



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Étude des antigènes d'histocompatibilité du bovin (Bola) par électrophorèse en deux dimensions

Uytters, Barbara

*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

FACULTE DES SCIENCES

Unité de Microbiologie et d'Immunologie Appliquée

Promoteur : A. DEPELCHIN

ÉTUDE DES ANTIGÈNES D'HISTOCOMPATIBILITÉ  
DU BOVIN (BOLA) PAR ÉLECTROPHORÈSE  
EN DEUX DIMENSIONS.

UYTTERS BARBARA

ANNÉE 86 - 87

ÉTUDE DES ANTIGÈNES D'HISTOCOMPATIBILITÉ DU BOVIN (BoLA) PAR  
ÉLECTROPHORÈSE EN DEUX DIMENSIONS.

UYTTERS BARBARA

Résumé

L'étude du polymorphisme des antigènes d'histocompatibilité bovins (BoLA) par les techniques habituelles (Sérologie) souffre de sévères limitations.

Au cours de ce travail, nous avons adapté à nos besoins une analyse biochimique de ce polymorphisme.

La technique utilisée est une électrophorèse en double dimension (IEF 5-7/SDS) appliquée soit à des antigènes d'histocompatibilité purifiés soit à des molécules immunoprécipitées par un monoclonal anti-BoLA (classe I) à partir du lysat de cellules mononuclées marquées isotopiquement ( $S^{35}$  méthionine).

Il ressort de ce travail que la méthode employée est capable de démontrer une hétérogénéité moléculaire des antigènes BoLA (classe I) à la fois chez un même individu et entre divers individus bovins.

Cette hétérogénéité moléculaire n'est pas imputable à une modification artéfactuelle des protéines étudiées.

Elle ne peut pas plus s'expliquer entièrement par des différences de glycosylation d'un polypeptide unique.

Nous avons également montré, que cette méthode est simplifiable et pouvait se réduire à une analyse en une seule dimension (IEF 5-7) à condition de s'assurer de l'efficacité totale des procédures de déglycosylation.

Mémoire de Licence en Sciences Biologiques

Juin 1987

Unité de Microbiologie et d'Immunologie Appliquée

Promoteur : Prof. A. DEPELCHIN

Je remercie le Docteur A. Depelchin d'avoir accepté de promouvoir ce mémoire.

Je remercie tout particulièrement le Docteur J.-J. Letesson pour sa collaboration, sa disponibilité et sa gentillesse.

Mes remerciements vont également à Madame N. Lostrie-Trussart, Madame M. Albert-Mulumba, Monsieur C. Didembourg et Madame Didembourg pour leur aide technique et leur sympathie.

Je remercie aussi le Docteur Mainferme, le Professeur Feytmans et le Département d'Histologie pour m'avoir permis l'accès à leur laboratoire, ainsi que Madame M.M. Gonze pour ses quelques conseils.

Je remercie enfin tous ceux qui, à leur manière, ont participé à la réalisation, la rédaction et l'impression de ce travail.



## Table des matières

### **Introduction**

#### **I. Complexe Majeur d'Histocompatibilité**

1.1. Généralités	1.
1.2. Complexe majeur d'histocompatibilité	2.
1.3. Organisation du CMH chez l'homme	4.
1.3.1. Localisation du système HLA	5.
1.3.2. Les antigènes de classe I	5.
1.3.2.1. Structure des antigènes de classe I	6.
1.3.2.2. Rôle des antigènes de classe I	8.
1.3.2.3. Autres molécules de classe I	9.
1.3.3. Les antigènes de classe II	9.
1.3.3.1. Structure des antigènes de classe II	10.
1.3.3.2. Rôle des antigènes de classe II	11.
1.3.4. Les antigènes de classe III	11.
1.4. Le complexe majeur d'histocompatibilité chez les bovins	12.
1.4.1. Classe I	12.
1.4.2. Classe II	13.
1.5. Intérêt des recherches en histocompatibilité	13.
1.5.1. Chez l'homme	13.
1.5.2. Chez le bovin	14.
1.6. Moyens d'investigation du système CMH	14.
1.6.1. Etude des produits du CMH	15.
1.6.1.1. L'approche sérologique	15.
1.6.1.2. L'approche cellulaire	16.
1.6.1.3. L'approche biochimique	16.
1.6.2. Etude du génome	16.

## **II. But du travail**

- 2.1. But du travail 18.
- 2.2. Justification de l'analyse biochimique du polymorphisme CMH chez les bovins. 19.

## **Matériels et Méthodes**

### **I. Anticorps monoclonaux utilisés** 20.

### **II. Préparation des antigènes d'histocompatibilité** 20.

- 2.1. Antigènes purifiés 21.
  - 2.1.2. Préparation de l'extrait antigénique brut 21.
  - 2.1.2. Chromatographie d'affinité 22.
- 2.2. Antigènes préparés par immunoprécipitation 23.
  - 2.2.1. Préparation des cellules 24.
    - A. Lignée bovine myéloïde établie 24.
    - B. Cellules mononuclées du sang périphérique stimulées à la phytohémagglutinine 25.
      - 1. Obtention 25.
      - 2. Stimulation à la phytohémagglutinine 26.
  - 2.2.2. Marquage isotopique par voie métabolique 26.
  - 2.2.3. Extraction des protéines membranaires 27.
  - 2.2.4. Mesure de la radioactivité précipitable 28.
  - 2.2.5. Immunoprécipitation 28.
  - 2.2.6. Déglycosylation 30.
    - A. Neuraminidase 31.
    - B. Tunicamycine 31.

### **III. Analyse**

3.1. Processus électrophorétique	32.
3.1.1. Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de poly-acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	32.
3.1.2. Electrophorèse bidirectionnelle	35.
3.1.3. Transfert électrophorétique de protéines sur feuille de nitrocellulose	42.
3.2. Détection	42.
3.2.1. Coloration au bleu de Coomassie	42.
3.2.2. Autoradiographie	43.
3.2.3. Détection immunoenzymatique	44.

## **Résultats et discussions**

### **I. Mise au point de l'électrophorèse en deux dimensions** 45.

### **II. Les antigènes purifiés** 51.

2.1. Analyse sur gel NEPHGE	52.
2.2. Analyse sur gel IEF - comparaison des antigènes entre deux bovins	54.
2.3. Analyse sur gel IEF - plusieurs comparaisons des antigènes des deux mêmes bovins	57.

### **III. Etude à partir des cellules** 59.

3.1. Mise au point de l'immunoprecipitation	59.
3.2. Les antigènes BoLA de classe I des lymphocytes activés à la PHA	63.
3.3. Les antigènes BoLA de classe I des cellules de lignée myéloïde	66.

IV. Gel IEF en une dimension

69.

**Conclusions et Perspectives**

73.



# INTRODUCTION

## Abreviations

CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilite
HLA	:	Human Leukocyte Antigens
BoLA	:	Bovine Leukocyte Antigens
Ag	:	Antigène
Ac	:	Anticorps
NP40	:	Nonidet P-40
SDS-PAGE	:	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TCA	:	Acide Trichloracétique
$\beta_2$ ME	:	Bêta 2 Mercapto éthanol
CPM	:	Coups par minute
PM	:	poids moléculaire
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
DOC	:	Deoxycholate
Ig	:	Immunoglobuline
TEA	:	Triéthanolamine
FCS	:	Foetal Calf Serum
1D	:	1ère dimension
2D	:	2ème dimension
SAC	:	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan
BSA	:	Albumine bovine sérique
IEF	:	Isoelectric focusing
NEPHGE	:	Non Equilibrium pH Gradient Electrophoresis
APS	:	ammonium persulfate
BBP	:	bleu de bromophénol
DMSO	:	diméthylsulfoxyde
PPO	:	2,5-diphényloxazole

## INTRODUCTION

### I. Complexe majeur d'histocompatibilité

#### I.1. Généralités

On sait depuis longtemps que le succès des transfusions sanguines dépend des groupes érythrocytaires du donneur et du receveur.

Landsteiner en 1931 émit l'hypothèse que des analogues des groupes érythrocytaires pouvaient être impliqués dans le succès des greffes d'autres tissus. Cette idée conduisit Görer a identifier en 1936, chez la souris, un groupe d'antigènes pour lequel la compatibilité entre donneur et receveur prolongeait nettement la survie des greffes : on leur donna le nom d'antigènes d'histocompatibilité. Ces antigènes sont les produits d'une région particulière du génome dénommée le "complexe majeur d'histocompatibilité" (CMH).

Des CMH ont été identifiés chez toutes les espèces de vertébrés étudiées. (voir tableau 1).

ESPECES	APPELLATION DU COMPLEXE
POULET	B
HOMME	HLA
CHIMPANZE	ChIA
MACAQUE RHESUS	RhIA
CHIEN	DLA
PORC	SLA
LAPIN	RLA
RAT	AqB
COBAYE	GPLA
CHEVRE	GLA
MOUTON	OLÁ
CHEVAL	ELA
BOVIN	BoLA

Tableau 1. Liste des principales espèces ayant fait l'objet d'études d'histocompatibilité



Le CMH a été à l'origine étudié à travers ses effets dans le rejet des greffes; mais il est maintenant reconnu que les protéines codées par cette région sont impliquées dans de nombreux aspects de la reconnaissance immunitaire, comme l'interaction entre lymphocytes et cellules présentatrices de l'antigène, ou l'interaction entre différentes cellules lymphocytaires. Et peut-être même dans des phénomènes plus vastes de reconnaissance de cellule à cellule dont l'implication dans les phénomènes immunitaires ne serait qu'une application particulière.

Signalons en outre, qu'en plus du CMH qui nous intéresse plus particulièrement, il existe divers complexes d'histocompatibilité dit "mineurs" qui sont distincts du CMH et n'interviennent que faiblement au niveau du rejet des greffes.

## **1.2. Complexe majeur d'histocompatibilité**

On désigne par "complexe majeur d'histocompatibilité" un segment chromosomique complexe portant un ensemble de gènes fonctionnellement et topographiquement liés (gènes H.), contrôlant l'expression de signaux membranaires et sériques (antigènes H.), intervenant entre autre dans divers mécanismes fondamentaux de l'immunologie.

### **Caractéristiques générales**

Le CMH peut se définir comme un système polygénique, polyallélique et codominant.

- Le CMH est polygénique car constitué d'un groupe de loci étroitement liés.



- Il est aussi polyallélique : pour la plupart des loci, on a pu définir de longues séries alléliques et donc autant de variantes dans les protéines-produits de ces gènes. Chaque allèle à chaque locus détermine la présence au niveau de la membrane cellulaire d'une molécule porteuse d'un ou plusieurs déterminants antigéniques (= épitopes) constitués par des motifs architecturaux réalisés par les replis dans l'espace de la chaîne protéique (déterminant conformationnel) ou par l'enchaînement d'un certain nombre de résidus acides aminés successifs (déterminant séquentiel).

Chaque produit allélique est donc défini par un ensemble de spécificités antigéniques, certaines figurent exclusivement sur un allèle particulier : elles sont qualifiées de privées; les autres qui peuvent être communes à plusieurs produits alléliques sont les spécificités dites publiques.

Une combinaison particulière d'allèles de tous les gènes du CMH s'appelle un haplotype.

- Il est codominant parce qu'un individu hétérozygote, possédant 2 haplotypes génétiquement différents par rapport à l'individu homozygote qui ne présente qu'un seul haplotype, exprimera à la fois l'haplotype paternel et l'haplotype maternel.
- Les antigènes d'histocompatibilité représentent un modèle unique de polymorphisme génétique c'est-à-dire que les produits de gènes polymorphes font preuve d'une grande diversité allélique par opposition aux protéines monomorphes qui présentent une séquence d'acides aminés identique chez tous les individus d'une même espèce (ex : l'hémoglobine). Ce très grand polymorphisme des antigènes d'histocompatibilité est favorisé par sélection naturelle et est indispensable au fonctionnement

- optimal du CMH : c'est en effet la présence d'un grand nombre d'allèles qui permet à chaque individu de disposer d'une combinaison antigénique originale responsable non seulement de sa spécificité antigénique, mais aussi de sa capacité immunologique, à tel point que l'on peut parler de complexe majeur de l'immunité (Dausset, 1985).
- Le CMH est composé d'un ensemble de gènes, chacun de ces gènes ayant une fonction immunologique précise par l'intermédiaire des antigènes qu'il synthétise.  
Selon la nature, la localisation et la fonction de ces antigènes, on peut les regrouper en 3 classes dénommées classes I, II et III.
  - Comme le CMH est présent sous une forme remarquablement similaire chez tous les mammifères et peut-être tous les vertébrés et que le CMH a été plus particulièrement étudié chez l'homme et la souris, je choisirai le CMH humain comme modèle de référence, notamment pour son grand polymorphisme et pour le fait qu'il existe de nombreuses réactions croisées tant au niveau produit, qu'au point de vue génomique entre le CMH humain et le CMH bovin.

### **1.3. Organisation du CMH chez l'homme**

En 1956, Dausset découvrit que le sérum de sujets polytransfusés ou de femmes multipares contenaient des anticorps agglutinant les leucocytes de certains individus. Par la suite, il est apparu que ces antigènes leucocytaires étaient contrôlés par un système génétique complexe, désigné complexe HLA (Human Leukocyte Antigens).



### 1.3.1 Localisation du système HLA

Le complexe HLA est porté par le petit bras de la 6ème paire de chromosomes.

On distingue parmi les molécules pour lesquelles il code :

- des antigènes de classe I : HLA-A, B et C
- des antigènes de classe II : HLA-DR, DQ et DP
- des antigènes de classe III : C<sub>2</sub>, Bf, C<sub>4</sub>A et C<sub>4</sub>B.

(voir figure 1).

**Le CMH humain.** Une carte génétique de la région du chromosome 6 chez l'homme montre le complexe HLA : les régions B, C et A codent pour les molécules de classe I, la région D code pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des protéines de classe 2, SB, DC, DR respectivement porteuses des spécificités DP, DQ et DR

La région entre D et B code pour les protéines de classe 3 (complément) comprenant les allèles de C4 et les gènes pour C2 et le facteur B (Bf). Les peptides sont représentés entre 2 tirets quand l'ordre précis de leurs gènes n'est pas encore déterminé.

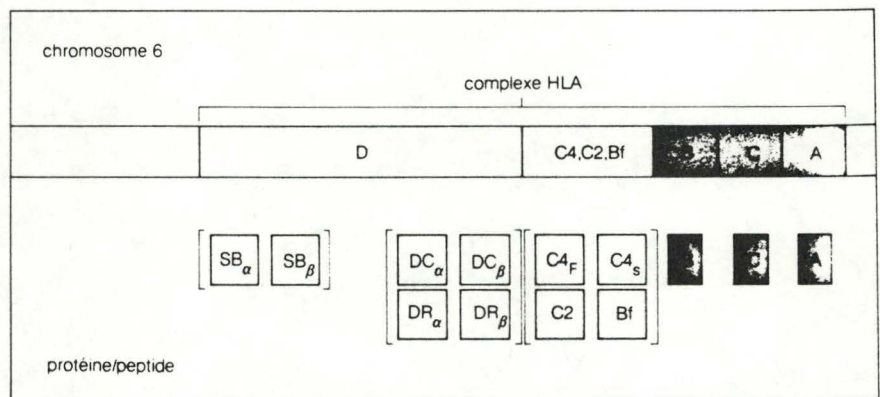


Fig. 1. Le CMH humain.

### 1.3.2. Les antigènes de classe I

Les antigènes de classe I sont codés par les loci A, B, C du système HLA. Ces antigènes sont exprimés à la surface de la majorité des cellules nucléées.

Puisque 3 loci sont responsables de leur apparition membranaire, on peut obtenir chez un individu hétérozygote à tous les loci l'expression membranaire de 6 molécules différentes.

Les produits de ces divers loci existent sous plusieurs formes alléliques, c'est ainsi que l'on connaît actuellement 23 allèles du gène du locus HLA-A, 43 pour HLA-B et 8 pour HLA-C (Kindt et Robinson, 1984).

Grâce à des techniques basées sur la digestion protéolytique des protéines membranaires, on a pu isoler ces antigènes de classe I et étudier leur constitution.

### 1.3.2.1. *Structure des antigènes de classe I*

Les antigènes de classe I sont des glycoprotéines qui comprennent :

- une chaîne polypeptidique glycosylée (chaîne lourde) de PM de 45000 daltons. Cette chaîne codée par le CMH présente 3 domaines globulaires ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ ). Le domaine  $\alpha_3$  est associé à un peptide non codé par le CMH, appelé  $\beta_2$ -microglobuline (voir figure 2).

Ce petit peptide globulaire de 12000 daltons est nécessaire à l'expression de la molécule de classe I. Le gène de la  $\beta_2$ -microglobuline est situé sur un autre chromosome que le CMH (chromosome 15).

Une courte portion hydrophile de la chaîne codée par le CMH s'insère dans le cytoplasme. La portion hydrophobe traverse la membrane et les 3 domaines globulaires, qui composent l'essentiel du peptide, sont exposés à l'extérieur de la surface cellulaire. Les sites allo-antigéniques (portant des déterminants spécifiques à chaque individu) sont situés sur les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ . Les spécificités sont donc déterminées par la chaîne lourde de la molécule. Les domaines  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  possèdent un pont central disulfure



- une partie glucidique (voir figure 3) :

l'asparagine en position 86 représente le site d'attachement d'une chaîne hydrocarbonée qui comporte du mannose, du fucose, du galactose, de la N-acétylglucosamine et plusieurs résidus d'acide sialique (D. Charron, 1985).

Cette partie glucidique semble ne présenter que de faibles propriétés antigéniques.

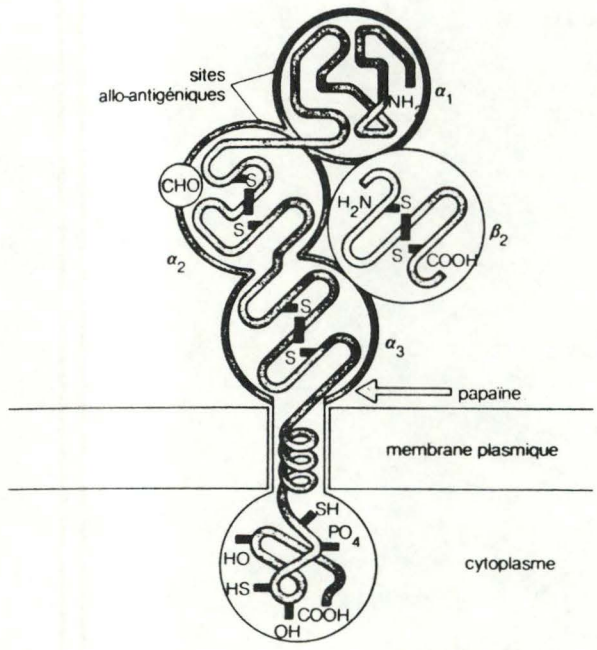
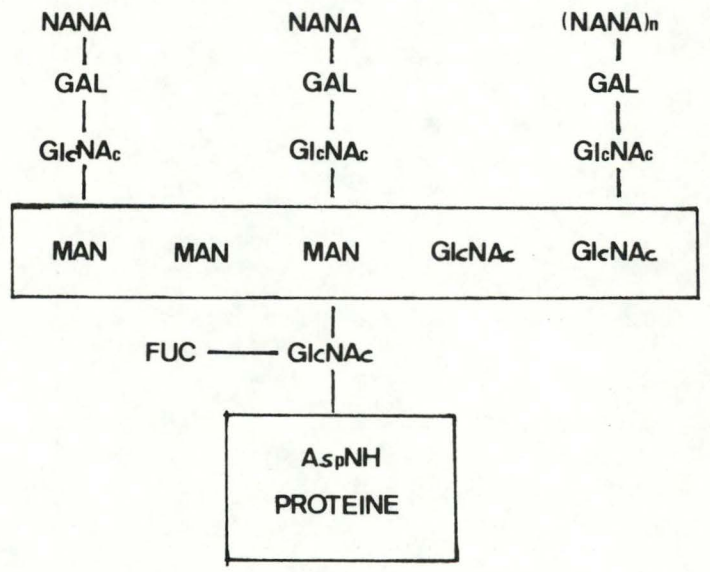


Fig. 2. Structure d'un antigène de classe I (HLA-A, B, C).



- NANA : ACIDE SIALIQUE
- GAL : GALACTOSE
- GlcNAc : GLUCOSAMINE
- MAN : MANNOSE
- FUC : FUCOSE
- AspNH : ASPARAGINE

Fig. 3. Structure de la partie glucidique des antigènes de classe I.

### 1.3.2.2. *Rôle des antigènes de classe I*

Les antigènes de classe I sont des structures se trouvant en antenne à la surface de toutes les cellules et ils jouent un rôle prépondérant dans la réponse immune à médiation cellulaire déclenchée lors d'une action antivirale ou dans la lutte contre les cellules cancéreuses.

