



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Problèmes inhérents à l'immunoprécipitation des antigènes d'histocompatibilité de classe II chez les bovins

Walravens, Karl

Award date:
1988

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

PROBLEMES INHERENTS A L'IMMUNOPRECIPITATION
DES ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE
DE CLASSE II CHEZ LES BOVINS

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

Karl WALRAVENS
1987 - 1988

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR
Tél.081-22.90.61 Tél'ex 59222 facnam-b Téléfax 981-23.03.91

PROBLEMES INHERENTS A L'IMMUNOPRECIPITATION
DES ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE DE
CLASSE II CHEZ LES BOVINS

WALRAVENS Karl

Résumé

L'étude du polymorphisme des antigènes de classe II bovins par des techniques biochimiques (Ief) est rendue indispensable par l'incapacité de la sérologie classique d'obtenir des antisérums adéquats et à cause des nombreuses limitations des techniques du génie génétique. Cependant, pour entreprendre le typage systématique des bovins, il nous fallait purifier les antigènes de classe II par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps monoclonal : le B₂ Val 7C7.

Très vite, nous avons constaté qu'il était impossible d'extrapoler le protocole utilisé pour les antigènes de classe I aux produits de classe II. Nous nous sommes alors attachés à définir les conditions optimales de l'immunoprécipitation des produits de classe II. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à éliminer certains contaminants. Il semblerait que ces protéines contaminantes soient coprécipitées avec l'antigène de classe II. Il s'agirait donc de protéines "associées" dont la présence signifierait l'intervention des molécules de classe II dans des phénomènes d'activation des cellules B au repos.

Il n'en reste pas moins que pour l'analyse des produits de classe II en Ief, de nouvelles conditions d'immunoprécipitations sont à étudier pour éliminer ces contaminants "spécifiques".

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1988

Laboratoire d'Immunologie

Promoteur : Prof. A. DEPELCHIN

Avant de commencer ce mémoire, je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur A. DEPELCHIN, qui a bien voulu assumer la direction de ce travail et nous a encouragé de ses conseils.

Toute ma gratitude va au Docteur J.J. LETESSON pour sa collaboration, sa compétence et sa sympathie.

Que Madame LOSTRIE-TRUSSART soit assurée de toute ma reconnaissance pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

J'adresse également un merci tout particulier aux membres du laboratoire pour leur aide technique; je pense à Monsieur DIDEMBOURG, à Madame MULUMBA-ALBERT. Toute ma sympathie va aussi à Madame DIDEMBOURG-POOS.

Je remercie également les membres du laboratoire de chimie-physiologique (Professeur WATTIAUX) pour leur aide scientifique et technique.

Ma gratitude va au Professeur FEYTMANS, au Professeur PAQUAY, ainsi qu'à l'unité de microscopie électronique pour m'avoir permis de disposer de leur matériel.

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

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION

1. <u>LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE (CMH)</u>	1
1.1. GENERALITES -----	1
1.2. DEFINITION - CARACTERISTIQUES - POLYMORPHISME -----	3
1.2.1. Définition	3
1.2.2. Caractéristiques géniques	3
1.2.3. Polymorphisme	4
1.3. <u>LE CMH HUMAIN (HLA)</u> -----	4
1.3.1. Caractéristiques communes aux antigènes de classe I et II	5
a. Organisation en domaines	6
b. Fonction immunitaire primordiale	7
§. Molécules du CMH : "présentoir à peptides"	
§. Le phénomène de restriction	
§. Rôle spécifique des antigènes de classe I et de classe II	
§. Rôle du polymorphisme des molé- cules du CMH dans la présentation des antigènes étrangers	
1.3.2. Les antigènes de classe I	12
a. Structure biochimique des anti- gènes de classe I	
b. Expression cellulaire des anti- gènes de classe I	
c. Autres molécules de classe I.	

	<u>Pages</u>
1.3.3. Les antigènes de classe II	14
a. Structure	14
1. Structure protéique des chaînes légères et lourdes et leur polymorphisme	
2. La chaîne Ii associée	
3. Complexes oligosaccharidiques associés à la protéine	
b. Les gènes de classe II et leurs polymorphismes	16
c. Polymorphisme combinatoire des produits de classe II	19
d. Distribution des antigènes de classe II	20
 1.4. <u>LE CMH BOVIN</u>	 21
1.4.1. Les antigènes de classe I	21
1.4.2. Les antigènes de classe II	22
 2. <u>MOYENS D'ETUDE DU POLYMORPHISME DU CMH</u>	 24
2.1. <u>ANALYSES DES PRODUITS DU CMH</u>	24
2.1.1. Introduction	24
2.1.2. La sérologie	25
a. Technique d'analyse	
b. Production des antisérums	
c. Limite de la sérologie	
2.1.3. Les études cellulaires	28
a. Techniques	
b. Limites	

	<u>Pages</u>
2.1.4. Les techniques biochimiques	31
a. Ief	
b. Digestion peptidique partielle	
c. Limite commune aux techniques biochimiques	
2.1.5. Etude génétique	35
a. Principe	
b. Limites	
3. <u>INTERET DE L'ETUDE DU CMH</u>	38
3.1. <u>CHEZ L'HOMME</u>	38
3.2. <u>CHEZ LE BOVIN</u>	38
4. <u>BUT DU TRAVAIL</u>	40
 <u>MATERIEL ET METHODES</u>	
1. <u>ANTICORPS MONOCLONAUX UTILISES</u>	41
1.1. <u>CARACTERISTIQUES DES ANTICORPS UTILISES</u>	41
1.2. <u>OBTENTION DES ANTICORPS</u>	43

	<u>Pages</u>
2. PURIFICATION DE L'ANTIGENE PAR <u>IMMUNOPRECIPITATION</u>	45
2.1. PREPARATION DES CELLULES -----	45
2.1.1. Préparation des cellules mononuclées du sang périphérique	46
2.1.2. La lignée myéloïde établie	47
2.1.3. Préparation des splénocytes	48
2.1.4. Cellules stimulées à la phytohémagglu- tinine	49
a. Principe	
b. Procédé	
2.2. MARQUAGE DES CELLULES PAR INCORPORATION DE METHIONINE S ³⁵ -----	50
2.2.1. Principe	50
2.2.2. Procédure	51
2.3. EXTRACTION DES PROTEINES MEMBRANAIRES -----	52
2.3.1. Lyse des cellules	53
2.3.2. Séparation des protéines membranaires à l'aide du Triton X114	53

	<u>Pages</u>
3. PURIFICATION D'ANTIGENE PAR CHROMATOGRAPHIE <u>D'AFFINITE</u>	69
3.1. PURIFICATION D'ANTIGENE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE ET MARQUAGE A L'IODE ¹²⁵	69
3.1.1. Préparation de l'extrait antigénique brut	69
3.1.2. Chromatographie d'affinité	70
3.2. MARQUAGE DES PROTEINES PURIFIEES A L'IODE ¹²⁵	71
3.2.1. Principe	71
3.2.2. Protocole	72
4. <u>ANALYSE</u>	74
4.1. <u>PROCESSUS ELECTROPHORETIQUE</u>	74
4.1.1. Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	74
a. Principe	
b. Procédure	
4.1.2. Electrophorèse bidirectionnelle	78
a. Principe général	
b. Première dimension	
c. Deuxième dimension	
4.2. <u>DETECTION</u>	84
a. Autoradiographie	84
b. Coloration au bleu de coomasie	85

	<u>Pages</u>
2.4. <u>MESURE DE LA RADIOACTIVITE</u>	54
2.4.1. Principe de scintillation liquide	54
2.4.2. Procédure de mesure de la radioactivité	56
a. Radioactivité précipitable	
b. Radioactivité totale	
2.5. <u>IMMUNOPRECIPITATION</u>	57
2.5.1. Principe	57
2.5.2. Type de protéine A disponible et préparation pour l'immunoprécipitation	58
a. Nature de la protéine A insoluble	
b. Préparation de la protéine A en vue de l'immunoprécipitation	
2.5.3. "Preclearing"	60
2.5.4. Immunoprécipitation proprement dite	61
a. Introduction du monoclonal	61
b. Ajout du 2e anticorps : le Rabbit anti-mouse	61
c. Adjonction de la protéine insoluble	62
d. Lavage du complexe immunoprécipité	62
e. Elution des protéines retenues	64.

