytes T.

La purification des lymphocytes T se fait sur laine de nylon.

A. Préparation de la colonne.

On dégraisse grâce à du HCl 0,2 N, 1 g de laine de nylon pendant trente minutes. On place ensuite la laine ainsi traitée dans une colonne. Celle-ci est alors rincée au moyen de 50 ml d'eau distillée puis de 50 ml de RPMI minimum et enfin de 50 ml de RPMI 10% de sérum de veau foetal (FCS-foetal calf serum) 30 minutes à 37° C.

On dépose alors sur la colonne 1 ml de RPMI 10% FCS contenant entre 50 et 200 millions de cellules mononucléées.

B. Filtration des cellules.

On fait pénétrer les cellules dans la laine de nylon et on incube la colonne 45 min. à 37° C. Ensuite, on remplit la colonne de milieu et règle le débit de manière à obtenir une goutte toutes les 5 sec.. La colonne doit être maintenue pleine pour éviter que le débit ne soit influencé par la réduction de la hauteur du liquide.

On récolte une première fraction de 10 ml: fraction T1. Celle-ci est essentiellement composée de cellules T. Comptage sur lame de Thoma et mise à concentration choisie. Le rendement de ces techniques est relativement faible, de l'ordre de 15 %.

1.5 Les lymphocytes B.

Une procédure de purification des cellules B chez le porc basée sur une adhérence différentielle de ces cellules sur ovalbumine, décrite par VAIMAN et coll, 1983, s'est avérée transposable chez le bovin (SPOONER, comm. pers.).

Des boîtes de Pétri en polystyrène (35/10 mm) sont incubées 40 min. à température ambiante avec 1 ml de Tris (Calbiochem. Berhing Corp.) 0,05 M, pH 9,5 contenant 0,012 % d'ovalbumine (Fluka).

Les boîtes sont lavées 4 fois en PBS 1 % FCS. On dépose, pour une incubation d'une heure à 4 °C 1 ml d'une suspension lymphocytaire à 3 millions de cellules par ml de PBS 5 % FCS. Les cellules non adhérentes sont éliminées par 3 lavages délicats avec du PBS 1% FCS. Les cellules adhérentes sont recueillies par un lavage énergique avec la même solution.

Le rendement cellulaire de cette technique est très faible, de 1-5 %.

1.6 Les cellules adhérentes.

Une suspension de cellules mononucléées à 100 millions de cellules par ml de RPMI 10 % FCS est incubée 3 heures en flacon, à 37 °C sous 5 % de CO₂.

Les cellules non adhérentes sont éliminées par lavage en PBS, répété deux à trois fois, les cellules adhérentes sont couvertes de PBS 0,5 % Ravocaïne (anesthésique local) à 4 ° C pendant 10 min. et recueillies au moyen d'un "rubber policeman".

2 Production d'anticorps monoclonaux.

2.1 En théorie.

Si on veut étudier une protéine, une bactérie, une cellule particulière... et qu'on ne peut l'obtenir de manière suffisamment pure, sa détection dans une préparation s'avère très difficile; la technique des anticorps monoclonaux de KOLHER et MILSTEIN (1975) permet de résoudre ce problème: cette méthode basée sur la production de cellules hybrides par fusion entre une cellule myélomateuse et un lymphocyte splénique d'une souris immunisée par une préparation contenant entr'autre l'antigène étudié, nous fournit une grande variété d'anticorps parmi lesquels il reste à caractériser et à produire celui ou ceux nous intéressant plus particulièrement.

La fusion cellulaire

Il y a plus de 25 ans que la fusion cellulaire fut décrite (Barski & coll., 1960). Cette technique est maintenant devenue classique. Deux paramètres sont essentiels dans l'efficacité de la méthode: la fréquence des fusions reste basse la difficulté de sélectionner les hybrides.

- Agents fusionnants.

KOLHER et MILSTEIN ont produit les premiers hybrides en utilisant le virus de Sendai inactivé. On utilise actuellement un agent fusionnant chimique: le polyéthylène glycol (PEG)

$$H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$$

On peut additionner au PEG, du diméthyl sulfoxyde (DMSO) qui semble améliorer l'efficacité de la fusion (Norwood & coll., 1976).

- Sélection des hybrides.

Cette sélection repose sur l'existence de deux voies de biosynthèse de l'ADN (Lehninger, 1981).

La voie de synthèse 'de novo' qui mobilise des sucres et des acides aminés comme précurseurs des bases puriques et pyrimidiques, nécessite l'activation enzymatique du dihydrofolate réductase.

La voie de synthèse de récupération où l'ADN se forme à partir de thymidine et d'hypoxanthine libre (provenant du turn-over des acides nucléiques) grâce aux enzymes thymidine-kinase (TK) et hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT).

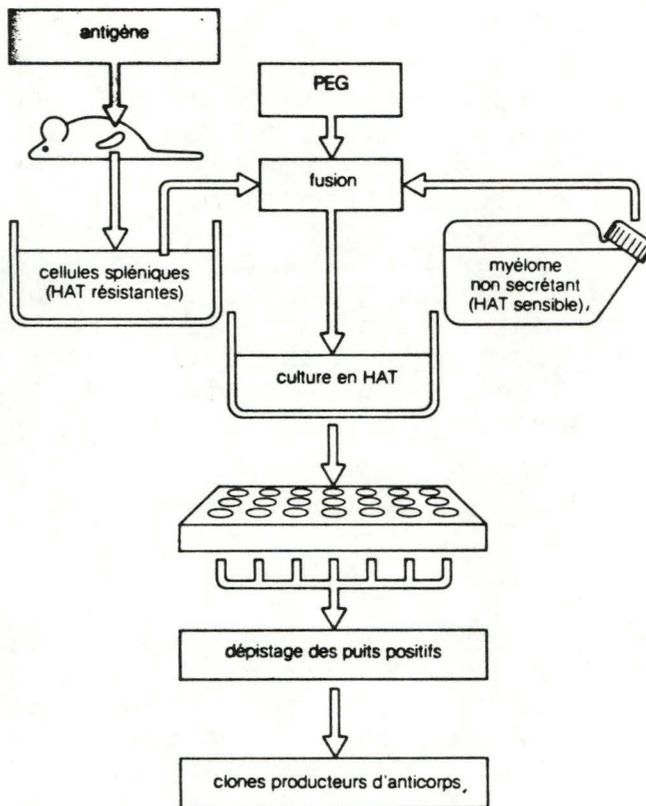
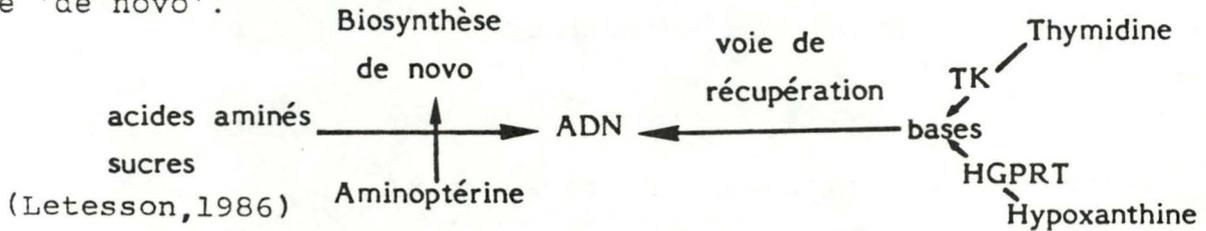


Fig. 8 Production d'anticorps monoclonaux.

d'après Roitt (1985)

Le choix d'un myélome particulier et d'un milieu sélectif exploitant la dualité de synthèse du génome permet de sélectionner les hybrides (LITTERFIELD, 1964) (fig. 8). On a sélectionné des cellules transformées déficientes pour l'HGPRT. Celles-ci sont tout à fait dépendantes, pour la biosynthèse de l'ADN, de la voie 'de novo'.

Le milieu sélectif contient de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine (milieu HAT). L'aminoptérine est un inhibiteur compétitif du dihydrofolate. En effet, ayant une structure analogue mais possédant une affinité supérieure à ce dernier pour la dihydrofolate réductase, l'aminoptérine bloque la voie 'de novo'.



Voici comment se passe la sélection des hybrides. Les lymphocytes ne posent pas de problème de sélection, ils disparaissent spontanément en culture. Le myélome quant à lui, a de grandes difficultés à se multiplier et même renouveler son génome. En effet, chacune des deux voies de synthèse est compromise: la voie de récupération en raison de leur déficience enzymatique en HGPRT et, la voie 'de novo' à cause d'un inhibiteur compétitif. Finalement, seules les cellules hybrides disposant du matériel génétique lymphocytaire, ont un équipement enzymatique complet (HGPRT) et ont, grâce à leur caractère myélomateux, la capacité de se maintenir indéfiniment en culture.

2.2 En pratique.

A. Immunisation

Quand on utilise des antigènes particuliers comme des cellules (dans notre cas, des lymphocytes bovins), la procédure habituelle d'immunisation est de faire deux injections séparées, dans un intervalle de quatre semaines minimum et de fusionner 4 à 5 jours après la seconde injection. Lors de chaque injection, la souris reçoit quelques 20 millions de cellules. (Trucco & coll., 1978)

Dans le but de stimuler la rate, les injections se font par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Par facilité, c'est cette dernière solution qui fut choisie.

Cellules myélomateuses: souche SP2/O Ag 14 HGPRT-, non sécrétrice d'immunoglobuline

Composition du PEG - DMSO

PEG 1500	(Fisher scientific company)	30	g
PBS		42	ml
DMSO	(Carlo Erba)	6,2	ml

autoclaver et mettre en aliquots à 4 °C

Composition du milieu HAT

- Aminoptérine 1000 fois concentrée est obtenue par dissolution de 17,6 mg d'aminoptérine (Fluka) dans 10 ml de NaOH 1 mol. et compléter d'eau jusqu'à 100 ml
- HAT 50 fois concentré:
 - dissoudre 0,1361 g d'hypoxanthine (Sigma) dans 100 ml d'eau
 - ajouter 0,03875 g de Thymidine (Sigma)
 - ajouter 10 ml d'aminoptérine 1000 fois concentrée
 - porter à 200 ml avec de l'eau
- le milieu RPMI HAT est obtenu en ajoutant 2 ml HAT 50 fois concentré à 100 ml RPMI 10 % FCS

Boîtes à micropuits à fond plat (Nunc)

NaN₃ Azide de sodium (Merck)

B. Fusion.

La rate de la souris immunisée est homogénéisée dans un potter (homogénéiseur coaxial de Dounce). Les globules rouges contaminant la préparation sont éliminés durant une centrifugation de 10 minutes à 200 g en chlorure d'ammonium 0,160 M, pH 7,2. On lave ensuite les cellules de la rate plusieurs fois en RPMI min. On dénombre les lymphocytes spléniques, et on leur joint dans un rapport de 7/1 à 8/1 les cellules myélomateuses prélevées en phase exponentielle de croissance toujours en RPMI minimum.

Les cellules, après centrifugation de 10 min. à 200 g, sont soumises, en vue de la fusion, à la solution PEG-DMSO pendant quelques minutes (fig.8).

Elles sont ensuite lavées délicatement en RPMI, et resuspendues en milieu HAT (RPMI 10% FCS) à raison de 10 millions d'équivalents spléniques par ml.

Les cellules sont finalement réparties dans des boîtes à micropuits à fond plat-100 µl/puits- et incubées à 37° C dans une enceinte humide sous 5% de dioxyde de carbone.

Les plaques utilisées sont préalablementensemencées avec 2 à 5 mille cellules péritonéales de rat Wistar comme feeder layer (couche nourricière). Le milieu de culture est renouvelé tous les trois jours et on observe la croissance des hybrides après dix jours.

C. Le clonage.

Pour s'assurer du caractère monoclonal des anticorps obtenus, les hybrides sécréteurs sont clonés par dilution limite. Ceci s'effectue également avec une couche nourricière de cellules péritonéales.

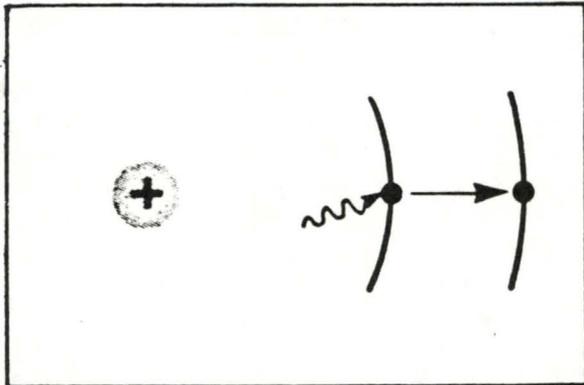
D. Multiplication cellulaire.

On maintient l'hybride en culture soit in vitro, l'anticorps s'accumule dans le surnageant de culture (10 µg/ml); soit in vivo, en le faisant croître comme une tumeur ascitique. On récupère le réactif monoclonal dans les fluides corporels et dans le serum (10 mg/ml). Le surnageant de culture est soit stocké à - 20° C, soit additionné de NaN₃ et stocké à 4° C. Le liquide d'ascite est stocké à - 20° C.

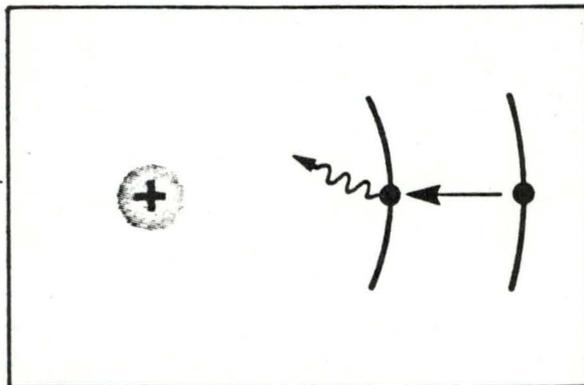
E. Congélation des hybridomes.

Les hybridomes en croissance exponentielle sont centrifugés et resuspendus dans un milieu de congélation (serum de veau foetal + 10% DMSO).

Le refroidissement s'opère comme ceci: on dispose les fioles contenant les hybridomes et destinées au stockage, dans une boîte de frigolite. Cette dernière est déposée pour la nuit à - 70° C. La frigolite permet un refroidissement lent et régulier. Le lendemain, les clones sont stockés dans une cuve à azote à - 180° C.



Électron de l'atome d'hydrogène qui absorbe de l'énergie lumineuse.



Électron qui émet de l'énergie lumineuse

Fig. 9 Principe de la fluorescence.

GAM FITC (Amersham)
 Anti-mousse Ig, fluorescein linked Whole antibody from Goat

GAM TR (Amersham)
 Anti-mousse Ig, Texas Red linked Whole antibody from Goat

3 Techniques immunohistologiques

3.1 Immunofluorescence.

A. Principe de la fluorescence.

Quand une molécule absorbe un quantum d'une radiation d'énergie suffisante, elle atteint un état excité avec une distribution électronique différente. Ce surplus d'énergie est la plupart du temps dissipé auprès des molécules avoisinantes, mais si la molécule excitée est suffisamment stable, elle peut retourner à son état électronique de base en émettant une radiation. Une émission de ce type est appelée fluorescence et elle est presque toujours d'une longueur d'onde supérieure à la radiation d'excitation (fig.9).

Certaines substances, connues sous le nom de fluorochromes, émettent une radiation visible lorsqu'elles sont stimulées par une lumière visible de petite longueur d'onde ou par des ultra-violets.

De nombreux facteurs affectent la fluorescence: la température, le pH, la concentration du colorant (FAURE & coll., 1977), l'oxydation du fluorochrome, les circonstances physico-chimiques de conjugaison, la liaison avec les tissus ... (GILOH & SEDAT, 1982).

Le pH du milieu de montage est d'une importance capitale pour une observation fiable. Ceci en raison d'un changement dans l'équilibre d'ionisation de la molécule avec le solvant. Le pH optimum se situe entre 8 et 9.

Pour lutter contre le "fading" de la fluorescence, limitant l'observation à parfois moins d'une minute, nous avons utilisé la p.phénylènediamine qui non seulement augmente la fluorescence de départ, mais aussi la maintient pendant vingt minutes au moins (Johnson & coll., 1981).

Les deux fluorochromes utilisés lors de ce travail sont l'isothiocyanate de fluoroscéine (FITC) et le Texas Red (TR). L'excitation et l'émission maximales de l'isothiocyanate de fluoroscéine se situent respectivement à 492 et 517 nm. Pour le Texas Red, cela se situe à 596 nm pour l'excitation et 615 nm pour l'émission (Amersham, formulaire d'accompagnement). De plus le système de filtres pour l'usage de la rhodamine convient avec le TR.

Nous avons utilisé le TR plutôt que la rhodamine car il présente les avantages suivants:

- pas de superposition dans l'émission avec FITC, idéal pour les double marquages,
- relativement résistant au "fading",
- couplé à un anticorps, il cause un minimum de perte d'activité biologique,
- le marquage est lumineux.

Boîte à multipuits à fond conique (Flow laboratories)

p. Formaldehyde

Microscope à fluorescence (Zeiss)

p. Phénylènediamine (Sigma)

glycérine

B. Marquage.

On met en présence deux à trois millions de cellules fraîches et 100 μ l de surnageant à tester pendant 45 min. à 4 °C. dans des puits à fond conique d'une boîte de PVC rigide.

Après un lavage en PBS, on centrifuge la boîte à 200 g pendant 10 min. On ajoute ensuite dans chaque puits 50 μ l de GAM-FITC (Gaot anti-mouse, anticorps de chèvre couplé au FITC anti-immunoglobuline de souris) 1/50 en PBS 10% de sérum bovin normal 45 min. à 4 °C.

On lave à nouveau et on resuspend en PBS 1% de p. formaldéhyde (PFD) à 4 °C. Cette fixation permet de conserver le marquage plusieurs jours et empêche l'internalisation des récepteurs marqués. On utilise le PFD, plutôt que la glutaraldéhyde, car celui-ci fixe les cellules sans altérer la fluorescence.

Pour l'observation au microscope, on centrifuge la boîte à 200 g pendant 10 min. et on resuspend les cellules dans une solution préparée comme suit: 100 mg de p. phénylènediamine dans 10 ml de PBS (pH 7,4), additionnés de 90 ml de glycérine, porter à pH 9 (JOHNSON & NOGUEIRA, 1981).

C. Contrôles.

Nous avons utilisé comme contrôles un témoin négatif (l'anticorps monoclonal est remplacé par du PBS) et divers témoins positifs, anticorps monoclonaux dont nous connaissons la spécificité:

- 11B2, il reconnaît un déterminant monomorphe des antigènes de classe 1 du CMH chez le bovin (LETESSON & coll., 1986),
- 1H4, il spécifie les IgM chez le bovin, déterminant dès lors la majorité des lymphocytes B circulant (LETESSON & coll., 1985),
- 3B8, est anti-chaîne légère d'immunoglobuline et a donc plus ou moins la même spécificité que le précédent,
- 2G1, quant à lui reconnaît un antigène membranaire se trouvant sur les cellules adhérentes (PMN, monocytes et macrophages) (LETESSON, comm. pers.).

3.2 Double marquage.

L'existence de molécules fluorescentes de longueur d'onde d'excitation et/ou d'émission différentes, permet leur utilisation dans un double marquage.

Pour cette technique nous disposons d'un monoclonal caractérisant les lymphocytes B, 1H4 (cfr. 2.3.1.C). Celui-ci est couplé directement à la fluoréscéine.