Les cellules T cytotoxiques reconnaissent les molécules HLA-A, B et C portées par des cellules étrangères et elles détruisent ces cellules étrangères. La plupart des cellules infectées par des virus portent des antigènes viraux sur leur membrane plasmique. Il a été démontré que les cellules T cytotoxiques reconnaissent ces antigènes viraux en association avec les antigènes HLA-A, B et C (du soi) présents sur la surface des cellules infectées : les cellules T cytotoxiques d'un homme infecté par un virus tuent les cellules cibles de même haplotype infectées par le même virus, mais pas des cellules d'un haplotype différent infectées par ce virus. Ce phénomène est dit "de restriction CMH" (restriction allogénique).

En fait, les molécules du CMH sur la surface des cellules infectées agissent comme un code, guidant la cellule cytotoxique vers sa cible.

Les modalités de cette double reconnaissance des antigènes viraux et du CMH par les cellules T cytotoxiques sont encore incertaines.

La cellule T cytotoxique peut soit reconnaître indépendamment l'antigène viral et le CMH, soit reconnaître leur combinaison sur la membrane cellulaire, combinaison qui modifierait la molécule du CMH (hypothèse du "soi altéré").

Les cellules T immatures apprennent à discriminer le soi du non-soi dans le thymus ("éducation thymique").



### 1.3.2.3. *Autres molécules de classe I*

Outre les classiques molécules HLA-A, B et C, il existe des molécules qui possèdent des caractéristiques structurales semblables à ces dernières mais qui ne sont exprimées que dans certaines cellules de l'organisme. Ces antigènes représentent probablement les équivalents chez l'homme des antigènes murins de différenciation T1a et Qa codés par le CMH, plus particulièrement exprimés sur les lymphocytes T activés et les cellules leucémiques. Ils sont constitués d'une chaîne lourde de 38 à 43000 daltons associée à la  $\beta_2$ -microglobuline et leur fonction reste encore hypothétique (D. Charron, 1985).

### 1.3.3. Les antigènes de classe II

Les molécules que la région HLA-D gouverne ne sont plus présentes à la surface de toutes les cellules de l'organisme, mais seulement de certaines cellules spécialisées : les lymphocytes B, les lymphocytes T activés, les macrophages (V. Lepage, C. Raffoux, 1985).

La région HLA-D comporte trois sous-régions distinctes : DP, DQ, DR.

Ces sous-régions sont subdivisées en plusieurs loci :

- 1 locus  $\alpha$  et 3 loci  $\beta$  pour DR
- 2 loci  $\alpha$  et 2 loci  $\beta$  pour DQ et DP

La sous-région HLA-DR comprend actuellement 14 allèles, la sous-région HLA-DQ 3 et la sous-région HLA-DP 6.

### 1.3.3.1. *Structure des antigènes de classe II* (voir figure 4)

- Les antigènes de classe II comprennent 2 chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  qui traversent la membrane plasmique et s'associent de façon non covalente dans leur partie extramembranaire. L'extrémité C-terminale s'insère dans le cytoplasme. Les 2 chaînes ont 2 domaines globulaires ( $\alpha_1, \alpha_2; \beta_1, \beta_2$ ), dont la structure rappelle ceux des immunoglobulines.

Tous, à l'exception du domaine  $\alpha_1$ , sont stabilisés par un pont disulfure intracaténaire

La chaîne  $\alpha$  a un PM de 33000 daltons et la chaîne  $\beta$  de 28000 daltons. C'est la chaîne la plus courte, la chaîne  $\beta$ , qui porte les sites allo-antigéniques.

De plus, il a été mis en évidence l'existence d'une 3ème chaîne glycosylée invariante, chaîne Ii d'un PM de 31000 daltons, mais celle-ci reste constamment intracytoplasmique.

- Les chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  sont fortement glycolysées. Il existe sur la chaîne  $\alpha$  deux types d'oligosaccharides, l'un est très riche en mannose, le second est de type complexe. La chaîne  $\beta$  ne comporte qu'un seul branchement oligosaccharidique qui est de type complexe.



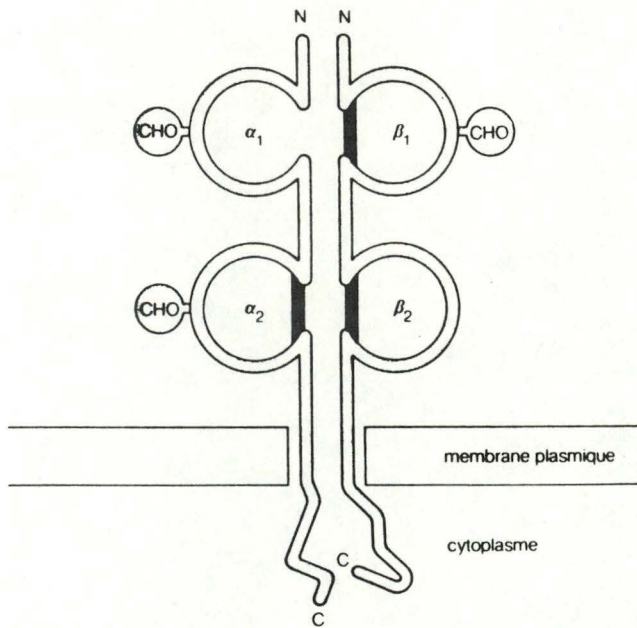


Fig. 4. Représentation schématique d'un antigène de classe II.

### 1.3.3.2. *Rôle des antigènes de classe II*

Des principes de restriction allogénique s'appliquent également aux cellules T helper qui reconnaissent l'antigène en association avec les antigènes de la région D. Dans ce cas, les antigènes de la région D agissent comme des signaux de reconnaissance entre les cellules présentatrices de l'antigène et le lymphocyte.

On peut supposer que, selon la formule génétique des gènes de la région D du complexe HLA que l'homme possède, il sera ou non capable de répondre positivement à un agent extérieur.

### 1.3.4. Les antigènes de classe III

Très proches des loci HLA, ces gènes conditionnent l'apparition de plusieurs composants du complément : C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>A et C<sub>4</sub>B, Bf. On sait que ces composants ainsi que d'autres constituent une chaîne de réactions chimiques qui entraîne l'opsonisation des substances étrangères et la lyse membranaire des bactéries et cellules sur lesquelles sont venus se fixer des anticorps. Ils ont donc une extrême importance dans les réactions immunologiques.

#### **1.4. Le complexe majeur d'histocompatibilité chez les bovins**

L'étude du CMH bovin : BoLA pour Bovine Leukocyte Antigens a dès le début bénéficié d'une large coopération entre différents laboratoires. Comme dans la plupart des espèces, l'immunisation par greffes de peau ou l'injection leucocytaire induit aisément des anticorps lymphocytotoxiques, cependant l'immunisation à la suite de gestation représente la source principale des réactifs. Parmi les femelles primipares, près de 40 % développent des anticorps dirigés en grande majorité contre des antigènes BoLA.

Actuellement, la localisation de ce complexe, par hybridation in situ utilisant une séquence de DNA cloné d'un gène de classe I du CMH du porc montre qu'il est situé sur le chromosome 23 (R. Fries et al., 1986).

##### 1.4.1. Classe I

Les 17 spécificités de classe I actuellement reconnues au plan international semblent toutes correspondre aux produits d'allèles à un même locus, dénommé locus A, toutefois certains auteurs ont décrit l'existence d'un second locus mais qui n'a pas encore été défini sans ambiguïté.

Les expériences d'immunoprécipitations avec des sérums conventionnels ou monoclonaux ainsi qu'une caractérisation biochimique d'un des antigènes BoLA internationalement reconnus (W16) confirment que cet antigène chez le bovin a une structure similaire à celle de molécules analogues d'autres espèces : à savoir, une chaîne lourde de 44000 daltons associée à un petit polypeptide de 12000 daltons qui serait l'équivalent bovin de la  $\beta$ 2-microglobuline (Mark J. Newman et Douglas F. Antczak, 1983, Letesson et al., 1986).



#### 1.4.2. Classe II

La région de classe II bovine a été dénommée D par analogie avec la région D du système HLA. Il a été postulé qu'au moins deux loci de cette région chromosomique contrôlent la MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) chez le bovin (Vaiman, 1985).

Une liaison étroite entre BoLA-A et BoLA-D a été reportée (Spooner 78, Usinger 81). De par l'inexistence de réactifs sérologiques conventionnels ou monoclonaux, il n'est pas possible actuellement de définir une ou plusieurs séries alléliques de classe II. Quoiqu'il en soit, ces molécules chez le bovin ont une répartition cellulaire et une structure comparable à celle des autres espèces (Letesson et al., 1983).

En ce qui concerne les autres groupes de gènes habituellement présents au sein d'un complexe majeur d'histocompatibilité, peu de résultats ont été obtenus.

On suspecte l'existence d'antigènes de classe III mais aucun n'a pu établir formellement l'appartenance des loci impliqués au système BoLA.

### **1.5. Intérêt des recherches en histocompatibilité**

#### 1.5.1. Chez l'homme

L'analyse génétique du système HLA dans les populations et dans les familles et le traitement statistique des résultats a révélé l'existence d'une corrélation entre la combinaison génique (haplotypes) au locus HLA et des anomalies d'ordre immunitaire engendrant des troubles pathologiques (cf. tableaux 2 et 3).

En effet, nombre de maladies apparaissent avec une fréquence accrue parmi les sujets possédant certaines spécificités HLA-ABC et/ou D/DR. Il s'agit d'une perturbation du contrôle du HLA sur le système immunitaire.



HLA	Maladies	Fréquences (%)		RR	Liaison
		Malades	Témoins		
A1	m. de HODGKIN	40	32	1.4	Possible, intermédiaire Excès d'antigènes en communs chez les parents
A2	Leucémie Aigue Lymphoblastique				
A3	Hémochromatose idiopathique	76	28	8.2	
B5	m. de Behcet	41	10	6.3	Prouvée, récessive
	Kératome (6)	28	9	3.9	
B12	Sclérose en plaques (9)	18	32	0.2	
B14	Déficit en 21-OH à expression tardive	58	4		
B27	Spondylarthrite ankylosante	90	9	87.4	
B35	s. de Reiter	79	9	37.0	
	Uvéïte antérieure aiguë	52	9	10.4	
	Thyroïdite subaiguë de Quervain	70	15	13.7	
Bw46	Cancer du naso-pharynx (8)	36	23	1.9	
Bw47	Déficit en 21-OH à expression précoce (congénitale)	9	1	15.4	
Cw6	Psoriasis	87	33	13.3	

Tableau 2 : Principales associations de maladies avec des allèles de classe I (ABC)

(Dausset, Pla ; 1985)

LA	Maladies	Fréquences (%)		RR	Liaison
		malades	témoins		
DR1	Myasthénie induite par D-pénicillamine (1)	63	24	5.4	Transmission préférentielle de DR2
DR2	Sclérose en plaques	59	26	4.1	
	Névrite optique	46	26	2.4	
	S. de Goodpasture	88	32	15.9	
	Réponse par IgE contre l'allergène Ra 5 (2)	90	31	20.0	
	Lèpre tuberculoïde (3)				
	Diabète insulino-dépendant	10	30	0.2	
DR3	Lupus érythémateux systémique	70	28	5.8	
	Maladie coeliaque	79	26	10.8	
	Dermatite herpétiforme	85	26	15.4	
	Déficit en IgA (4)	81	25	13.0	
	m. d'Addison	69	26	6.3	
	m. de Basedow	57	26	3.7	
	Thyroïdite de Hashimoto f. atrophique (5)	64	24	3.2	
	Myasthénie	50	28	2.5	
	s. de Gougerot-Sjogren	79	26	9.7	
	Glomérulonéphrite extramembraneuse	75	20	12.0	
	Hépatite chronique active (6)	37	21	2.2	
	Cirrhose biliaire primitive (6)	57	15	7.6	
	F. chronique de s. Guillain-Barre' (7)	50	17	4.8	
	Dermatomyosite juvénile (8)	50	20	3.9	
	Diabète insulino-dépendant (ID)	56	28	3.3	Prouvée, intermédiaire
DR 1/4	Diabète ID (1)	32	0*	47.0	
DR4	Diabète ID	75	32	6.4	
	Polyarthrite rhumatoïde	50	19	4.0	
	Pemphigus	87	32	14.4	
	m. de Berger	49	19	4	
	Lupus induit (hydralazine)	73	33	5.6	

tableau 3 (suite)

D/DR5	Thyroïdite de Hashimoto avec goître (2)	49	23	5.6
	Anémie de Biermer	25	6	5.4
	Arthrite juvénile articulaire	50	16	5.2
	Sarcome de Kaposi (3)	58	20	5.5
	Leucémie lymphoïde chronique (4)	62	21	6.0
D/DR7	s. néphrotique de l'enfant (5)	67	31	4.4
	Lymphome de Burkitt (6)	33	13	3.3
	m. coeliaque (7)	55	20	4.8
D/DR 3/7	m. coeliaque (8)	34	1	60.0
D/DR w8	Arthrite juvénile	23	7	3.6
DQw2	m. coeliaque (9)	100**	72	38.5

Tableau 3 : Principales associations de maladies avec des allèles de classe II

usset, Pla ; 1985)



Le haut degré de polymorphisme du système HLA permet de mieux connaître les associations existantes HLA-maladies et d'en révéler de nouvelles.

### 1.5.2. Chez le bovin

Les réactions croisées entre les antigènes HLA et BoLA confirment l'existence d'une homologie antigénique remarquable entre les deux. On peut donc présumer qu'il contrôle aussi un bon nombre de facteurs impliqués dans la réponse immune. La découverte de gènes affectant la susceptibilité aux maladies revêt une importance capitale chez les bovins, puisque les efforts actuels de sélection par insémination artificielle visent essentiellement à améliorer les caractères zootechniques afin d'obtenir une productivité maximale.

En tenant compte ainsi des associations "BoLA-maladies", on pourrait sélectionner des races à la fois performantes et résistantes aux maladies endémiques, ce qui ajouterait encore à leur rentabilité (cf. tableau 4).

Tableau 4.

#### **Exemples de liaisons entre états pathologiques et BoLA**

carcinome squameux de l'oeil (Caldwell et coll., 1979);

résistance au lymphosarcome (Bortolozzi et Hines, 1982);

susceptibilité à la mammite (Solbu et coll., 1982);

résistance aux tiques (*Boophilus microplus*) (Stear et coll., 1984).

### 1.6. Moyens d'investigation du système CMH

Le complexe majeur d'histocompatibilité peut être étudié d'une part au niveau des produits membranaires qui en dépendent et d'autre part, plus récemment, au niveau du génome lui-même.



### 1.6.1. Etude des produits du CMH

Les antigènes d'histocompatibilité sont généralement analysés de manière indirecte par les réactions qu'ils suscitent : à savoir analyse de leur fixation d'anticorps produits après greffes (c'est l'approche sérologique) ou encore analyse de la prolifération cellulaire qu'ils provoquent lors d'une réaction lymphocytaire mixte (c'est l'approche cellulaire).

Actuellement on étudie beaucoup les antigènes CMH directement au niveau de leur structure (c'est l'approche biochimique). Nous passerons brièvement en revue ces divers modes d'investigation.

#### 1.6.1.1. *L'approche sérologique*

Elle sert à la fois à l'analyse du polymorphisme des molécules de classe I et de classe II et aboutit aux spécificités dites "séro-définies" ou SD.

Les anticorps utilisés sont obtenus soit de femelles multipares, soit après greffes allogéniques, ou semi-allogéniques.

Les antisérums résultant de ces immunisations naturelles ou artificielles sont polyspécifiques (c'est-à-dire qu'ils reconnaissent l'ensemble des différences existant entre le donneur et le receveur). Il convient dès lors de les rendre opérationnellement monospécifique par une série d'absorptions cellulaires. Les réactifs ainsi préparés sont utilisés pour la technique de microlymphocytotoxicité complément dépendante mise au pont par Terasaki et Mc Clelland en 1964. En bref, les cellules exprimant l'antigène reconnu dans le sérum testé seront lysées par le complément et cette lyse est mise en évidence par la prise d'une coloration vitale.

### 1.6.1.2. *L'approche cellulaire*

Les antigènes de classe II sont aussi étudiés par des méthodes de cultures cellulaires mixtes (MLR) déterminant les spécificités lympho-définies ou LD.

La MLR est un test prolifératif mesurant les différences génétiques principalement aux loci de classe II.

Cependant chez le bovin, le polymorphisme de la région BoLA-D semble limité, du moins dans certaines races, c'est-à-dire qu'un nombre important de MLR entre individus BoLA distincts se révèlent négatives (Vaiman, 1985).

### 1.6.1.3. *L'approche biochimique*

Les techniques biochimiques apportent, par les systèmes de gels électrophorétiques en une dimension et en deux dimensions des informations complémentaires sur les antigènes d'histocompatibilité respectivement la connaissance du poids moléculaire et de la charge de ces molécules.

Par exemple, l'utilité de cette méthode est illustrée par la caractérisation de nouveaux sous-types des antigènes HLA-A et B (J.J. Neefjes et coll., 1986).

### 1.6.2. Etude du génome

Après 25 ans d'études sérologiques et biochimiques des molécules du CMH, la biologie moléculaire permet, désormais, d'aborder les gènes qui les gouvernent.

Des sondes radiomarquées permettent l'abord direct des gènes et de leurs ARN messagers correspondants, de façon spécifique, grâce à l'hybridation

moléculaire (Southern blot).

Par exemple des sondes CMH humaine sont utilisées pour étudier les gènes de classe II bovins par cette analyse de Southern blot. Des hybridations de DNA bovin, digéré par une endonucléase de restriction, avec des sondes de cDNA humain  $DQ\alpha$ ,  $DQ\beta$ ,  $DR\alpha$  et  $DR\beta$  ont révélé la présence d'une sous-région DQ et DR dans la région BoLA-D (Andersson et al., 1986).



## **II. But du travail**

**2.1. Le but du travail est** d'analyser le polymorphisme BoLA non plus par des réactifs externes au système (anticorps de la sérologie) mais par la révélation de sa réalité interne (analyse des antigènes BoLA eux-mêmes).

Cette approche se fera donc par des méthodes biochimiques capables de révéler l'existence de plusieurs loci classe I et d'y montrer des différences entre animaux.

En effet, chaque allèle d'un locus donné code pour un produit polypeptidique dont la séquence d'acides aminés comportera des variantes par rapport aux produits des autres allèles.

Tous ces produits alléliques manifesteront dès lors des différences de charges électriques, ce qui se traduira par des points isoélectriques différents et permettra leur séparation par isoélectrofocusing (IEF) selon une première direction, suivi d'une électrophorese en SDS-PAGE selon une seconde direction qui les sépare suivant leur poids moléculaire.

## **2.2. Justification de l'analyse biochimique du polymorphisme CMH chez les bovins**

Comme dans la plupart des espèces, le typage CMH se fait par des méthodes sérologiques. Toutefois, les méthodes biochimiques, tel que l'électrophorèse sur gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide en deux dimensions, l'IEF (isoélectric focusing) en une dimension et l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction, apportent une information de typage additionnel au sujet du polymorphisme du BoLA classe I car la sérologie se limite à la reconnaissance de 17 spécificités internationalement définies, tandis qu'il reste à préciser s'il existe d'autre(s) série(s) allélique(s) codée(s) par un ou plusieurs autres loci. De plus la caractérisation biochimique du BoLA classe II est la seule méthode pouvant démontrer le polymorphisme des molécules de classe II chez le bovin, la sérologie du BoLA classe II étant impossible actuellement. Le développement d'un système de typage sérologique est dépassé et difficile ou même impossible quand il n'y a pas de réactifs bien caractérisés et de sources de matériels disponibles.



MATERIEL ET

METHODES



## MATERIAL ET METHODES

### I. Anticorps monoclonaux utilisés

- Les anticorps monoclonaux ont deux caractéristiques essentielles :
  - . ils sont spécifiques d'un seul déterminant antigénique
  - . et peuvent être obtenus "absolument purs" en quantité illimitée.
 Les anticorps monoclonaux constituent un outil d'une puissance remarquable notamment pour purifier spécifiquement des antigènes (Colette Raffoux et Virginia Lepage, 1985).
- Au cours de ce travail, nous avons utilisé divers anticorps monoclonaux spécifiques de produits du CMH bovin (voir table 1).

	Isotype	Spécificité	épitope	polymorphe
11B <sub>2</sub>	IgG2a	classe I	β2m dépendant	non
(Letesson et coll., 1985)				
4F <sub>4</sub>	IgG2a	classe I	chaîne lourde	oui (large)
(Letesson et coll., 1984).				

Table 1.

### II. Préparation des antigènes d'histocompatibilité

Il existe plusieurs façons de préparer ces antigènes :

- La préparation des antigènes purifiés par chromatographie d'affinité est longue mais nous permettra la mise au point des conditions pour la technique d'électrophorese.

- La préparation des antigènes par immunoprécipitation à partir des cellules radiomarquées nous permet d'avoir un matériel de travail disponible plus rapidement et d'application plus aisée pour le travail de routine.