	<u>Pages</u>
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	
0. <u>PREAMBULES</u>	86
0.1. <u>AVIS AU LECTEUR</u>	86
0.2. <u>CHOIX DE L'ANTICORPS B₂ Val 7C7</u>	87
 <u>PREMIERE PARTIE</u>	
1.1. PREMIERE ETAPE : TRANSPOSITION DES CONDITIONS D'IMMUNOPRECIPITATION DES ANTIGENES DE CLASSE I AUX ANTIGENES DE CLASSE II	89
1.1.1. Expérience n° 1	89
a. Résultats	90
b. Discussion	90
1.1.2. Expérience n° 2	92
a. Résultats	92
b. Discussion	92
1.1.3. Conclusion	93
1.2. DEUXIEME ETAPE : EFFET DES CONDITIONS D'ELUTION SUR LA BANDE DE 30000 DE POIDS MOLE- CULAIRE ET SUR LA ZONE FORTEMENT MARQUEE DU SOMMET DU GEL	95
a. Résultats	95
b. Discussion	96

	<u>Pages</u>
1.3. TROISIEME ETAPE : ESSAI D'ELIMINATION DES CONTAMINANTS -----	98
1.3.1. Utilisation des lavages drastiques	98
a. Résultats	98
b. Discussion	99
1.3.2.1. Mise au point de la sépara- tion de phase TX 114	99
a. Résultats	100
b. Discussion	100
1.3.2.2. Comparaison d'immunoprécipités réalisés sur une phase déter- gente et sur un lysat total	101
a. Résultats	102
b. Discussion	102

DEUXIEME PARTIE

2. DENSITE ANTIGENIQUE DES CELLULES UTILISEES POUR <u>LE MARQUAGE ISOTOPIQUE</u> -----	104
2.1. IMMUNOPRECIPITATION A PARTIR DE CELLULES MYELOIDES ETABLIES -----	104
a. Résultats	105
b. Discussion	106
2.2. IMMUNOPRECIPITATION A PARTIR DE CELLULES MONONUCLEES DU SANG PERIPHERIQUE STIMULEES A LA PHA -----	108
a. Résultats	109
b. Discussion	110

	<u>Pages</u>
<u>TROISIEME PARTIE</u>	
3. <u>ELIMINATION DES CONTAMINANTS</u>	111
3.1. CHOIX DU SUPPORT SOLIDE ET DE LA QUANTITE DE MATERIEL AU DEPART DE L'IMMUNOPRECIPITE -----	111
a. Résultats	113
b. Discussion	113
3.2. APPLICATION DU PROTOCOLE CHOISI A DEUX TYPES DE LYSATS ET DEUX TYPES D'ELUTIONS -----	115
a. Résultats	115
b. Discussion	116
3.2. CONCLUSION PARTIELLE -----	117
 <u>QUATRIEME PARTIE</u>	
4. <u>DETERMINATION DE LA CAUSE DE FAIBLESSE DU SIGNAL PRESENTEE PAR DES ANTIGENES DE CLASSE II BOVINS</u>	118
4.1. FIXATION DU B ₂ Val 7C7 SUR LA PROTEINE A : EMPLOI D'UNE PROCEDURE INDIRECTE -----	118
a. Résultats	119
b. Discussion	119
4.2. EVALUATION DE LA PERTINENCE DU PRECLEARING ET DE L'EFFICACITE DU TAMPON D'ELUTION TDN pH 11 -----	121
4.2.1. Première approche	121
a. Résultats	122
b. Discussion	124

	<u>Pages</u>
4.2.2. Effet d'un changement de température et vérification du problème inhérent au preclearing	125
a. Résultats	125
b. Discussion	126
4.2.3. Lavage du culot de preclearing	127
a. Résultats	128
b. Discussion	128
4.3. TENTATIVE D'UTILISATION D'ANTIGENES DE CLASSE II PURIFIES MARQUES DANS LA MISE AU POINT DE LEUR IMMUNOPRECIPITATION	131

4.3.1. Purification des molécules de classe II par chromatographie d'affinité	131
a. Résultats	132
b. Discussion	132
4.3.2. Marquage de l'Iode ¹²⁵ des molécules de classe II purifiées	134
a. Résultats	135
b. Discussion	135

CINQUIEME PARTIE

5. DETERMINATION DU PATTERN DE BANDES SPECIFIQUEMENT PRECIPITEES PAR LE B ₂ Val 7C7 ET TENTATIVE DE DEFINITION DE LA NATURE DU CONTAMINANT DE <u>60000 PM</u>	138
5.1. TENTATIVE DE DEFINITION DE LA NATURE DU CONTAMINANT DE 60000 PM -----	138
a. Résultats	139
b. Discussion	140
5.2. DETERMINATION DU PATTERN DE BANDES SPECI- FIQUEMENT PRECIPITE PAR LE B ₂ Val 7C7 -----	141
a. Résultats	141
b. Discussion	142
 <u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	 145

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

I N T R O D U C T I O N

Appellation du CMH.	Espèces.
HLA	Homme
H-2	Souris
BoLA	Bovin
OLA	Mouton
DLA	Chien
SLA	Porc
RLA	Lapin
ELA	Cheval
GpLA	Cobaye

Tableau 1: appellation du complexe majeur d'histocompatibilité de quelques espèces où il a été identifié; d'après M. Vaiman (4).

1. LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE (CMH)

1.1. GENERALITES

Dès 1938, le généticien américain Peter Gorer montrait que les rejets de greffe de peau entre souris de souches différentes étaient dus à des différences entre donneurs et receveurs au niveau de protéines exprimées à la surface cellulaire (1,2,3).

Il baptisa ces molécules : antigènes H-2.

Le gène H-2, considéré au début comme unique, s'est révélé être un complexe de gènes polyalléliques étroitement liés (3).

Parmi les systèmes géniques intervenant dans le rejet d'un organe ou d'un tissu, le système H-2 a été reconnu comme le complexe MAJEUR d'histocompatibilité (CMH) car il induit un rejet rapide des transplants incompatibles et l'apparition d'anticorps aisément décelables (3)

Vingt ans après la découverte de P. Gorer, l'immunologiste français J. Dausset découvrait à la surface des globules blancs humains, les molécules homologues des antigènes H-2 murins, qui furent appelés antigènes HLA (Human Leukocyte Antigens) (1).