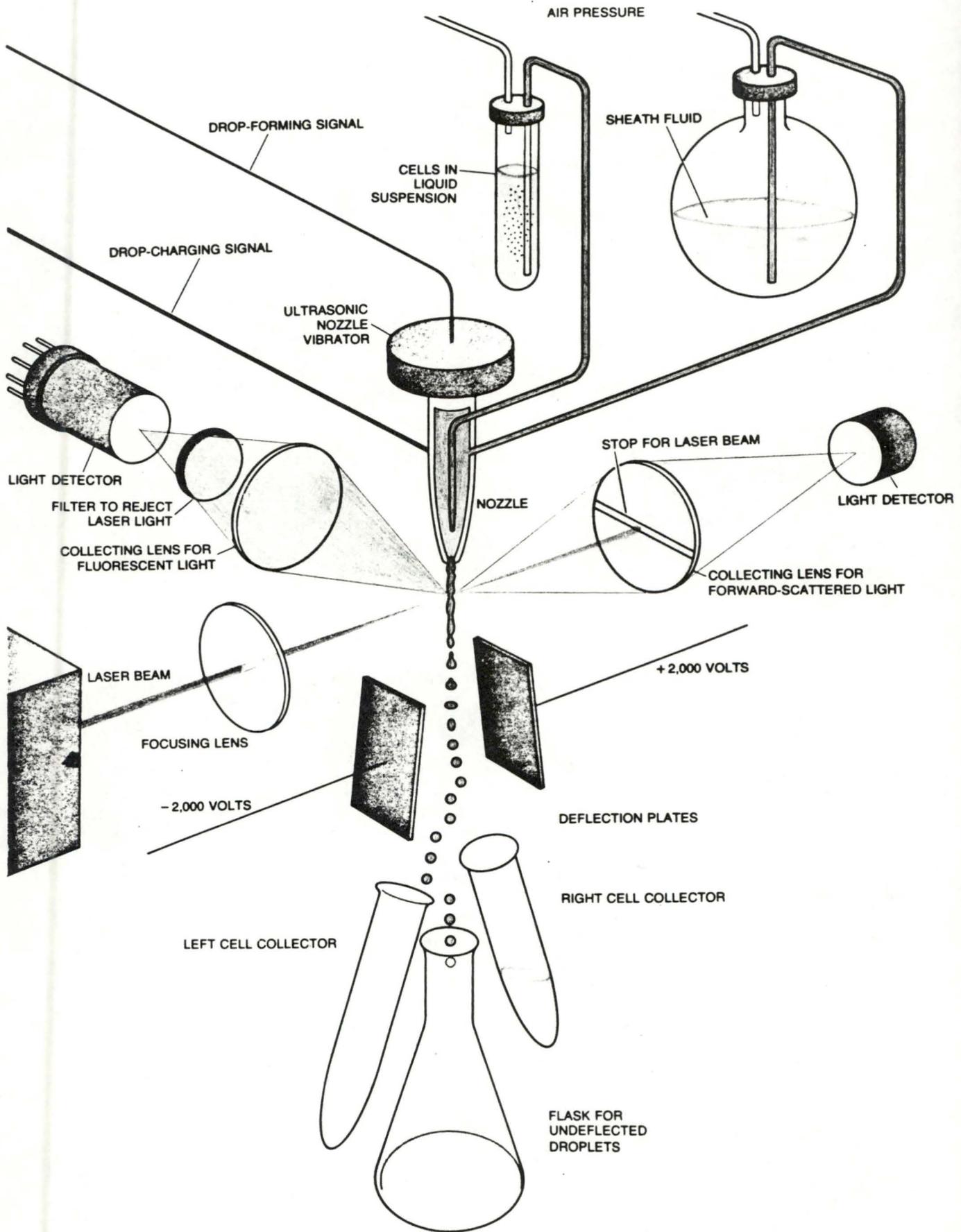


Fig. 10 Représentation schématique d'un cytofluorimètre de flux muni d'un trieur de cellules (Herzenberg et al., 1976).

A. Le couplage.

Ce couplage est réalisé au laboratoire, comme suit: on sépare les immunoglobulines (Ig) du sérum de souris puis, après les avoir dosées, on les combine avec 1/50 de leur poids en isothiocyanate de fluoréscéine de façon à obtenir un conjugué renfermant environ cinq molécules de FITC par molécule d'Ig. On isole les molécules marquées du mélange réactionnel par filtration à travers un tamis moléculaire puis on les fractionne, en fonction de leur degré de marquage, par chromatographie d'échange anionique sur une colonne de diéthylaminoéthyl-cellulose. On détermine le rapport moléculaire FITC/Ig égale à cinq et l'activité immunologique de cette fraction. On concentre par dialyse et on additionne de glycérine pour assurer la conservation.

B. Le double marquage.

L'opération s'effectue en deux étapes majeures.

Dans un premier temps, on met en présence des cellules fraîches et l'anticorps monoclonal test pendant 45 min. à 4 °C. On lave, puis on resuspend les cellules dans 50 µl de GAM-TR 1/50 en PBS 10% de sérum bovin normal pour 15 min. à 4 °C. On met ensuite les cellules à 37 °C pendant 15 min., à ce moment l'antigène reconnu se dispose en "patches" rouges sur la membrane. On lave alors en PBS à 4 °C et resuspend en PBS 1% p.formaldéhyde pendant 30 min. à température ambiante.

Dans un second temps, après un lavage, on sature les valences du GAM-TR restées libres par une incubation de 30 min. avec un monoclonal murin neutre (P3). Enfin, après lavage, on resuspend le culot dans 50 µl de 1H4-FITC pour 15 min. à 37 °C.

On observe, après avoir lavé une dernière fois, les cellules au microscope à fluorescence (ZEISS).

3.3 Cytofluorimétrie.

La Cytofluorimétrie de flux permet une analyse rapide d'un très grand nombre de cellules. Cette technique nous donne le pourcentage de cellules marquées et nous renseigne sur la taille relative de celles-ci.

Principe de fonctionnement du FACS.

Nous avons utilisé un analyseur trieur de cellules: le FACS IV (Fluorescence Activated Cell Sorter, de Becton-Dickinson) qui fonctionne comme suit (FULWYLER, 1980), (HERZENBERG & HERZENBERG, 1978)(fig.10):

un système hydropneumatique injecte sous pression la suspension cellulaire au centre d'une veine de liquide isotonique. Ce liquide d'entraînement confine les cellules au sein d'un flux laminaire caractérisé par une vitesse constante de 12 m par sec.; il entraîne ainsi les cellules une par une, avec un débit de mille cellules à la seconde à travers un gicleur dont l'orifice est calibré à 70 µm de diamètre. Le jet formé à la sortie du gicleur croise le point focal d'une source de lumière monochromatique émise par un laser à l'argon. La longueur d'onde est choisie en fonction du fluorochrome étudié.

Cryostat
Colle

(Analis)

L'interaction de chaque cellule avec le faisceau lumineux présente deux conséquences importantes. D'une part, la cellule diffuse la lumière incidente dans toutes les directions de l'espace (l'intensité de cette diffusion, appelée "scatter" est proportionnelle à la taille cellulaire); cette lumière diffusée possède la même longueur d'onde que la lumière incidente.

D'autre part, lorsque la cellule est associée à des molécules de fluorochrome, celles-ci vont absorber la lumière du laser. Ces molécules excitées vont ensuite réémettre, également dans toutes les directions, une lumière de fluorescence caractérisée par une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière incidente. Cette caractéristique permet de distinguer aisément les cellules fluorescentes de celles ne présentant pas ou peu d'auto-fluorescence.

Les deux signaux de diffusion et de fluorescence sont captés par des photomultiplicateurs qui convertissent l'énergie photonique en énergie électrique; celle-ci après amplification est transmise à un dispositif d'analyse informatisée.

La spécificité des signaux transmis est assurée grâce à l'utilisation de filtres optiques.

Les données traitées sont alors représentées par un cytogramme. Les deux paramètres recueillis (scatter et fluorescence) pour chaque cellule constituent les coordonnées x,y d'un point qui est reporté sur l'écran cathodique; l'intensité du scatter est reportée sur l'axe horizontal, tandis que l'axe vertical représente l'intensité de fluorescence.

Simultanément, des histogrammes à 256 canaux sont construits; ils représentent soit la distribution relative de la taille, soit la distribution de l'intensité de la fluorescence; l'ordonnée de ces deux histogrammes caractérise le nombre relatif de cellules.

3.4 Marquage sur coupe à congélation.

Comme nous l'avons vu lors de l'introduction, il existe dans les organes lymphoïdes des zones où se répartissent les lymphocytes T (aires thymo-dépendantes) et les espaces occupés préférentiellement par les lymphocytes B (aires thymo-indépendantes). Les coupes à congélation permettent de localiser in situ les cellules réagissant à l'anticorps monoclonal.

A. Préparation de l'échantillon.

Un organe frais (rate ou ganglion) est découpé en fragments carrés de 1 cm³. Ceux-ci sont plongés dans l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Les fragments sont ensuite transférés dans l'enceinte du cryostat où on les laisse se stabiliser à la température y régnant (- 20 °C). On dépose alors les morceaux de tissu sur les porte-objets où ils sont scellés grâce à de la colle spéciale.

On fixe alors le porte-objet sur la tête du cryotome. D'abord, nous réalisons des coupes grossières pour éliminer les cellules endommagées de la périphérie et pour égaliser la surface de coupe.

GAM couplé à la peroxydase (Amersham)

Anti-mousse Ig, peroxydase linked Whole antibody from Goat

Composition de la solution de DAB

Diaminobenzi-dine (Sigma) 1 - 3 mg par ml, de
PBS 0,01 % H_2O_2

milieu de montage: glycérine 10 % PBS

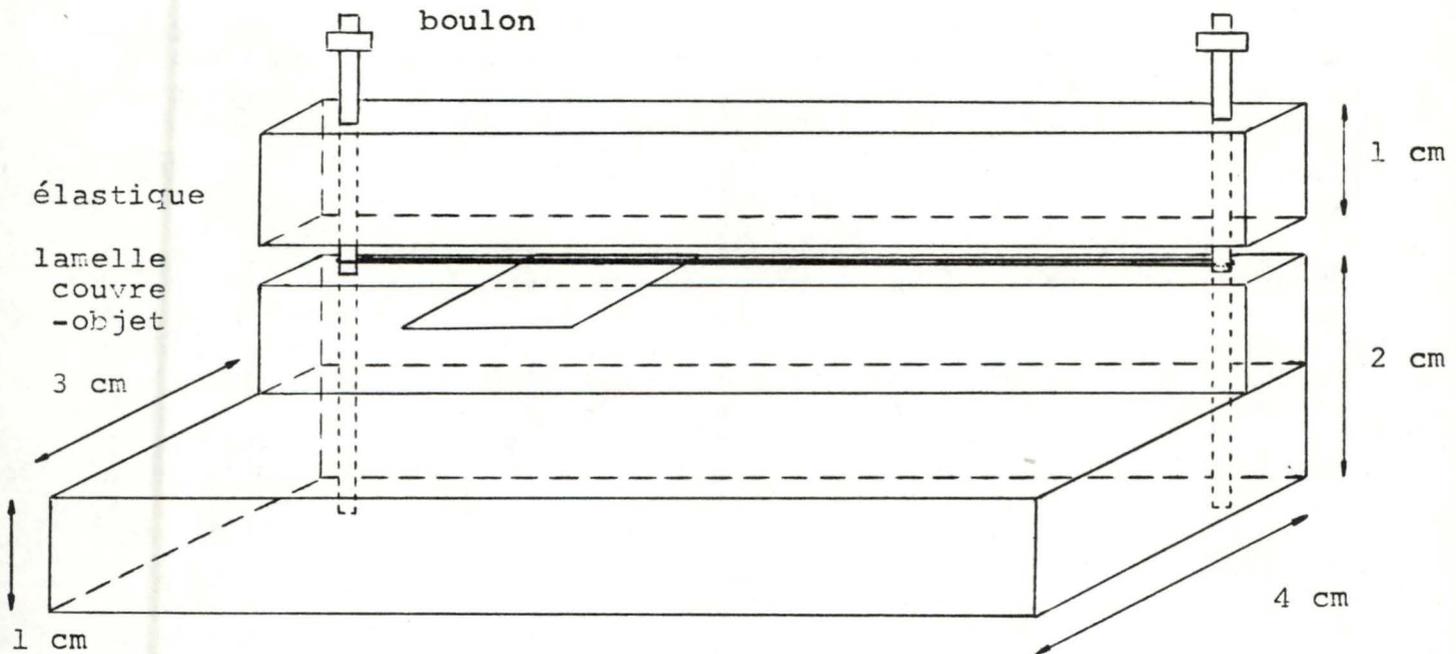


Fig. 11 Montage permettant la manipulation aisée
des lamelles couvre-objets.

Boîte multipuits à fond plat en PVC flexible (Nunc)

Anticorps purifié de chèvre anti-Ig de souris, GAM Anti-Ig

GAM Anti-IgG1

Anti-IgG2a

Anti-IgG2b

Anti-IgM

biotinylé (Amersham)

Streptovidine peroxydase

(Amersham)

On peut enfin effectuer des coupes fines (4 à 6 μm) que l'on récolte à l'aide d'une lamelle couvre-objet. Les coupes sèchent à l'air 5 min. puis sont fixées 10 min. dans l'acétone à 4 °C. On peut conserver ces coupes à - 20° C.

B. Marquage.

On sature la lame par un bain de PBS-gélatine (200 $\mu\text{g/ml}$) pendant 15 min. à température du laboratoire (fig.11). On rince au PBS puis les lamelles sont incubées avec l'anticorps monoclonal pendant 45 min. à 37 °C en chambre humide. Les coupes sont lavées 15 min. en PBS sous une légère agitation.

La fixation de l'anticorps monoclonal sur le tissu est détectée grâce au GAM-peroxydase (anticorps de chèvre couplée à la peroxydase anti-Ig de souris) 1/200 en PBS pendant 15 min.. Après ceci on lave les coupes pendant 15 min. sous légère agitation.

La préparation est ensuite recouverte d'une solution de chromogène (DAB/H₂O₂) pendant 10 min..

On rince au PBS plusieurs fois et on contrecolore au bleu de méthylène (2%) pendant 5 min. puis on décolore dans l'éthanol 10% et l'on peut monter la lame pour l'observation en microscopie optique.

4 Techniques immunologiques.

4.1 Détermination de l'isotypie par ELISA en sandwich.

Cette méthode offre, par rapport à la méthode classique à savoir la technique d'immunodiffusion double selon Ouchterlony, une sensibilité bien supérieure. Ceci permet une économie du matériel qu'il faut un certain temps à produire en quantité appréciable.

On dépose par puits d'une boîte en PVC à fond plat, 50 μl d'une solution purifiée de GAM anti-Ig de souris à 10 $\mu\text{g/ml}$ (fig.12). On incube la boîte une nuit à 4 °C. On sature les sites de fixation restés libres par une solution de PBS 2% d'ovalbumine pendant 2 h à 37 °C.

On rince la boîte en PBS, puis on y dépose 50 μl du monoclonal à tester 45 min. à 37 °C.

Après un lavage, on ajoute 50 μl /puits d'une solution contenant un des GAM anti-Ig (anti IgG1, IgG2A, IgG2B, IgM) biotinylé 1/1000 en PBS 10% FCS pendant une heure à 37 °C.

Après plusieurs lavages, on dépose 50 μl de streptavidine peroxydase 1/1500 en PBS 15 min. à 37 °C. On ajoute la solution substrat à raison de 100 μl /puits et on lit 15 min. après le début de la réaction sur un compteur ELISA à 405 nm.

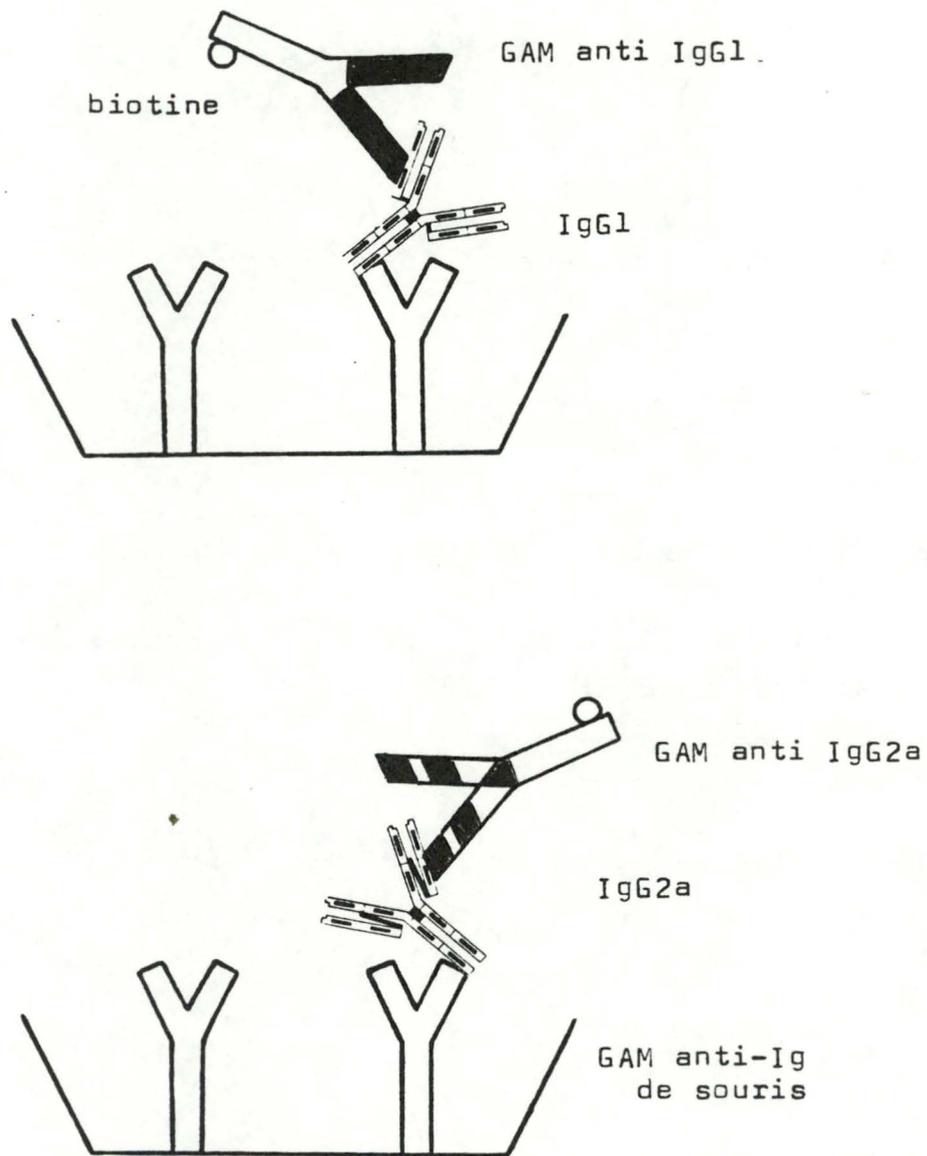


Fig. 12 Détermination de l'isotypie par ELISA en sandwich.