## **2.1. Antigènes purifiés**

### **2.1.1. Préparation de l'extrait antigénique brut**

- des ganglions mésentériques bovins (150 g) sont broyés au hachoir mécanique (Moulinex) et récoltés à 4°C dans un volume de 150 ml de tampon PBS + PMSF 0,2 mM;
- filtration sur gaze double épaisseur;
- centrifugation de 10 min à 4°C à 4000 RMP, ce qui fait sédimenter les cellules;
- le culot est resuspendu dans du PBS-PMSF 0,2 mM 4°C;
- passé . à l'ultraturax 30 sec.
  - . aux ultrasons 2 min (45 % puissance max.)
  - . au potter mécanique;
- centrifugation de 30 min à 4000 RPM à 4°C;
- le surnageant est récolté et centrifugé 1 heure à 60000 RPM 4°C (rotor 60 Ti) pour sédimenter les constituants cellulaires;
- resuspension du culot dans du tampon de lyse, laissé une nuit à 4° C;
- après cette incubation, le lysat est centrifugé 1 heure à 36000 RPM et le surnageant constitue l'extrait antigénique brut.

<u>Composition du PBS :</u>			
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44 g	
	$\text{NaCl}$	8 g	
	$\text{KCl}$	0,2 g	
	$\text{H}_2\text{O}$	1000 ml	mettre à pH 7,4

Composition du tampon de lyse :

Tris	50 mM	0,61 g	
$\text{NaCl}$	150 mM	0,88 g	
EDTA	5 mM	0,19 g	
$\text{NaN}_3$	0,02 %	0,02 g	
NP40	0,5 %	0,5 ml	
eau		100 ml	mettre à pH 7,2
+ PMSF 0,2 mM (PMSF : Phénylméthyl-sulfonyl fluoride).			

2.1.2. Chromatographie d'affinité

L'extrait antigénique est passé à raison de 15 ml/h sur des colonnes placées en série (Parham, 1979).

La colonne 1 : sert de préfiltre et comporte du sépharose 4B.

La colonne 2 : constituée par du sépharose 4B couplé à des Ig. murines permet de retenir les protéines se fixant non spécifiquement sur ces Ig.

La colonne 3 : consiste également en du sépharose 4B couplé cette fois au monoclonal 11B2 servant à purifier les molécules BoLA de classe I.



- Les colonnes sont alors lavées individuellement avec du tampon de lyse (10 à 15 x le volume de la colonne) puis avec 0,5 % DOC, 15 mM TEA, pH 8 pour éliminer les protéines non spécifiques avant d'être éluées avec 0,5 % DOC, 15 mM TEA, pH 11, 0,5 M NaCl.
  - L'éluat, contenant les protéines spécifiques, est alors immédiatement neutralisé par du 0,5 M TEA pH 7,9.
  - Les colonnes sont ensuite neutralisées par du tampon de Lyse à pH 8.
  - Elles sont stockées à 4°C dans du PBS NaN<sub>3</sub> 0,1 %.
  - Un aliquot de l'éluat (1 ml) est concentré par une précipitation avec 6 ml d'acétone à -20°C toute la nuit.
  - Ensuite centrifugation de 10 min à 4000 RPM.
  - Le "culot" protéique est alors resuspendu avec le tampon adéquat pour l'analyse électrophorétique.
- (Aaron P. Turkewitz et coll., 1983).

## **2.2. Antigènes préparés par immunoprécipitation**

Nombre de cellules normales ou transformées expriment à leur surface des antigènes d'histocompatibilité. Il est possible de marquer radioactivement par voie métabolique, les protéines constitutives de ces cellules et d'isoler les antigènes radioactifs intéressants au moyen d'anticorps spécifiques.

Cette procédure nécessite différentes étapes :

- préparation des cellules
- marquage isotopique par voie métabolique
- extraction des protéines membranaires
- immunoprécipitation.

### 2.2.1. Préparation des cellules

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des cellules de deux origines distinctes : dans un premier temps, nous avons employé une lignée bovine myéloïde établie. Par la suite, en vue d'une application de la technique en routine, nous avons employé des cellules mononuclées du sang périphérique d'un bovin normal.

#### A. *Lignée bovine myéloïde établie*

##### *(BOLCL : pour Bovine Lymphoblastoid Cell Line)*

Cette lignée (R 328 TA 1AD) nous a été fournie par le Professeur W Leibold (Hannovre).

Celle-ci est dérivée d'une infestation in vitro par des sporozoïtes de *Theileria annulata* de la fraction adhérente d'une population mononuclée récoltée chez un bovin normal.

Tant au niveau de l'analyse morphologique qu'au niveau des antigènes membranaires, ces cellules s'apparentent aux monocytes bovins (W. Leibold et al., juillet 1986). De plus, et ce point est pour nous capital, ils expriment de nombreuses molécules d'histocompatibilité tant de classe I que de classe II.

Ces cellules sont maintenues en culture à 37°C sous 5 % CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 10 % FCS sans antibiotiques, dans un flacon de 500 ml (GIBCO-NUNC). Elles prolifèrent d'abord dans le flacon jusqu'au stade de semi-confluence sous forme adhérente, puis commencent à se multiplier sous forme libre. Les passages successifs se font en transférant les cellules surnageantes dans un nouveau flacon où le cycle se reproduit. Par tous les tests employant cette lignée, seules les cellules non adhérentes sont récoltées.

## B. *Cellules mononuclées du sang périphérique stimulées à la phytohémagglutinine*

### 1. Obtention

- Du sang est prélevé au niveau de la veine jugulaire du donneur. Il est immédiatement additionné d'un dixième de son volume de :
  - . tampon phosphate 0,0132 M pH 6,8
  - . 0,8 % NaCl
  - . 1,5 % Na<sub>2</sub> EDTA (anticoagulant).
- L'échantillon est divisé en aliquots de 50 ml et centrifugé à 1000 g pendant 15 min.
- Après centrifugation, une couche blanche (buffycoat) constituée de cellules mononucléaires, lymphocytes et monocytes, se situe à l'interface du plasma et du culot de globules rouges. Ces "buffycoats" sont récoltés et dilués au moins 2 x dans du PBS pH 7,4.
- Des aliquots de 20 ml de cette préparation sont déposés délicatement sur 15 ml d'un mélange Ficoll-Urografine (densité : 1,077) et centrifugés à 500 g pendant 25 min afin de purifier les lymphocytes.
- La couche de lymphocytes est prélevée dans chaque tube et lavée dans du PBS pendant 10 min à 200 g.
- Le culot est alors resuspendu en NH<sub>4</sub>Cl 0,75 % en eau distillée, ce qui permet d'éliminer les globules rouges.
- Centrifugation de 10 min à 200 g.
- Les lymphocytes sont ensuite lavés 3 x dans du PBS pendant 10 min à 200 g pour éliminer les thrombocytes.



## 2. Stimulation à la phytohémagglutinine (PHA)

Dans le but d'augmenter la densité des antigènes d'histocompatibilité à la surface de ces cellules, elles seront stimulées par la phytohémagglutinine. Cette lectine, isolée de *Phaseolus vulgaris*, est un mitogène non spécifique activateur des lymphocytes T entraînant une transformation des petits lymphocytes en larges lymphoblastes.

La PHA est un inducteur de l'interféron  $\gamma$  qui augmenterait l'expression des antigènes d'histocompatibilité (Lindhal et coll., 1973).

Ainsi, les cellules, à raison de 2 millions/ml, sont incubées dans un milieu RPMI 1640 10 % FCS avec 10  $\mu\text{g/ml}$  de PHA pendant 3 jours à 37°C 5 %  $\text{CO}_2$ .

### 2.2.2. Marquage isotopique par voie métabolique

Le marquage bio-synthétique se fait par incorporation métabolique d'un précurseur (acide aminé) radiomarké introduit dans le milieu de culture dans lequel les cellules sont incubées.

Nous avons choisi la  $^{35}\text{S}$ -méthionine (activité spécifique de 1086 Ci/mmol) comme isotope, car l'énergie des particules  $\beta$  émise à partir du  $^{35}\text{S}$  est plus élevée que celle du  $^3\text{H}$ . Tandis que l'énergie du  $^{14}\text{C}$  est comparable avec celle du  $^{35}\text{S}$ , son activité spécifique basse et son haut prix font que son utilisation est impraticable.

#### Procédé (P.P. Jones, 1977) :

- Après une étape de lavage par centrifugation en milieu sans méthionine, les cellules ( $50 \cdot 10^6$  cellules) sont resuspendues dans 2 ml de milieu de

culture MEM sans méthionine, enrichi en sérum de veau foetal (5 %) auquel on ajoute de la glutamine, des antibiotiques, de la méthionine  $^{35}\text{S}$  (500  $\mu\text{Ci}$ ).

- La suspension est incubée à 37°C avec 5 %  $\text{CO}_2$  pendant 4-5 heures. Une agitation se fait plusieurs fois par heure pour resuspendre les cellules.

### 2.2.3. Extraction des protéines membranaires (P.P. Jones, 1977)

Nous avons utilisé le NP40 détergent non-ionique pour solubiliser les protéines membranaires sous une forme très proche de leur état natif. Le NP40 agit en dispersant les constituants membranaires par rupture des liaisons hydrophobes et électrostatiques (Klein, 1975).

- Après l'incubation, on effectue 3 lavages de 10 min à 200 g dans 5 ml de PBS 2 mg/ml méthionine non radioactive, 0,02 %  $\text{NaN}_3$  à 4°C afin d'éliminer la radioactivité résiduelle.
- Le culot est resuspendu avec 0,5 ml de tampon d'extraction : 10 mM Tris-Cl pH 7,2 , 0,15 M NaCl, 0,02 %  $\text{NaN}_3$ , 0,5 % NP40, PMSF 0,2 mM (inhibeur de protéase).
- Laisser à 4°C pendant 30 min.
- Ensuite, centrifuger 1 heure à 4° C à 36000 RPM.
- Le surnageant est récolté pour les étapes ultérieures.

Un autre tampon a été aussi utilisé pour faire un lysat total, qui nous a permis la mise au point des conditions électrophorétique bidirectionnelle (cf. résultats).

#### 2.2.4. Mesure de la radioactivité précipitable (P.P. Jones, 1977)

##### Procédé :

- On ajoute à 500  $\mu$ l de Saline-FCS (0,15 M NaCl, 0,5 % FCS), 1  $\mu$ l de l'échantillon radioactif (soit lysat cellulaire, soit immunoprécipité) et 500  $\mu$ l de TCA 10 % + méthionine 2 mg/ml.
- La préparation est laissée à température ambiante 30 min.
- La solution est filtrée par un filtre 0,45  $\mu$  et nettoyée avec du TCA 5 %.
- Les filtres sont laissés séchés à température ambiante.
- Ensuite, ils sont placés dans des fioles à comptage auxquels on ajoute 4 ml d'Instafluor.
- Les fioles sont mises à compter dans un compteur  $\beta$  (Beckman LS-1801).

#### 2.2.5. Immunoprécipitation (P.P. Jones, 77)

##### Principe :

- Exploitant la haute spécificité de l'anticorps monoclonal par son antigène, on peut isoler sélectivement cet antigène des autres molécules radioactives du lysat cellulaire par immunoprécipitation en excès d'anticorps.
- Les complexes antigènes-anticorps (Ag-Ac) formés sont précipités par des *Staphylococcus aureus* Cowan Strain I (SAC). Ces bactéries présentent à leur surface une molécule : la protéine A, constituée d'une seule chaîne polypeptidique (PM 42000) liée de manière covalente à la couche de peptidoglycane de la paroi bactérienne. Elle a pour propriété de se fixer sur la portion Fc de la plupart des IgG de mammifère (Kessler, 81).



Procédé :

## 1. Préparation du SAC 10 % (Protéine A insoluble Sigma Chemical Co).

- A 1 g de SAC lyophilisés on ajoute 10 ml de PBS  $\text{NaN}_3$  0,1 %.
- On lave 2 fois par une centrifugation de 10 min à 4000 RPM.
- Avec du PBS  $\text{NaN}_3$  0,1 %, on resuspend le culot dans 10 x son volume. Cette suspension est répartie en aliquot et conservée à  $-70^\circ\text{C}$ .
- Par immunoprécipitation, on utilise 200  $\mu\text{l}$  de la suspension de SAC 10 %, lavée 2 fois par centrifugation dans du tampon SAC : PBS 0,010 M pH 7,4, 0,5 % NP40, 2 mM méthionine, 0,02 %  $\text{NaN}_3$ .
- Le culot est resuspendu dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon SAC + 1 mg/ml d'ovalbumine et est séparée en deux.

2. Un préclearing de l'extrait cellulaire avec le SAC avant l'addition de l'anticorps est effectué pour éliminer la majorité des protéines liées de façon non spécifique au SAC.

- 100  $\mu\text{l}$  de SAC en culot sont mis en présence de 50  $\mu\text{l}$  d'extrait cellulaire marqué soit  $5 \cdot 10^6$  cellules ou un équivalent de 5 millions CPM pendant 30 min à  $4^\circ\text{C}$ .

## 3. Immunoprécipitation proprement dite

- Après centrifugation à 1000 g pendant 10 min à  $4^\circ\text{C}$  le surnageant est recolté et est mis en contact avec un anticorps monoclonal 5 à 20  $\mu\text{l}$  d'ascite pendant 30 min à  $4^\circ\text{C}$ .
- Ensuite la suspension est mise en présence de 100  $\mu\text{l}$  de SAC pendant 15 min à température ambiante.

- La suspension est centrifugée à 1000 g, le culot est lavé dans du tampon immunomix 0,2 % SDS : tampon immunomix 5 mg/ml BSA, 1 % Triton, PBS ; 0,5 % DOC .
- Ensuite lavage dans du tampon immunomix 2M KCl.
- Un troisième lavage s'effectue dans du tampon Neufeld : 0,1 % SDS, 0,6 M NaCl, 0,05 % NP40 pH 8,6 .
- Deux derniers lavages sont effectués dans du PBS.
- Le culot du dernier lavage est resuspendu suivant les cas  
**soit** dans 25  $\mu$ l de tampon échantillon SDS : Tris 0,0625 M pH 6,8 glycérol 10 %,  $\beta$ 2-ME 5 % (réducteur puissant), SDS 2 % pour une séparation de l'antigène BoLA en SDS-PAGE. La suspension est mise à 100°C pendant 5 min. Cette étape consiste à "dérouler" les protéines (action du SDS et de la chaleur), à dissocier les complexes Ag-Ac-SAC (action de la chaleur) et à décomposer l'Ag et l'Ac en leurs sous-unités éventuelles même si leur association est de nature covalente (action du  $\beta$ 2ME) (D. Charron, 1985)  
**soit** dans 25  $\mu$ l de tampon d'échantillon IEF : urée 9,5 M , NP40 2 %, Ampholine pH 5-7 1,6 % , Ampholine pH 3,5-10 0,4 % ,  $\beta$ 2-ME 5 % , laissé en contact 15 min à température ambiante pour une séparation de l'antigène BoLA en IEF.
- la suspension est centrifugée à 1000 g afin de sédimenter les SAC, le surnageant est récolté avec précaution et sera déposé sur le gel.

#### 2.2.6. Déglycosylation

Nous avons vu que les molécules BoLA sont des glycoprotéines. Il sera intéressant dès lors de comparer des antigènes glycolysés et déglycolysés, ces derniers seront indépendants des modifications de charges pouvant résulter notamment de leur glycosylation post-translationnelle.

A. ***Nous avons utilisé la neuraminidase, enzyme qui enlève les acides sialiques : éléments les plus chargés des chaînes osidiques liés aux protéines. Son moment d'application a lieu à la fin de l'immunoprécipitation.***

- Le culot du dernier lavage de l'immunoprécipité est resuspendu dans 20  $\mu$ l de neuraminidase (5  $\mu$ /ml) et 20  $\mu$ l de tampon neuraminidase (50 mM NaAc pH 5,0 , 1 mM CaCl<sub>2</sub>) (J.J. Neefjes, 1986).
- La suspension est incubée 4-5 heures à 37°C sous agitation.
- Ensuite centrifugation 10 min à 1000 g.
- Le culot est resuspendu avec 25  $\mu$ l de tampon IEF et laissé 15 min à température ambiante.
- Recentrifugation et récupération du surnageant.

B. ***Nous avons également utilisé la tunicamycine bloquant la glycosylation des glycoprotéines. La tunicamycine est un antibiotique produit par Streptomyces sp. qui bloque la synthèse du GlcNAc- pyrophosphoryl- dolichol à partir du Dol-P et de l'UDP-GlcNAc (Dan Duksin et coll., 1982). Elle est ajoutée au moment du marquage radioactif des antigènes.***

- Les cellules sont incubées dans un milieu MEM sans méthionine contenant 1  $\mu$ g/ml de tunicamycine pendant 1 heure ensuite on ajoute le précurseur <sup>35</sup>S méthionine et l'on poursuit l'incubation 5 heures en présence de tunicamycine.



### III. Analyse

#### 3.1. Processus électrophorétique

##### 3.1.1. Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de poly-acrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

###### Principe :

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une électrophorèse de zone couramment utilisée pour l'analyse d'un mélange complexe de plusieurs protéines. Elle permet en effet la séparation complète des divers constituants de l'échantillon déposé au sommet du gel grâce à son haut pouvoir de résolution et possède une grande reproductibilité.

On réalise un gel de polyacrylamide en faisant polymériser l'acrylamide ( $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) et le NN'-méthylène bisacrylamide ( $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$ ). La polymérisation est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres, par exemple l'ammonium peroxydisulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) et le NNN'N' tétraméthylènediamine (TEMED).

La polymérisation de l'acrylamide sous forme de chaînes pontées par les molécules de NN' méthylènebisacrylamide aboutit à la formation d'un réseau dont la réticulation du gel dépend du % d'acrylamide et de bisocrylamide utilisé. Le diamètre des pores ainsi formés détermine la mobilité électrophorétique des protéines déposées sur le gel : plus les pores sont petits, plus la mobilité diminue.

Le sodium dodécyl sulfate (SDS), détergent anionique, est utilisé pour ses propriétés de rompre la structure tridimensionnelle des protéines et

de les charger négativement. De plus, le complexe SDS-polypeptide en solution a la forme d'un ellipsoïde dont le grand axe est proportionnel au poids moléculaire de la chaîne peptidique.

Ainsi, l'abondance des charges négatives et la forme constante des protéines rend leur comportement électrophorétique constant. Leur séparation en SDS-PAGE se fera donc uniquement sur base de leur différence de poids moléculaires (B.D. Hames, 1985).

Procédé :

\* Préparation des gels :

- Les gels de séparation (running gel) à 10 ou 12 % d'acrylamide sont coulés en gels plats d'épaisseurs, 0,75 mm, de longueur 6 cm, de largeur 8 cm.
- Composition du running gel :

Tris-HCl 1,500 M pH 8,8	2,5 ml
SDS 0,4 %	
acrylamide 30 %	4 ml
bisacrylamide 0,8 %	
eau	3 ml
Temed pur	10 $\mu$ l
APS 1 %	0,5 ml

Après l'addition du Temed, la solution est dégazée pour éliminer l'O<sub>2</sub> présent et l'APS est ajoutée au dernier moment.

- On place au-dessus de l'alcool isoamylique pendant le temps de polymérisation.
- Le running gel est ensuite surmonté d'un cm de gel d'empilement (stacking gel) à 3 % d'acrylamide

- Composition du stacking gel :

Tris-HCl 0,500 M pH 6,8	1,25 ml
SDS 0,4 %	
acrylamide 30 %	0,5 ml
bisacrylamide 0,8 %	
eau	2,75 ml
Temed	5 $\mu$ l
APS 1 %	0,5 ml

- Des que le stacking gel est coulé on met un peigne a 10 puits et la polymérisation se fait plus ou moins en 45 min.

\* Electrophorèse

- On dépose dans chaque puit 20  $\mu$ l d'échantillon auquel ont été mélangées quelques gouttes de glycérine pour augmenter la densité de l'échantillon et quelques  $\mu$ l de bleu de bromophénol, colorant de très faible PM, pour situer le front de migration.
- Du tampon d'électrophorèse est placé dans la cuve à électrophorèse (mini Protean II cell Biorad).

Tampon électrophorétique :

Tris	25 mM
glycine	0,192 M
SDS	0,1 %

- On applique alors un courant de 200 volts pendant plus ou moins 45 min.
- Parallèlement aux échantillons déposés, on fait migrer sur une des pistes du gel un mélange de protéines étalons radiocatives de PM connus ( $^{14}$ C Methylated protein mixture Amersham).



Protéines étalons de poids moléculaire :

14300	lysosyme méthylée
30000	anhydrase carbonique méthylée
46000	ovalbumine méthylée
69000	sérum albumine : bovine méthylée
92000	phosphorylase méthylée
200000	myosine méthylée.

3.1.2. Electrophorèse bidirectionnelle

Principe :

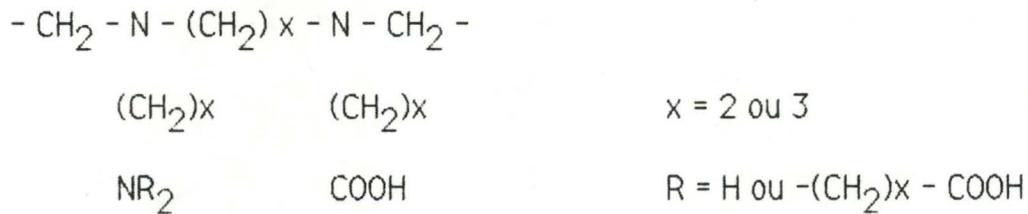
Le système de gel électrophorétique en 2 dimensions combine les techniques de convergence isoélectrique (IEF) en présence d'urée et d'un détergent neutre dans la première dimension et de gel électrophorétique plat sous des conditions dénaturantes utilisant le sodium dodécyl sulfate (SDS) dans la seconde dimension. O'Farrell (1975) démontrait le premier le grand potentiel d'une telle technique qui, utilisant des protéines marquées isotopiquement résout plus d'un millier de polypeptides et détecte des composants jusqu'à 0,001 % ou moins des protéines cellulaires totales.