L'organisation génique du CMH est maintenant bien connue chez l'homme et la souris. Son étude se développe aussi dans d'autres espèces pour lesquelles une appellation spécifique a été proposée (tableau 1).

On constate qu'entre le CMH des différentes espèces de vertébrés étudiés, il existe une homologie tant fonctionnelle que structurelle, ce qui témoigne de l'émergence lointaine de cette région chromosomique au cours de l'évolution (4).

Le rejet de greffe n'est pas le rôle naturel de ces gènes, ce n'est qu'une manifestation artéfactuelle de la fonction du CMH induite par l'expérimentation. Cette manifestation n'exerçant aucune pression évolutive, elle ne peut expliquer la conservation du CMH. En réalité, depuis quelques années, un nombre croissant d'arguments indiquent que c'est en fait l'ensemble des réponses immunitaires qui est sous le contrôle de ces molécules du CMH. On peut alors parler de complexe majeur de l'immunité (5).

Le CMH aurait donc dans le système immunitaire un rôle de chef d'orchestre comparable à celui de l'hypothalamus dans le système endocrinien.

Le rôle biologique actuellement proposé pour les produits du CMH est la présentation de l'antigène au cours de la reconnaissance spécifique par des lymphocytes T (6,7,8,9).

Mais, vu la large distribution tissulaire de ces molécules, leur fonction non immunologique peut être d'intervenir dans des phénomènes plus vastes de reconnaissance entre cellules et dont l'implication dans des réponses immunitaires ne serait qu'une application (10).

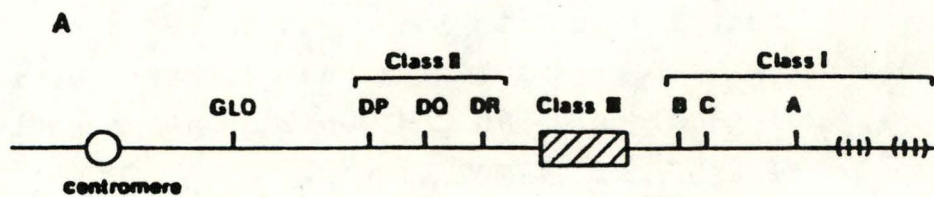


Figure 1: organisation des loci de classe I ,II et III du CMH humain sur le petit bras du chromosome 6; d'après J.Trowsdale (25).

1.2. DEFINITION - CARACTERISTIQUES - POLYMORPHISME

1.2.1. Définition

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un segment chromosomique portant un ensemble de gènes fonctionnellement et topographiquement liés, intervenant dans divers mécanismes fondamentaux de l'immunologie (3).

1.2.2. Caractéristiques géniques

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

Le CMH est polygénique, c'est-à-dire qu'il est constitué de toute une série de loci ETROITEMENT LIÉS sur un même chromosome (6) (figure 1).

Le CMH est également polyallélique, car pour chaque locus, on a de nombreux allèles dont la quantité varie en fonction du locus (6). Une combinaison particulière d'allèles de tous les gènes du CMH que peut porter un chromosome s'appelle un haplotype d'histocompatibilité.

Le CMH est enfin codominant, ce qui signifie que chaque allèle sur chaque chromosome est exprimé et que son produit peut être détecté en utilisant une technique adéquate (6).

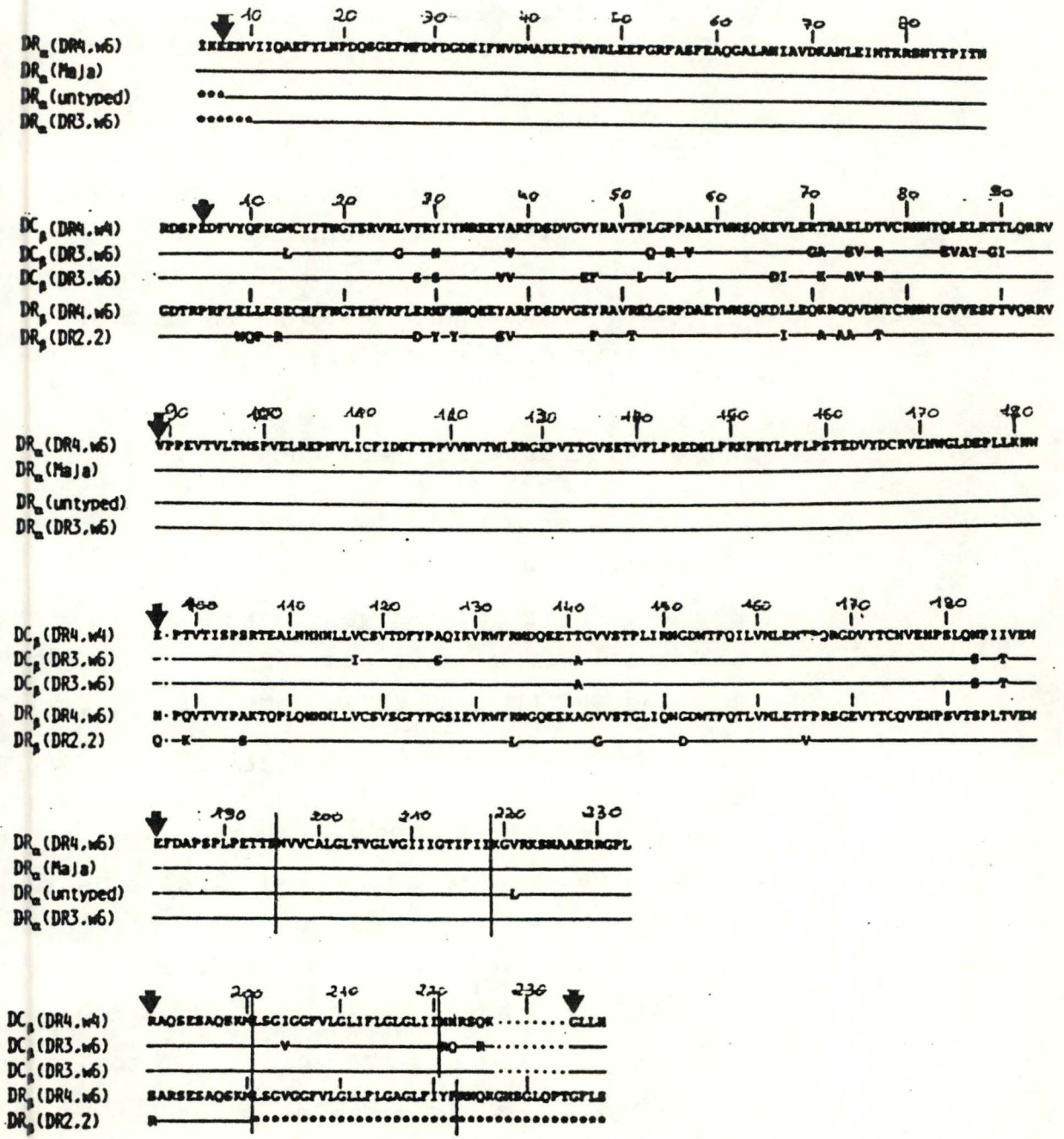


Figure 2: diversité de séquence entre des allèles de classe II humains. Les séquences d'acides aminés sont comparées entre 4 allèles DR α (lignée cellulaire B DR4,w6, cellules Maja, individu non typé, lignée B DR3,w6), entre 2 allèles DR β (lignée cellulaire B DR4,w6 et DR2,2) et entre 3 allèles DC β (lignée cellulaire B DR4,w4 et 2 lignées cellulaires B DR3,w6); d'après L. Smith et al. (17).