Composition solution substrat

Tampon Citrique	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20,5 g	
	Acide citrique	8,9 g	pH 5,6
	H_2O dist.	1000 ml	
ABTS		4,2 g	
H_2O_2 30 %	(UCB)	5 ml	

Compteur ELISA Dynatech longueur d'onde 405 nm

Composition du rosetting medium (RM)

- Absorber 1 vol. de FCS avec 0,2 vol. GRM 2 heures à 37 °C
- 10 % FCS absorbé dans RPMI HEPES

Solution AET

0,143 M en H_2O dist. mettre à pH 9 avec NaOH 5 N

Méthionine S^{35} (Amersham)

Glutamine

Méthionine froide (Merck)

4.2 Inhibition de formation de rosettes AET.

Nous avons vu - cfr. 1.6 - que les lymphocytes T humains ont un récepteur pour les globules rouges de mouton (GRM) et que la méthode des rosettes fut longtemps employée pour séparer les lymphocytes T humains d'une suspension de leucocytes (fig.13).

Mais, dans le cas du bovins, les GRM exigent un pré-traitement à l'AET (bromure d'amino-2 éthyliothiouronium) pour former des rosettes autour des lymphocytes T.

A. Traitement des GRM.

On met en incubation un volume de GRM en culot pour quatre volumes de la solution d'AET sous agitation pendant 20 min. à 37° C. Après 4 lavages en solution froide de 0,9% NaCl, on rince une dernière fois en rosetting medium (RM). On resuspend les GRM à 2% en RM.

B. Formation des rosettes.

Les lymphocytes à 10 millions/ml en RM sont additionnées de la solution d'érythrocytes, v/v. On ajoute en même temps l'anticorps monoclonal ou du PBS pour le témoin négatif. Après une incubation de 10 min. à 37 °C, la suspension est centrifugée 5 min. à 100 g et le culot résultant est maintenu 18 h à 4 °C.

C. Comptage.

Après une remise en suspension très délicate du culot et dépôt sur lame, on relève les lymphocytes fixant plus de 4 globules rouges sur leur membrane.

4.3 Test de compétition pour un épitope.

Cette expérience permet de constater si oui ou non deux anticorps monoclonaux reconnaissent le même épitope.

A. Marquage de l'anticorps monoclonal.

Le marquage isotopique de l'anticorps se fait, en cultivant le clone dans un milieu sans méthionine additionné de méthionine S35: 2 millions de cellules hybrides dans un 1 ml de RPMI sans méthionine plus 100 µCi de méthionine S35.

B. Fixation des cellules.

On dépose 100µl de PBS 5 % poly-l-lysine (Sigma) par puits d'une boîte à fond plat, pour une heure à température ambiante.

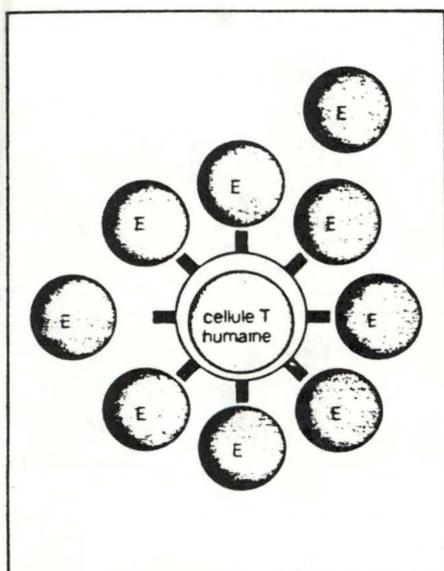


Fig. 13 Populations lymphocytaires
Rosettes.

d'après Roitt (1985)

Tampon de lyse

Tris HCl	(Janssen chemica)	80	mM
NaCl		150	mM
EDTA	(UCB)	5	mM
NaN ₃	(Merck)	0,02	%
NP 40	(LKB)	0,5	%
PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride)		0,2	mM

Ultracentrifugeuse Beckman Spinco L8-70, rotor SW 40

Après lavage en PBS, on additionne 100 μ l d'une suspension leucocytaire à 5 millions par ml. On centrifuge 10 min. à 250 g; on fixe les cellules à la glutéraldéhyde 0,5 % en PBS, 30 min. à 4 °C. On rince et lave trois fois en PBS, pH 7,4. On peut conserver la boîte en PBS 1% BSA et 0,1 % NaN₃ à 4 °C.

C. Compétition.

On dépose des dilutions sériées à raison de 50 μ l/puits du premier anticorps monoclonal froid pour une heure à 37 °C. On lave vigoureusement en PBS, puis on incube à nouveau pour une heure à 37 °C, avec 50 μ l du monoclonal chaud à une dilution préalablement établie.

On lave énergiquement, puis on découpe les puits que l'on immerge dans 3 ml d'une liquide scintillant, Insta-Fluor II (Packard).

Un compteur beta (Beckman) relève le nombre de cpm (ou de dpm - désintégration par minute-) dans chaque puits, indicatif de la quantité d'anticorps monoclonal chaud fixé.

5 Techniques biochimiques et immunologiques.

5.1 Généralités.

La caractérisation des anticorps implique l'étude de l'antigène reconnu. Nous avons utilisé les techniques d'immunoprécipitation et de Western blotting. Ces deux techniques pouvant aboutir à la détermination du poids moléculaire de l'antigène.

Le Western blot est plus précis mais plus restrictif. En effet, la reconnaissance antigène - anticorps se fait après des étapes de dénaturation. Aussi seuls les déterminants séquentiels seront reconnus, les épitopes conformationnels étant détruits.

5.2 Electrophorèse et transfert sur nitrocellulose: Western-blot.

Lors de cette technique, un lysat cellulaire est électrophorétisé en SDS-PAGE et transféré sur nitrocellulose; l'identification de la protéine spécifique de l'anticorps se fait par une méthode immunoenzymatique (TOWBIN & coll., 1979).

A. Extraction des protéines membranaires.

Les cellules sont mises en suspension à 20 millions/ml de tampon de lyse pendant 30 min. à 4 °C. Ensuite, le lysat est centrifugé à 100 000 g pendant 60 min. (SILVER & HOOD, 1974). On peut stocker le lysat à - 20 °C, après avoir précipité les protéines à l'acétone.

Composition du mélange " 5 fois concentré "

SDS	10 %	1	g
Tris HCl	250 mM	0,3028	g
Mercapto ethanol	10 %	1	ml
Glycerol	50 %	5	ml
BBP (Bleu de Bromophénol)	0,25 %	0,025	g
H ₂ O dist.		2,6722	ml/10 ml

Gel plat minislabs gel (8 x 6 x 0,75 cm)

Cuve à électrophorèse (Pharmacia fine Chemicals)

Composition running gel

Tris HCl	(Janssen chemica)	375	mM	pH 8,8
Acrylamide	(LKB)	12	%	
Bisacrylamide	(LKB)	0,27	%	
SDS		0,1	%	
TGMD	(Merck)	0,05	%	
Persulfate	(Merck)	0,05	%	

Composition stacking gel

Tris HCl		125	mM	pH 6,3
Acrylamide		3	%	
Bisacrylamide		0,08	%	
SDS		0,1	%	
TGMD		0,05	%	
Persulfate		0,05	%	

Cuve pour blotting Trans blotting Cells (Bio Products)

Nitrocellulose

Composition du tampon blotting

Tris	(Calbiochem Berking Corp.)	3,085	g
Glycérine	(Merck)	14,41	g
Méthanol	(Merck)	200	ml
H ₂ O dist.		800	ml

Composition du GAM

GAM anti-Ig de souris couplé à la peroxydase (Amersham), dilué 200 fois dans du PBS 10 % serum de bovin normal

B. Electrophorèse.

Le lysat en tampon échantillon, auquel on ajoute le mélange "concentré 5 fois", avec ou sans beta mercaptanméthanol suivant que l'électrophorèse se fait en condition réductrice ou non. En milieu réducteur, le lysat subit une ébullition de 5 min.

On dépose alors 15 μ l de lysat par piste, sur un gel plat sous 200 V pour 3/4 h.

Une piste est réservée à l'usage des protéines étalons qui migrent suivant leur poids moléculaire (p.m.).

C. Le Western blot.

Le gel démoulé est équilibré 15 min. en tampon blotting et recouvert d'une feuille de nitrocellulose. Deux feuilles de papier Wathman sont déposées de part et d'autre.

Ce dispositif est immergé dans le tampon blotting contenu par le Trans-blot Cell (Bio Rad) et soumis à un champ électrique de 60 V durant 3 h afin de transférer les protéines du gel sur la feuille de nitrocellulose.

Celle-ci, après transfert, est incubée pour la nuit en PBS 3% NP40 à 4 °C.

D. Détection immunoenzymatique.

La feuille de nitrocellulose est découpée suivant les pistes d'électrophorèse. Les pistes étalons sont fixées et colorées.

Les pistes échantillons sont incubées 1h en PBS 1% BSA (bovin serum albumin) (sature les sites restés libres sur la nitrocellulose) et sont lavées en PBS 1% Tween 20.

On plonge alors les bandes de nitrocellulose dans le surnageant de culture pendant 45 min. à température ambiante. Puis, elles sont lavées 3 fois 5 min. en PBS 1% Tween 20 sous agitation.

Le monoclonal (fixé sur l'antigène absorbé sur la nitrocellulose) est détecté par l'entremise de GAM couplé à la peroxydase 1/200 en PBS 10% sérum bovin normal. Ceci, pendant 45 min. à température ambiante.

On lave les bandes 3 fois en PBS 0,1% Tween 20. La peroxydase, relevant l'antigène cible, est localisée par une incubation dans du tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 7,6 contenant 0,05% de DAB (diaminobenzidine) et 0,03% H₂O₂. La peroxydase favorise la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, le DAB par un mécanisme de polymérisation et de cyclisation oxydative, se transforme en un vaste polymère insoluble de coloration brune.

On arrête la réaction en immergeant les bandes dans du HCl 0,1 N. On visualise l'antigène grâce à une marque brune. Dès lors, en comparant le pourcentage de migration de protéines étalons et la position relevée, on connaît le poids moléculaire de la protéine ou des sous-unités protéiques portant un épitope reconnu par l'anticorps monoclonal.

Méthionine S³⁵ (Amersham)

Glutamine

Méthionine froide (Merck)

I¹³⁵ sous forme iodide de sodium

H₂O₂ solution à 30 ‰

Tampon phosphate 0,5 M pH 7,0

NaH₂PO₄·H₂O 6,9 g

H₂O 100 ml

Solution de lactoperoxydase

lactoperoxydase 2 mg/ml de PBS

Tampon de lavage

PBS contenant 0,02 ‰ NaN₃

2 mM d'iodure de potassium

Staphylocoques Cowan Strain 1 (Sigma)

Tampon SAC

PBS contenant 0,5 ‰ NP 40

0,02 ‰ NaN₃

2 mM méthionine (dans le marquage de S³⁵)

2 mM potassium iodide (si marquage I¹³⁵)

Tampon SAC + Ovalbumine

Tampon SAC

Ovalbumine 1 mg/ml

5.3 Immunoprécipitation.

A. Marquage isotopique: méthionine S35.

Le marquage se fait en cultivant les cellules dans un milieu contenant un acide aminé marqué. Notre choix s'est porté sur la méthionine S35. Le Soufre 35 permet de révéler le gel sur plaque photo.

50 millions de lymphocytes sont resuspendus dans 2 ml de RPMI (sans méthionine) 10 % FCS + 20 µl de glutamine et 500 µCi de méthionine S35 pour une incubation de 12 h à 37 °C sous 5 % de CO₂. En fin d'incorporation, on lave 3 fois au moyen de PBS (+ méthionine) pour éliminer les acides aminés radioactifs libres.

iode 125

Ce marquage fut choisi en alternative au précédent, au cas où l'antigène est dépourvu de méthionine ou a un turn over lent. En effet, l'I125 est couplé chimiquement aux glycoprotéines de membrane.

50 millions de cellules mononucléées dans 150 µl de PBS sont mises à 30 °C, on y ajoute 50 µl de la solution de lactoperoxydase et 10 µl de tampon phosphate 0,5 M, pH 7. On transfère alors 1 mCi d'I125 à la suspension cellulaire (dans une hotte aspirante), à laquelle on additionne 20 µl de PBS 0,03 % H₂O₂. On mélange vigoureusement et met en incubation 4 min. à 30 °C. Ensuite, on répète l'opération cette fois à température ambiante. On dilue alors la suspension avec 5 ml de tampon de lavage froid, et on centrifuge à 200 g pendant 10 min. On lave à nouveau, puis on resuspend dans 1 ml de tampon de lavage (4 °C), surmonté par 2 ml de FCS, que l'on centrifuge. On lave encore 2 fois, et récupère les cellules marquées (JONES P., 1977).

B. Extraction des protéines membranaires.

Cette opération s'effectue de la même manière que précédemment (cfr. 2.5.2 A).

C. Immunoprécipitation.

Grâce à la spécificité des réactions antigène-anticorps, on va chercher parmi les protéines celle qui est reconnue par l'anticorps monoclonal.

Les quantités requises d'extrait, d'anticorps et de SAC (staphylocoques Cowan) pour isoler une protéine sont fort variables. Ces paramètres dépendent du niveau de radioactivité de la protéine intéressante et de l'activité du monoclonal.

Théoriquement, chaque anticorps doit être titré pour déterminer la quantité nécessaire à une précipitation optimale, la concentration en SAC, elle aussi varie. Cela est difficile et dépensier à faire. Heureusement pour beaucoup d'expériences, il n'est pas essentiel que 100 % des antigènes soient précipités, ainsi en suivant dans les grandes lignes les expériences faites précédemment, on peut économiser du temps et des réactifs précieux.

D'une manière générale, un lysat de 50 μ l issu de 20 millions de cellules est mis, 30 min. à 4 °C, en présence de 100 μ l de SAC, préalablement lavé 2 fois en tampon SAC et resuspendu à 10 % pds/vol en tampon SAC + ovalbumine. Ceci permet d'éliminer du lysat tout ce qui pourrait se lier au SAC de manière non spécifique. On centrifuge pendant 10 min. à 2500 g. On récupère le surnageant auquel on additionne 400 μ l d'anticorps monoclonal pour une incubation de 30 min. à 4 °C. On ajoute ensuite 100 μ l de SAC (préparé comme précédemment) pendant 15 min. à température ambiante. On centrifuge à 2500 g durant 10 min. et on resuspend le culot dans du tampon SAC + ovalbumine, ceci est répété 3 fois.

On resuspend enfin dans 20 μ l de tampon échantillon auquel on ajoute 5 μ l du mélange "concentré 5 fois".

Une ébullition de 5 min. (bain-marie) déroule les protéines, dissocie les complexes et décompose les protéines en leurs sous-unités éventuelles.

Une dernière centrifugation (2500 g) permet d'éliminer les corps bactériens, le surnageant étant destiné à l'analyse électrophorétique.

D. Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

- Principe.

L'électrophorèse permet la séparation complète des divers constituants déposés au sommet du gel, avec un haut pouvoir de résolution et une bonne reproductibilité.

Le gel est préparé par la polymérisation d'acrylamide et N N' méthylène bisacrylamide. Cette polymérisation est initiée par des catalyseurs: le persulfate d'ammonium et N N N'N' tétraméthylène diamine (TEMED). La réticulation du gel, fonction du pourcentage de bisacrylamide et d'acrylamide, détermine la mobilité électrophorétique des protéines déposées sur le gel. L'utilisation de SDS, détergent anionique, permet une séparation en SDS-PAGE basée uniquement sur le poids moléculaire. En effet, le SDS détruit la structure tridimensionnelle des protéines et les charge négativement. Ainsi plus la protéine est lourde plus elle est longue et fixe du SDS.

- Réalisation de gel.

L'électrophorèse se fait sur un gel plat (8x6x0,75 cm) à 200 mA pendant 3/4 h. Le gel de séparation (running gel) à 12 % d'acrylamide est coulé entre deux plaques, il est surmonté par le gel d'empilement (stacking gel) à 3 % d'acrylamide, dans lequel on imprime au moyen d'un peigne en plastique 10 puits (0,5x1,4x0,75 cm).

- Electrophorèse.

Le gel est disposé dans la cuve (Bio Rad) contenant le tampon d'électrophorèse. On dépose dans chaque puits 15 μ l d'échantillon préparé, on emploie une piste à l'usage de protéines étalons de poids moléculaire connu.

On soumet alors le gel à un courant de 200 mA pendant 3/4 h.

Composition de la solution de PPO

PPO (diphényl-2,5 oxazole) molécule aromatique	60 g
DMSO(diméthylsulfoxyde) (Carlo Erba)	200 ml

Plaques photographiques (Amersham)

Révélateur radiographique manuel à contraste variable (May & Baker)

Révélateur radiographique manuel ultra-rapide (May & Baker)

E. Révélation du gel.

Le gel démoulé, est plongé par 3 fois dans une solution de DMSO pendant 15 min.. Il est alors placé pour la nuit dans une préparation de PPO. Mis entre cellophane, il est séché par pompe à vide pendant 2 h. Le gel est ensuite placé entre 2 plaques photographiques (hyperfilm-MP) sensibles en chambre noire, pour une durée de 1 à 10 jours suivant la radioactivité sur le gel.

On révèle les plaques par un bain de révélateur de 4 min., suivi après lavage à l'eau, d'un trempage dans le fixateur.

RESULTATS ET

DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1	Caractéristiques des fusions.	25
2	Screening primaire.	25
	2.1 Immunofluorescence.	25
	2.2 Caractéristiques des hybrides retenus.	26
3	Screening secondaire.	26
	3.1 Répartition cellulaire.	26
	3.2 Répartition tissulaire.	32
	3.3 Caractérisation des anticorps monoclonaux.	33
	3.4 Caractérisation immunobiochimique des antigènes.	34

Tableau 3 Caractéristiques des fusions étudiées

FUSION	Matériel immunisant
JK	Rosettes AET
JN	Thymocytes
JO	Fraction T1
JP	Fraction T1

Fusions JO - JP
puits avec croissance cellulaire

Screening primaire

hybridomes
produisant
un anticorps
reconnaissant
moins de 5 %
des leucocytes
bovins

Elimination

hybridomes
produisant
un anticorps
reconnaissant
entre 5-80 %
des leucocytes
bovins

Screening secondaire

hybridomes
produisant
un anticorps
reconnaissant
plus de 80 %
des leucocytes
bovins

Surgélation

Fig. 14 Démarche expérimentale.

1 Caractéristiques des fusions.

Nous avons, au cours de ce travail, exécuté deux fusions (JO - JP); mais de peur qu'aucune de ces deux fusions ne donne de résultats et vu qu'une telle entreprise demande un temps précieux, nous avons, simultanément, dégelé quelques clones définis comme positifs provenant de fusions précédentes (JK - JN) afin de les caractériser.

Les caractéristiques de ces quatre fusions sont reprises dans le tableau 3.

JO nous a fourni des hybridomes dont les surnageants ne reconnaissent aucun antigène de la membrane des lymphocytes bovins pour une raison indéterminée.

Parmi les quelques mille puits issus de la fusion JP, le screening primaire releva 37 hybridomes produisant un anticorps qui réagissait avec les leucocytes bovins. Mais un certain nombre de ces hybridomes se sont montrés instables et ont perdu la capacité de synthèse lors du sub-clonage.

2 Screening primaire.

2.1 Immunofluorescence.

Le screening primaire exigeant de tester près de mille surnageants de culture pour chaque fusion, nécessite une technique rapide, et qui nous renseigne immédiatement si le réactif reconnaît tout, une partie ou aucun des lymphocytes du sang circulant chez le bovin.