\* La séparation fait appel à deux caractéristiques indépendantes des protéines : une est la charge, qui est reflétée par le point isoélectrique (PI), et l'autre est le poids moléculaire qui détermine la mobilité des complexes SDS-protéines dans les gels de polyacrylamide.

La séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique est basée sur leur migration électrophorétique dans un gel support comportant un gradient de pH. Chaque protéine migrera dans le champs jusqu'à ce qu'elle atteigne son point d'équilibre à un pH donné. Chacune

s'immobilisera au pH qui lui donne son point de non-charge globale (point isoélectrique).

\* Ce gradient de pH est créé par des porteuses d'ampholytes, petites protéines de bas poids moléculaire. La formule générale en est :



Ces molécules synthétiques présentent des fonctions acides et basiques, qui sont introduites lors de la préparation des gels. Elles vont migrer en fonction de leur charge jusqu'à leur point isoélectrique. Elles ont une capacité de tampon et de solubilité élevée au point isoélectrique, ainsi qu'une bonne conductivité (P.G. Righetti et coll., 1980).

- La résolution sera d'autant meilleure que la rangée de pH est étroite. C'est pourquoi il est intéressant de mélanger deux lots d'ampholytes provenant de firmes différentes, car la composition des ampholytes commercialisés ne donne pas un gradient tout à fait linéaire de pH. Ainsi l'un dans l'autre, ils se complètent.

On peut aussi augmenter le pourcentage d'ampholyte à 4 % au lieu de 2 % habituellement utilisé ce qui permet une meilleure efficacité de la gamme de pH.

- Lors de la préparation des gels nous utilisons de l'amberlite MB-1 (Monobed mixed resin analytical grade), résine échangeuse d'ions mixtes, qui enlève les dernières traces d'acides acryliques et cyanates et d'autres impuretés chargées qui risqueraient d'interférer avec la migration (Dr. Lecoq, comm. pers., H. Erasme).



\* Distinction gel IEF et NEPHGE (Bravo, 1984)

Malheureusement, les protéines basiques ne sont pas bien séparées dans le système IEF/SDS parce qu'en général elles entrent peu dans le gel IEF. Même si des ampholytes plus basiques sont inclus, l'extension du gradient de pH est très petite, parce qu'en présence d'urée la région basique du gradient est instable. En outre, les quelques protéines basiques qui entrent dans le gel IEF sous ces conditions produisent toujours des traînées. Cependant, il est possible de surmonter ces problèmes en utilisant une électrophorèse à gradient de pH non équilibré (NEPHGE) en première dimension au lieu du IEF. Les principales différences entre NEPHGE et IEF sont que dans le premier, les échantillons sont appliqués du côté acide du gel et le produit voltage par temps est plus petit que celui dans le IEF. Sous de telles conditions, le gradient de pH n'atteint pas un équilibre complet, et les protéines ne convergent pas totalement en leur point isoélectrique comme elles le sont dans les gels IEF. Néanmoins, plus de protéines dans les gels NEPHGE sont séparées selon leurs différences de charge. Le gel NEPHGE pH 3,5-10 est le plus utilisé pour parcourir tous les modèles de protéines tandis que les rangées de pH étroites peuvent être utilisées par une étude plus détaillée de protéines particulières grâce au gel IEF. La meilleure résolution de protéines acides est donc obtenue avec l'IEF puisque la région des gels contenant les protéines acides est compressée dans le NEPHGE. La meilleure résolution de protéines basiques est au contraire obtenue avec un gel NEPHGE pH 7-10.



Procédé :Préparation gel NEPHGE et IEF (O'Farrell, 1975; Bravo, 1984)Composition :

	<u>gels IEF</u>	<u>gels NEPHGE</u>
urée 9,2 M	2,75 g	2,75 g
30 % acrylamide	0,665 ml	0,665 ml
10 % NP40	1,0 ml	1,0 ml
eau	0,78 ml	0,98 ml
Ampholines pH 5-7 4 %	400 µl	-
Ampholines pH 3,5-10 2 %	50 µl	0,25 ml
10 % APS	6 µl	8 µl
Temed	4 µl	4,5 µl

acrylamide 30 % : acrylamide 28,38g      portés à 100 ml d'H<sub>2</sub>O  
    bis acrylamide 1,62 g

- Il faut que l'urée soit dissout, puis on ajoute une cuillère d'amberlite (échangeurs d'ions) et on laisse agir 30 min à température ambiante.
- Avant d'ajouter le Temed, la solution est dégazée.
- L'urée utilisée à haute concentration, permet de solubiliser et de dissocier les protéines liées fermement par disruption des ponts qui maintiennent la structure tertiaire.
- Le NP40 solubilise les protéines hydrophobes tel que les composants des membranes cellulaires.

### Préparation des tubes cylindriques

- Les tubes ont une longueur de 15 cm et un diamètre interne de 2,5 mm.
- Avant l'utilisation des tubes, ils doivent être lavés soigneusement dans une solution d'acide (HCl 0,1 N) à 100°C, ensuite rincés à l'eau distillée et séchés. Ce traitement assure que les gels s'accrocheront de façon appropriée aux tubes.
- Les tubes sont marqués à 13 cm et l'autre extrémité est enrobée de plusieurs couches de Parafilm.
- Les gels sont alors coulés dans les tubes jusqu'au trait à l'aide d'une seringue terminée par une aiguille longue très fine (18 cm, 22 gauge).
- Lorsqu'on coule les gels on évite la formation de bulles en y appliquant une certaine pression.
- Les gels sont alors surmontés d'un gel overlay (urée 8M en eau distillée) pendant le temps de polymérisation (1 à 2 h).
- Ensuite le gel overlay est enlevé et remplacé par 20  $\mu$ l de tampon IEF.

### Electrophorèse

- gel NEPHGE

La cuve électrophorétique est composée de deux parties. La partie inférieure contient la solution NaOH 0,02 M; la partie supérieure contient la solution  $H_3PO_4$  0,01 M. Le tampon basique est relié à la cathode.

Les échantillons sont déposés du côté acide, on en dépose 15  $\mu$ l qui sont surmontés de 10  $\mu$ l de sample overlay et du  $H_3PO_4$ .

sample overlay : uree	9 M
Ampholines pH 5-7	0,8 %
Ampholines pH 3,5-10	0,2 %

On applique 500 Volt pendant 5 heures 30 min.

- gel IEF

Ici, la partie supérieure contient le tampon basique NaOH et la partie inférieure le tampon acide  $H_3PO_4$ .

Le NaOH est préalablement dégazé. Ici, on fait un prérun pour éliminer un excès de persulfate et les isocyanates.

On ajoute 20  $\mu$ l de tampon IEF sur chaque gel et du NaOH.

On applique                    200 V pendant 15'  
                                      300 V pendant 30'  
                                      400 V pendant 30'

On arrête l'électrophorèse et on retire le NaOH.

Pour l'électrophorèse proprement dite, on dépose les 20  $\mu$ l d'échantillons du côté basique des gels qui sont surmontés de 10  $\mu$ l de sample overlay et de NaOH.

L'électrophorèse se fait pour un total de 4800 volts-heures à raison de 400 volts l'heure.

Ensuite, pendant 1 heure, on augmente le voltage à 800 volts, cette procédure resserre les bandes de protéines et réduit les traînées dans la dimension IEF.



### Passage en 2ème dimension

- La préparation du gel SDS-PAGE se rapproche de celle de l'électrophorèse unidirectionnelle, à part qu'ici on coule les gels en grands gels plats de 1,5 mm d'épaisseur, de 16 cm de longueur, de 16 cm de largeur.

Ici, on n'utilise pas de peigne et on surmonte le gel d'une baguette pendant le temps de polymérisation. Un petit puit sur le côté est formé pour les protéines étalons.

- Les gels de 1ère dimension sont démoulés en utilisant une seringue terminée par un embout appliqué au côté basique du gel, on y applique une certaine pression en injectant de l'eau.
- Les gels sont extrudés dans 5 ml de tampon d'équilibration pendant 30 min, ainsi les protéines pourront migrer dans le gel 2D.

<u>Tampon d'équilibration</u> :	Tris 0,5 M - pH 6,8	25 ml
	glycérol	20 ml
	SDS 10 %	40 ml
	2 $\beta$ ME	10 ml
	0,05 % BBP	5 ml
	eau	100 ml

- Les gels de 1ère dimension sont disposés ensuite sur les gels SDS-PAGE au moyen d'un support en plastic qui permet de déposer le gel 1D parallèlement aux plaques, bien au dessus du gel 2D, le côté acide toujours en opposé aux étalons. Le gel de 1D est fixé par l'agarose et le tampon d'équilibration restant est éliminé.
- Les protéines étalons de PM connus sont déposés dans le petit puit.
- On place le gel 2D chargé dans une cuve à électrophorèse Protean II cell avec du tampon électrophorétique.

- On applique un courant de 40 mA/gel pendant 5 heures.

### 3.1.3. Transfert électrophorétique de protéines sur feuille de nitrocellulose (Towbin et coll., 1979)

- Après électrophorèse de protéines non marquées sur gel plat, le gel est démoulé et équilibré dans du tampon transfert, sans agitation, pendant 15 min à 20°C.

<u>Tampon transfert :</u>	Tris	25 mM
	Glycine	192 mM
	méthanol	20 %

- Le gel est alors mis en contact étroit avec une feuille de nitrate de cellulose équilibrée dans du tampon transfert, en prenant soin d'éliminer les bulles d'air pour un contact optimal.
- Le dispositif est immergé dans le tampon transfert et dans le Trans-blot Cell et soumis à un champ électrique (60 v pendant 3 heures) destiné à transférer les protéines du gel sur la feuille de nitrocellulose.
- Après le transfert, la feuille de nitrocellulose est incubée une nuit à 4°C dans du PBS 3 % NP40 pour ses propriétés renaturantes.

## 3.2. Détection

### 3.2.1. Coloration au bleu de Coomassie

Après séparation d'antigènes non marqués, le gel est fixé avec du TCA 12 % pendant 30 min, puis rincé à l'eau courante.

Ensuite, il est coloré avec le bleu de Coomassie :

bleu de Coomassie (brillant blue R250)	0,25 g
méthanol	45 ml
H <sub>2</sub> Od	45 ml
acide acétique glacial	10 ml

On laisse une heure à l'abri de la lumière.

On décolore avec	éthanol T	30 ml
	acide acétique T	10 ml
	H <sub>2</sub> Od	60 ml

### 3.2.2. Autoradiographie (Bravo, 1984)

Après la séparation des antigènes marqués isotopiquement, le gel est placé dans 3 bains successifs de DMSO (puissant déshydratant) pendant 30 min, ensuite on le place dans un bain de DMSO et PPO (200 ml - 60 g), 4 heures ou toute la nuit. Le solvant DMSO permet de porter le PPO (substrat scintillant) dans le gel. Le PPO convertit les particules  $\beta$  en photons de lumière bleue ou ultraviolette.

Ensuite, le gel est lavé à l'eau courant au moins 40 min pour réhydrater le gel et précipiter le PPO.

Le gel est alors placé entre papiers de cellophane et séché sur un sécheur de gel relié à une pompe à vide au moins 5 heures.

Une fois sec le gel est mis en sandwich entre 2 films (hyperfilm TM-MP, Amersham 18 x 24 cm) dans l'obscurité et stocké dans une cassette à -70°C pour augmenter l'efficacité.

Après quelque temps d'exposition, le film est développé dans un révélateur radiographique manuel à contraste variable (Polycon May & Baker) et fixé dans un fixateur radiographique manuel ultra-rapide (Perfix May & Baker).



### 3.2.3. Détection immunoenzymatique

- Après blotting, le gel est fixé et coloré pour vérifier l'efficacité du transfert.
- La feuille de nitrocellulose est incubée 1 h en PBS 1 % BSA pour saturer les sites restés libres sur la membrane de nitrocellulose et est lavée en PBS 1 pour mille Tween 20.
- Elle est incubée 45 min à 20°C avec l'anticorps monoclonal (surnageant de culture) et lavée 3 fois sous agitation en PBS un pour mille Tween 20.
- Elle est incubée 45 min à 20°C dans du Rabbit-Anti-Mouse (RAM), conjugué à la peroxydase dilué 1/200 dans du PBS 10 % sérum de bovin normal, qui permet de détecter la fixation du monoclonal sur l'antigène.
- Après 3 lavages en PBS Tween, la peroxydase, localisant l'antigène cible, est révélée par incubation de la feuille de nitrocellulose dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contenant 0,05 % de Diaminobenzidine (DAB) et 0,03 %  $H_2O_2$ .
- La peroxydase catalyse la réduction de l'eau oxygénée en eau en présence d'un donneur d'électrons : la DAB qui, par un mécanisme de polymérisation et de cyclisation oxydative, se transforme en un vaste polymère de Phénazine insoluble (coloration brune).
- La réaction enzymatique est stoppée en trempant la feuille dans de l'HCl 0,1 N.

RESULTATS ET

DISCUSSION



## RESULTATS ET DISCUSSION

### **I. Mise au point de l'électrophorèse en deux dimensions**

L'équipement et la méthodologie de l'électrophorèse en deux dimensions peut sembler initialement assez complexe, cependant la bonne résolution de cette technique compense le travail fourni.

- La préparation des échantillons pour l'électrophorèse doit être faite dans un tampon approprié de façon à ce que les protéines soient complètement solubilisées et dénaturées, afin qu'elles puissent entrer dans le gel et ne pas s'aggréger. Les tampons échantillons contiennent entre autre pour la 1ère dimension, l'urée et le NP40, et pour la 2ème dimension le Tris et le SDS (O'Farrell, 1975).

La quantité d'échantillons que l'on peut déposer sur les gels de 1ère dimension est limité pour éviter d'une part une distortion du gel et d'autre part, lors de la détection par autoradiographie, d'obtenir des spots dont la taille élevée diminuerait la distance entre les spots voisins, avec une perte de résolution.

- Les solutions électrolytes pour la 1ère dimension.

Plus la solution anodique et cathodique est concentrée, plus stable est le gradient de pH. Le pH de la solution anodique doit être proche du pH de l'extrémité anodique du gradient de pH et le pH de la solution cathodique doit être proche du pH de l'extrémité cathodique. On utilise le  $H_3PO_4$  0,01 M et le NaOH 0,02 M comme solution anodique et cathodique, qui ont pour rôle d'empêcher l'oxydation et la réduction, respectivement, des échantillons et/ou des porteuses d'ampholytes aux deux électrodes.



- Il est important de renouveler les solutions, essentiellement celles d'acrylamide et de NaOH pour augmenter la résolution.
- Le temps requis pour une séparation adéquate des protéines dans les gels 1ère dimension est dépendant du choix de la gamme de pH, il sera donc plus long pour une gamme de pH étroite et plus court pour une gamme large de pH. Pour obtenir la résolution optimale des protéines en gel IEF, le temps requis sera de 16 heures à raison de 400 volts/heure et de 5 heures à raison de 400 volts/heure pour les gels NEPHGE. Pour ces derniers, le temps d'électrophorèse est si court que les protéines n'atteignent pas leur équilibre et par conséquent le temps d'électrophorèse détermine la distance des protéines (O'Farrell, 1975).
- Le temps d'équilibration des protéines a été fixé à 30 min. Ce temps est choisi pour limiter la perte d'un certain pourcentage de protéines (5 à 25 %).
- Pour qu'une comparaison soit valable d'un gel à l'autre, il est absolument nécessaire de travailler dans des conditions de reproductibilité.
- \* Lors de la préparation des tubes pour les gels 1ère dimension ou des plaques pour les gels 2ème dimension, on y trace un trait à une distance convenue (13 cm pour les tubes, 14 cm pour les plaques). Les gels sont alors coulés jusqu'à ce trait permettant ainsi d'avoir des gels de même longueur et donc les protéines parcourront la même distance.
- \* Il faut aussi éviter toutes variations par changement des conditions électrophorétiques. Pour se faire, les gels de 1ère dimension qui doivent être comparés seront électrophorétisés en même temps.

\* Lors du passage en 2ème dimension, les gels 1ère dimension sont déposés au-dessus, à partir d'une des extrémités du gel 2ème dimension (en général le côté acide en opposé aux étalons). Au moment de la détection à l'autoradiographie, le film sera posé sur le gel à partir de la même extrémité. Ainsi les différentes taches apparaissant sur le film pourront être comparées exactement.

- Optimisation du gradient de pH.

La technique d'isoélectrofocusing donne une très bonne résolution, qui sera fonction de la gamme de pH incluse dans le gel : plus le gradient représentera des limites restreintes de pH, plus la résolution entre protéines de points isoélectriques proches sera importante. Il convient donc dans un premier temps de déterminer dans quelle zone de PI, et par conséquent dans quelles limites de pH les molécules BoLA se situeront. La technique choisie est le NEPHGE, car cette procédure couvre une gamme suffisamment large de pH (3,5-10) et parce qu'elle se fait aussi en un temps plus rapide (5 h au lieu de 16 h).

Lors de l'électrophorèse des gels de 1ère dimension, un gel sur lequel aucun échantillon n'a été déposé, est coupé en bandes de 1 cm ou 1,5 cm de longueur. Chacun de ces morceaux est placé dans une fiole contenant 1 ml d'eau distillée et laissé en contact 1 heure. Après le passage de ces fioles au vortex, on mesure le pH des différents morceaux du gel. Cependant, il faut tenir compte du fait qu'une concentration élevée en urée réduit l'activité des ions hydrogènes et a un effet apparent sur la charge nette des protéines dans leur région isoélectrique, entraînant ainsi des modifications dans les mesures du pH (Nobuo Ui, 1971). De plus, il y a le problème de trouver des points de références pour le PI de la 1ère dimension. Il est possible d'utiliser comme marqueurs internes des polypeptides identifiés de l'échantillon comme l'actine, ou d'ajouter



des standards internes comme des protéines carbamylées (Anderson et Hickman, 1979).

Nous n'avons pas utilisé de marqueur interne pour la première dimension, seul le gel coupé en morceaux nous sert de référence.

- La 1ère dimension est suivie d'une seconde dimension en SDS qui contient des protéines étalons de PM connus (cfr. méthodes) servant de référence pour visualiser le poids moléculaire des protéines.
- Sensibilité de détection : l'autoradiographie utilisée en conjonction avec l'électrophorèse des gels en deux dimensions augmente fortement la sensibilité de détection des protéines (O'Farrell, 1975).

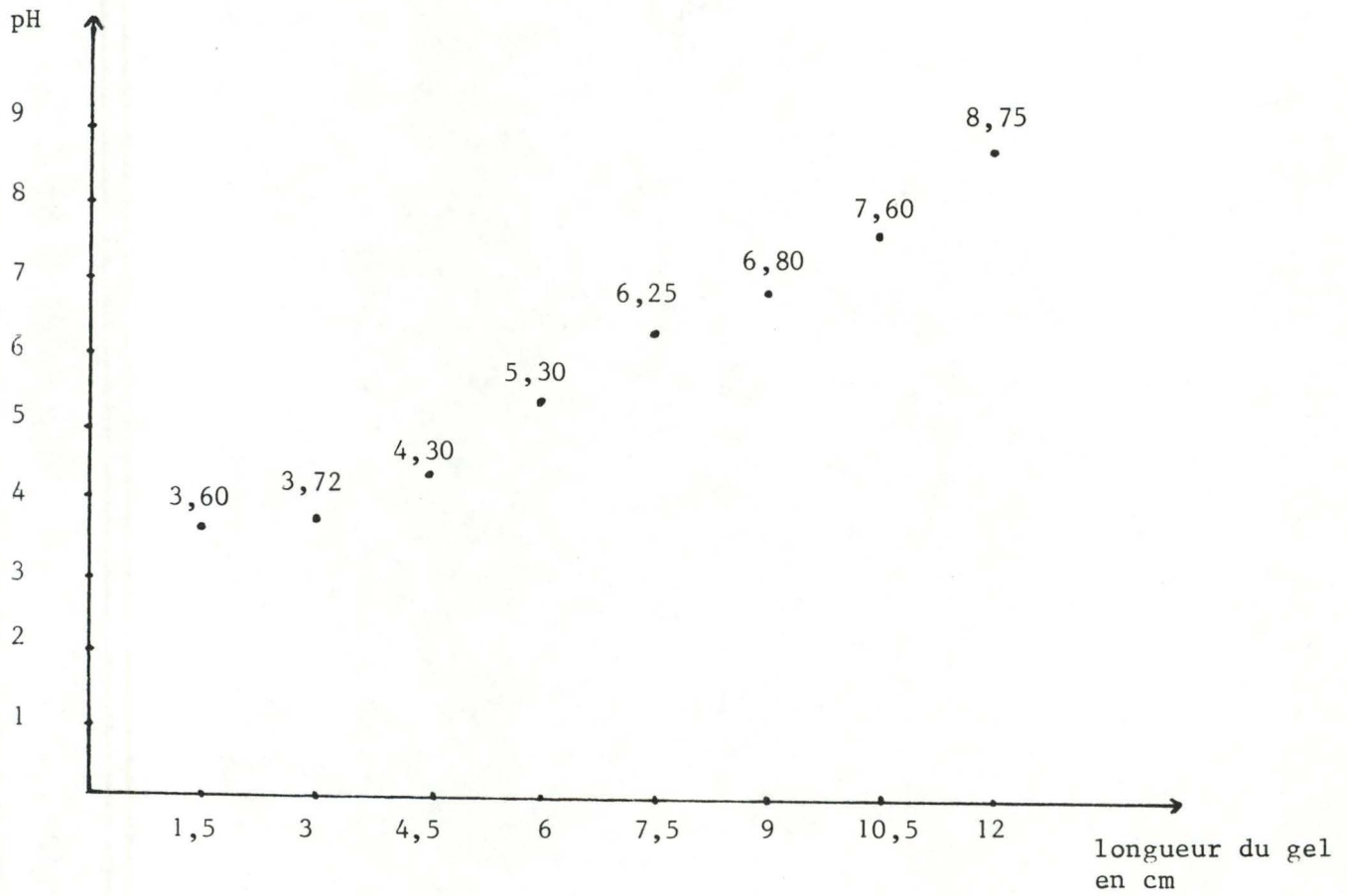
Le principal problème est la détection des protéines "mineures" qui ont besoin d'un temps d'exposition plus long que les protéines "majeures". Celles-ci sont alors surexposées et la surface de leur spot est alors augmentée, pouvant interférer avec d'autres spots. Le temps d'exposition sera notamment fonction de la quantité de radioactivité déposée sur le gel.