1.2.3. Polymorphisme

En conséquence de ces caractéristiques géniques : polygénie, polyallélisme et codominance, les produits du CMH présentent un très large polymorphisme.

En effet, les nombreux loci du CMH codent chacun pour une série allélique différente. Et chaque produit d'un allèle se distingue de celui d'un autre allèle par sa structure primaire, c'est-à-dire sa séquence en acides aminés (figure 2); ce polymorphisme aura des conséquences tant d'un point de vue fonctionnel (voir chapitre 1.3.1.b) que d'un point de vue analytique (voir chapitre 2).

1.3. LE CMH HUMAIN (HLA)

Ce sont les CMH de l'homme et de la souris qui ont été les plus étudiés et qui servent aujourd'hui de référence lorsqu'on étudie celui d'une autre espèce, que ce soit selon une approche génétique, biochimique, cellulaire ou sérologique.

Nous décrirons ici le CMH humain car en plus d'être bien connu, il semble qu'il possède une forte homologie avec le CMH bovin (11).

Le CMH humain localisé sur le chromosome 6 (12) se divise classiquement en deux grands groupes de loci; les gènes de classe I et de classe II qui codent pour

des antigènes à structure et fonctions différentes. Les gènes codant pour les composants du complément; C_2 , C_4a , C_4b et proactivateur de C_3 ou Bf sont souvent appelés gènes de classe III car leurs loci sont liés à ceux du CMH (13). Mais ces protéines ont un rôle très différent de celui des molécules de classe I et II, c'est pourquoi de nombreux auteurs ne les incluent pas dans le CMH (6,14).

Quoi qu'il en soit, nous commencerons par décrire les caractéristiques communes des antigènes d'histocompatibilité, avant de donner une brève description des molécules de classe I; par la suite, nous insisterons sur la structure et les moyens d'études des antigènes de classe II qui constituent notre sujet d'étude.

1.3.1. Caractéristiques communes aux antigènes de classe I et II

A première vue, les molécules d'histocompatibilité de classe I semblent fonctionnellement et structurellement fort différentes de celles de classe II. Cependant, une observation plus approfondie nous révèle qu'elles partagent de nombreuses propriétés peut-être à cause d'une origine commune entre autre :

- l'organisation en domaines
- fonction immunologique.

Les différences qui les caractérisent seraient alors la conséquence d'une diversification évolutive à partir d'une base commune (15)

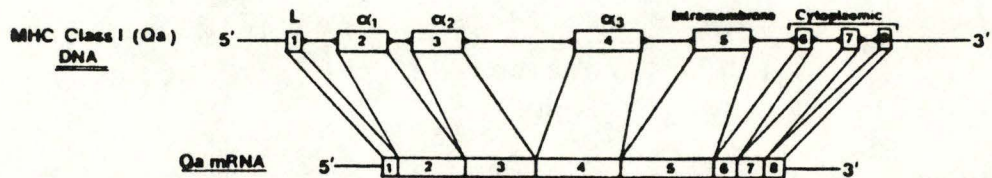


Figure 3: structure des configurations génomique et messenger d'un gène du CMH de classe I(Qa). L (1): séquence leader; α_1 (2), α_2 (3), α_3 (4): domaines extracellulaires de la chaîne lourde; intramembrane (5): domaine transmembranaire; cytoplasmique (6, 7, 8): domaine cytoplasmique; d'après W.Cushley et al. (16).

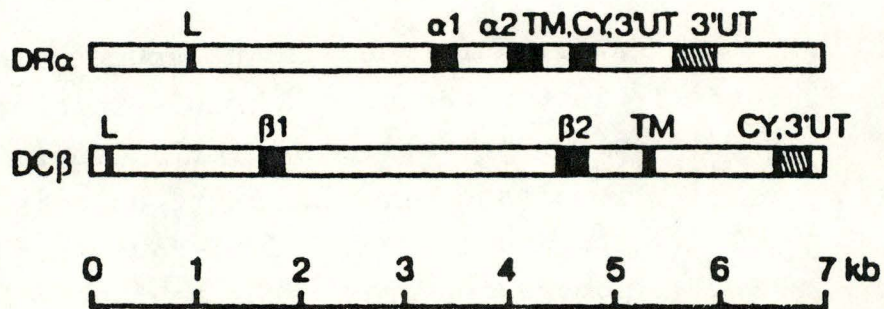


Figure 4: organisation en intron-exon des gènes humains DR α et DC β . L: séquence leader; α_1 , α_2 , β_1 , β_2 : domaines extracellulaires; TM: domaine transmembranaire; CY: domaine cytoplasmique; 3'UT: région 3' non traduite; d'après L.Smith et al. (17).

a. Organisation en domaines

L'organisation structurale de base des produits de classe I et de classe II est similaire. Ces molécules sont constituées de 4 domaines extracellulaires d'environ 90 acides aminés chacun, souvent délimités de part et d'autre par une cystéine permettant la formation d'un pont disulfure (14) (figure 5). La compartimentalisation en domaines de ces molécules correspond à la segmentation en introns et exons des gènes de structure du CMH (figure 3,4) (14,15,17)

Cette organisation particulière, les antigènes du CMH la partage avec la β_2 microglobuline (β_2M), les immunoglobulines et la protéine Thyl des lymphocytes T (figure 5). Si bien que l'on parle pour toutes ces molécules d'une superfamille génique immunoglobulinique (14,15,18).

La présence d'éléments structuraux de base très semblables dans différentes protéines est souvent interprétée comme une évidence pour une origine commune de ces molécules. Cependant, des domaines semblables se trouvent dans des protéines comme la superoxyde-dismutase qui ne présentent pas de similitude avec le CMH.

La présence de tels domaines dans ces molécules ne signifie donc pas nécessairement qu'elles ont un ancêtre protéique commun. Ils peuvent représenter une solution optimale à quelques problèmes topologiques de base dans la structure de la protéine dès lors, une solution identique peut arriver indépendamment dans différentes familles protéiques (14). Malgré tout, le séquençage des gènes codant pour ces protéines montre une grande homologie entre elles (15,18).