L'immunofluorescence fut la technique adoptée. Elle permet, au premier coup d'oeil, de classer les anticorps produits en trois groupes.

- ceux qui ne marquent aucune cellule mononucléée du sang,
- ceux qui les marquent toutes, et
- ceux qui en marquent un certain pourcentage.

C'est cette dernière catégorie qui nous intéresse (fig.14).

D'autres techniques (SPRIA, ELISA) bien que plus rapides lors de la lecture ne permettent pas une telle discrimination. En effet, un anticorps spécifique d'une glycoprotéine en petite densité sur la membrane de tous les lymphocytes, ne pourra jamais être différencié d'un réactif reconnaissant un antigène réparti de manière dense sur la membrane d'une population particulière des cellules mononucléées. Nous avons pu comparer les deux techniques et cela s'est, en effet, avéré exact (résultats non montrés).

Mais l'immunofluorescence présente pourtant un problème. Après exposition de moins de deux minutes aux rayons U.V., la fluorescence disparaît complètement. De plus, il est des cas où la fluorescence est tellement faible que l'anticorps est classé comme négatif si on n'y prend garde. Pour surmonter ces difficultés, nous avons utilisé le p. phénylènediamine (PD) qui non seulement renforce la fluorescence mais maintient aussi cette luminescence à un niveau élevé pendant vingt minutes au moins.

Anticorps monoclonaux	L.To %	F.T1 %	L _B %	PMN %	C.adh. %	Thy %
contrôle						
1H4	19	1	77	- de 3	- de 3	nd
2G1	15	7	13	+ de 95	+ de 95	nd
test						
3A8	47	53	10	- de 3	- de 3	75
17A3	60	85	23	+ de 95	+ de 95	nd
5B5	40	73	12	- de 3	- de 3	65
7B9	41	90	21	"	"	nd
12B10	57	87	nd	"	"	nd
12B11	49	75	nd	"	"	nd
8C11	50	73	20	"	"	69
1D3	37	57	nd	"	"	73
1D4	32	74	nd	"	"	68
1D5	42	52	nd	"	"	80
7D5	39	91	20	"	"	80
12D8	43	80	nd	"	"	52
5E10	45	79	nd	"	"	80
L.To Lymphocytes totaux				PMN Polymorphonucléaire		
F.T1 Fraction T1				C.adh. Cellules adhérentes		
L _B Lymphocytes B				Thy Thymocytes		
nd non déterminé						

Tableau 4 Pourcentage des cellules marquées, observation en optique

Pour la plupart des tests une observation au grossissement 400 x suffit. Mais pour les cas tangents (peu d'antigènes sur la membrane) où la fluorescence est faible, nous utilisons un agrandissement de 1000 x, qui offre toute garantie quant au diagnostic.

On peut de plus, après marquage, fixer les cellules au formol 1 % en PBS; ce qui permet de différer de 1 ou 2 jours la lecture sans extinction de la fluorescence et sans risque d'apparition d'autofluorescence, comme c'est le cas avec la glutéraldéhyde.

2.2 Caractéristiques des hybrides retenus.

Pour être sélectionnés, les hybrides doivent produire un anticorps reconnaissant un pourcentage de cellules leucocytaires compris entre 5 et 80 %. Nous espérons en effet obtenir un marqueur de lymphocytes T (LT) ne reconnaissant pas les lymphocytes B (LB) qui représentent 15 - 25 % des cellules du sang. Ce marquage doit se situer sur la membrane cellulaire uniquement.

Sur les 37 hybridomes positifs, nous en avons choisi 11 qui se sont révélés stables lors du sub-clonage. On doit y ajouter un clone sélectionné pour chacune des fusions faites antérieurement.

3 Screening secondaire.

3.1 Répartition cellulaire.

Nous avons alors poussé plus avant la caractérisation de ces 13 réactifs monoclonaux dans le but de préciser la répartition cellulaire et tissulaire de leur antigène, et d'en connaître les caractéristiques biochimiques. Pour ce faire nous avons eu recours à différentes techniques.

A. Immunofluorescence indirecte au microscope.

Une immunofluorescence indirecte (IFI) sur leucocytes et sur diverses sous-populations fut réalisée. Ces comptages ont été effectués au microscope à fluorescence sur un échantillon de quelque cent cellules. Les résultats sont repris dans le tableau 4. Les contrôles sont également repris dans celui-ci.

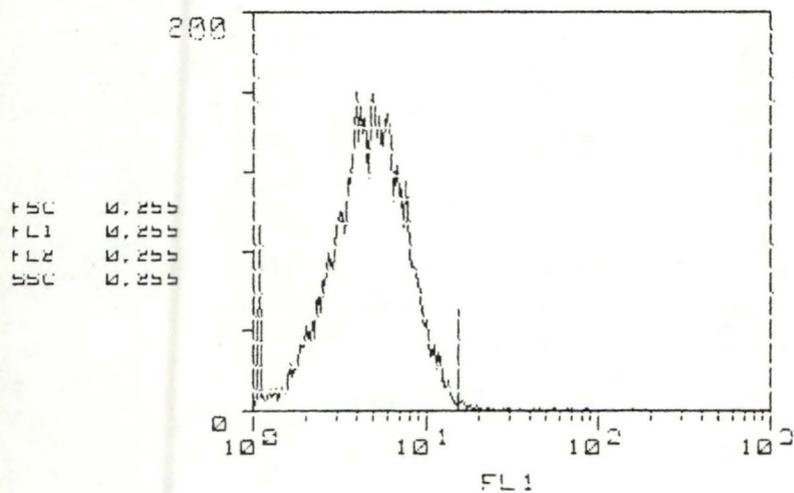
Ces pourcentages sont à considérer avec la plus grande réserve. Ils sont indicatifs mais pas catégoriques. En effet, les tests ont été réalisés sur des cellules provenant d'animaux différents; le comptage s'est fait sur un échantillon assez restreint et enfin, la subjectivité de la lecture intervient également.

Contrôle.

Le 1H4 et le 2G1 (cfr. 2.3.1C) nous permettent d'apprécier la purification des différentes préparations cellulaires. La fraction T1 ne recèle pratiquement pas de LB mais contient quelques macrophages, monocytes ou PMN. La préparation des LB, quant à elle, présente un pourcentage de purification assez faible (77 %); ceci explique peut-être les pourcentages élevés des réactifs sensés ne pas reconnaître les LB.

Sample : SAMPLE 001 PBS
 Cytometer: FACS 440

Date: 04-Mar-87 9:21



Sample : SAMPLE 001
 Cytometer: FACS 440

Date: 04-Mar-87 9:21

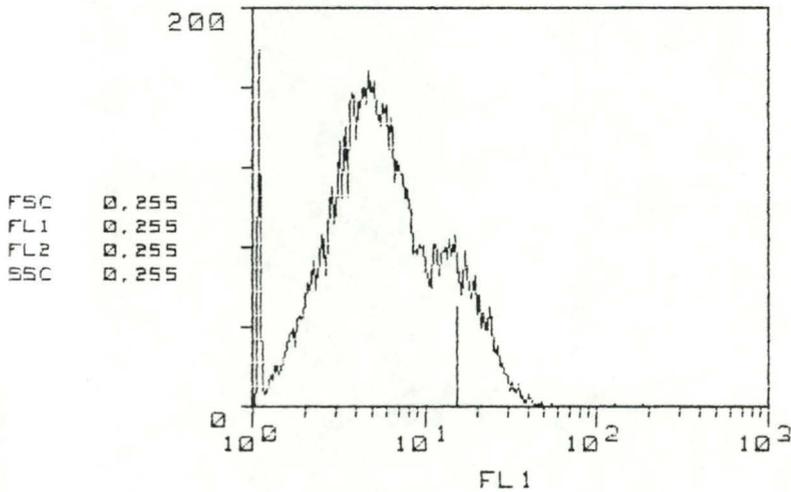
Single histogram statistics								
Parameter : FL1		Gated events : 10000			Total events : 10000			
Left	Right	Events	% Gated	% Tot	Mean	Mode	Peak	CV
15.43	1000.00	63	0.6	<u>0.6</u>	26.57	16.28	8	88.9

Histogramme 1. Témoin négatif fixant le seuil.
 - en ordonnée logarithme du nombre des cellules.
 En abscisse logarithme de la fluorescence.

Sample : SAMPLE 009
Cytometer: FACS 440

1D4

Date: 04-Mar-87 9:49



Sample : SAMPLE 009
Cytometer: FACS 440

Date: 04-Mar-87 9:49

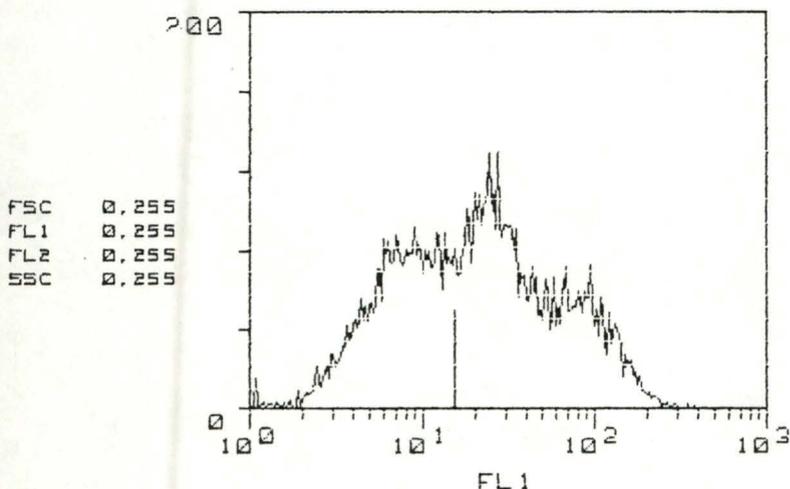
Single histogram statistics								
Parameter : FL1		Gated events : 10000			Total events : 10000			
Left	Right	Events	% Gated	% Tot	Mean	Mode	Peak	CV
15.43	1000.00	1262	12.6	12.6	21.58	17.19	78	36.0

Histogramme 2.

Cellules marquées par le 1D4-GAM Fitc. La séparation des 2 populations cellulaires (positive et négative) est en deçà du seuil fixé par le témoin négatif.

Sample : SAMPLE 002 12B10
 Cytometer: FACS 440

Date: 04-Mar-87 9:25



Sample : SAMPLE 002
 Cytometer: FACS 440

Date: 04-Mar-87 9:25

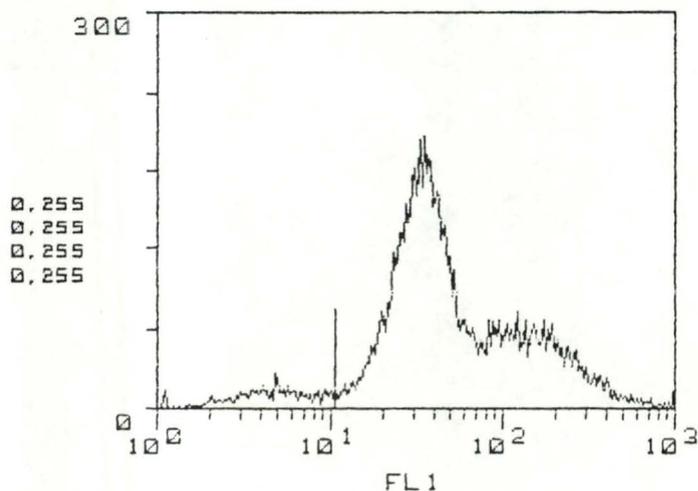
Single histogram statistics								
Parameter :	FL1	Gated events :		10000	Total events :		10000	
Left	Right	Events	% Gated	% Tot	Mean	Mode	Peak	CV
15.43	1000.00	5916	59.2	<u>59.2</u>	53.75	27.25	130	79.2

Histogramme 3. Lymphocytes totaux marqués au 12B10- GAM Fitc

le : SAMPLE 034
meter: FACS 440

12B10

Date: 04-Mar-87 10:49



le : SAMPLE 034
meter: FACS 440

Date: 04-Mar-87 10:49

meter : FL1

Single histogram statistics
Gated events : 10000 Total events : 10000

Left	Right	Events	% Gated	% Tot	Mean	Mode	Peak	CV
10.56	1000.00	9323	93.2	<u>93.2</u>	88.74	34.77	207	127.1

Histogramme 4. Fraction T1 (lymphocytes T) marquée au 12B10-GAM Fitc montre de manière plus explicite la bimodalité

Anticorps monoclonaux	Lymphocytes totaux %	Fraction T1 %
contrôle		
PBS	0,6	1,8
1H4	18	2,7
2G1	13	5,8
test		
3A8	54	43
17A3	65	83
5B5	60	89
7B9	50	nd
12B10	59	93
12B11	61	92
8C11	54	92
1D3	41	90
1D4	12	50
1D5	58	90
7D5	59	82
12D8	59	92
5E10	59	79
nd non déterminé		

Tableau 5 Pourcentage des cellules marquées relevé par le FACS

RESULTATS ET DISCUSSION

La purification des PMN et cellules adhérentes (macrophages et monocytes) est très satisfaisante.

Test.

Tous les anticorps monoclonaux testés, présentent une augmentation du pourcentage des cellules reconnues lors du passage des lymphocytes totaux à la fraction T1; ceci préjugant d'une reconnaissance spécifique des LT.

Seuls, le 3A8 et le 1D5, ont un accroissement faible de leur pourcentage.

Il semble qu'aucun réactif ne reconnaît les LB, mais le degré de purification, très peu satisfaisant, exige une confirmation.

Les PMN et cellules adhérentes sont reconnues uniquement par le 17A3.

La reconnaissance des thymocytes est indicative d'une spécificité pour les LT. Les thymocytes comprennent essentiellement les pré-T et les LT (fig.4)(comme tout organe irrigué, le thymus compte des LB).

Nous pouvons conclure de ce tableau 4, qu'il semble bien que tous les anticorps monoclonaux produits reconnaissent les LT uniquement, sauf le 17A3 qui en plus réagit avec les PMN et les cellules adhérentes. Mais en raison d'une purification insuffisante des LB, il reste à confirmer une non reconnaissance des LB par ces monoclonaux.

De plus, il serait intéressant de disposer de résultats effectués mécaniquement, éliminant le caractère subjectif de l'observation et basés sur un échantillon plus large.

B. Immunofluorescence indirecte au FACS.

L'analyse de chaque anticorps monoclonal est ici réalisée sur 10 000 cellules. Cette opération a été entreprise sur lymphocytes totaux et sur la fraction T1 (cfr. 2.1.4.).

Les résultats sont repris dans le tableau 5.

L'augmentation du pourcentage des cellules marquées dans la fraction T1 par rapport aux lymphocytes totaux est confirmée; sauf le 3A8 qui présente une diminution du pourcentage (il est éliminé car ne répondant pas à nos critères de sélection - risque de reconnaissance des LB). Quant au 1D4, un accroissement est bien relevé mais un pourcentage inférieur aux autres réactifs est enregistré pour les lymphocytes totaux et la fraction T1. Ceci témoigne peut être d'une reconnaissance d'une sous-population de LT ou, ce qui semble confirmer par l'histogramme 2, d'un problème de concentration du monoclonal. On voit en effet que la cassure entre les deux pics, distinguant les cellules non marquées des cellules marquées, est à gauche du signal séparant les cellules négatives des positives. Ce seuil fixé par le test négatif: PBS (histogramme 1), n'est pas suffisamment dépassé par les cellules marquées en raison sans doute d'une insuffisance d'anticorps fixés sur la membrane. Ceci témoigne d'une concentration trop faible de l'anticorps dans le surnageant de culture, d'une densité faible de l'antigène reconnu sur la membrane ou d'un manque d'affinité de cet anticorps.

Une bimodalité des cellules marquées de la fraction T1, existant mais de manière moins évidente pour les lymphocytes totaux, est observée (histogrammes 3 et 4).

Anticorps monoclonaux	PMN %	L _B %	Fraction T1 %
contrôle 1H4	- de 3	80	- de 3
test 17A3	95	23	90

Tableau 6 Pourcentage de cellules marquées relevé par le FACS

Anticorps monoclonaux	Marquage simple %	Marquage cumulatif (+ 1H4) %	
contrôle 1H4 2G1	17 13	17 32	
test			différence
17A3	66	77	11
5B5	60	75	15
7B9	50	40	-10
12B10	59	61	2
12B11	61	76	15
8C11	54	64	10
1D3	41	61	20
1D4	12	78	66
1D5	58	75	17
7D5	59	78	19
12D8	59	80	21
5E10	59	79	20

Tableau 7 Pourcentage de cellules fluorescentes en marquage simple et cumulatif sur lymphocytes totaux

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette bimodalité est relevée pour tous les réactifs sauf les contrôles, le 3A8 et le 17A3. Ces deux pics peuvent avoir deux causes: - soit l'existence de deux sous-populations reconnues, l'une ayant une densité supérieure d'antigènes reconnus par le monoclonal sur la membrane de ses cellules par rapport à l'autre sous-population, - soit une concentration inadéquate du réactif monoclonal.

Pour trancher la question, il suffit d'effectuer ce même marquage mais à diverses dilutions. Ceci fut fait, et toujours on a conservé la bimodalité confirmant l'hypothèse des deux sous-populations.

Le 17A3 étant un cas particulier (seul monoclonal sélectionné à reconnaître en plus des LT, les PMN et les cellules adhérentes - tableau 4) fut testé au FACS sur PMN et LB.

Les résultats du tableau 6 confirment bien les commentaires du tableau 4, à savoir reconnaissance des PMN, et des LT par le 17A3; la reconnaissance des cellules adhérentes sera expérimentée plus loin.

A la vue des résultats, la plupart des monoclonaux présentant une augmentation des cellules reconnues lors de la purification des LT, signifie que ceux-ci reconnaissent au moins les LT à l'exclusion des PMN et des cellules adhérentes; seul le 17A3 réagit également avec les PMN et les cellules adhérentes.

Mais il nous faut encore déterminer si ces anticorps reconnaissent ou non les LB. Il suffit de purifier des LB, mais cette opération qui demande énormément de temps pour un rendement cellulaire faible et une purification très peu satisfaisante, n'était pas envisageable dans le cadre de ce travail pour tous les réactifs. Pour palier cette lacune, nous avons décidé d'effectuer des marquages cumulatifs.

C. Marquage cumulatif.

Cette démarche consiste en une incubation des cellules avec deux anticorps monoclonaux simultanément. Lorsque ces deux anticorps sont fixés sur leur antigène respectif, on les détecte classiquement par IFI

Nous avons utilisé chacun des douze réactifs sélectionnés avec l'anticorps monoclonal 1H4 (cfr. 2.3.1C).

Les résultats nous permettent de préjuger si l'anticorps monoclonal test reconnaît ou non les LB. En effet, si celui-ci reconnaît les LB, aucune augmentation du pourcentage des cellules marquées ne sera enregistrée lors du marquage cumulatif avec le 1H4. Les LB que reconnaît le 1H4 seront déjà marqués et repris dans le pourcentage des cellules reconnues par l'anticorps test utilisé seul.

Si le réactif monoclonal test ne reconnaît pas les LB, une augmentation du pourcentage équivalent à peu près au pourcentage des LB sera enregistrée. Les résultats dans le tableau 7 indiquent clairement une non reconnaissance des lymphocytes B pour la plupart des monoclonaux.