Puisque l'IEF et le SDS sont faits dans des conditions réductrices et dénaturantes, chaque spot sur le gel 2D représente une chaîne polypeptidique unique (Jones P.P., 1977).

Les premiers essais de l'électrophorèse en deux dimensions ont été effectués sur un lysat total à partir de cellules de lignée myéloïde (préparation cfr. méthodes). 10  $\mu$ l contenant  $2 \cdot 10^6$  cpm ont été déposés sur gel NEPHGE puis ont migré en gel SDS (voir photo 1).







Graphe 1. Gradient de pH d'un gel NEPHGE.

Nous pouvons constater que dans l'ensemble, la résolution est bonne, mais il est difficile de mettre en évidence les protéines BoLA de classe I sans avoir au préalable une idée de leur mobilité en IEF, c'est pourquoi nous allons poursuivre notre étude sur les antigènes purifiés. Normalement, la majorité de protéines est située entre pH 5-7.

## II. Les antigènes purifiés

A partir de 150 g de ganglions, on obtient environ 3-4 mg de protéines purifiées (préparation cfr. méthodes). Lors de la chromatographie d'affinité, c'est l'anticorps monoclonal 11B<sub>2</sub> qui est fixé aux billes de Sépharose, ainsi l'antigène récupéré doit être un antigène de classe I (propriétés 11B<sub>2</sub> cfr. méthodes). Nous avons fait un contrôle en SDS (voir photo 2).

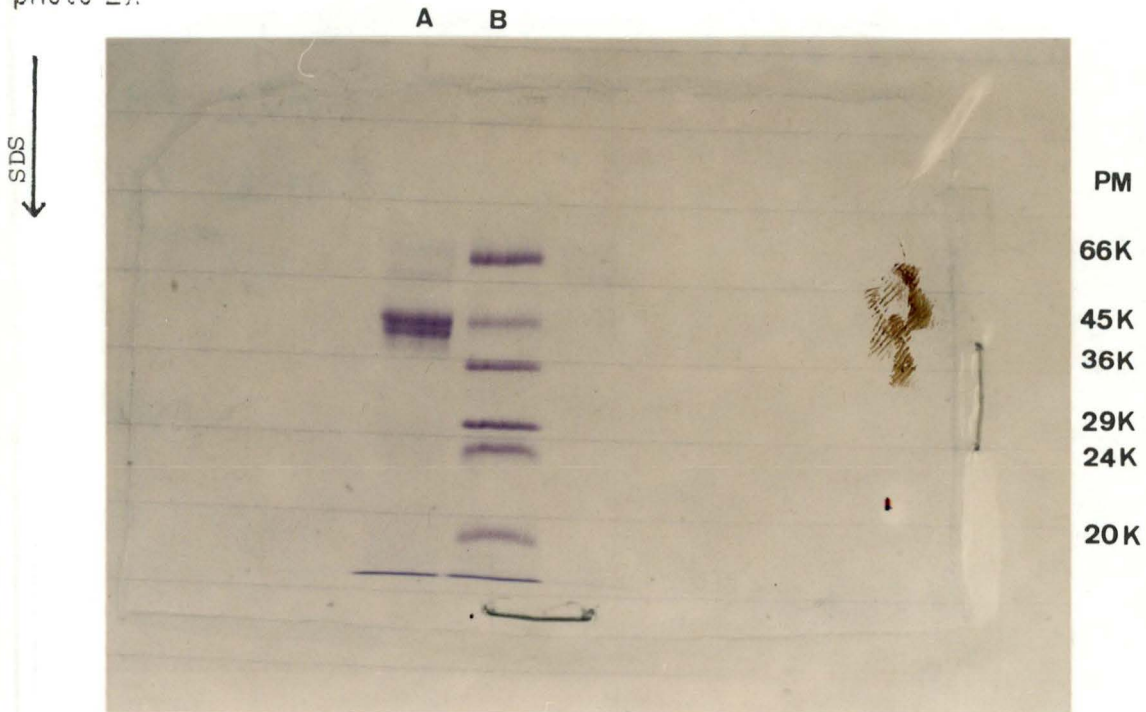


Photo 2. Analyse en gel SDS.

A : les antigènes purifiés de classe I (préparation cfr. méthodes) resuspendus dans 10  $\mu$ l de tampon échantillon SDS ont été déposés sur le gel.

B : bande étalon.

Nous voyons que l'antigène est bien purifié, il n'y a pas de contaminant et l'antigène est situé à un poids moléculaire d'environ 45000 daltons (une deuxième petite bande apparaît un peu en-dessous). Nous pouvons dire que



l'on est en présence de l'antigène de classe I. Un antigène préparé de façon analogue a d'ailleurs servi à la détermination de la séquence N-terminale de cette molécule qui confirmait la nature CMH classe I de cet antigène (Letesson et coll., soumis pour publication).

## 2.1. Analyse sur gel NEPHGE

Par la suite, nous avons utilisé la technique en deux dimensions. Des antigènes de classe I (91 µg/ml) précipités dans 6 ml d'acétone sont resuspendus dans 20 µl de tampon échantillon IEF. Ces antigènes ainsi préparés sont déposés sur deux gels NEPHGE pour la 1ère dimension et ont migré ensuite sur gel SDS pour la 2ème dimension. Nous avons utilisé deux techniques de détection :

- d'une part, un gel a été détecté par le bleu de Coomassie (voir photo 3);

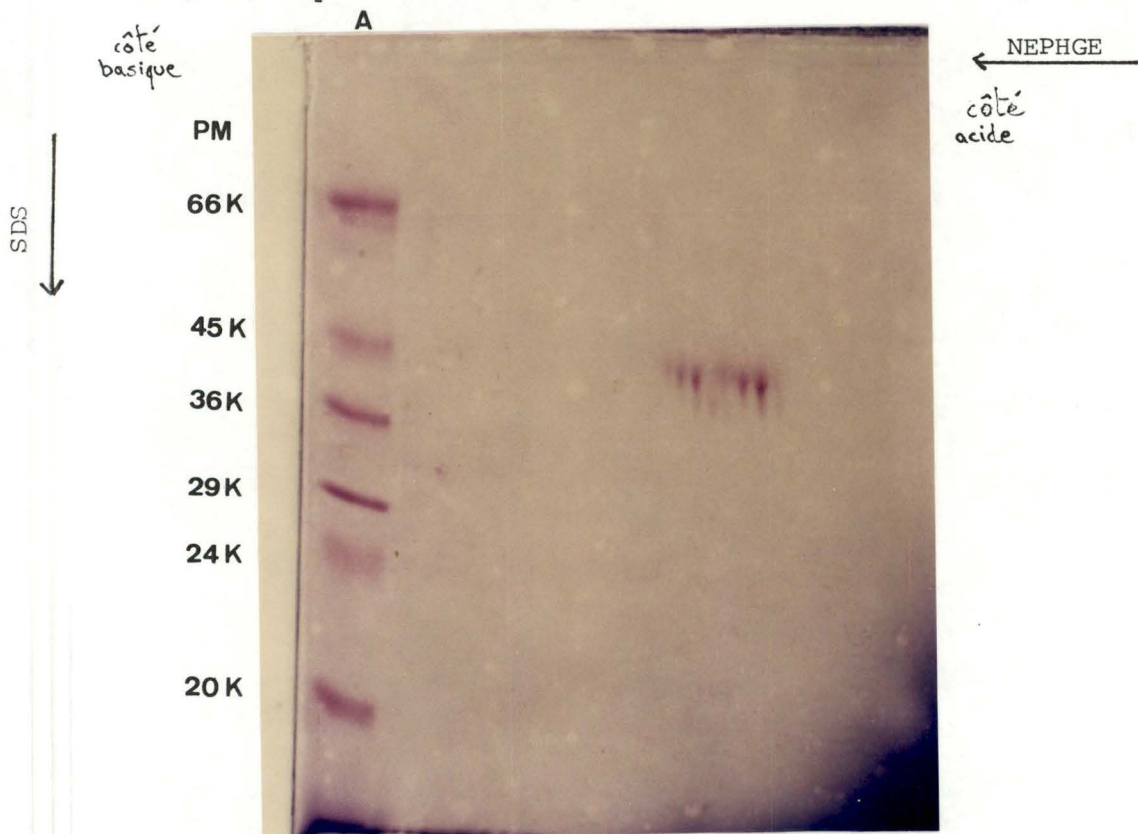


Photo 3. Analyse en NEPHGE (1D) et en SDS (2D). Les antigènes purifiés de classe I (91 µg/ml) resuspendus dans 20 µl de tampon IEF ont été déposés sur le gel NEPHGE. Détection au bleu de Coomassie. A : bande étalon.

- d'autre part après l'électrophorèse en deux dimensions, l'autre gel a subi un blotting suivi d'une détection immuno-enzymatique faisant intervenir ici le monoclonal 4F<sub>4</sub> reconnaissant en Western blot la chaîne lourde des molécules de classe I, alors que le 11B2 ne réagit pas dans cette technique (voir photo 4).



Photo 4. Analyse par Western blot des antigènes purifiés de classe I (91  $\mu\text{g/ml}$ ) resuspendus dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF et déposés sur gel NEPHGE, migrant ensuite en SDS.

Détection immunoenzymatique sur feuille de nitrocellulose.

Sur les deux photos, on voit bien différentes taches qui ont des charges non identiques, mais de même poids moléculaire (environ 45000 daltons).

En référence au gradient de pH (graphe 1), nous pouvons donner approximativement le pH de ces taches. Elles se situent entre 5,30 et 6,4 pour les taches de la photo 3. Seules les taches les plus acides de la photo 3 sont visualisées sur la photo 4. Puisque ces taches ont un pH entre 5,3 et 6,4, il est possible de faire leurs études sur un gel



pH entre 5,3 et 6,4, il est possible de faire leurs études sur un gel IEF (pH 5-7), nous permettant ainsi d'augmenter la résolution des protéines à PI proches. De plus, nous ferons l'analyse des antigènes de classe I préparés à partir de deux bovins différents pour avoir une meilleure comparaison.

## 2.2. Analyse sur gel IEF - Comparaison des antigènes entre deux bovins

Les antigènes de classe I du bovin  $aI_2$  (91  $\mu\text{g/ml}$ ) précipités dans 6 ml d'acétone et ceux de l' $aI_6$  (173  $\mu\text{g/ml}$ ) dont 0,5 ml ont précipité dans 6 ml d'acétone sont resuspendus chacun dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF. Ils ont été déposés sur gels IEF pour la 1ère dimension et ont migré en gels SDS pour la 2ème dimension. La détection se fait au bleu de Coomassie pour les deux (voir Photos 5 et 6).

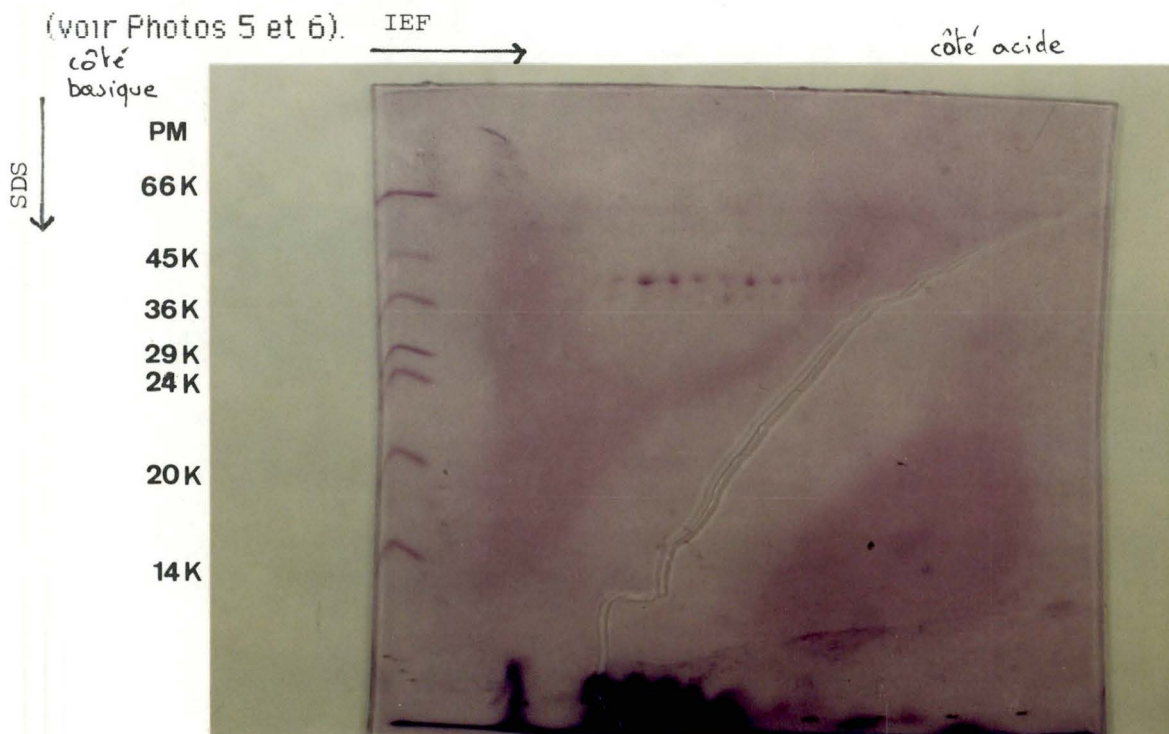


Photo 5 -  $aI_2$ . Analyse sur gel IEF (1D) et sur gel SDS (2D) d'antigènes purifiés de classe I (91  $\mu\text{g/ml}$  précipités préalablement dans 6 ml d'acétone) resuspendus dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF. Détection au bleu de Coomassie.



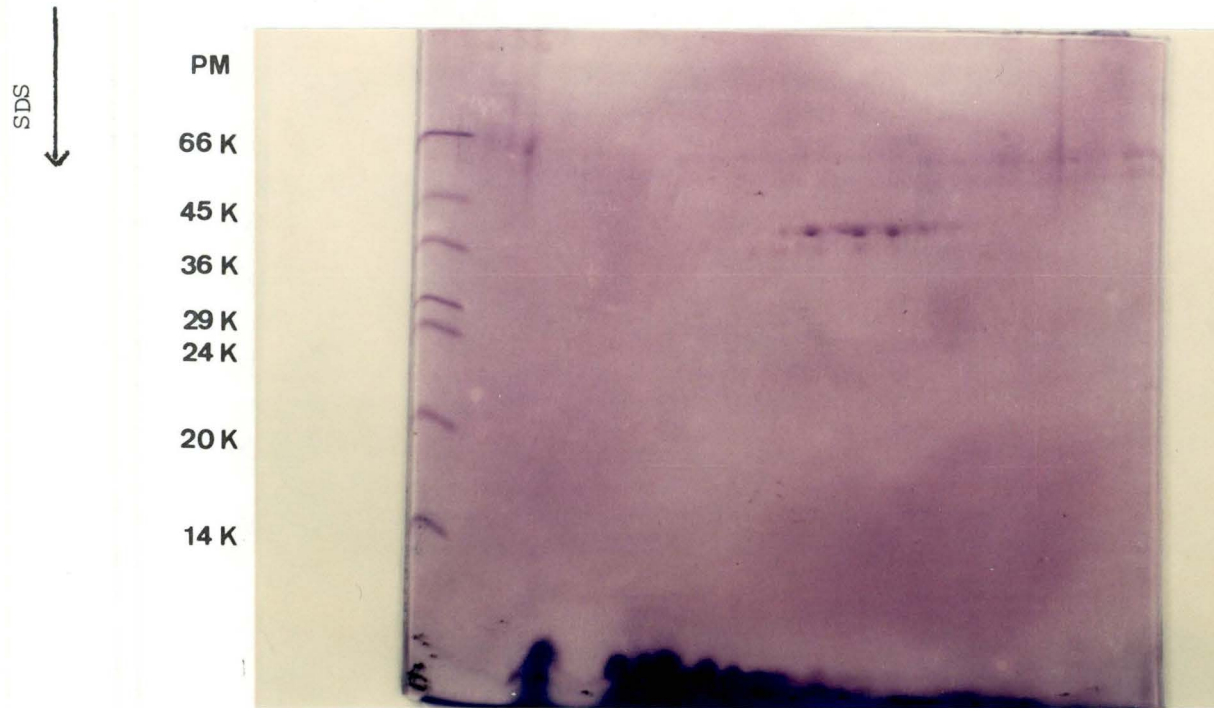
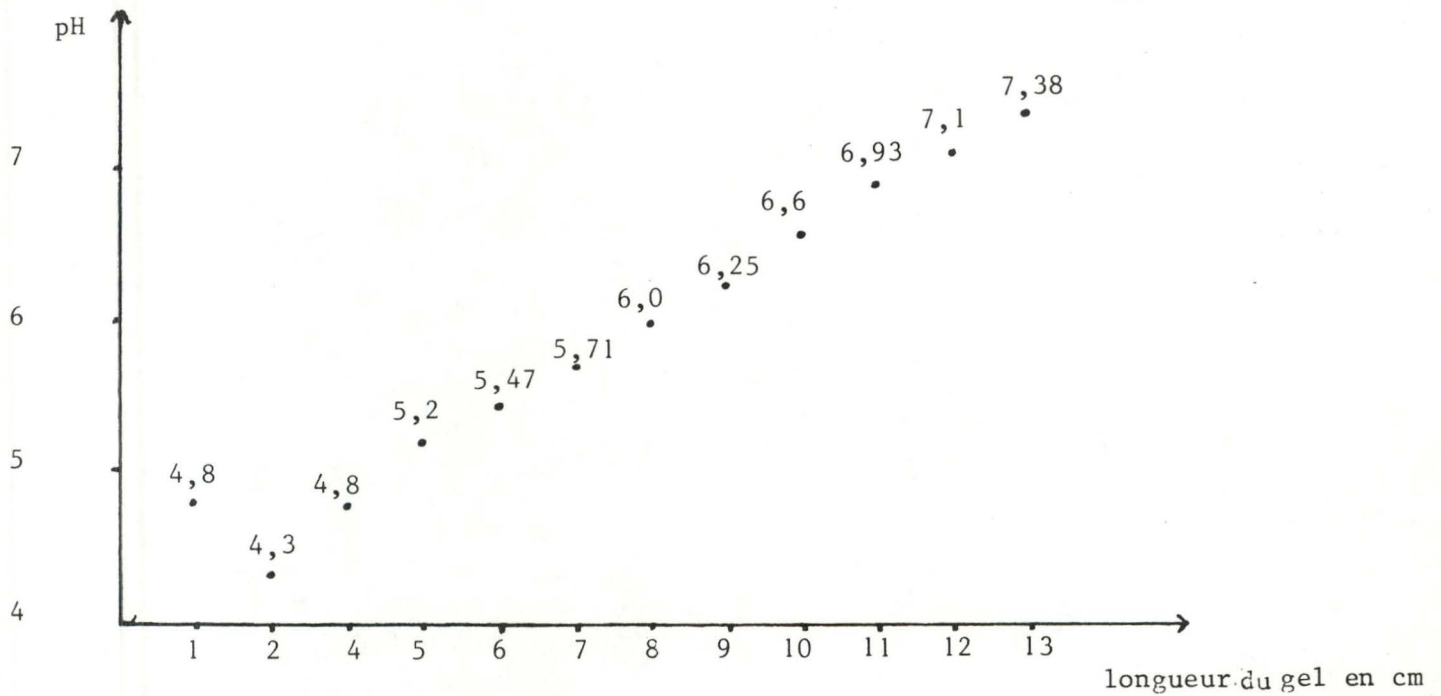


Photo 6 -  $\alpha_6$ . Analyse sur gel IEF (1D) et sur gel SDS (2D) des antigènes purifiés de classe I (173  $\mu\text{g/ml}$  dont 0,5 ml ont préalablement précipité dans 6 ml d'acétone) resuspendus dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF.