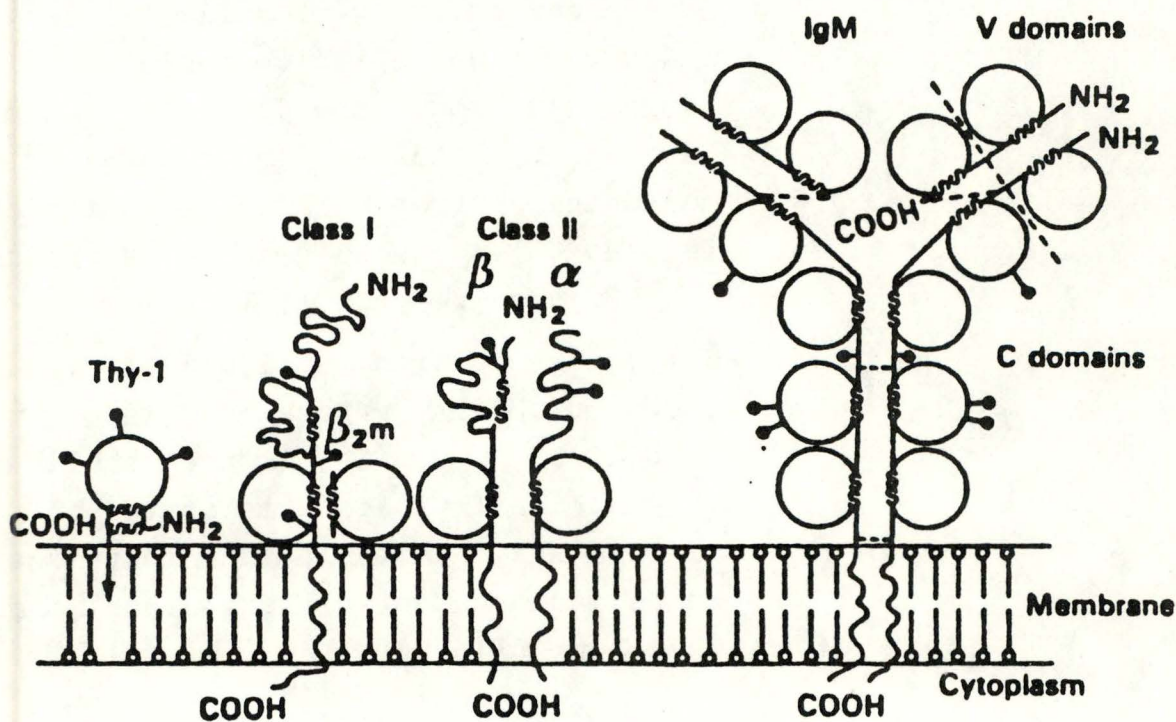


Figure 5: molécules de la superfamille génique immunoglobulinique associées à la membrane plasmique. Les domaines d'immunoglobine et leurs régions homologues dans les autres molécules sont représentés par des cercles. Les ponts disulfures intra-chaîne sont présentés par le symbole -S-S- alors que les ponts disulfures inter-chaînes des IgM sont présentés par des pointillés. Les structures oligosaccharidiques N liées sont présentées par des "épingle" (†). Les molécules d'IgM, de classe I et de classe II, sont intégrées dans la membrane par une séquence protéique hydrophobe, mais pour les molécules Thy-1, c'est une structure non protéique qui est responsable de l'intégration membranaire. D'après J.E. Colligans et al. (15).

b. Fonction immunitaire primordiale

Durant l'ontogenèse du système immunitaire, les antigènes du CMH des 2 classes sont impliqués dans la sélection du répertoire des réactivités des cellules T et dans l'induction de la tolérance au soi (19).

A l'âge adulte, les produits de classe I et de classe II du CMH interviennent dans la reconnaissance de l'antigène et dans la réponse immune à celui-ci bien que le type de réponse qu'ils modulent diffère.

§. Molécules du CMH : "présentoir à peptides" (8)

Les antigènes étrangers doivent être présentés aux récepteurs spécifiques des lymphocytes T pour enclencher une réponse (6).

A la question de savoir comment les produits du CMH présentent les peptides antigéniques, une équipe de l'Université de Harvard a répondu tout récemment de manière spectaculaire.

Ils ont en effet déterminé, par diffraction aux rayons X d'un cristal de protéines la forme dans l'espace d'une molécule de classe I (7). Les molécules de classe I (il est probable que les molécules de classe II fassent de même) présenteraient l'antigène dans une "poche" constituée par sa structure tridimensionnelle. Il est frappant de voir en plus que c'est dans cette "poche"

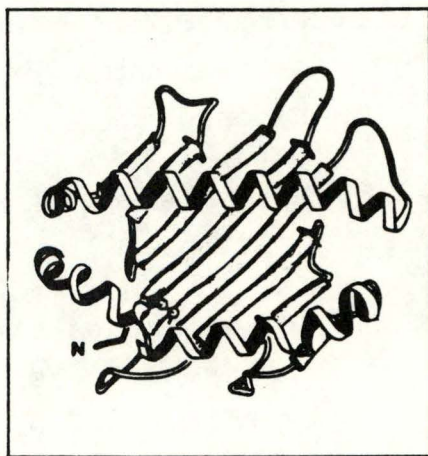


Figure 6. **Schéma de la « poche » de la molécule HLA-A2.** Les hélices α_1 et α_2 de la chaîne lourde de la molécule HLA-A2 forment un sillon composé de huit feuillets β (plancher) et de deux hélices α (parois). Le peptide immunogène est supposé être lié au niveau du sillon dont l'ouverture est tournée vers l'extérieur, le plancher étant situé au-dessus de la membrane cellulaire. N = extrémité NH_2 terminale.

D'après A. Kahn (7).

que se retrouve les zones très variables en acides aminés d'une allèle à l'autre du CMH (7,8,9,20). Le déterminant antigénique d'une taille d'environ 10 à 20 acides aminés y trouverait donc un "nid" où il se loge et où il est accessible aux récepteurs spécifiques des cellules T (7) (figure 6).

Si on connaît mieux maintenant comment l'antigène s'associe à la molécule du CMH pour être présenté, les modalités de la reconnaissance de ce complexe par les récepteurs spécifiques des cellules T sont encore incertaines (7,8,21).

§. Le phénomène de restriction

Cette présentation des peptides antigéniques par des molécules du CMH aux cellules T n'est pas facultative mais obligée, ces cellules ne reconnaissant les antigènes que s'ils sont présentés en association avec des produits du CMH. Cette hypothèse a été introduite par Zinkernagel en 1974 et est maintenant bien acceptée en immunologie. On l'appela dès son origine le phénomène de restriction.

§. Rôle spécifique des antigènes de classe I et de classe II

Le rôle des molécules de classe I et de classe II dans la présentation des peptides

antigéniques diffère quelque peu dans le type de réponse qu'elles modulent. La nature des cellules T diffère quand il s'agit de reconnaître l'antigène en association avec un produit de l'une ou l'autre classe.

Les antigènes de classe I interviennent dans la présentation des molécules étrangères qui sont composants intégraux de la membrane plasmique comme les antigènes viraux ou les antigènes des cellules cancéreuses (on parle de peptides endogènes). Il semble que pour qu'il y ait association entre l'antigène de classe I et la molécule à présenter, il faut qu'ils soient co-synthétisés par la cellule (7). Ce qui explique la nature des molécules présentées par cette classe de produits du CMH.

Ces antigènes étrangers associés aux produits de classe I sont reconnus par les récepteurs spécifiques des lymphocytes T, porteurs du marqueur de membrane CD8 (6) (T cytotoxique, T suppresseur); c'est ce qu'on appelle la restriction de classe I. Etant donné la nature des cellules activées par ce complexe (T cytotoxique en majorité), on comprend que les molécules de classe I jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Dans le cas des antigènes de classe II, ce sont des peptides exogènes qui sont présentés. La plupart du temps, les antigènes étrangers subissent une dégradation intracellulaire et seuls les peptides antigéniques résiduels de taille raisonnable sont intégrés dans la "poche présentatrice" des molécules de classe II (8). Plus rarement, ces molécules étant ancrées à la membrane dans leur conformation définitive, elles peuvent fixer un peptide présent dans l'atmosphère pericellulaire (7).