Anticorps monoclonaux utilisé pour marquage	Pourcentage de cellules marquées %
contrôle 1H4 2G1 1H4 + 2G1	 16 15 32
test 17A3 17A3 + 1H4 17A3 + 2G1 17A3 + 1H4 + 2G1	 66 77 67 76,6

Tableau 8 Pourcentage de cellules reconnues en
marquage cumulatif

Le 7B9 présente une diminution lors du marquage cumulatif, ceci est inexpliqué. Peut être existe-t-il une inhibition entre les deux anticorps ou une reconnaissance des LB.

Le 12B10 quant à lui présente à peu près les mêmes pourcentages en marquage simple et cumulatif. Sans doute reconnaît-il les LB également.

Pour confirmer ces résultats, l'expérience aurait pu être renouvelée sur 7B9 et 12B10 mais, disposant d'anticorps monoclonaux en nombre suffisant, nous avons préféré appliquer une sélection drastique afin d'obtenir des réactifs monoclonaux anti-LT constants du point de vue de leur spécificité et de leur stabilité.

12B10 et 7B9 ont été surgelés.

Nous avons de plus effectué les marquages cumulatifs suivant le tableau 8 pour déterminer la répartition cellulaire de l'antigène reconnu par le 17A3

Le 17A3 reconnaît les cellules adhérentes et les PMN. On ne voit pas en effet de différence significative du pourcentage des cellules fluorescentes après marquage par le 17A3 seul et par le 17A3 + 2G1, signifiant que les cellules reconnues par le 2G1 (cfr. 2.3.1C), le sont déjà par le 17A3.

Par contre il ne reconnaît pas les LB. De fait, une augmentation, quoique inférieure au pourcentage des cellules fluorescentes après marquage au 1H4 seul, est enregistrée.

Le 17A3 reconnaît donc les LT, PMN et cellules adhérentes à l'exclusion des LB.

Ces marquages cumulatifs exigent l'utilisation du FACS. Ces observations, réclamant des pourcentages représentatifs, ne peuvent se faire que pour un nombre élevé de cellules. Et ne disposant pas de l'appareil à Namur, cette solution est finalement peu pratique quoique très intéressante. Aussi avons nous mis sur pied un test réalisable aux Facultés: le double marquage.

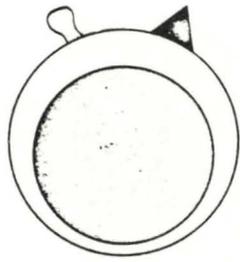
Nous avons décidé de limiter à quatre, les anticorps monoclonaux étudiés pour pousser leur caractérisation au plus loin. Nous avons choisi le 17A3 qui présente quelques caractéristiques uniques. Le 8C11, 1D4 et 12D8 ont été sélectionnés également, car ils semblent, jusqu'ici répondre à nos critères (tableau 7); reconnaissance des LT uniquement.

D. Double marquage en immunofluorescence.

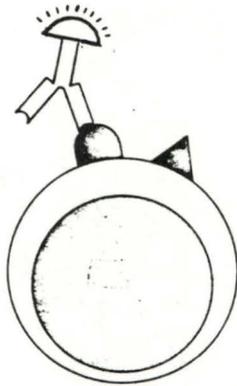
Ce double marquage est basée sur une reconnaissance différentielle d'une part des LB et, d'autre part des cellules reconnues par l'anticorps monoclonal produit.

Mise au point.

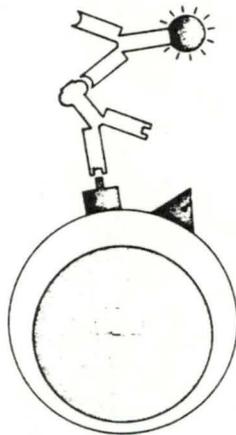
Choix des réactifs: notre premier choix s'est tout naturellement porté sur le RAB (Rabbit Anti-Ig de Bovin) pour la détection des LB. nous disposons d'un RAB couplé à la biotine (Amersham) dont on visualisait la fixation grâce à de la streptavidine Texas Red (Amersham).



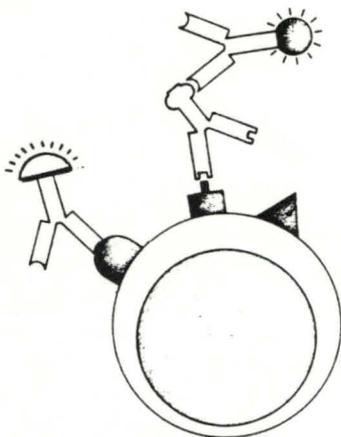
Cellule double-négative



Cellule positive en IFD



Cellule positive en IFI



Cellule double-positive

Fig. 15 Principe du double marquage.

RESULTATS ET DISCUSSION

Marquage.

L'opération s'effectue comme suit. Incubation des cellules avec du RAB-biotine révélé par la streptavidine TR. Ensuite, incubation avec le monoclonal test, révélé grâce au GAM-Fitc. Mais pour éviter toute réaction croisée, c'est-à-dire reconnaissance des Ig (immunoglobulines) de souris par RAB, on épuise par saturation le RAB avec du serum de souris.

Mais la lecture du TR, pour une raison indéterminée, était très difficile au microscope. Peut être en raison d'une qualité déficiente de la streptavidine TR (lot 9), (Greimers, comm. pers.).

Réactif de remplacement.

Nous nous sommes alors tournés vers le 1H4 marqueur spécifique des LB (cfr. 2.3.1C.). Nous l'avons couplé directement à l'isothiocyanate de fluorescéine (seule méthode de couplage que nous maîtrisons) dans le but de faire un marquage en immunofluorescence directe (IFD) d'une préparation cellulaire marquée par un anticorps monoclonal test, et révélé grâce au GAM-TR suivant la méthode classique d'IFI (fig.15).

Le couplage nécessite un contrôle strict des rapports entre molécules de Fitc et l'anticorps (cfr. 2.3.2A.). De plus, une sélection de ces anticorps marqués doit être réalisée pour récolter une préparation de 1H4-Fitc homogène, stable et ayant gardé la même spécificité.

Le monoclonal test est détecté par du GAM-TR plutôt que du GAM-rhodamine. Le premier présentant certains avantages (cfr. 2.3.2A.).

Précautions à prendre.

Après marquage en IFI, il faut endiguer la plasticité de la membrane afin d'éviter l'endocytose du complexe antigène-anticorps monoclonal-GAMTR. Pour ce faire nous fixons les cellules au moyen de formaldéhyde après que ces complexes soient disposés en patch autour de la cellule (cfr. 2.3.2B.).

Le marquage en IFD (1H4-Fitc) peut se faire à température ambiante, mais il est plus efficace à 37 °C.

Il faut éviter toute réaction entre GAM-TR (anticorps de chèvre anti-Ig de souris) et le 1H4-Fitc (Ig de souris anti-IgM de bovin). Pour cela, avant l'IFD, nous saturons tous les sites du GAM-TR restés libres au moyen d'une Ig neutre de souris (P3).

Effectué comme ceci, le double marquage est performant et permet une analyse distinctive des LB dans une suspension cellulaire non purifiée.

Résultats du double marquage.

Ce double marquage est donc réalisé dans l'optique essentielle de constater si les 4 réactifs monoclonaux reconnaissent les LB bovins.

Les pourcentages repris au tableau 9 sont à prendre avec réserve, seule la reconnaissance simultanée ou non de la cellule par le 1H4-Fitc et l'anticorps monoclonal est à prendre en considération.

Les pourcentages n'ont rien d'indicatif, seule l'absence de cellules doubles positives a été vérifiée.

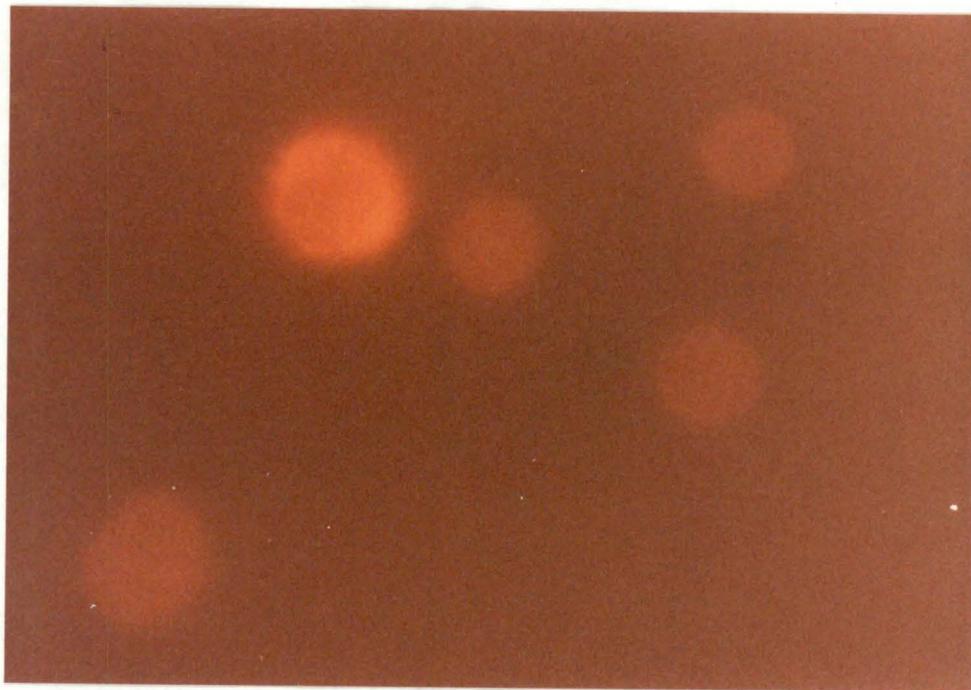


Photo 1. Cellule positive en IFI.

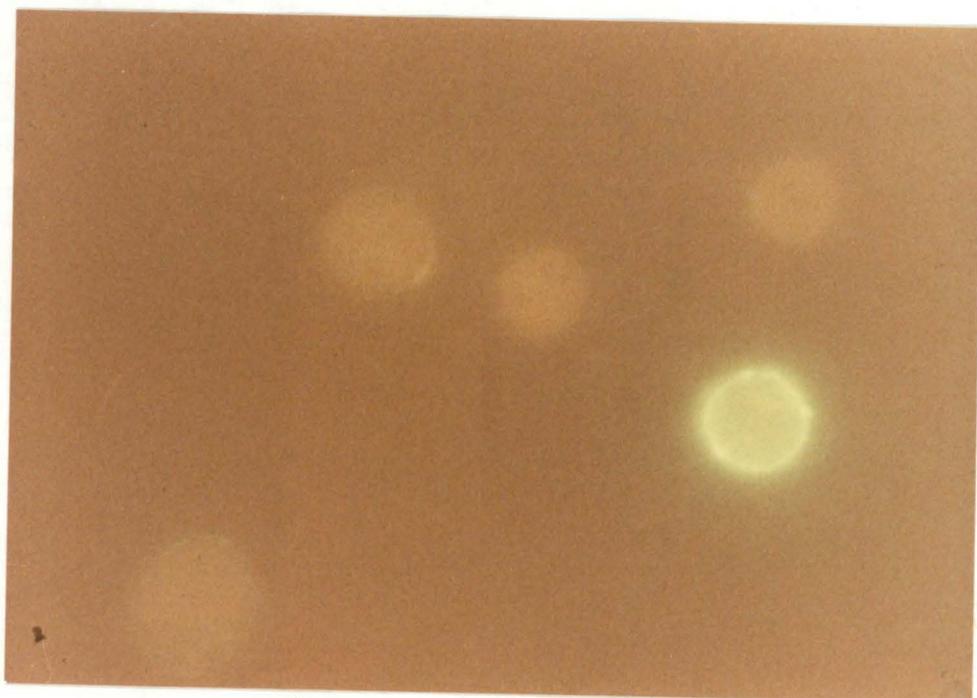


Photo 2. Cellule positive en IFD.

Ces photos ont été prises sous faible luminosité normale en plus des U.V. pour permettre la visualisation des cellules négatives.

Anticorps monoclonaux	Cellules fluo- rescente en rouge (T.R) %	Cellules fluo- rescente en vert (Fitc) %	Résultats
contrôle			
1H4	23	27	ttes les ϕ rouges sont vertes
11B2	90	24	ttes les ϕ vertes sont rouges (ϕ =cellules)
test			
17A3	39	21	aucune double posi-
8C11	52	20	" " "tive
12B8	23	23	" " "
1D4	17	27	" " "

Tableau 9 Résultats du double marquage sur lymphocytes
totaux

RESULTATS ET DISCUSSION

Il est évident que toutes les cellules (LB) reconnues en IFD (1H4-Fitc), doivent l'être également en IFI par 1H4 (1H4-GAMTR). Il n'est donc pas normal de trouver quelques cellules marquées en IFD, ne l'étant pas en IFI. Cela s'explique peut être par un déplacement des complexes 1H4-GAMTR par 1H4-Fitc ou par le fait que certains lymphocytes B, plus actifs, ont endocyté le complexe antigène-1H4-GAMTR avant que le formol ne fixe la membrane cellulaire (patching trop poussé). Mais la majorité (85 %) des LB est reconnue par le 1H4 et en IFI et en IFD.

Aucun des anticorps monoclonaux produits ne semble reconnaître les lymphocytes B. Le double marquage ne recèle aucune cellule fluorescente en IFI et en IFD (photos 1 et 2).

E. Double marquage au FACS.

Nous avons tenté de transposer la technique du double marquage au FACS. Ce qui permettrait l'analyse sur des échantillons comptant beaucoup plus de cellules.

Nous avons effectué un double marquage suivant les mêmes modalités (cfr. 2.3.2.).

Les résultats obtenus (histogrammes 5 et 6) ne présentent pas une séparation nette des différentes populations; à savoir celles positives pour l'anticorps monoclonal produit, pour 1H4-Fitc et les double négatives. Ceci semble dû à un marquage insuffisant du TR.

Perspective pour le double marquage au FACS.

Pour rendre efficient le double marquage, c'est-à-dire distinguer les diverses populations cellulaires, il reste à intensifier le marquage du TR. Ceci peut être envisagé en jouant sur les dilutions du GAM-TR, et de l'anticorps monoclonal produit.

Une toute autre approche peut être envisagée: l'usage de GAM reconnaissant spécifiquement des classes Ig de souris. Pour ce, il suffit de disposer d'anticorps monoclonaux de classes différentes. Nous savons que le 1H4 est une IgG1 (cfr. 2.3.1C.) et que le 17A3 est une IgG2a (cfr. 3.3.3).

Disposant d'un GAM, couplé au Fitc, anti-IgG1 murine et d'un GAM, couplé au TR, anti-IgG2a de souris, le double marquage pourrait être réalisé simultanément par l'anticorps test et le 1H4. Ceci impliquerait beaucoup moins de manipulations, qui sont toujours dommageables pour l'intégrité cellulaire et donc pour la spécificité de la reconnaissance antigène-anticorps. Cette mise au point ne put être envisagée dans le cadre de ce travail.

F. Récapitulatif des résultats.

Les résultats consignés au tableau 9 indiquent une reconnaissance spécifique des LT par le 8C11, 1D4 et 12D8: ils ne reconnaissent, parmi les populations cellulaires sanguines, les LT uniquement.

Le 17A3 reconnaît un antigène qui se situe sur les lymphocytes T, les PMN, les macrophages et les monocytes.

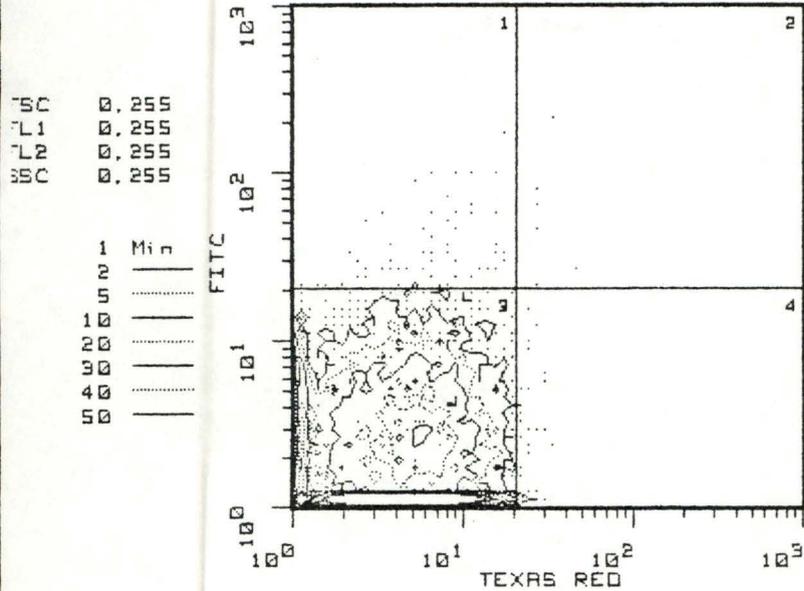
Aucun de ces quatre réactifs ne spécifie les lymphocytes B bovins.

Histogrammes 5 Témoins

- a. témoin double négatif
 - en ordonnée fluorescence en Fitc
 - en abscisse fluorescence en T.R.
 - (échelles logarithmiques)

Sample : SAMPLE 020 PBS
 Cytometer: FACS 440

Date: 19-Mar-87 16:16
 File: TEST001



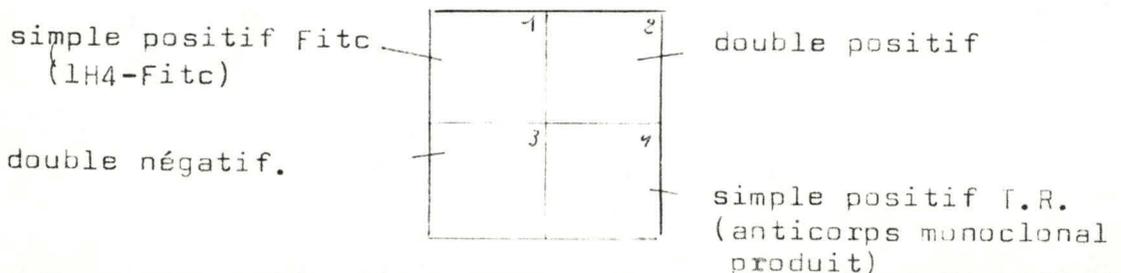
La répartition cellulaire est schématisée au moyen de courbes (analogues aux courbes de niveau) reprenant une quantité constante de cellules.