Détection au bleu de Coomassie.

Sur le graphe 2, nous voyons le gradient de pH qui s'est établi dans le gel IEF de référence. Que ce soit pour l' $\alpha_2$  ou l' $\alpha_6$  on voit une série de taches, situées entre pH 5,71 et 7,5 pour l' $\alpha_2$  et entre pH 5,0 et 6,25 par l' $\alpha_6$ .



Graph 2. Gradient de pH du gel IEF de référence.

Nous voyons que les taches des deux photos se situent au PM d'environ 45000 daltons.

Ce qui est intéressant de constater, c'est que les deux animaux n'ont pas la même disposition des taches. Or, nous avons vu que chaque individu dispose d'une combinaison antigénétique originale responsable de sa spécificité individuelle et de son identité immunologique. Bien sûr, il se peut qu'il s'agisse d'une focalisation différente d'un gel à l'autre, mais sur les deux photos, nous voyons dans la zone des bas poids moléculaires que les ampholytes précipités sont disposés de la même manière. Cela suppose que la migration a été identique. Nous devons cependant envisager la possibilité d'artéfacts pouvant résulter de la précipitation à l'acétone, de la carbamylation des groupements aminés des protéines par les isocyanates formés par décomposition de l'urée, de la glycosylation post-translationnelle. Pour nous assurer de la répétabilité de cette technique, nous avons vérifié la migration des antigènes BoLA de classe I des deux bovins ( $a_{12}$  et  $a_{16}$ ) en faisant plusieurs comparaisons.

### 2.3. Analyse sur gel IEF - Plusieurs comparaisons des antigènes des deux mêmes bovins

Des antigènes de l' $Al_2$ , des antigènes de l' $Al_{2+6}$ , des antigènes de l' $Al_6$  et des antigènes de l' $Al_6$ , préparés de même manière que précédemment et resuspendus dans 20  $\mu$ l de tampon IEF ont été déposés sur gels IEF; puis ils ont migré deux par deux, les deux premiers et les deux derniers, en SDS pour la 2ème dimension (voir photo 7).

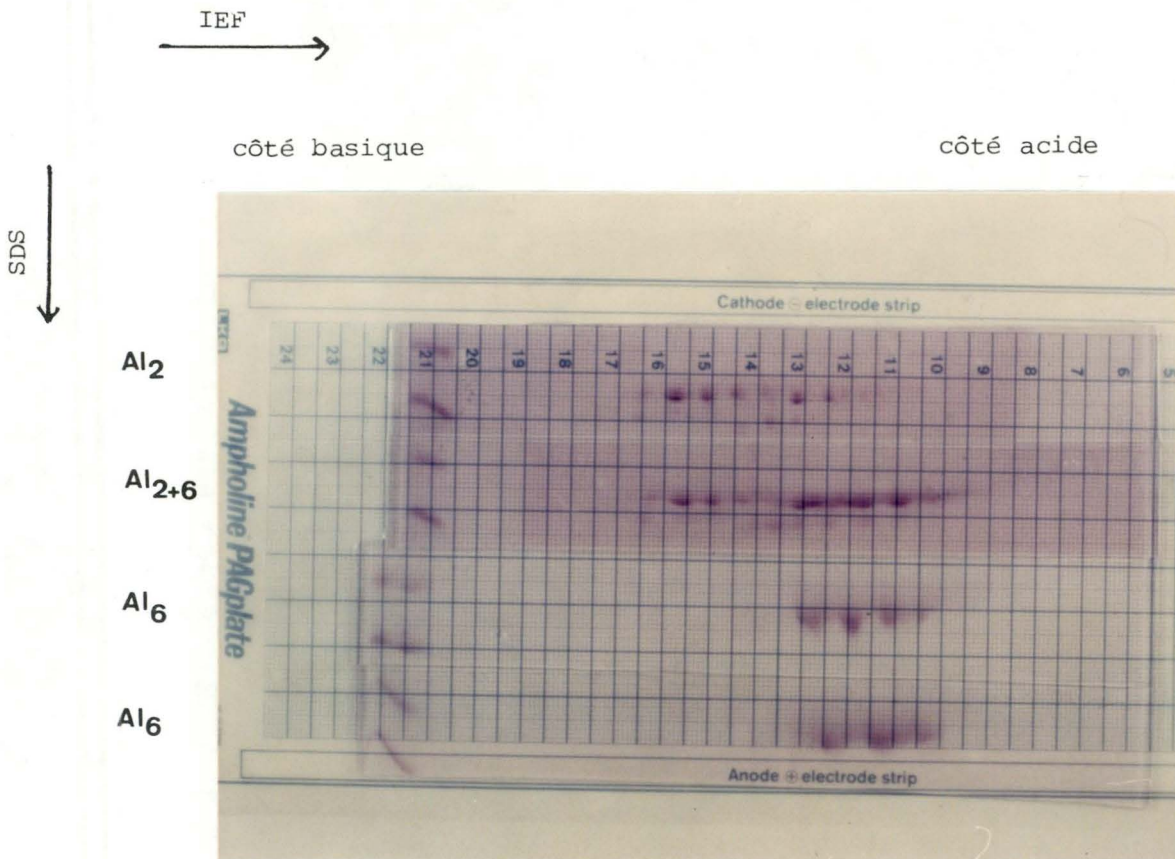


Photo 7. Analyse en gels IEF (1D) et en SDS (2D) d'antigènes purifiés de classe I de  $Al_2$  (91  $\mu$ g/ml) et  $Al_6$  (86,5  $\mu$ g/ml) de deux bovins, resuspendus dans 20  $\mu$ l de tampon IEF.

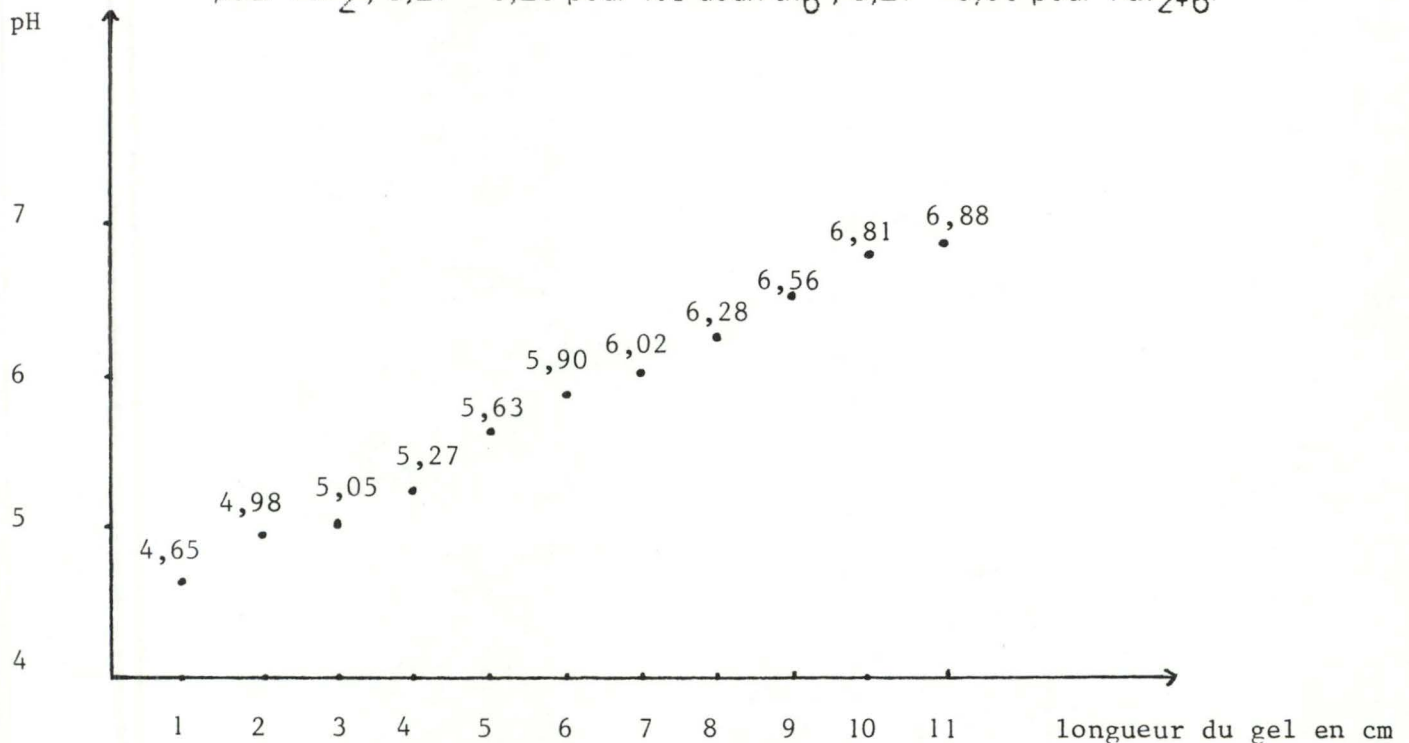
Détection au bleu de Coomassie

Les 4 gels ont été regroupés pour faciliter la comparaison.



Bien que les gels aient été découpés pour la présentation, nous savons que ces antigènes se situent à un PM de 45000 daltons environ.

Grâce au gel de référence établissant le gradient de pH du gel IEF (graphe 3), on peut situer les séries de taches entre pH 5,9 - 6,88 pour l'al<sub>2</sub>, 5,27 - 6,28 pour les deux al<sub>6</sub> ; 5,27 - 6,88 pour l'al<sub>2+6</sub>.



Grappe 3. Gradient de pH établi par le gel IEF de référence.

Nous constatons à nouveau des différences de charges entre al<sub>2</sub> et al<sub>6</sub>. De plus, les séries de taches sont situées plus ou moins aux mêmes endroits de pH que les séries des taches précédentes. En outre, en comparant deux par deux les gels, nous y retrouvons les mêmes taches, malgré une moins bonne isoélectrofocalisation pour les deux derniers, sans doute parce qu'elle s'est faite à une distance plus éloignée de la cathode (voir photo 7). Au niveau de l'al<sub>2+6</sub>, on retrouve l'ensemble des taches de al<sub>2</sub> et de al<sub>6</sub>, bien qu'il soit difficile de le montrer avec exactitude dans la zone d'intersection.

Ces taches devraient donc normalement représenter les différents produits de classe I. Mais nous ne devons pas négliger à nouveau la possibilité des artéfacts.

Voyant que la séparation des protéines et que la reproductibilité sont satisfaisantes, nous allons passer à un niveau de travail de routine à partir des immunoprécipités.

Cette technique éliminera en outre la possibilité d'un artéfact par l'acétone. Nous envisagerons également de travailler avec des réactifs déglycolysés.

### **III. Etude à partir des cellules**

#### **3.1. Mise au point de l'immunoprécipitation**

Après que les complexes antigènes-anticorps se soient liés aux SAC par l'intermédiaire de la protéine A, des lavages sont effectués pour éliminer les protéines qui se sont fixées de façon non spécifique aux SAC. Nous avons réalisé au départ deux lavages successifs avec du tampon SAC ovalbumine, et un lavage avec du tampon SAC ovalbumine SDS 0,1 %. Cependant, lors de la révélation par autoradiographie, nous avons constaté que ces lavages étaient insuffisants et qu'un trop grand nombre de protéines fixées non spécifiquement aux SAC étaient encore présentes. Nous avons dès lors utilisé d'autres tampons plus drastiques jouant notamment sur des grandes différences de concentration des solutions (cfr. méthodes : tampons immunomix). Nous pouvons voir les résultats sur les photos 8 et 9. De plus, en examinant la photo 8 on voit que la quantité de radioactivité déposée est trop importante ainsi que le temps d'exposition. Nous les avons donc modifiés, ce qui est visible sur la photo 9.

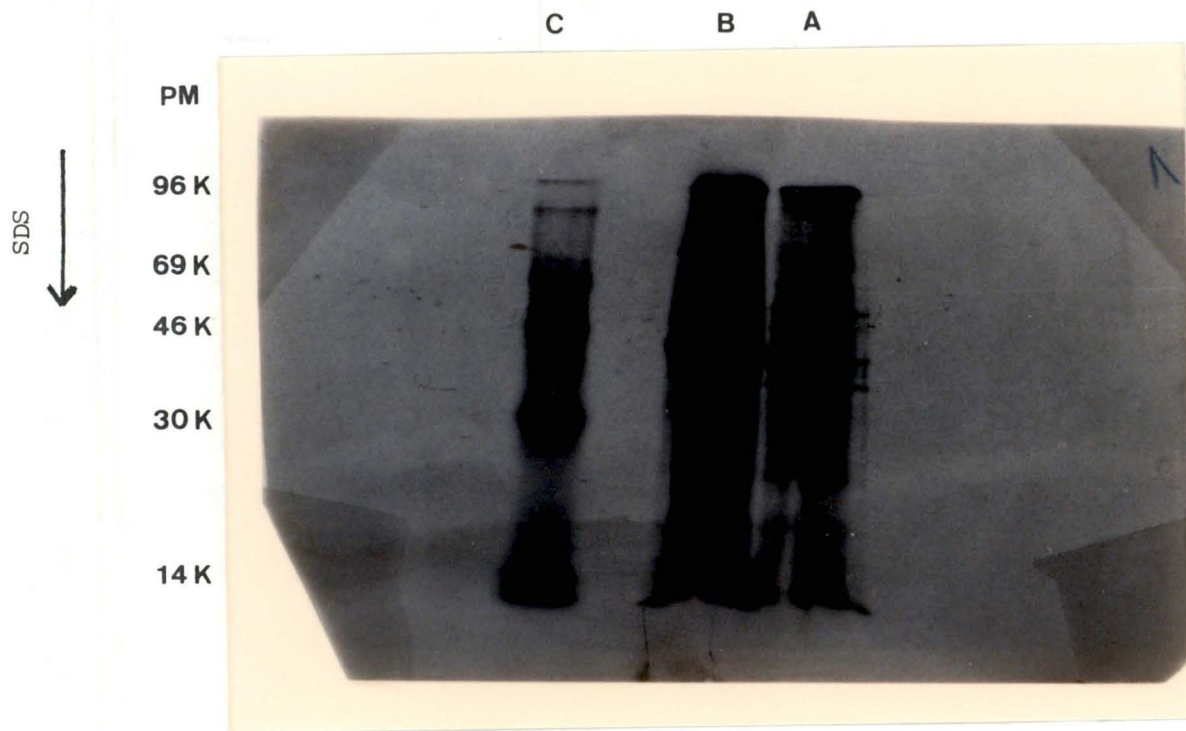


Photo 8. Analyse en SDS. Immunoprécipités lavés avec du tampon SAC ovalbumine et SDS 0,1 %.

A : piste du préclearing 15  $\mu$ l contenant 34635 cpm.

B : piste de l'immunoprécipité ayant réagi avec le 11B<sub>2</sub>. 15  $\mu$ l contenant 60952 cpm.

C : piste étalon 15  $\mu$ l.

Temps d'exposition de 96 h.



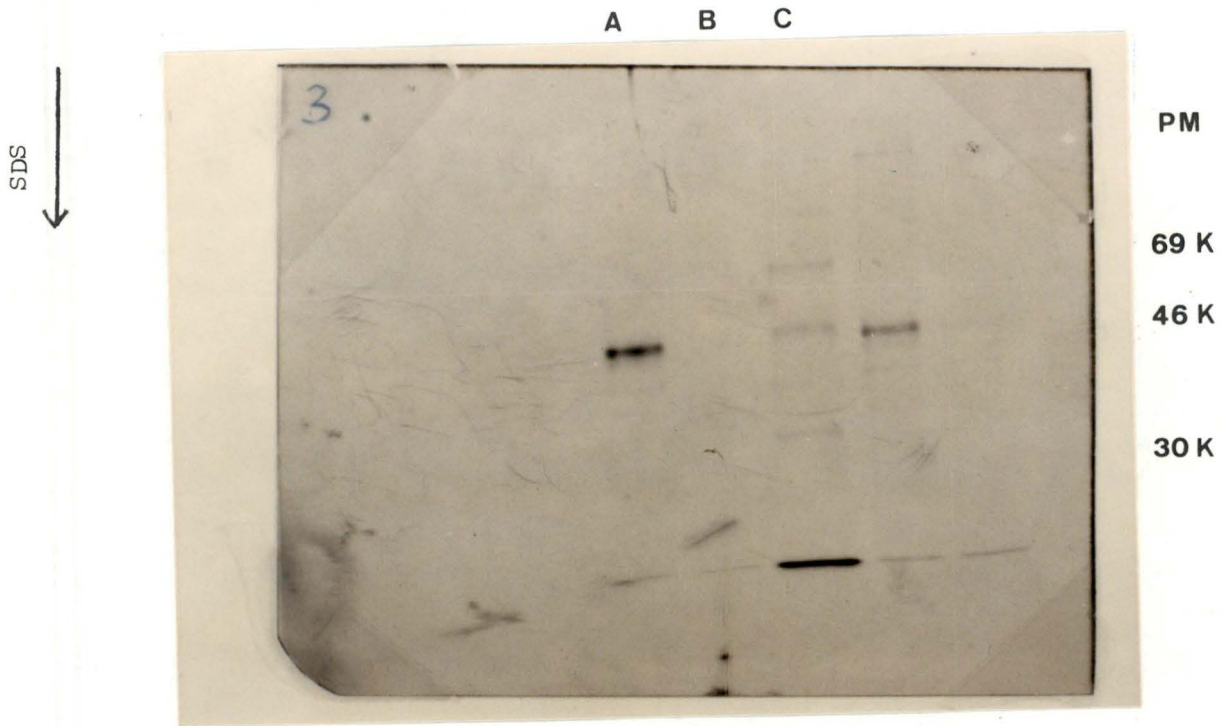


Photo 9. Analyse en SDS. Immunoprécipités lavés avec les tampons immunomix.

A : piste de l'immunoprécipité ayant réagi avec le 11B<sub>2</sub>. 10 µl contenant 11500 cpm.

B : piste du préclearing 10 µl contenant 12322 cpm.

C : piste étalon 10 µl

Temps d'exposition de 24 h.

Au début, pour chaque immunoprécipitation effectuée, nous avons séparé le culot du dernier lavage (cfr. méthodes), d'une part pour être resuspendu en tampon échantillon SDS (1/5) et d'autre part pour être resuspendu en tampon échantillon IEF (4/5). Ainsi par électrophorèse unidirectionnelle en SDS, suivie de l'autoradiographie pour la détection, on peut vérifier si les complexes antigènes-anticorps se sont bien formés, le préclearing nous servant de témoin négatif puisqu'il ne contient pas d'anticorps. On peut aussi vérifier leur PM, situé à 44000 daltons pour les antigènes BoLA de classe I, en comparant avec les bandes de protéines étalons de PM connus (voir photo10).

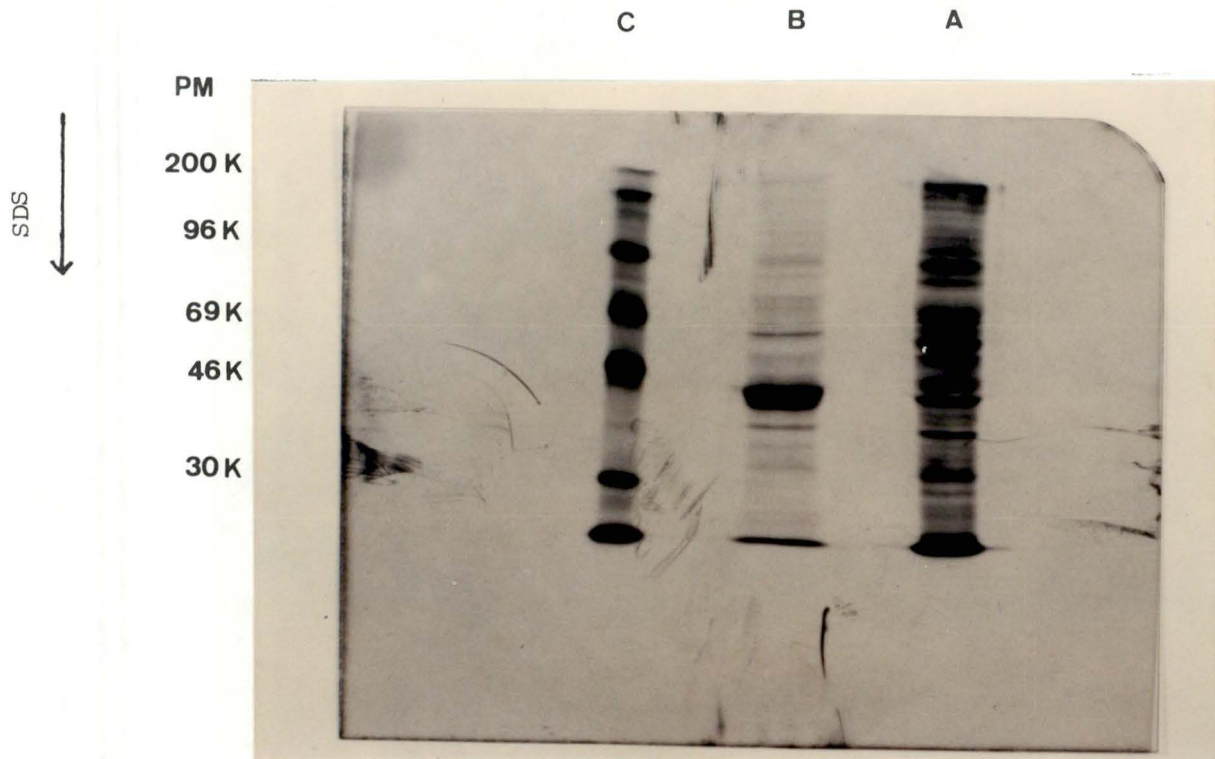


Photo 10. Analyse en SDS. Immunoprécipités lavés avec du tampon SAC ovalbumine et SDS 0,1 %.