Le principe de restriction introduit par Zinkernagel est aussi valable pour les cellules T porteuses du marqueur de membrane CD4 (T helper, T d'hypersensibilité retardée) qui ne reconnaissent un antigène étranger que si celui-ci est associé à une molécule de classe II (22). Ici également, étant donné la nature des cellules activées par ce complexe (T helper principalement), on comprend que c'est la réponse immunitaire globale mais surtout de type humorale que contrôlent les molécules de classe II.

§. Rôle du polymorphisme des molécules du CMH dans la présentation des antigènes étrangers
.....

En conséquence de ce phénomène de restriction, il faut que l'individu dispose des

antigènes d'histocompatibilité appropriés pour répondre à tel ou tel antigène étranger pour l'organisme. En effet, tout se passe comme si le polymorphisme des molécules du CMH dictait la capacité des individus à répondre ou non à un antigène donné, le rendant susceptible ou résistant à l'une ou l'autre maladie, pour peu que cet antigène soit porté par un pathogène (2). Ce phénomène serait dû, au moins en partie, à ce que l'association entre la molécule du CMH et le peptide antigénique déterminé n'est possible qu'avec certains allèles.

La molécule étrangère ne formerait un complexe stable avec le produit du CMH que si elle trouve dans la "poche" qui l'accueille un environnement en acides aminés déterminé et qu'il ne rencontre que chez certains allèles (8,9,20,23). Un même allèle du CMH peut toutefois présenter plusieurs peptides différents. Comme le dit A. Kahn : "il y a plusieurs manières de se coucher dans le lit formé par la poche à peptide". (7)

On comprend ainsi que l'hétérozygotie de l'individu et le polymorphisme de la population sont autant de facteurs assurant la survie de l'espèce.

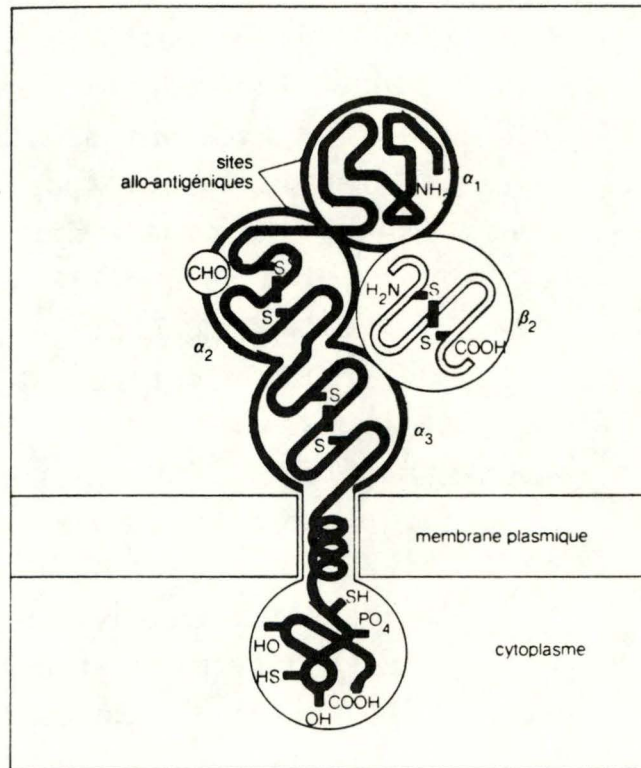


Fig 7. Structure d'un antigène de classe 1 (HLA-A, -B) dans la membrane plasmique. La chaîne codée par le CMH présente 3 domaines globulaires (α_1 , α_2 et α_3). Le domaine α_3 est associé à un peptide non codé par le CMH appelé β_2 microglobuline. La β_2 microglobuline est un petit peptide globulaire de P.M. 12 kDa, qui comprend un pont disulfure intracaténaire et a une structure tertiaire similaire à un domaine d'immunoglobuline. Une courte portion hydrophile de la chaîne codée par le CMH s'insère dans le cytoplasme. La portion hydrophobe traverse la membrane et 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 α_1 et α_2 . Le domaine α_2 porte une chaîne saccharidique (CHO).

D'après I. Roitt et al. (21).

1.3.2. Les antigènes de classe I

Les antigènes d'histocompatibilité de classe I sont des glycoprotéines de surface codées au niveau du CMH humain par 3 loci identifiés : HLA-A, HLA-B, HLA-C (figure 1).

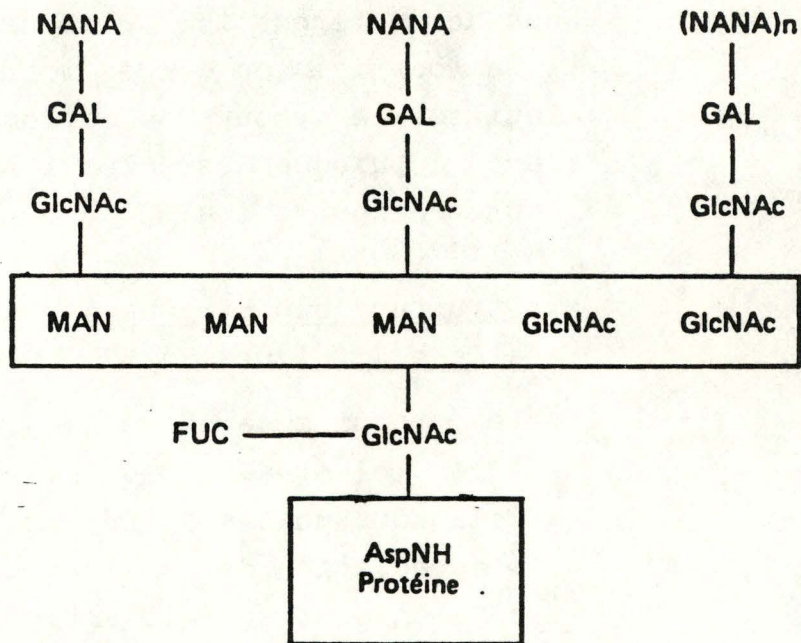
Nous ne décrivons ici qu'en bref la structure et la localisation de ces molécules de classe I ainsi que la découverte de nouveaux loci de classe I puisque ces molécules ne font pas l'objet de notre étude.

a. Structure biochimique des antigènes de classe I (figure 7)

Les produits de classe I sont des hétérodimères, c'est-à-dire qu'ils sont constitués de 2 sous-unités différentes (24,21,9).

L'association des chaînes est toujours non covalente et se fait entre une chaîne polymorphe et une chaîne monomorphe qui semble stabiliser la structure tertiaire de la première (9).

La chaîne polymorphe est la grande sous-unité d'un poids moléculaire de 44000. Elle possède 3 domaines extracellulaires ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) qui s'organisent dans une structure secondaire en feuillets plissés et dont deux (α_2, α_3) sont délimités chacun par un pont disulfure (21,24). Seuls les domaines α_1 et α_2 semblent montrer des variations dans leur séquence en acides aminés d'un allèle à l'autre et ainsi supporter la totalité du polymorphisme de la molécule de classe I (17,21,24).



NANA = acide sialique.
 GAL = galactose.
 GlcNAc = glucosamine.
 MAN = mannose.
 FUC = fucose.
 AspNH = asparagine.

FIG. 8 — *Structure de la chaîne glucidique des antigènes sérologiquement définis du complexe H-2 de la souris.*

D'après H. Leveziel (3).

C'est sur le domaine α_2 qu'un arbre sucré de type complexe est fixé à la protéine via une asparagine; il est de ce fait dit N lié (21) (figure 8).