Sample : SAMPLE 020
 Cytometer: FACS 440

Date: 19-Mar-87 16:16
 File: TEST001

Parameters : FL2 FL1		Contour statistics			Total events : 10000		
		Gated events : 10000					
X & Y Lower	X & Y Upper	Events	% Gated	% Tot	X & Y Mean	X & Y Mode	Peak
1.00	19.31	64	0.64	0.64	7.50	5.18	3
21.54	1000.0				42.94	21.54	
21.54	1000.0	6	0.06	0.06	31.19	26.83	1
21.54	1000.0				75.84	21.54	
1.00	19.31	9888	98.88	98.88	5.11	1.12	238
1.00	19.31				2.86	1.12	
21.54	1000.0	42	0.42	0.42	24.09	21.54	9
1.00	19.31				3.24	1.12	

Les résultats sont spécifiés pour chacun des 4 cadrans

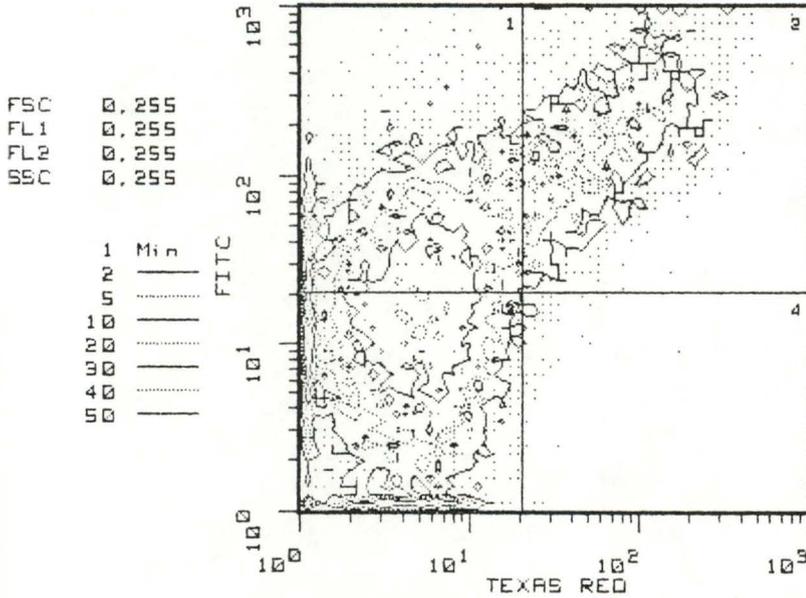


b. Témoin double positif (LH4-Fitc/LH4-GAMT.R.)

Sample : SAMPLE 026
Cytometer: FACS 440

Double positif

Date: 19-Mar-87 16:24
File: TEST006



Sample : SAMPLE 026
Cytometer: FACS 440

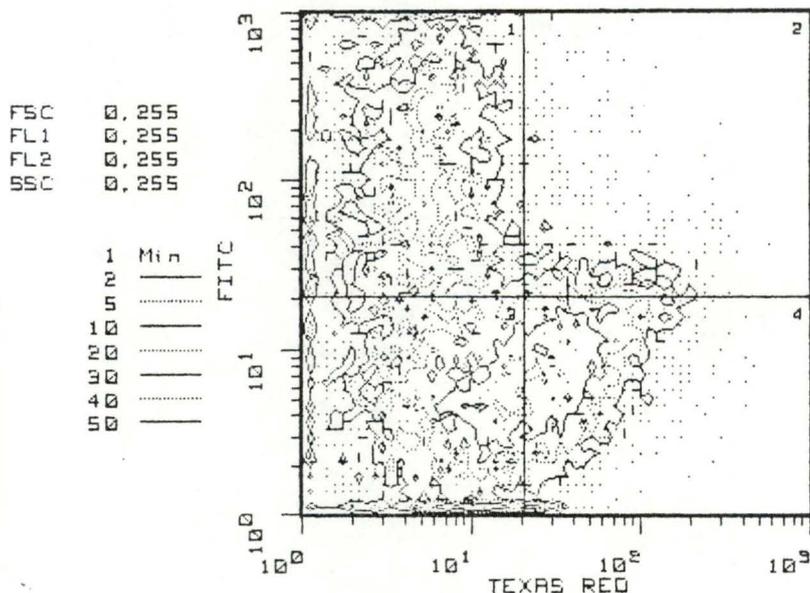
Date: 19-Mar-87 16:24
File: TEST006

Parameters : FL2 FL1		Contour statistics Gated event's : 10000			Total events : 10000			
#	X & Y Lower	X & Y Upper	Events	% Gated	% Tot	X & Y Mean	X & Y Mode	Peak
1	1.00 21.54	19.31 1000.0	3287	32.87	32.87	7.17 65.55	3.73 24.04	23
2	21.54 21.54	1000.0 1000.0	1753	17.53	17.53	84.60 230.09	21.54 57.80	12
3	1.00 1.00	19.31 19.31	4906	49.06	49.06	5.20 9.02	1.12 13.89	31
4	21.54 1.00	1000.0 19.31	54	0.54	0.54	30.53 11.71	21.54 15.51	4

Histogramme 6 double marquage (LH4-Fitc/ anticorps monoclonal produit-GAMT.R.)

Sample : SAMPLE 030 *test*
 Cytometer: FACS 440

Date: 19-Mar-87 16:28
 File: TEST010



Sample : SAMPLE 030
 Cytometer: FACS 440

Date: 19-Mar-87 16:28
 File: TEST010

Parameters : FL2		FL1		Contour statistics			Total events :		Peak
				Gated events : 10000			10000		
#	X & Y Lower	X & Y Upper	Events	% Gated	% Tot	X & Y Mean	X & Y Mode		
1	1.00 21.54	19.31 1000.0	2830	28.30	28.30	6.13 238.20	1.12 1000.00	12	
2	21.54 21.54	1000.0 1000.0	513	5.13	5.13	79.99 96.79	24.04 21.54	8	
3	1.00 1.00	19.31 19.31	3809	38.09	38.09	9.66 6.42	17.30 8.96	25	
4	21.54 1.00	1000.0 19.31	2848	28.48	28.48	46.87 8.53	21.54 7.20	29	

La séparation entre les populations double négative, simple positive en IFD (LH4-Fitc) et simple positive en IFI (anticorps monoclonal-GAMT.R.) est insuffisante.

Anticorps monoclonaux	L.To	LT	L _B	PMN	C.adh.
17A3	+	++	-	++	++
8C11	+	++	-	-	-
1D4	+	++	-	-	-
12D8	+	++	-	-	-

L.To	Lymphocytes totaux	PMN	Polymorphonucléaire
LT	Lymphocytes	C.adh.	Cellules adhérentes
L _B	Lymphocytes B		

Tableau 10 Récapitulatif

RESULTATS ET DISCUSSION

Ces observations répondent bien à notre attente. Connaissant la répartition cellulaire de ces divers réactifs, nous allons confronter ces résultats avec la répartition tissulaire des cellules portant les antigènes reconnus.

3.2 Répartition tissulaire.

Il existe dans les différents organes lymphoïdes des zones peuplées spécifiquement par les lymphocytes T (aires paracorticales des ganglions lymphatiques, gaines périartériolaires de la rate et tissu interfolliculaire) et d'autres aires colonisées par les lymphocytes B (follicules de la rate, des ganglions lymphatiques, des plaques de Peyer, les cordons médullaires des ganglions lymphatiques) (cfr. 1.2).

A. Marquage sur coupe à congélation.

Nous ne pouvions envisager que cette technique pour la localisation "in situ" des cellules reconnues par un anticorps monoclonal. L'antigène de surface et donc les membranes cellulaires doivent être dans un état le plus proche possible de leur structure naturelle. Mais cette technique nous a posé de nombreux problèmes.

Il est très difficile d'obtenir une coupe large, pour localiser les structures observées, sans plis ou cassures. De plus, il arrive que lors du marquage les coupes se détachent de leur support.

Nous avons choisi de révéler l'anticorps au moyen de GAM couplé à la peroxydase plutôt qu'au Fitc, ceci permet de conserver la coupe (cfr. 2.3.4.).

B. Résultats.

La rate et les ganglions lymphoïdes sont les organes lymphoïdes choisis. La rate donne de bien meilleures coupes et c'est sur celles-ci que nous avons obtenu des résultats.

1H4 constitue le contrôle idéal. Reconnaisant les cellules B il se fixe dans les aires thymo-indépendantes et ne marque pas les cellules des aires thymo-dépendantes.

Nous espérons que les réactifs monoclonaux fournissent l'image négative du contrôle témoignant d'une reconnaissance des LT.

Le marquage au 1H4 répond à nos espérances (photo 3).

Et des quatre anticorps monoclonaux étudiés, seul le 12D8 nous a fourni des coupes marquées (photo 4). Les cellules reconnues par le 12D8 se situent bien dans la zone des LT, confirmant sa spécificité pour ceux-ci.

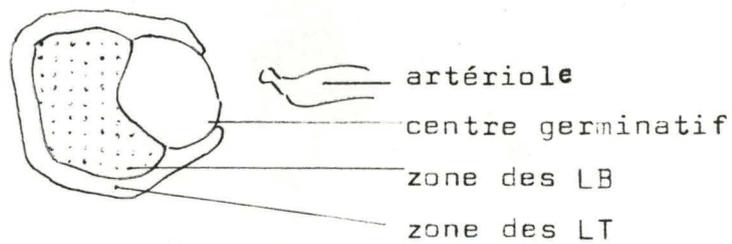
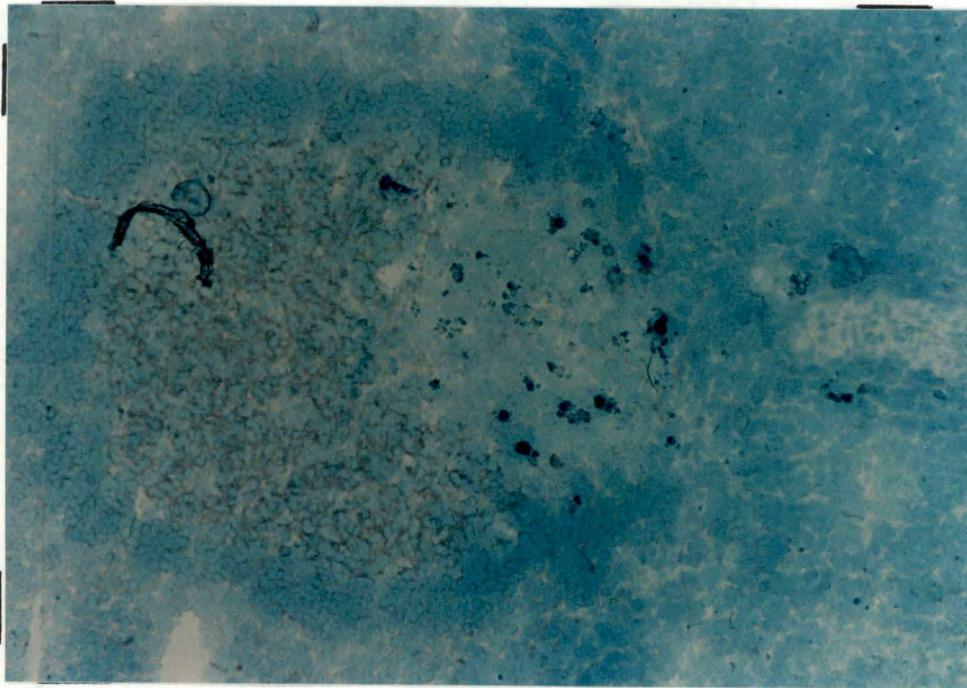
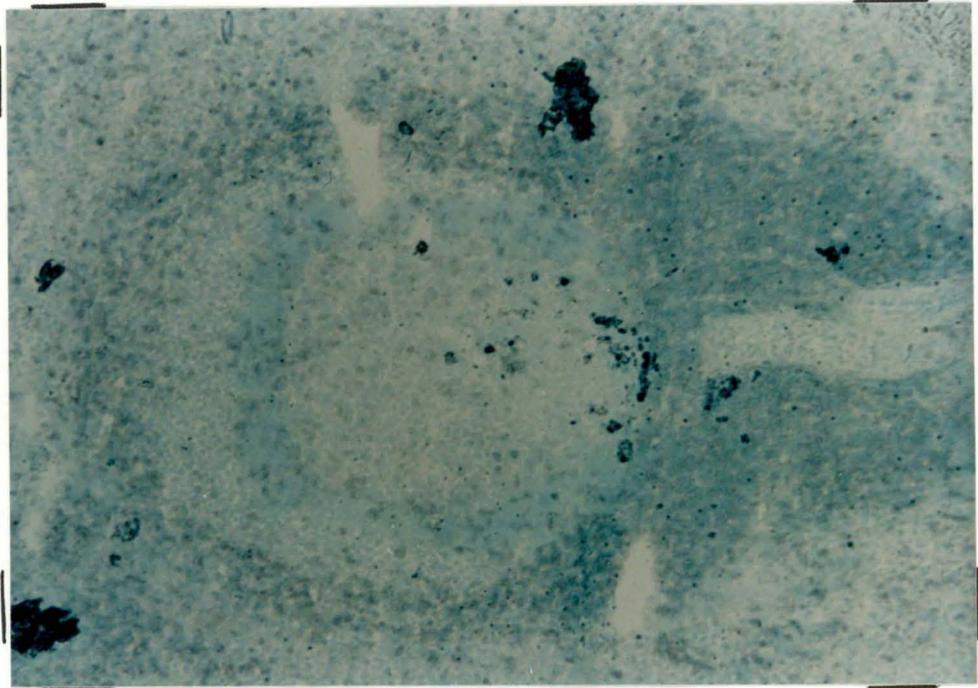
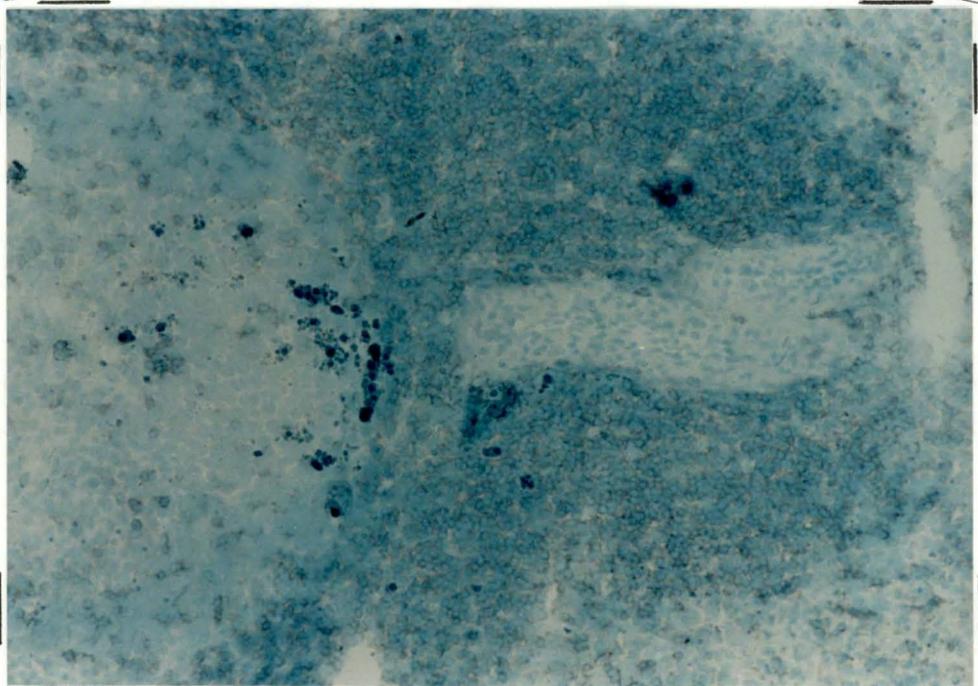
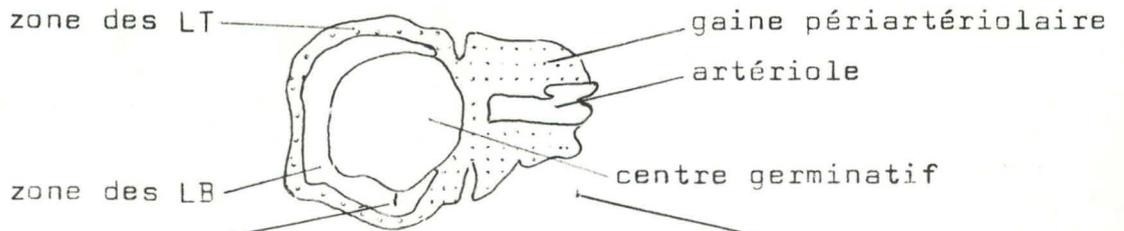


Photo 3 (10 x) coupe de rate bovine au niveau d'un follicule lymphoïde.
Marquage grâce au LH4 (monoclonal anti-LB) révélé à la peroxydase.



10X



25X

photo 4. Coupe de rate bovine au niveau d'un follicule et d'une artériole. La zone des T et la gaine périartériolaire sont mises en évidence au moyen d'un marqueur de T (12D8).

Pour le 1D4,8C11 et 17A3 il n'a pas été possible d'obtenir de tels résultats. Sans doute parce que l'antigène reconnu par ces monoclonaux est modifié ou détruit lors de la manipulation (congélation, déshydratation, ... cfr. 2.3.4.).

Ayant étudié la répartition cellulaire et tissulaire de antigènes cibles des anticorps monoclonaux il est intéressant de déterminer l'isotypie de l'anticorps et de caractériser l'antigène reconnu d'un point de vue biochimique.

3.3 Caractérisation des anticorps monoclonaux.

Détermination de l'isotypie.

La détermination de l'isotypie se fait comme décrit précédemment (cfr. 2.4.1.).

Tous les anticorps monoclonaux sont des IgG2a sauf 1D4 qui est une IgM.

Les IgM forment une classe d'immunoglobulines (Ig) très difficiles à manipuler et à étudier (LETESSON & COPPE, comm. pers.). Ceci explique peut-être les pourcentages quelque peu bas obtenus sur les lymphocytes totaux réalisés au FACS (tableau 6). De plus il faut régulièrement vérifier la classe de ces Ig, en effet un switch (passage pour une Ig, de la classe M à une autre classe) reste toujours possible (AQUILA & coll., 1986).

La détermination de l'isotypie est importante parce qu'elle laisse préjuger d'une part, de la procédure à suivre pour purifier ces monoclonaux, et d'autre part de leur potentialité cytotoxique.

Purification.

La capacité de fixer la protéine A pour certaines classes d'Ig permet d'éviter l'étape intermédiaire du GAM et de limiter du même coup les risques de perte de spécificité qu'elle comporte.

Nous savons (GODING, 1976) que les IgG2a fixent la protéine A contrairement aux IgM.

Cytotoxicité

La capacité activatrice du complément est spécifique de certaines classes d'Ig. Le composant C1 du système du complément se fixe à ces classes d'Ig et en activant la voie classique de ce système, provoque la lyse des cellules portant l'antigène reconnu.

3.4 Caractérisation immunobiochimique des antigènes.

Dans le but d'obtenir des renseignements complémentaires, la caractérisation biochimique des antigènes cibles a été réalisée.

A. Western blot.

Comme le prescrit la technique (cfr.2.5.2.), un lysat de leucocytes bovins soumis ou non à des conditions réductrices est électrophorétisé. Les protéines se répartissent suivant leur PM. Elles sont ensuite transférées sur nitrocellulose.

Si l'antigène a conservé les épitopes caractéristiques, il est détecté par l'anticorps monoclonal qui, grâce à une réaction immunoenzymatique, est mis en évidence.

Résultat.

Un seul des anticorps monoclonaux nous a fourni le PM de l'antigène cible. Il s'agit du 17A3.

En conditions non réductrices, la protéine reconnue apparaît avec un poids moléculaire équivalent à 104.000 daltons.

En conditions réductrices, cette protéine demeure mais en plus petite quantité (spot beaucoup plus diffus) et une nouvelle marque apparaît au niveau de 17.000 daltons.

Pour des raisons de contraste insuffisant, il ne nous est pas possible d'illustrer les résultats, mais les bandes de nitrocellulose sont disponibles.

le PM attribué aux molécules mises en évidence n'est pas toujours précis; les bandes étalons et tests, ne subissant pas le même traitement, montrent une rétraction différentielle.