A : piste du préclearing 15  $\mu$ l contenant 6735 cpm.

B : piste de l'immunoprécipité ayant réagi avec le 11B<sub>2</sub>. 15  $\mu$ l contenant 12180 cpm.

C : piste étalon 15  $\mu$ l.

Temps d'exposition de 60 h.

En passant d'abord par la technique en SDS 1ère dimension, cela nous permet, si l'immunoprécipité ne marche pas, d'éviter de faire l'électrophorèse bidirectionnelle, technique qui prend plus d'une semaine (1ère dimension, passage 1ère dimension sur 2ème dimension, 2ème dimension, temps d'exposition) pour obtenir des résultats. Si l'immunoprécipité est convenable, la suspension dans le tampon échantillon IEF (4/5) est alors utilisé pour faire l'électrophorèse en deux dimensions.

IEF (4/5) est alors utilisé pour faire l'électrophorèse en deux dimensions. Par la suite, puisque l'immunoprécipitation fonctionnait à chaque fois, nous avons resuspendu le culot du dernier lavage uniquement dans du tampon échantillon IEF pour l'électrophorèse bidirectionnelle.

### 3.2. Les antigènes BoLA de classe I des lymphocytes activés à la PHA

Nous avons d'une part, déposé un immunoprécipité resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF sur gel IEF et d'autre part, un immunoprécipité traité préalablement à la neuraminidase et resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF a été déposé également sur gel IEF pour la 1ère dimension (préparation cfr. méthodes). Les deux gels IEF ont ensuite migré en SDS pour la deuxième dimension (voir photo 11 et 12).

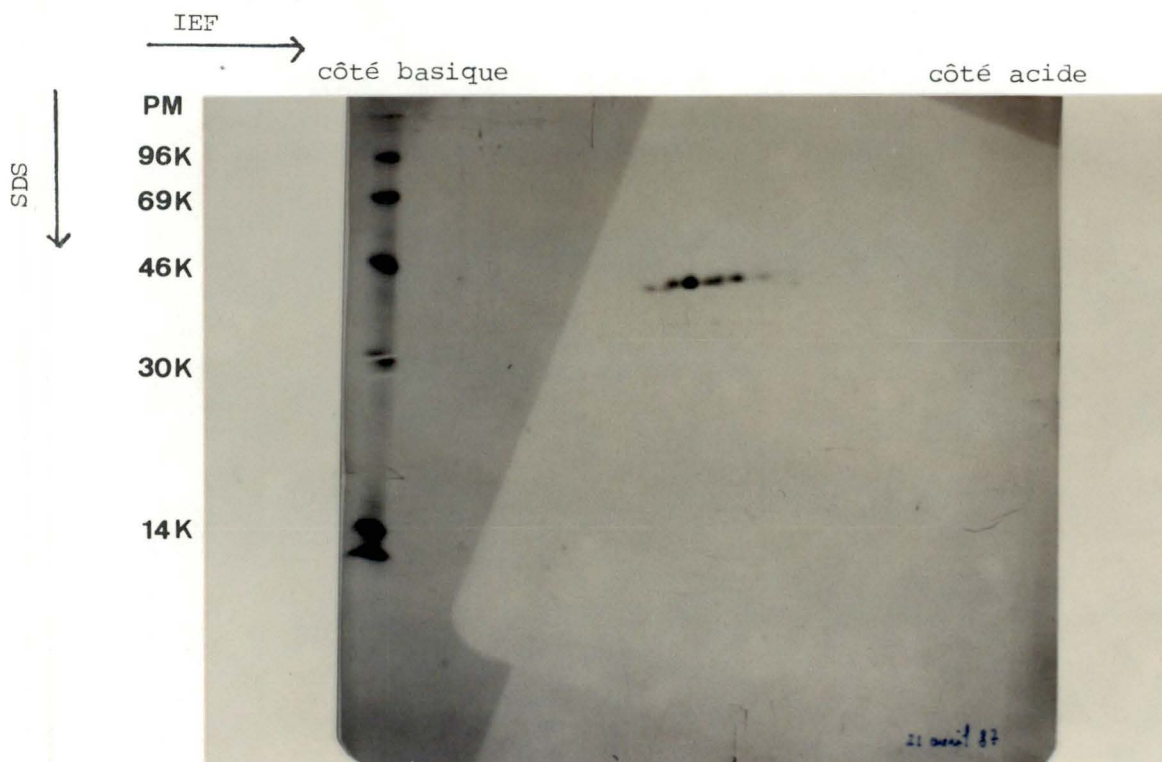


Photo 11. Analyse en gels IEF (1D) et SDS (2D). Antigènes de classe I provenant de lymphocytes activés à la PHA. L'immunoprécipité ayant réagi avec le 11B<sub>2</sub>, resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF contenant 10500 cpm a été déposé sur le gel IEF. Temps d'exposition de 72 h.



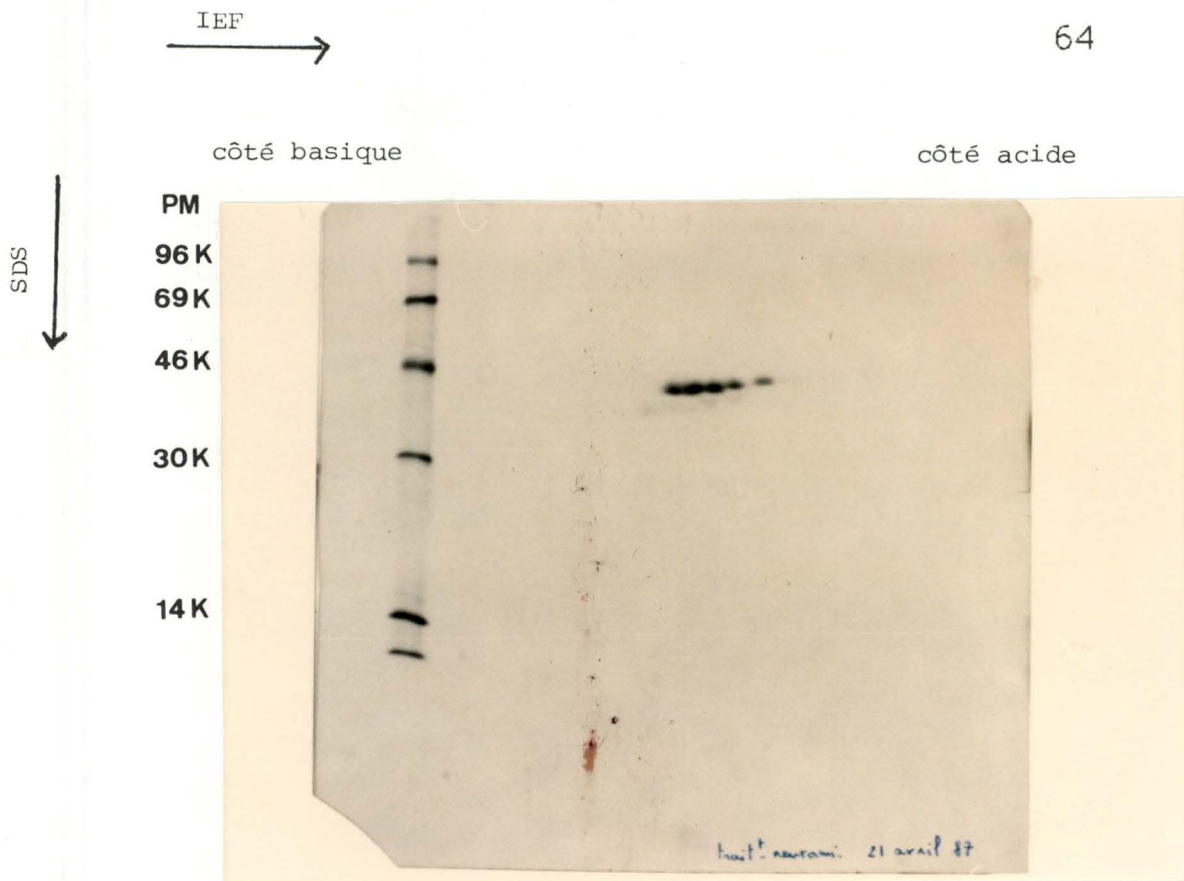


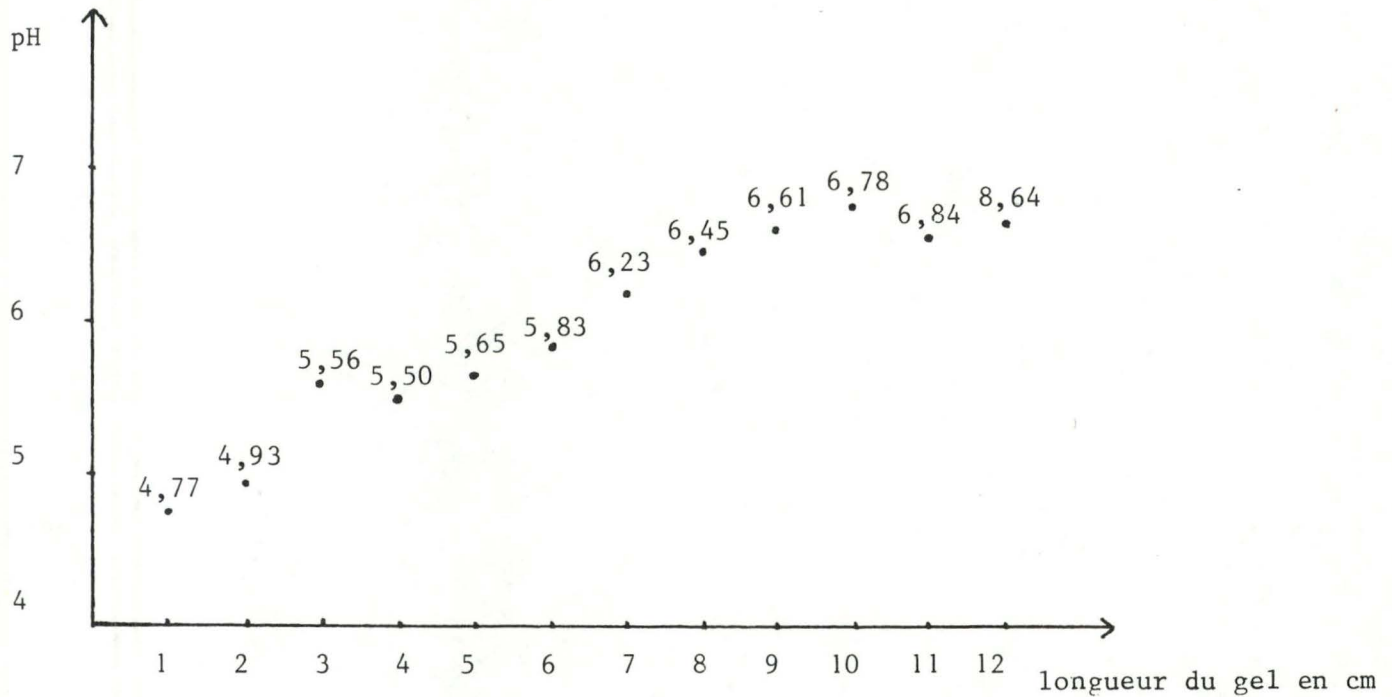
Photo 12. Analyse en IEF (1D) et SDS (2D).

Antigènes de classe I provenant de lymphocytes activés à la PHA et traités à la neuraminidase (incubation 4 h).

L'immunoprécipité ayant réagi avec le 11B<sub>2</sub>, resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF contenant 18860 cpm a été déposé.

Temps d'exposition de 72 h.

Par l'intermédiaire du gradient de pH du gel IEF de référence (graphe 4), nous voyons que la série de taches se situe entre pH 5,83 et 6,61 pour le premier et entre pH 5,83 et 6,78 pour le second. Les deux sont situés à un PM d'environ 45000 daltons.



Graphe 4. Gradient de pH établi par le gel IEF de référence.

Nous constatons une légère différence au niveau des charges entre les deux gels, avec un déplacement du côté basique pour les antigènes traités à la neuraminidase. Ceci semblerait logique puisque la neuraminidase enlève les résidus d'acides sialiques, constituant une partie de la chaîne glucidique des antigènes de classe I, qui sont chargés négativement, ce qui entraîne une stabilisation des antigènes à un pH plus basique.

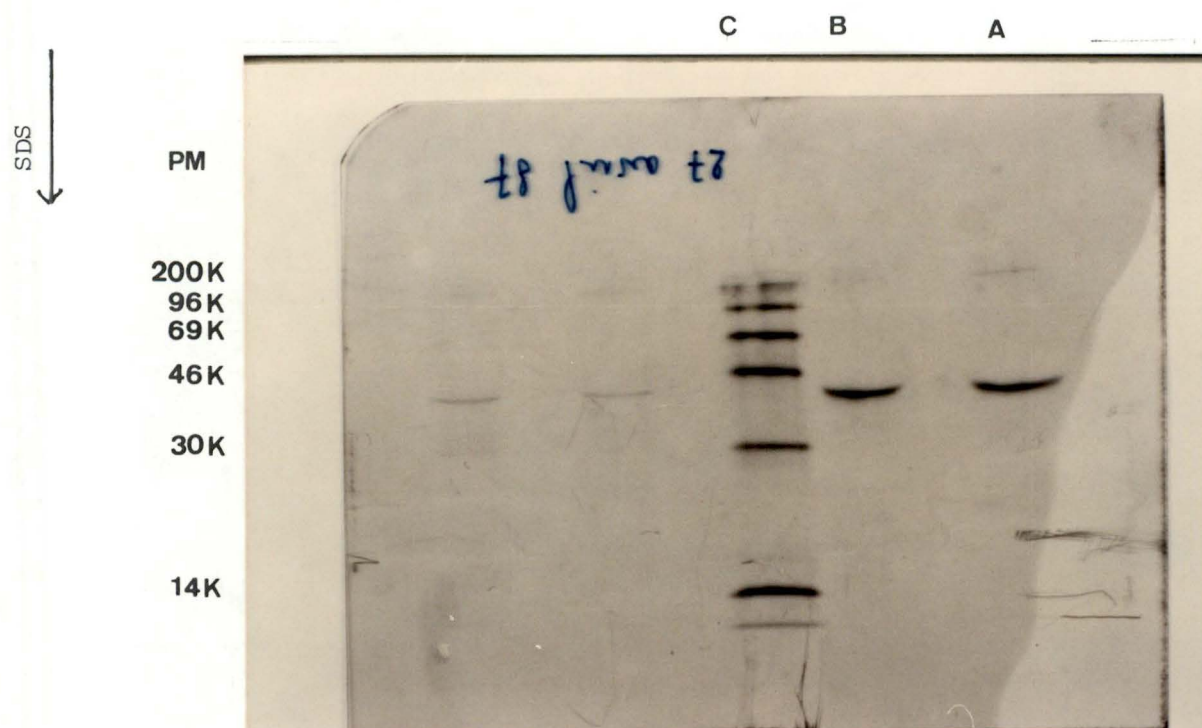
Cependant, nous ne constatons pas de différence réelle quant au modèle des taches, il y a juste la 3ème tache sur la photo 11 qui apparaît plus intense. Cela voudrait donc dire que les acides sialiques ne contribuent pas au polymorphisme structural des produits BoLA de classe I dans la mesure où la neuraminidase a été effective.

Nous avons également utilisé la tunicamycine, qui empêche la glycosylation, pour voir le rôle du reste des hydrates de carbone des antigènes de classe I (action de la tunicamycine cfr. méthodes). Cette étude s'est faite sur des cellules de lignée myéloïde car elles se multiplient rapidement.

### 3.3. Les antigènes BoLA de classe I des cellules de lignée myéloïde

Nous avons d'abord testé l'effet de la tunicamycine sur les cellules de lignée myéloïde ( $2 \cdot 10^6$  ml) à diverses concentrations : 1, 2, 3, 4  $\mu\text{g/ml}$ . Nous l'avons laissé réagir pendant 6 heures sans voir une modification de la viabilité de ces cellules. On a choisi 1  $\mu\text{g/ml}$  comme concentration de la tunicamycine pour qu'il n'y ait pas d'affectation de la synthèse protéique. Pour l'immunoprécipitation, 100  $\mu\text{l}$  d'extrait cellulaire ont été ajoutés aux SAC au lieu de 50  $\mu\text{l}$  habituellement utilisés. L'immunoprécipité non traité à la tunicamycine resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon SDS et l'immunoprécipité traité à la tunicamycine (1  $\mu\text{g/ml}$ ) resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon SDS ont été déposés sur gel SDS pour une vérification préalable de ces immunoprécipités (voir photo 13).





**Photo 13.** Analyse en SDS. A : L'immunoprécipité traité à la tunicamycine, resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon SDS contenant 17120 cmp a été déposé sur le gel. B : L'immunoprécipité non traité à la tunicamycine, resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon SDS contenant 11200 cmp a été déposé sur le gel. C : bande étalon. Temps d'exposition : 72 h.

On constate que pour les deux immunoprécipités, les complexes antigènes-anticorps se sont bien formés, par contre on ne voit pas une différence dans les PM; ils sont situés tous les deux aux environs de 45000 daltons. Or, normalement, la tunicamycine inhibe la glycosylation, ce qui devrait se noter par une diminution légère du PM. Nous avons alors examiné ce qui se passait en deux dimensions.

L'immunoprécipité non traité à la tunicamycine resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF et l'immunoprécipité traité à la tunicamycine (1  $\mu$ g/ml) resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF ont été déposés sur gel IEF et ont migré ensuite sur gel SDS pour la deuxième dimension (voir photos 14 et 15).

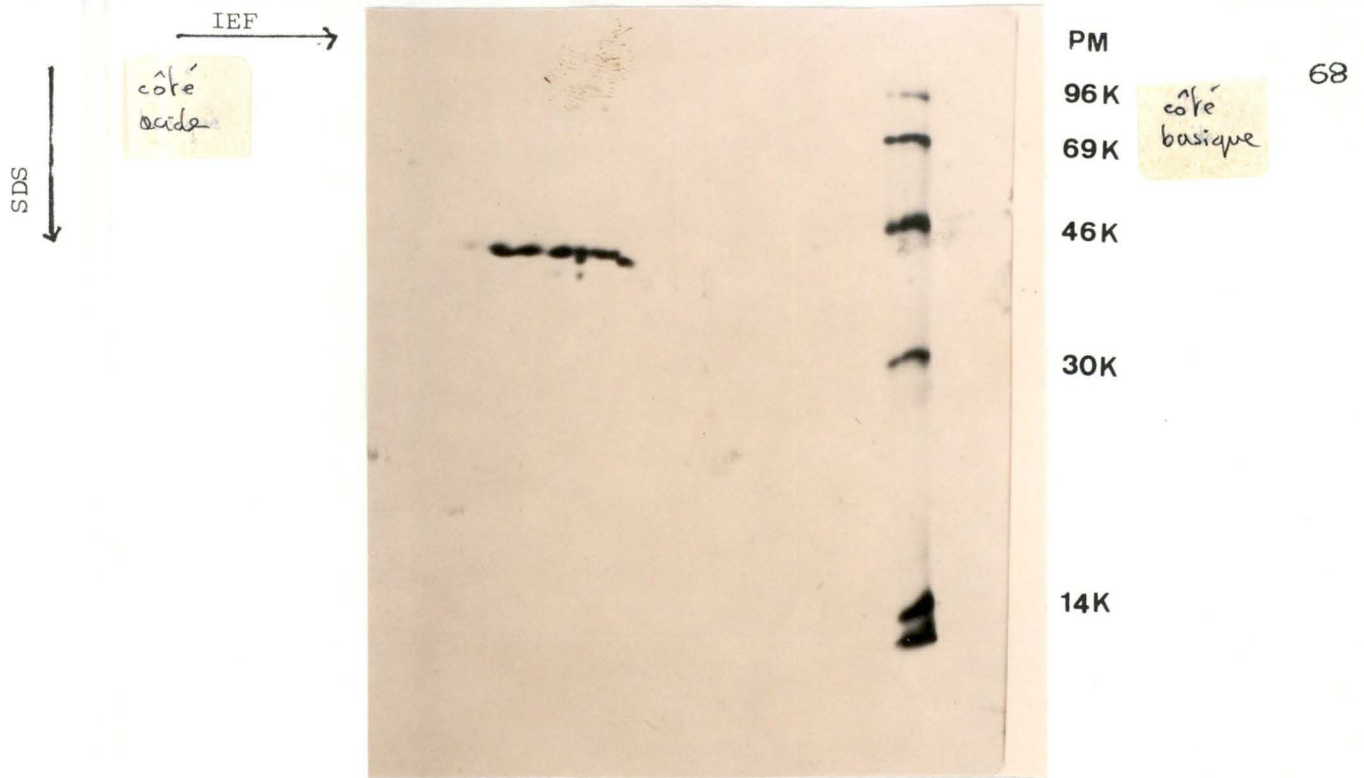


Photo 14. Analyse en IEF (1D) et en SDS (2D). Antigènes de classe I de cellules de lignée myéloïde non traités à la tunicamycine. L'immunoprécipité resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF contenant 16000 cpm a été déposé. Temps d'exposition : 96 h.