La chaîne monomorphe est une plus petite sous-unité de 14000 de poids moléculaire appelée β_2 microglobuline (β_2 M). Elle n'est pas liée au CMH car elle est codée sur le chromosome 15 (24). Elle semble jouer un rôle dans l'établissement de la structure tertiaire de la chaîne lourde qui lui permet de présenter sa zone polymorphe le plus largement possible et pourrait selon Parham (9) servir de clé bloquant le peptide antigénique associé.

b. Expression cellulaire des antigènes de classe I (24)

Les antigènes de classe I sont exprimés sur la plupart des cellules nucléées de l'organisme mais leur taux d'expression varie en fonction du type de cellule et des conditions physiologiques ou pathologiques. Par exemple, l'interferon γ (IFN γ) augmente l'expression de ces molécules. La fréquence de ces antigènes reste cependant plus élevée sur les cellules du système immunitaire en condition physiologique normale.

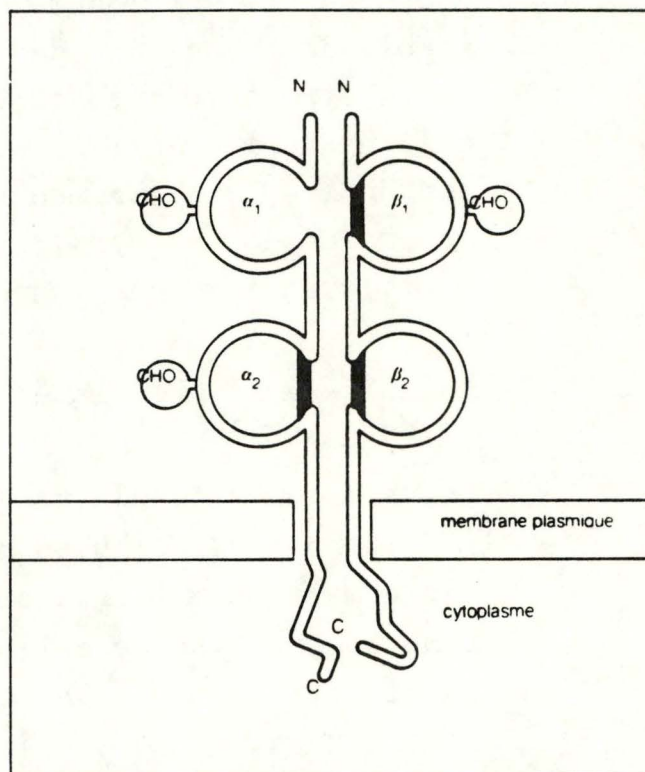


Fig. 9. Représentation schématique d'un antigène de classe 2 (HLA-DR). Les antigènes HLA-DR comprennent 2 peptides non identiques (α et β) liés par des liaisons non covalentes, dont l'extrémité C-terminale s'insère dans le cytoplasme. Les 2 chaînes ont 2 domaines globulaires, dont la structure rappelle ceux des immunoglobulines. Tous, à l'exception du domaine α_1 , sont stabilisés par un pont disulfure intracaténaire (*noix*). Les 2 chaînes portent des sucres (CHO). La plus courte, la chaîne β (P.M. 28 kDa) contient les sites allo-antigéniques. Cependant, la chaîne α de certaines molécules de classe 2 peut être également légèrement variable.

D'après I. Roitt et al. (21).

c. Autres molécules de classe I (14,24)

En plus des 3 loci de classe I classiquement décrits, une trentaine de gènes supplémentaires ont été définis dans une région du génome analogue de la zone appelée TLa - Qa chez la souris. Ces loci codent pour des molécules fort semblables aux produits de classe I classiques, associés aussi à la β_2^m . Ces produits sont peu exprimés et peu polymorphes. Leurs fonctions restent encore hypothétiques.

1.3.3. Les antigènes de classe II
 - - - - -

Les antigènes de classe II constituent un système très polymorphique codé par la région HLA-D placée à l'extérieur du segment HLA-A/HLA-B (22). La région HLA-D étant elle-même subdivisée en différentes sous-régions appelées HLA-DR, DP, DQ, DZ/DO contenant chacune plusieurs loci (25).

a. Structure biochimique (figure 9)

1. Structure protéique des chaînes légères et lourdes et leur polymorphisme

Les antigènes de classe II sont des glycoprotéines constituées de 2 chaînes peptidiques; la chaîne lourde appelée α ayant un poids moléculaire d'environ 32000 et la chaîne légère dite β qui a un poids moléculaire évalué à 28000. Ces deux polypeptides sont constitués chacun de 2 domaines

extracellulaires (α_1 et α_2 pour la chaîne α et β_1, β_2 pour la β) d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'une partie intra-cellulaire carboxy terminale (18,21,24).

Chaque domaine est constitué d'environ 90 acides aminés qui se replient dans une structure secondaire en plans β .

Trois d'entre eux : β_1, β_2 et α_2 sont limités par des ponts disulfures (18,21,24).

Les chaînes α et β sont associées par des liens non covalents, ce qui n'empêche que ce complexe soit très stable (24).

Seule la chaîne légère (β) supporte un polymorphisme important dans la structure primaire en acides aminés, la chaîne α ne semble intervenir que pour stabiliser la structure de la chaîne β , un peu comme la β_2M avec la chaîne lourde de classe I. C'est sur le domaine β_1 que la zone variable d'un allèle à l'autre se situe (figure 2) (26,27,28).

2. La chaîne Ii associée

Dans leur partie intracellulaire les antigènes de classe II sont associés à une glycoprotéine ayant un poids moléculaire d'environ 31000 appelée la chaîne invariante (Ii chez la souris) car elle ne présente pas de polymorphisme (26,28,29).

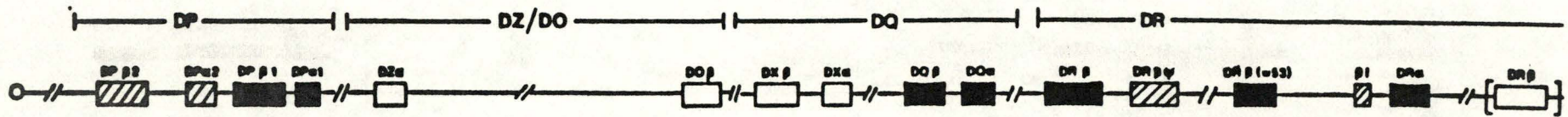


Figure 10 : carte de la région HLA-D. Les gènes exprimés sont représentés par des rectangles noirs; les pseudogènes connus par des rectangles hachurés et de statut indéterminé sont blancs. D'après J. Trowsdale (25).

Il semble que cette association soit transitoire (29). Son rôle est encore mal défini mais on suppose qu'elle intervient dans le transport intracellulaire des chaînes α et β associées, dans leur incorporation dans la membrane plasmique ou encore elle stabiliserait ce complexe (29).

3. Complexes oligosaccharidiques associés à la protéine

Des branchements sucrés s'associent aussi à la protéine de classe II. On en trouve 2 sur les chaînes α humaines dont l'un est un arbre glucidique complexe, l'autre riche en mannose, et un sur les chaînes β qui est aussi de type complexe (figure 8) (30). Ces structures sucrées n'interviendraient pas ou marginalement tout au moins dans le polymorphisme fonctionnel des molécules du CMH (26,28).

b. Les gènes de classe II et leurs polymorphismes (figure 10) (25)

Les gènes codant pour les produits de classe II sont chez l'homme organisés en 4 sous-régions : DP, DZ/DO, DQ et DR. Le tout faisant partie de la région HLAD. Dans ce cas-ci, les gènes codant pour les 2 chaînes polypeptidiques font partie du CMH. Il est à noter que la carte des

gènes présentées ici est provisoire et que l'ordre de ces gènes doit encore être confirmé.