Deux possibilités existent pour expliquer la présence des 2 bandes (17000 d et 104000 d) en conditions réductrices dont une est retrouvée en conditions non réductrices,

-le 17A3 reconnaît une sous-unité de 17000 d d'une protéine plus importante de 104000 d, mais un traitement réducteur déficient ne dissocie pas toutes ces protéines en leurs sous-unités; quelques-unes gardent leur structure quaternaire (bande à 104000).

-la protéine reconnue par le 17A3 ne comprend pas de sous-unités et reste d'un seul tenant en conditions réductrices, la bande à 17000 pourrait être une sous-unités d'une autre protéine qui dissociée présente un site comparable à l'épitope caractéristique de l'antigène cible du 17A3. Cette bande est un artéfact du traitement réducteur.

Les autres monoclonaux n'ont pu nous révéler leur antigène cible, probablement en raison d'un traitement dénaturant (électrophorèse SDS-PAGE, cfr 2.5.1.B.).

Nous allons tenter de déterminer le PM de l'antigène de ces réactifs monoclonaux par immunoprécipitation; technique moins restrictive car la reconnaissance antigène-anticorps se fait avant l'électrophorèse en conditions dénaturantes.

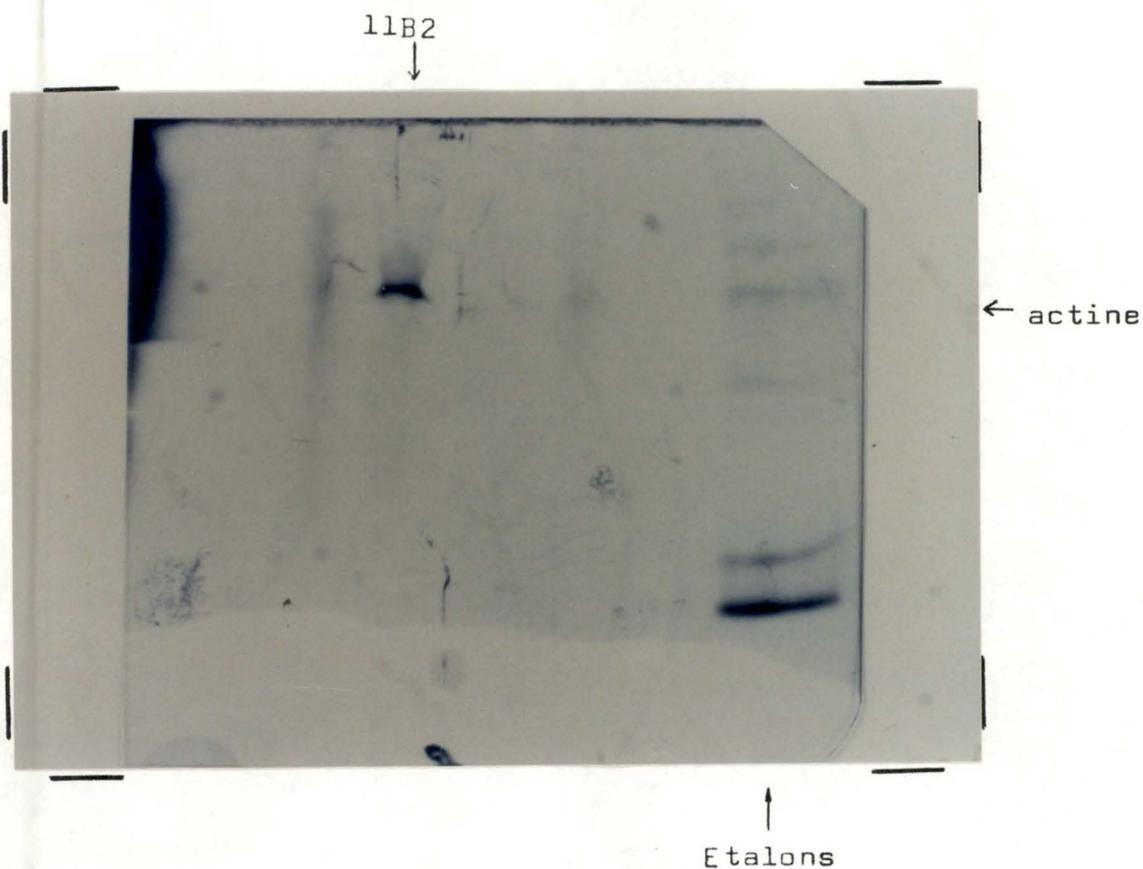


photo 5. Autoradiographie d'un lysat de cellules stimulées, marquées à la méthionine S35. On peut y voir l'antigène cible du 11B2, et dans les pistes voisines, de l'actine.

B. Immunoprécipitation directe.

Nous n'envisagerons pas le cas du 1D4. Etant une IgM, cette Ig réclame une immunoprécipitation indirecte. Les anticorps restants sont des IgG2a et peuvent fixer la protéine A, ce qui permet une immunoprécipitation directe.

Détermination du poids moléculaire.

Comme décrit dans le chapitre Méthodes (cfr 2.5.3.), les cellules mononucléées sont marquées isotopiquement à la méthionine S35 puis lysées en NP40; les antigènes spécifiques, après avoir été isolés par immunoprécipitation avec le monoclonal à étudier, sont électrophorétisés en SDS-PAGE, en conditions réductrices et non réductrices. La révélation se fait par autoradiographie.

Résultat.

Lors des premières expériences, nous n'avons rien obtenu à la révélation, pas même pour le 11B2 (cfr 2.3.1.C.), témoin positif qui reconnaît un antigène de 44.000 d sans aucune difficulté.

Nous nous sommes alors arrêtés sur l'incorporation de méthionine qui se faisait de manière peu efficiente. Un lysat cellulaire de 50 millions de cellules donnait 140 millions de cpm, ce qui est peu.

Pour augmenter l'incorporation, nous avons eu recours à un mitogène : PHA (lectine végétale), qui provoque la croissance et la multiplication des lymphocytes (JANOSSY & GREAVES, 1971).

La stimulation s'effectue comme ceci: on incube, pour 2 jours à 37° C sous 5% de CO₂, 100 millions de cellules dans 50 ml d'un milieu de culture (RPMI 10% FCS) contenant de la PHA à 10 µg/ml. On récupère les cellules stimulées, on les lave et les resuspend pendant 4 heures à 37° C sous 5% de CO₂, dans un milieu de culture contenant de la méthionine S35.

Nous obtenons dans un lysat de 25 millions de cellules 2 650 millions cpm, c'est-à-dire 40 fois plus que sans stimulations. Mais malgré ce progrès, l'autoradiographie ne nous révèle toujours rien sinon l'antigène cible du 11B2 et les contaminants classiques (actine) que l'on retrouve dans toutes les pistes (photo 5).

Pour expliquer ces revers plusieurs hypothèses sont envisageables,

- l'antigène cible ne contient pas de méthionine,
- le turn over de cet antigène est très lent,
- l'anticorps n'a pas assez d'affinité pour l'antigène
- l'anticorps n'est pas en concentration suffisante.

La lyse au NP40, ne dissocie normalement pas les protéines en leur sous-unités (structure quaternaire) et n'altère pas leur structure. L'épitope est vraisemblablement hors de cause.

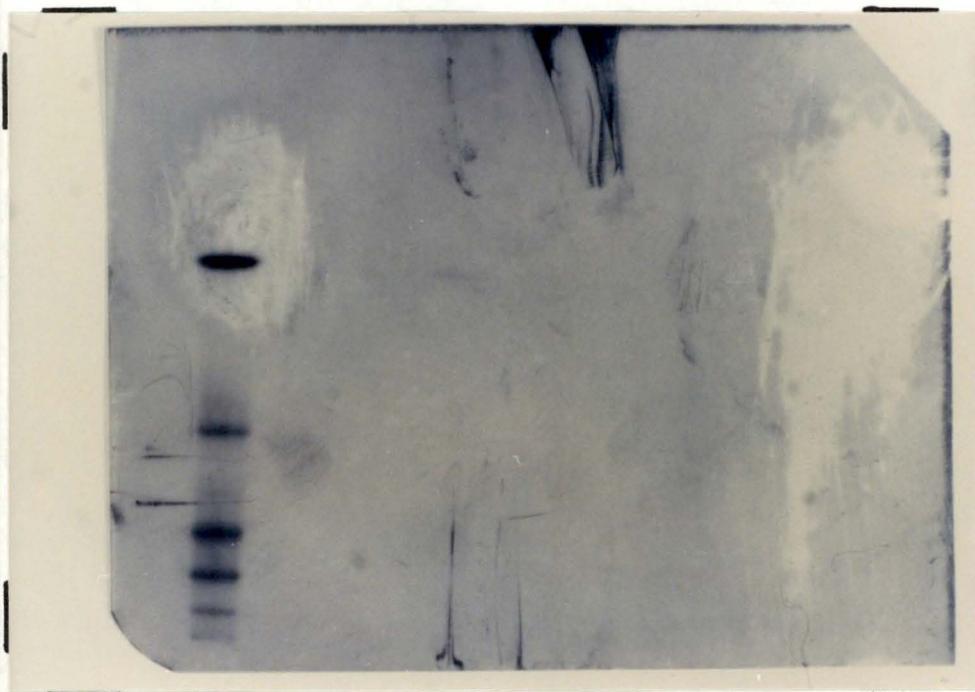


Photo 6 d'une plaque obtenue après autoradiographie
suite à une immunoprécipitation d'un lysat
de cellules marquées à l'iode 125.
Seuls les étalons sont visibles.

C. Marquage à l'iode 125.

Pour tester les deux premières hypothèses, nous avons décidé d'effectuer un marquage des protéines à l'iode 125.

L'iode 125 est couplé aux résidus tyrosines des protéines membranaires grâce à l'activité enzymatique de la peroxydase. Ceci se fait de manière douce et sur cellules entières. L'intégrité structurale des protéines est bien conservée. On lyse les cellules et on poursuit l'immunoprécipitation de manière classique (cfr. 2.5.3.).

Le lysat de 50 millions de cellules témoigne d'un bon marquage: 500 millions de cpm.

Cette opération doit s'effectuer avec les plus grandes précautions en raison du haut niveau de radioactivité de l'iode 125 et de sa volatilité sous forme non conjuguée.

De plus, en raison de la demie-vie courte (60 j) de l'iode 125, le lysat marqué isotopiquement doit être utilisé incessamment.

Résultat.

Ici non plus, nous n'avons pas obtenu de tache sur la plaque photo lors de la révélation. Même le 11B2 ne nous a pas montré la position de son antigène (photo 6).

Il faut signaler que les immunoprécipitations se sont toujours effectuées avec du surnageant de culture du clone. On peut bien sur invoquer à nouveau l'absence de résidus tyrosines accessible sur l'antigène cible (sans doute vrai pour 11B2). Mais il serait étonnant qu'aucun antigène cible des trois monoclonaux (17A3, 8C11 et 12D8) ne renferme de méthionine et n'ait pas de résidus tyrosines accessible.

Il est probable que les surnageants de culture dont nous disposons contiennent des immunoglobulines en trop faible concentration ou d'affinité insuffisante. Car, même pour le 11B2 nous n'obtenons, par autoradiographie, qu'une tâche relativement blême par rapport à ce qui s'obtient avec du 11B2 d'ascite de souris (cfr. 2.2.2.D). L'antigène, détecté par le 11B2, est de plus un antigène de classe 1; c'est-à-dire présent sur toutes les cellules nucléées et donc en plus grande quantité que les antigènes recherchés.

Nous devons donc pour espérer révéler les antigènes cibles, disposer d'anticorps monoclonal sous forme d'ascite où l'on titre généralement 10 mg d'Ig par ml de sérum alors que la concentration normale de l'anticorps monoclonal dans le surnageant de culture est de l'ordre des 10 µg/ml.

Mais avant de pouvoir disposer de ces anticorps monoclonaux sous forme d'ascite, il faut compter un bon mois au minimum.

Anticorps monoclonaux	Pourcentage de lymphocytes ayant au minimum 5 GRM fixé sur sa substance %
PBS PBS	73
17A3	64
8C11	71
1D4	67
12D8	72

Tableau 11 Résultat du test d'inhibition de formation des rosettes AET.

Dilution	cpm du au 8C11 ⁺ fixé	cpm du au 12D8 ⁺ fixé
1	3404.00	1453.00
	3448.00	1456.00
2	1770.00	1136.00
	1609.00	944.00
4	1161.00	503.00
	986.00	632.00
8	747.00	371.00
	618.00	330.00
16	553.00	219.00
	360.00	247.00
32	265.00	188.00
	212.00	152.00
64	153.00	122.00
	161.00	106.00

Tableau 12 Recherche de la dilution optimale des anticorps monoclonaux R.A.

D. Inhibition de rosettes AET.

Les répartitions cellulaires (et tissulaires) des quatre anticorps monoclonaux nous sont connues. Le 8C11, 12D8 et 1D4 sont spécifiques des lymphocytes T. Le 17A3 reconnaît les lymphocytes T, les PMN et les cellules adhérentes. Or, nous savons que les globules rouges de mouton (GRM) traitées à l'AET, se lient spécifiquement aux LT (NAGAHATA, 1984) pour former des rosettes.

Comme les anticorps monoclonaux dont nous disposons, spécifient les LT, peut-être l'un d'eux reconnaît le récepteur pour les GRM traités. Pour tester cette hypothèse, une incubation simultanée des GRM-AET, de chaque anticorps monoclonal et des lymphocytes T bovins a été réalisée.

Si une compétition existe entre l'anticorps et les érythrocytes pour le même récepteur membranaire des LT, une diminution des rosettes formées sera observée.

Il faut cependant émettre quelques réserves. Bien que disposant d'un témoin négatif (PBS) nous ne disposons pas d'un témoin positif inhibant effectivement de manière intégrale ou partielle la formation des rosettes.

Résultat.

A la vue des résultats du tableau 11, on pourrait exiger des expériences complémentaires pour le 17A3. Il ne faut pas oublier que ce dernier réagit avec les PMN et les cellules adhérentes: deux classes cellulaires n'étant pas impliquées dans le phénomène des rosettes. Le récepteur que les LT partagent avec les PMN et les cellules adhérentes, spécifié par le 17A3, ne peut correspondre à celui impliqué dans le phénomène des rosettes AET.

Le 1D4, lui aussi, donne un résultat quelque peu inférieur. Nous ne pouvons pas parler d'inhibition, mais peut-être d'un encombrement stérique sur la membrane des LT du à la structure des IgM.

Le 8C11 et 12D8 ne spécifient pas le récepteur des lymphocytes T impliqué dans ce phénomène. Les résultats étant analogues au témoin négatif.

Récapitulatif.

Nous avons bien obtenu trois anticorps monoclonaux spécifiques des LT, et le 17A3 reconnaissant également les PMN, les monocytes et les macrophages (cfr tableau 6 et 9).

Le 8C11 et 12D8 se ressemblent énormément, quoique ne provenant pas de la même fusion, ils spécifient les LT, ont une même isotypie, et ne reconnaissent pas le récepteur pour les GRM traités à l'AET.

Le PM de l'antigène cible permettrait de préjuger de l'homologie ou non de ces anticorps monoclonaux.

Nous avons pour tester cette hypothèse, fait le test suivant.

dilution du monoclonal froid	témoin positif pour le 8C11: cpm du 8C11 fixé	témoin positif pour le 12D8: cpm du 12D8 fixé
1	1335.00	552.00
2	1241.00	477.00
4	1422.00	585.00
8	1643.00	610.00
16	1613.00	703.00
32	1709.00	695.00
64	1756.00	780.00
128	1610.00	1135.00
256	1810.00	1187.00
512	2112.00	1041.00
1024	2234.00	1041.00

Tableau 13 Témoin positif du test de compétition

dilution du 12D8 froid	cpm du au 8C11 ⁺ fixé aux cellules	dilution du 8C11 froid	cpm du au 12D8 ⁺ fixé aux cellules
1	2154.353	1	903.8101
2	2471.622	2	1089.351
4	2154.548	4	810.1074
8	2188.617	8	999.6619
16	2201.317	16	883.7019
32	1897.101	32	990.8967
64	2023.519	64	899.8528
128	2314.558	128	1052.298
256	3077.497	256	1039.276
512	2590.517	512	1043.829

Tableau 14 Test de compétition entre un anticorps froid en dilution et un anticorps chaud en dilution optimale.

E. Test de compétition entre Anticorps monoclonaux.

Ce test s'effectue comme décrit auparavant (cfr 2.4.3.)

Le principe du test est le suivant: après marquage des cellules avec le premier anticorps froid en dilution - 12D8 ou 8C11 - , on incube les cellules avec le deuxième anticorps chaud à une dilution pour laquelle la fixation sur l'antigène est maximale - 8C11* ou 12D8*, respectivement -.

Si une compétition pour le même récepteur existe, en raison d'une dilution croissante du premier anticorps (froid), celui-ci occupera de moins en moins de sites que le deuxième anticorps (chaud) pourra reconnaître et on relèvera une augmentation de la radioactivité fixée aux cellules.

Dilution optimale de l'anticorps monoclonal chaud.

Il faut avant d'effectuer le test de compétition, connaître la dilution à laquelle la fixation de l'anticorps monoclonal radioactif, tout en restant maximale, est très sensible à une influence inhibitrice. Cette fixation est visualisée grâce à la radioactivité liée aux cellules cibles.

8C11* - Les résultats en duplicate révèlent un optimum de fixation pour l'anticorps monoclonal utilisé pur (cfr tableau 12). C'est donc comme tel que nous l'emploierons dans ce test.

12D8* - Les résultats sont également optimaux à cette dilution.

Contrôle.

Les témoins positifs consistent en ceci: après marquage des cellules par le 8C11 (12D8) froid en dilution, on incube les cellules avec le même anticorps monoclonal mais cette fois, chaud et à la concentration prédéterminée, c-à-d le 8C11* (12D8*).