Photo 15. Analyse en IEF (1D) et en SDS (2D). Antigènes de classe I de cellules de lignée myéloïde traités à la tunicamycine. L'immunoprécipité resuspendu dans 20  $\mu$ l de tampon IEF contenant 26000 cpm a été déposé. Temps d'exposition : 72 h.



Malheureusement, ici nous n'avons pas établi le gradient de pH suite à une erreur de manipulation. D'une part, il n'y a aucune différence au niveau du PM, et d'autre part, aucun changement dans les charges, ce qui voudrait dire que la tunicamycine n'aurait pas eu d'effet sur la glycosylation. De plus, il n'y a aucune modification dans le modèle des taches.

Il se peut que la quantité de tunicamycine utilisée soit trop faible (1 µg/ml) pour qu'un effet visible soit apparent. Nous n'avons pas eu le temps de le vérifier à d'autres concentrations.

Nous voyons également sur les deux photos, deux taches, chacune d'elles représentant une chaîne polypeptidique unique contaminante. Ces deux taches ont une disposition identique de part et d'autre et ne montrent pas l'apparition d'autres petites taches dans le sens IEF, ce qui signifierait qu'il n'y a pas d'artéfact provoqué par une carbamylation. De plus, on retrouve cette même série de taches sur l'électrophorèse témoin de 5 µl de lysat cellulaire total contenant 400000 cpm développé après 10 jours (résultats non montrés).

Les dernières vérifications se feront en gel IEF en une seule dimension.

#### **IV. Gel IEF en une dimension**

La procédure en deux dimensions sera abandonnée en faveur de la procédure en IEF sous une dimension, car la double dimension, bien qu'extrêmement discriminante, ne permet d'analyser qu'un seul échantillon par gel et implique l'utilisation de matériel radioactif pour le repérage des antigènes séparés au départ d'un extrait cellulaire. La simple dimension IEF permet au contraire l'analyse simultanée de plusieurs échantillons et donc leur comparaison immédiate. De plus, elle laisse la possibilité d'avoir recours à d'autres méthodes de détection que l'autoradiographie, car elle peut supporter une charge protéique plus importante.



Procédé

Le gel IEF est coulé engel plat de 0,75 mm d'épaisseur, de 6 cm de longueur, de 8 cm de largeur.

Préparation du gel :

9 M urée	: 2,7 g		
acrylamide	: 30 %		750 µl
bisacrylamide	: 1,6 %		
NP40 - 10 %	: 1 ml		
Ampholytes :	pH 5-7	4%	500 µl
	pH 3,5-10	1 %	130 µl
	pH 7-9	0,4 %	50 µl
eau			5 ml

avant d'ajouter le reste, il faut que l'urée soit dissoute

+ APS 10 %    10 µl

+ TEMED        5 µl

ici, on ne dégaze pas la solution,

un peigne de 10 pistes est placé pendant le temps de polymérisation.

**Electrophorèse** : on place le NaOH 50 mM dégazé dans la cuve centrale, l'électrode étant relié à la cathode.

On place le  $H_3PO_4$  20 mM dans l'autre partie de la cuve, on dispose les échantillons : 20 µl dans les puits, on les surmonte de 10 µl de sample overlay et de NaOH.

Ensuite, un courant de 300 volts est appliqué pendant 4 heures et 500 volts pendant 1 heure.

L'immunoprécipitation s'est faite à partir des cellules de lignée myéloïde. L'immunoprécipité traité à la tunicamycine (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF, l'immunoprécipité non traité à la tunicamycine resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF et l'immunoprécipité non traité à la tunicamycine mais traité à la neuraminidase (5  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF ont été déposés sur le gel IEF (voir photo 16).

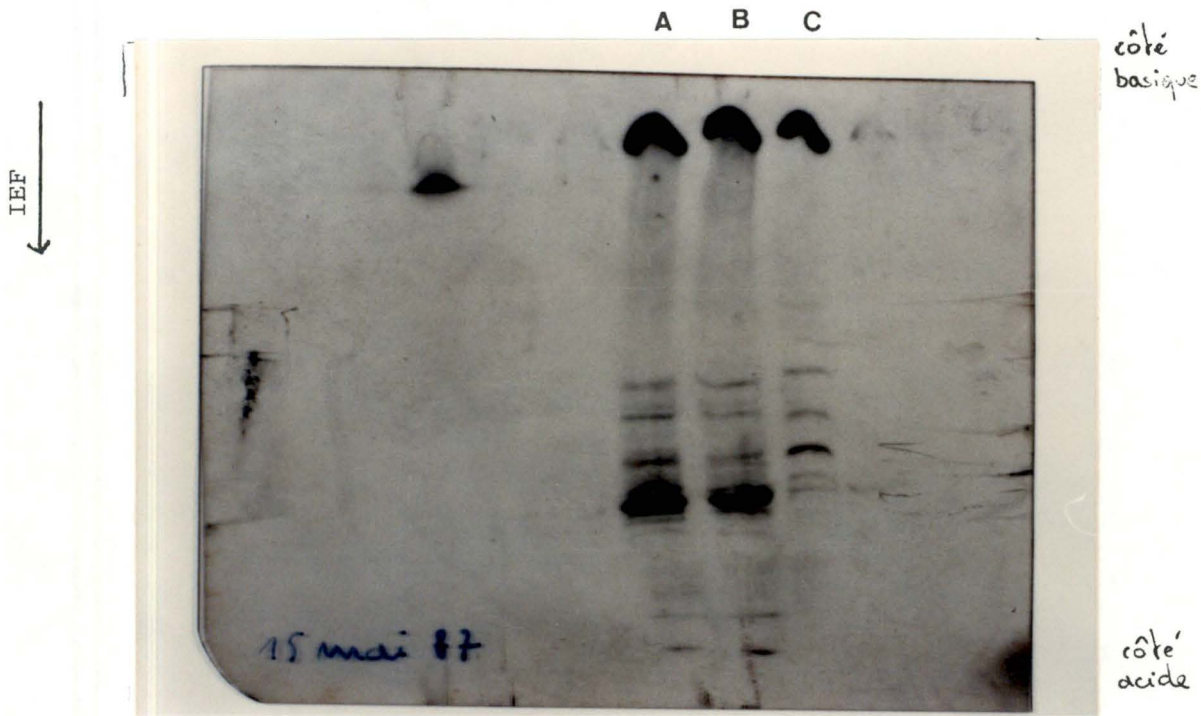


Photo 16. Analyse en IEF (1D).

Antigènes de classe I à partir de cellules de lignée myéloïde.

A : L'immunoprécipité traité à la tunicamycine (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF contenant 4360 cpm a été déposé.

B : L'immunoprécipité non traité à la tunicamycine resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF contenant 6540 cpm a été déposé.

C : L'immunoprécipité traité à la neuraminidase (5  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ), resuspendu dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon IEF contenant 4760 cpm a été déposé.

Temps d'exposition : 168 h.

En comparant les différentes bandes qui apparaissent, l'on voit d'une part aucune modification entre les antigènes traités ou non traités à la tunicamycine, ce qui confirme ce que l'on a vu précédemment et d'autre part, nous voyons qu'avec un traitement à la neuraminidase, il y a un déplacement des bandes vers le côté basique, ce qui montre bien l'effet de la neuraminidase sur les résidus d'acides sialiques.

Cependant à nouveau, on ne remarque pas une différence réelle dans le modèle de ces bandes et l'hétérogénéité est toujours présente.



# CONCLUSIONS

## **Conclusions et perspectives**

Dans ce travail, nous n'avons montré qu'une faible partie des essais effectués, car en effet nous avons rencontré divers problèmes notamment pour la polymérisation des gels IEF et NEPHGE et lors du démoulage des gels de 1ère dimension, soit ils cassaient, soit nous ne distinguons plus le côté acide du côté basique. Néanmoins malgré ces aléats, la technique semble au point et la reproductibilité est suffisante pour comparer les protéines par cette technique en deux dimensions (voir photos 5 et 6). Pour les antigènes bovins, l'analyse en deux dimensions illustre une grande hétérogénéité de ces molécules, non seulement d'un animal à l'autre mais également à l'intérieur des molécules d'un seul animal. Nous avons essayé dans la mesure des moyens d'éliminer toutes les causes artéfactuelles pouvant être responsables de l'hétérogénéité remarquée. Nous ne pouvons pas incriminer la précipitation à l'acétone puisque même les antigènes sans ce traitement (cfr. les immunoprécipités) conservent une multiplicité de localisation sur le gradient de pH. On pourrait éventuellement attribuer l'hétérogénéité constatée à une carbamylation différentielle d'un ou plusieurs polypeptides. Néanmoins, nous pensons que ce n'est pas le cas pour plusieurs motifs :

- dans certaines autoradiographies en deux dimensions des protéines contaminantes à un PI acide (cfr. photos 14 et 15) existent sous la forme de spot unique et bien que traitées de la même manière des antigènes d'histocompatibilité, ne montrent pas de modification de charge due à la fixation de cyanate.
- D'autre part, l'ensemble des spots observés après immunoprécipitation se trouve comme tel sur un gel en deux dimensions réalisé sur un lysat total.



Pour les mêmes raisons, nous pouvons éliminer la modification artéfactuelle des protéines extraites au NP40 pour l'immunoprécipitation. Nous pouvons également affirmer que la resuspension des antigènes en tampon IEF ne produit pas de modifications des protéines (P.P. Jones, 1977). Avant d'affirmer que les multiples spots observés sont formés par des polypeptides distincts, il ne faut pas perdre de vue que les antigènes d'histocompatibilité sont des glycoprotéines et que certaines modifications observées pourraient refléter des déplacements dans la mobilité causés par des glycosylations séquentielles d'un même polypeptide. Divers auteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différences notables dans les résidus osidiques entre antigènes d'histocompatibilité issus d'allèles d'un même locus (Parham P. et coll., 1977).

Il a été démontré qu'une certaine hétérogénéité persistait même quand les produits radiomarqués précipités résultaient de marquage membranaire à l'iode 125. On peut donc exclure, dans ce cas, l'intervention, dans l'hétérogénéité, d'une glycosylation post-translationnelle car toutes les protéines précipitées sont des produits terminaux (P.P. Jones, 1977).

Pour tenter néanmoins de diminuer ce risque, nous avons eu recours à divers moyens :

- d'une part, l'anticorps monoclonal utilisé tant pour purifier que pour précipiter les protéines est un anticorps reconnaissant l'association chaîne lourde de classe I avec la  $\beta_2m$  et donc des produits "pré-terminaux". Celui-ci nous permettra normalement d'éviter des interférences avec les produits en cours de maturation.
- d'autre part, nous avons tenté, par deux approches différentes, de supprimer les modifications que pourraient apporter les résidus osidiques.



La voie qui consistait à inhiber la glycosylation par emploi de la tunicamycine dans le milieu d'incorporation n'a pas été fructueuse; une étude ultérieure avec des doses de drogues plus importantes sera poursuivie.

En ce qui concerne l'emploi de la neuraminidase aux doses couramment employées dans la littérature et suivant les conditions prescrites dans celle-ci (J.J. Neefjes, 1986), nous avons pu mettre en évidence un léger "shift" de la série des spots vers le côté basique. Ce qui semble corroborer l'élimination des résidus d'acides sialiques, sans que nous puissions préjuger des caractéristiques complètes de cette élimination. Nous avons constaté également malgré ce déplacement vers la cathode que l'hétérogénéité persistait dans une certaine mesure.

Afin de continuer ce travail et d'arriver à une certitude en ce qui concerne l'origine distincte des différents spots observés, il nous faudra affiner les processus de déglycosylation pour s'assurer qu'elle est complète, soit en augmentant les doses de tunicamycine, soit en dosant avant et après traitement à la neuraminidase, les acides sialiques au niveau des antigènes.

Ce point établi, il restera à rattacher tout ou partie de cette hétérogénéité à la possession de tel ou tel allèle ou de tel ou tel locus.

Nous ne pouvons avec certitude affirmer que le monoclonal utilisé dans ce travail reconnaît l'ensemble des molécules de classe I exprimé par un individu; il serait donc intéressant d'étudier divers monoclonaux pour voir s'ils reconnaissent une partie ou tous les loci de classe I. Nous avons par ailleurs remarqué que le 4F4 reconnaissait quelques spots : 4 au lieu de 6 reconnus par le 11 $\beta$ <sub>2</sub>. Nous pouvons également envisager différents monoclonaux anti-HLA-A, B et C humains monomorphes qui sont connus

pour leur réaction croisée avec leur équivalent bovin (ex. : Anticorps W6/36 décrit par Brodsky et al., 1981 et utilisé aussi par J.J. Neefjes, 1986).

Munis de cet outil supplémentaire, nous pouvons envisager par des études familiales d'établir une correspondance entre certains polypeptides et des spécificités sérologiques classiquement définies. Donc en finale, pour rattacher tel ou tel polypeptide au seul locus défini actuellement, les polypeptides restant devront provenir de loci différents.

Pour conclure et malgré le caractère performant et reproductible de la technique en deux dimensions, nous ne pouvons l'envisager comme technique pour un travail de routine.

Aussi avons-nous essayé de la transposer à une analyse en simple dimension IEF qui, en ce qui concerne ces antigènes particuliers, devrait permettre d'obtenir des résultats discriminants permettant de comparer sur un seul gel les antigènes de nombreux individus.



# BIBLIOGRAPHIE



## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aaron P. Turkewitz, C.P. Sullivan, M.F. Mescher. Large-scale purification of murine I-A<sup>k</sup> and I-E<sup>k</sup> antigens and characterization of the purified proteins. *Molecular Immunology*, vol. 20, n° 11, 1139-1147; 1983.
- Anderson NL, B.J. Hickman. Analytical techniques for cell fractions xxiv. Isoelectric point standards fro two dimensional electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 93, 312-320; 1979.
- Andersson L., J. Böhme, L. Rask, P.A. Peterson. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes : 2. polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Animal Genetics* 1986, 17, 295-304
- Bortolozzi J., Hines H.C. Histocompatibility Antigens and disease resistance in Jersey breed of cattle. *Second World Congress on Genetics applied to livestock production, Madrid; Symposia. 7 : 325-330, 1982.*
- Bravo R. Two-Dimensional gel electrophoresis : A guide for the beginner 3-36. *Two-Dimensional gel Electrophoresis of Proteins*. Ed. : R. Bravo, J.E. Cells, 1984 (Academic Press).
- Brodsky FM., Stone WH., Parham P. Of Cows and Men; a comparative study of histocompatibility antigens. *Human Immunology*, 3 : 143-152; 1981
- Caldwell J., Cumberland P.A., Weseli D.F., Williams J.D. Breed differences in frequency of BoLA specificities. *Anim. Blood Groups Biochem Genet.*, 10 : 93-98, 1979

- Charron, D. Biochimie et expression moléculaire des produits HLA. Ch. 8, 138-153. Flammarion Médecine-Sciences : HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme; 1985. Ed. : Dausset J., Pla M.
  
- Dausset, J. HLA Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Introduction : 1-10. Flammarion Médecine-Sciences; 1985. Ed. : Dausset J., Pla M.
  
- Duksin D., W.C. Mahoney. Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of Tunicamycin. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 257, n° 6, 3105-3109; 1982.
  
- Fries R., R. Hediger, G. Stranzinger. Tentative chromosomal localization of the bovine major histocompatibility complex by in situ hybridization. Animal Genetics; 1986, 17, 287-294.
  
- Hames B.D. An Introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. 1-91; 1985. Gel electrophoresis of proteins a practical approach. Ed. : B.D. Hames, D. Rickwood. IRL Press.
  
- Jones P.P. Analysis of H-2 and Ia molecules by two-dimensional gel electrophoresis. The Journal of experimental medicine, vol. 146, 1261-1279; 1977.
  
- Kessler S.W. Use of protein A-bearing Staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. Methods in Enzymology, vol. 73, part B, 442-459. Ed. : Langone, Van Vunakis (Academic Press); 1981.

- Kindt J.J., Robinson M.A. Major Histocompatibility Complex Antigens. *Fundamental Immunology*, 347-377; 1984. Ed. : Paul W.E., Raven Press, New York.
- Klein J. Biochemical aspect of H<sub>2</sub> antigens. *Biology of the mouse Histocompatibility-2 Complex* Springer-Verlag (Heidelberg-N.Y.), 351-383; 1975.
- Leibold W., G. Büscher, J.J. Letesson, B. Uchanska-Ziegler, W. Davis, K.T. Friedhoff. Different subsets of bovine mononuclear cells from one individual established as lymphoblastoid cell lines (BoLCL) in vitro. Submitted to the 1<sup>st</sup> International Veterinary Immunology Congress, 1986, Guelph, Canada.
- Lepage V., Raffoux C. Polymorphisme serologique des antigenes de classe 2 : les series alléliques DR, DQ, DP. Ch. 5, 89-100. *Flammarion Médecine-Sciences : HLA Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme*, 1985. Ed. : Dausset J., Pla M.
- Letesson J.J., Coppe Ph., Lostrie N., Depelchin A. A bovine Ia like antigen detected by a xenogeneic monoclonal antibody. *Animal. Bl. Groups Biochem. Genet.*, 14. 239-250; 1983.
- Letesson J.J., Coppe Ph., Lostrie N., Depelchin A. Production of monoclonal antibodies detecting MHC allo-antigens in cattle. *Cell mediated immunity a CEC meeting*. Ed. : Quinn P.J., 107-121; 1984.
- Letesson J.J., Lostrie N., Depelchin A. Production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'isotypes d'immunoglobulines bovines. *Ann. Med. Vet.*, 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 13 : 213-226; 1986.
  
- Lindhal P., Leary P., Gresser I. Enhancement by interferon of the expression of histocompatibility antigens of mouse lymphoid cells in vitro. *Eur. J. Immunol.*, 4: 779; 1973.
  
- Neefjes J.J., B.S. Breur-Vriesendorp, G.A. Van Seventer, P. Ivanyi, H.L. Ploegh. An improved biochemical Method for the analysis of HLA-Class I Antigens. Definition of new HLA - Class I subtypes. *Human Immunology* 16, 169-181; 1986.
  
- Newman M.J., Antzak D.F. Histocompatibility polymorphisms of domestic animals. *Advances in veterinary sciences (and comparative medicine)*, vol. 27 : 2-76; 1983.
  
- Nobuo Ui. Isoelectric points and conformation of proteins. 1. Effect of area on the behavior of some proteins in isoelectric focusing. *Biochem. Biophys. Acta*, 229 : 567-581; 1971.
  
- O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 250, n° 10 : 4007-4021; 1975.
  
- Parham P., Alpert B.N., Orr H.T., Strominger J.L. Carbohydrated moiety of HLA Antigens. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 252, n° 21 : 7555-7567; 1977.

- Parham P. Purification of immunologically active HLA-A and B antigens by a serie of monoclonal antibodies columns. *J. Biol. Chem.* 254 : 8709-8712; 1979.
- Righetti P.G., Drysdale J.W. Theory and fundamental aspects of IEF. 357-373. Isoelectric focusing. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Ed. : T.S. Work, E. Work; 1980.
- Solbu H., Spooner R.L., Lie O. A Possible influence of the MHC on mastitis. 7 : 368-371, 1982. Second World Congress on genetics applied to livestock production. Madrid.
- Spooner R.L., Leveziel H., Grosclaude F., Olivier R.A., Vaiman M. Evidence for a possible MHC in cattle. *J. Immunogenet.* 5 : 335-346; 1978.
- Stear M.J., Newman M.J., Nicholas F.W., Brown S.C., Holroyd R.G. Thick resistance and the major histocompatibility system. *Aust. J. Exp. Med. Sci.*, 62 : 47-52; 1984.
- Terasaki P.I., Mc Clelland J.D. Microdroplets assay of human cytotoxins. *Nature*, 204 : 998-1000; 1964.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. : USA.* 76 : 4350-4354; 1979.
- Usinger W.R., Curie-Cohen M., Benforado K., Pringnitz D., Rowe R., Splitter G.A., Stone W.H. The bovine MHC : close linkage of the genes controlling serologically defined antigens and MLR. *Immunogenetics*, 14 : 423-428; 1981

- Vaiman M. Le groupe de liaisons génétiques du complexe HLA. Ch. 3 : 38-58. Flammarion Médecine-Sciences HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme, 1985. Ed. : Dausset J., PLa M.