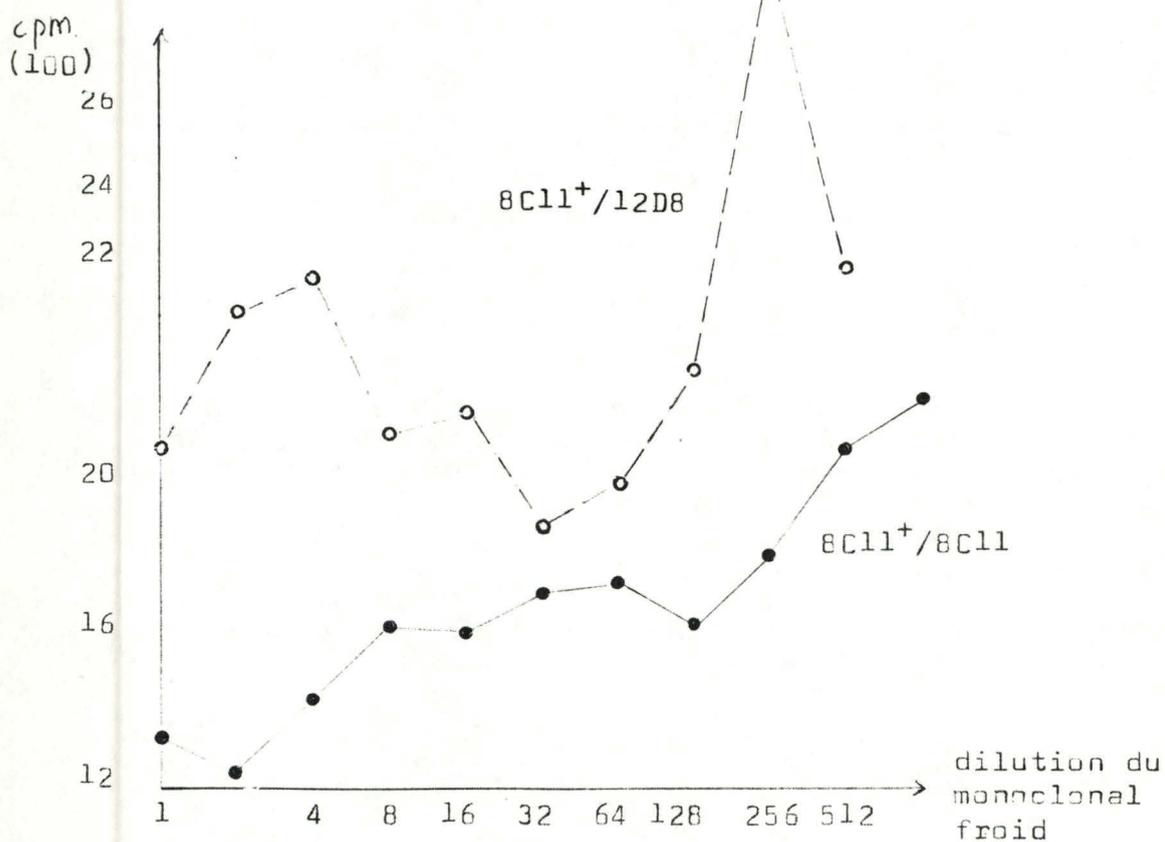
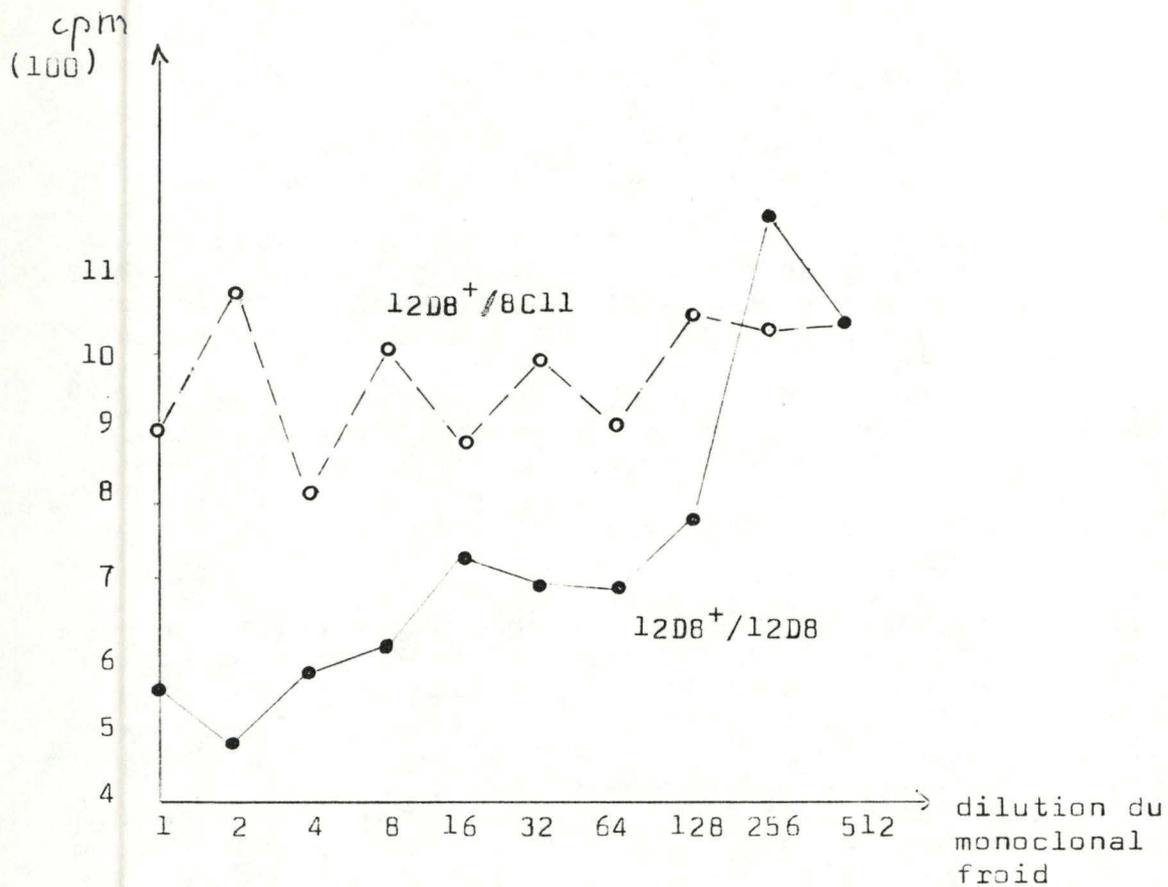
Les courbes de radioactivité augmentent comme attendu (tableau 13).

Test

Les courbes témoins montrent une inhibition incomplète (cpm à l'origine différents de 0). Il faut signaler que les anticorps monoclonaux chauds et froids ont été obtenus dans les mêmes conditions et en même concentration.

Une compétition, mise en évidence par un niveau de RA croissant au fil des dilutions de l'anticorps froid, se fera jour - soit dans les deux tests, si le 8C11 et 12D8 spécifient le même épitope et ont une affinité comparable; un encombrement stérique, du à une proximité des épitopes, provoque une compétition également;

-soit dans un seul des tests, si le 8C11 a plus d'affinité que le 12D8. Le premier déplacera le second mais ne sera jamais déplacé. Ceci est vrai dans l'autre sens également.



Graphiques 1 et 2
 Contrôles et tests de compétition
 entre 2 anticorps monoclonaux.

RESULTATS ET DISCUSSION

12D8* en compétition avec 8C11.

On ne peut parler de compétition, la courbe témoin étant bien plus catégorique. Un encombrement stérique est sans doute en cause et explique cette légère diminution du niveau de R.A. (tableau 14). Les points se situent à peu près sur une droite, équivalente au niveau maximum de fixation du 12D8* fixé lors du contrôle (12D8*/12D8).

8C11* en compétition avec 12D8.

Le niveau de R.A. est très instable et varie énormément d'une dilution à l'autre. Du à une mauvaise répartition cellulaire dans les puits ou à une découpe des puits, cette découpe se fait au moyen d'un fil chauffant qui peut entraîner des dégâts cellulaires, pouvant biaiser les résultats (cfr. 2.4.3.). Il reste que le niveau de radioactivité est généralement supérieur au témoin (graphiques 1 et 2).

Vu que le 8C11 ne déplace pas le 12D8*, ce dernier ne reconnaît pas le même épitope ou, si c'est le cas, il a plus d'affinités que le 8C11 pour le même site antigénique. Mais comme le 12D8 ne déplace pas le 8C11 (niveau de R.A. est supérieur au niveau du contrôle, l'épitope reconnu par 12D8 semble différer de celui que reconnaît le 8C11.

Un petite inhibition peut résulter d'un encombrement stérique, témoignant d'une proximité de ces deux épitopes (n'oublions pas que ces deux anticorps monoclonaux spécifient la même population cellulaire).

Ces épitopes différents peuvent appartenir à la même protéine; dans ce cas, la nomenclature actuelle les considérerait sous le même nom. Mais pour s'en assurer, il faut à tous prix déterminer le PM de l'antigène cible de l'un et de l'autre.

Tableau 14A Récapitulatif des caractéristiques des anticorps monoclonaux étudiés

Anticorps monoclonaux	Distribution cellulaire	Distribution tissulaire	Isotypie	P.M. de l'antigène d	Reconnaissance du récepteur pour GRM-AET	Epitope reconnu
17A3	LT PMN ∅ adh.	--	IgG2a	104.000 N.R. 104.000 R. 17.000 R.	--	sur antigène particulier commun aux LT, PMN et cellules adhérentes
8C11	LT	--	IgG2a	--	--	épitope différent
12D8	LT	aire des cellules T	IgG2a	--	--	
1D4	LT	--	IgM	nd	--	nd

N.R. = en conditions non réductrices

R. = en conditions réductrices

∅ adh. = cellules adhérentes

nd = non déterminé

CONCLUSIONS

Animal 1			Animal 2		
16,5 %	LH4	positives	70 %	LH4	positives
57,5 %	8C11	positives	84 %	8C11	positives
7 %	LH4 et 8C11	positives	66,5 %	LH4 et 8C11	positives
33 %	LH4 et 8C11	négatives	13 %	LH4 et 8C11	négatives

Tableau 15 Illustration de stades de lymphocytose chez des animaux infectés par le BLV.

CONCLUSIONS

Ce travail démontre que la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de protéines de certaines classes cellulaires est réalisable.

Il reste cependant à affiner les données obtenues ou les techniques mises au point.

C'est ainsi que l'on devra notamment déterminer le PM des antigènes reconnus par le 8C11, le 1D4, le 12D8. Il serait intéressant également de rechercher quel pourrait être le rôle fonctionnel des antigènes reconnus à la surface des lymphocytes T par ces monoclonaux.

Au niveau technique, l'adaptation en routine d'un double marquage en immunofluorescence serait un progrès notable. Néanmoins la spécificité de ces anticorps est d'ores et déjà suffisamment déterminée pour permettre des études qui, sans ces réactifs, ne pourraient être entreprises.

C'est ainsi que nous avons eu l'occasion de comparer la répartition en sous-populations de cellules mononucléées provenant d'animaux infectés par le BLV (Bovin leukemia Virus) et de les comparer à des animaux sains (Dr. Mammerix INRV). Il nous est apparu que le monoclonal 8C11 reconnaissait chez les animaux infectés non seulement les lymphocytes T, mais également un pourcentage de lymphocytes B (pourcentage directement proportionnel à l'intensité de la lymphocytose). Rappelons que chez un individu normal le 8C11 ne reconnaît pas les lymphocytes B. Le tableau 15 illustre une partie de ces résultats. Des recherches complémentaires sont en cours en collaboration avec le Professeur A. Burny (ULB) pour vérifier si ces cellules B exprimant l'antigène "8C11" ne sont pas également celles qui voient l'expression d'antigènes viraux.

De telles observations obtenues avec ces outils performants que sont les anticorps monoclonaux, ouvrent de larges champs d'investigation et ne peuvent qu'encourager à produire des réactifs monoclonaux pouvant aider à disséquer et à mieux comprendre le système immunitaire bovin.

BIBLIOGRAPHIE

Références Bibliographiques

- Aquila H.L., Pollckr R.R., Spira G., Scharff M.
The production of more useful monoclonal antibodies.
Immunology Today
7(12): 380-385; 1986
- Barsky G., Sorieul S, Cornefect F.
Production dans des cultures "in vitro" de deux souches
cellulaires en association de cellules hybrides.
C.R. Acad. Sci. (Paris)
251: 1825-1827; 1960
- Batsen A., Miller J.F., Spent J. and Pye J.
A receptor for antibody on B lymphocytes. Method of detection
and functional signifiante.
J. Exp. Med.
135: 610; 1972
- Batsen A., Warner N.L. and Mandel T.
A receptor for antibody on B lymphocytes. II. Immunochemical
and electron microscopy characteristics.
J. Exp. Med.
135: 627; 1971
- Benacerraf B. and McDevitt H.O.
A new class of genes that controls the formation of specific
immune responses has been identified.
Science.
175: 273; 1972
- Coombs R.R.A, Gurner B.W., Wilson A.B., Holm G. and Eindgren B.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.
39: 658; 1970
- Deqos J.
Les lymphocytes T.
Médecine/Sciences.
3: 229-230; 1987

- Dialynas et al.
Unpublished observations tiré de,
Bluestone J. and Hodes R.
Cell-surface molecules involved in T-cell functions.
Immunology Today.
4 (9): 256-259; 1983
- Elzinga M., Collins J.H., Kuehl W.M. Adelstein R.S.
Complete amino-acid sequence of actine of rabbit skeletal
muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
70: 2687-2691; 1973
- Evans R.L., Breard J.N., Lazarus H., Stuart F., Schlossman
and Chess L.
Detection, isolation and functional characterization of two
human T cell subcasses bearing unique differentiation antigens.
J. Exp. Med.
145: 221-233; 1977
- Faure M. Dupouey P. Morelec M.-J.
Les techniques de l'immunofluorescence et les réactions immu-
no-enzymatiques.
Ed. Maloine S.a.
1977
- Fulwyler M.
Flox cytometry and cell sorting.
Blood Cells.
6: 173-189; 1980
- Giloh H. Sedat J. W.
Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine
and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate.
Science.
217: 1252; 1982

- Goding J.W.
Use of staphylococcal protein A as immunological reagent.
J. Immunol. Methods.
20: 241-253; 1978
- Gupta S. and Good R.A.
Markers of human lymphocyte subpopulation in primary immunodeficiency and lymphoproliferative disorders.
Semin. Hematol.
17: 1; 1980
- Herzenberg L., Herzenberg I.
Analysis and separation using the fluorescence activated cell sorter.
in: Handbook of experimental immunology
Blackwell Scientific Publications
Cha. 22: 1-20; 1978
- Hoefsmid et al.
Immunobiol.
161: 255; 1982
- Hudson L. Hay F.L.
in: Practical immunology.
Blackwell Scientific Publications.
1976
- Janossy G. Greaves M.F.
Lymphocyte activations 1. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens.
Clin. Exp. Immunol.
9: 483-489; 1971
- Johnson D.G., de C. Noqueira Aranjó G.M.
A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy.
J. Immunol. Meth.
43: 349-350; 1981

- Jones P.P.
Analysis of H-2 and Ia molecules by two dimensional gel electrophoresis.
J. Exp. Med.
146: 1261-1278; 1977
- Katz D.H., Benacerraf B.
Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes VII. Cooperative responses between lymphocytes are controlled by genes in the I regions of the H-2 complex.
J. Exp. Med.
141: 263-268; 1975
- Klein J.
The major histocompatibility complex of the mouse.
Science.
203: 516-521; 1979
- Köhler G., Milstein C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity.
Nature.
256: 495-497; 1975
- Lehninger A.L.
Biochimie.
Flammarion Médecine Science.
1981
- Letesson J.-J., Lostrie N., Depelchin A.
Production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'isotypes d'immunoglobulines bovines.
Ann. Méd. Vét.
129: 131-141; 1985
- Letesson J.-J., Coppe Ph., Lostrie N., Greimers R., Depelchin A.
Production and characterization of monoclonal antibodies raised against BOLA Class I antigens.
Vet. Immun. and Immunopath.
13: 213-226; 1986

- Letesson J.-J.
Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de produits du complexe majeur de l'histocompatibilité bovine (BOLA).
Thèse de Doctorat.
1986
- Litterfield J.
Selection of hybrids from mating of fibroblast "in vitro" and their presumed recombinants.
Science.
145: 709-710; 1964
- Marchalonis J.J.
An enzymatic method for the radioiodination of immunoglobulins and other proteins.
Biochem. J.
113: 299-305; 1969
- Marrack et Kappler
Les lymphocytes T et ses récepteurs.
Pour la Science.
18-28; 1986
- Meuer S.C., Schlossman S.F., Reinherz E.L.
Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4⁺ and T8⁺ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
79: 4395-4399; 1982
- Miller J.F. and Osoba D.
Current concepts of the immunological function of the thymus.
Physiol. Rev.
47: 437; 1967

- Miller J.F. and Sprent J.
Thymus derived cells in mouse thoracic duct lymph.
Nature (New Biol.) London.
230: 267; 1971
- Morrison W.I., Goddeeris B.M., Teale A.J., Baldwin C.L.,
Bensaid A. and Ellis J.
Cell-mediated immune responses of cattle to *Theileria parva*.
Immunology Today.
7: 211-215; 1986
- Nagahata H., Funahashi T., Noda H.
Standardization of bovine E-rosette assay and enumeration of
lymphocyte subpopulations.
Jpn. J. Vet.
46 (6): 815-821; 1984
- Nairn R.C.
Fluorescent protein tracing.
Churchill Livingstone, Medical division of Longman group Ltd.
1976
- Norwood T., Zeidler C., Martin G.
Dimethyl sulfoxide enhances PEG mediated somatic cell fusions.
Somatic Cell Genet.
2: 263-270; 1976
- Rabellino E., Colon S., Grev H.M. and Unanue E.R.
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
J. Exp. Med.
133: 156; 1971
- Raff M.C., Owen J.J.T.
Thymus derived cells and their distribution and role in the
development of peripheral lymphoid tissues of the mouse.
Eur. J. Immunol.
1: 27; 1971

- Reinherz E.L. and Schlossman S.F.
The differentiation and function of human T lymphocytes T.
Cell.
19: 821-827; 1980
- Reinherz E.L. and Schlossman S.F.
The characterization and function of human immunoregulatory
T lymphocytes subsets.
Immunology Today.
1: 69-74; 1981
- Reinherz E.L., Meuer S., Fitzgerald K.A., Hussey R.E.,
Levine H. and Sclossman S.F.
Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to sur-
face expression of the T3 molecular complex.
Cell.
30: 735-743; 1982
- Roitt I., Brostoff J., Male D.
Immunologie fondamentale et appliquée.
Médecine et Sciences Internationales (Paris)
1985
- Rossi C.R., Campos M., Ghanekar S. V. and Panangala V.S.
A monoclonal antibody that identifies nature T lymphocytes
of cattle.
Vet. Immun. and Immunopath.
11: 319-324; 1986
- Shaw S.
Characterization of human leukocyte differentiation antigens.
Immunology Today.
8: 1-3; 1987
- Silver J., Hood L.
Detergent solubilized H-2 alloantigens is associated with a
small molecular weight polypeptide.
Nature.
249: 764-765; 1974

- Spooner R.L., Leveziel H., Groseclaude F., Olivier R.A.,
Vaiman M.
Evidence for a possible M.H.C. in cattle.
J. Immunogenet.
5: 335-346; 1978
- Swain S.L.
Significance of Lyt phenotypes: Lyt 2 antibodies block activities of T cells that recognize class 1 major histocompatibility complex antigens regardless of their function.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
78 (11): 7101-7105, 1981
- Terhorst C., Van Adthoven A., Reinherz E.L., Schlossman S.F.
Excitatory and inhibitory effects of serotonin on sensorimotor reactivity measured with acoustic startle.
Science.
209; 1980
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.
Electrophoretic transfer of protein from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
76: 4350-4354; 1979
- Trucco M.M., Stocker J.W., Cepellin R.
Monoclonal antibodies against human lymphocyte antigens.
Nature.
273: 666; 1978
- Truffa-Bachi P. et Leclerc C.
Comment les cellules coopèrent pour défendre l'organisme.
La Recherche.
17: 642-709; 1986
- Veys E.M., Hermans P., Schindler J., Kung P.C., Goldstein G., Symoens J and Van Wauwe J.
Evaluation of T cell subsets with monoclonal antibodies in

patients with rheumatoid arthritis.

J. Rheumatol.

In press.

- Werdelein O.

T cells recognize antigen alone and not MHC molecules.

Immunology Today.

8: 80-84; 1987