. En_bref (figure 10)

Région D	{	Sous-région DP	2 gènes α , 2 gènes β
		Sous-région DZ/DO	1 gène DZ α , 1 gène DO β
		Sous-région DQ	2 gènes α , 2 gènes β
		Sous-région DR	1 gène α , 1 ou 2 gènes β

. La_sous-région_DP

Cette sous-région est constituée de 2 paires de gènes α/β ; α_1/β_1 qui expriment des produits et α_2/β_2 qui sont des pseudogènes c'est-à-dire des gènes qui par différentes caractéristiques géniques ne donnent aucun produit (17).

Ici, à la fois les produits DP α et DP β exprimés montrent une variabilité entre individus quoique DP β présente beaucoup plus de polymorphisme.

. La_sous-région_DZ/DO

La sous-région suivante appelée DZ/DO contient 2 gènes à fonction inconnue : DZ α et DO β . Ces 2 gènes ne constituent pas une paire α/β et s'ils sont peu polymorphes et s'expriment faiblement, ils ne présentent cependant aucune caractéristique de pseudogène.

• La sous-région DQ

La sous-région DQ contient deux paires de gènes codant pour des chaînes α et β : DQ α/β et DX α/β . Ces 2 paires de gènes sont adjacentes mais non liées physiquement. Les gènes DQ α/β donnent des produits faciles à détecter alors que DX α/β qui ne sont pas pour autant des pseudogènes s'expriment peu.

Les gènes de la région DQ sont ceux pour lesquels on a le plus d'information au niveau de leur séquence et on note qu'ils sont très polymorphes. C'est parmi ce polymorphisme DQ que les recherches pour une association étroite entre la présence d'allèles et la susceptibilité ou la résistance à des maladies est concentrée. Les gènes DX sont moins étudiés mais ils sont sans doute moins polymorphes.

• La sous-région DR

La sous-région DR est constituée d'un seul gène de chaîne α associé à un ou deux gènes de chaîne β , dont le nombre varie en fonction de l'haplotype. Un des gènes β comporte de nombreux allèles, l'autre semble relativement invariant.

La région DR contient aussi différents pseudogènes.

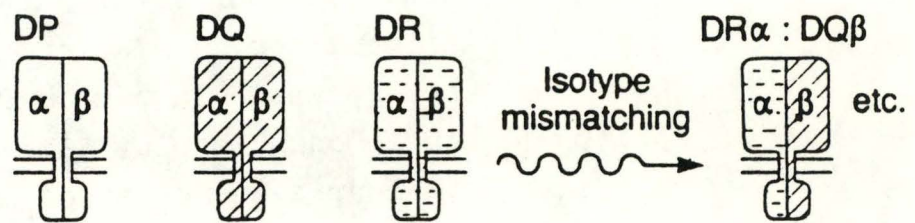


Figure 11 : appariement entre chaînes provenant de sous-régions distinctes du CMH de classe II. (Isotype mismatching).

Appariement normal des chaînes α et β HLA-DP, DQ et DR, et une molécule hybride provenant de l'appariement d'une chaîne α HLA-DR et d'une chaîne β HLA-DQ.

D'après R.I. Lechler (31).

. Rôle possible des pseudogènes de la région D

Bien que tous ces pseudogènes de la région HLA-D soient clairement non fonctionnels, puisqu'étant dans le HLA, il est possible qu'ils contribuent à la diversité des gènes exprimés, par exemple en agissant comme donneur dans des phénomènes de conversions de gènes (25).

c. Polymorphisme combinatoire des produits de classe II (31)

En plus du polymorphisme dû à la structure primaire de chacune des chaînes prises séparément, l'association entre les chaînes α et β pour former le dimère fonctionnel fait que le polymorphisme sera d'autant plus large qu'il existe de combinaisons. Le polymorphisme d'appariement a aussi une signification fonctionnelle puisqu'il semble que les deux chaînes interviennent dans l'association de l'antigène de classe II avec la molécule étrangère à présenter.

Un même individu voit donc augmenter grâce à ces combinaisons multiples le nombre de "sites d'accueil" offerts aux peptides antigéniques, ce qui lui permet de présenter une gamme plus large d'antigènes.

Ces combinaisons entre chaînes α et β se font préférentiellement entre des protéines

codées dans une même sous-région venant de deux chromosomes. Mais on a aussi montré l'existence de molécules "hybrides" formées de chaînes codées par des sous-régions distinctes, même si toutes les combinaisons possibles n'ont pas encore été démontrées (figure 11).

d. Distribution des antigènes de classe II

(32,33)

Initialement, on a décrit les antigènes de classe II sur les cellules "présentatrices de l'antigène" c'est-à-dire les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques mais aussi sur les cellules T activées, les cellules endothéliales et durant quelques stades de différenciation sur les précurseurs myéloïdes et érythroïdes. Il semblerait en fait que ces molécules soient exprimées plus largement mais à des concentrations très faibles en condition physiologique normale en dehors des cellules "présentatrices de l'antigène".

De plus, l'expression des antigènes de classe II peut être induite dans différentes conditions physiologiques et pathologiques.

On sait par exemple, que l'IFN γ est un puissant amplificateur de l'expression des antigènes de classe II.

1.4. LE CMH BOVIN

L'existence du CMH bovin a été démontré simultanément en 1978 par différents laboratoires (34,35).

L'étude des antigènes du CMH bovin, appelé BoLA (bovine leukocytes antigens) fut commencée à l'aide d'allo-antisérums obtenus par immunisation croisée ou venant de vaches multipares.

Ensuite, profitant des nombreuses réactions croisées des réactifs monoclonaux anti-H-2 ou anti-HLA ont été utilisés conjointement à la sérologie classique, ce qui a permis de montrer la grande similitude entre le CMH bovin et humain (11,36,37,38).

Actuellement, de plus en plus de monoclonaux anti-BoLA sont produits (39,40).

La génétique moléculaire a permis de situer le complexe BoLA sur le chromosome 23 (41).

1.4.1. Les antigènes de classe I

Actuellement, au plan international, on reconnaît 17 spécificités de classe I sérologiquement définies (42).

Elles semblent être toutes les produits d'un même locus BoLA A.

Certains auteurs ont décrit un autre locus de produits de classe I mais il n'est pas encore défini sans ambiguïté (43).

Des expériences d'immunoprécipitation à l'aide d'antisérums ou d'anticorps monoclonaux anti-BoLA ou anti-HLA classe I ont montré que les antigènes du locus BoLA sont de même structure

que les produits de classe I murins et humains : une chaîne lourde de 44000 de poids moléculaire associée à une chaîne légère d'un poids moléculaire d'environ 12000 analogue de la β_2M humaine (40,44).

Ces produits des gènes de classe I sont les éléments de restriction pour les lymphocytes T cytotoxiques (45).

1.4.2. Les antigènes de classe II

L'analyse des molécules de classe II réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-HLA DR et anti-classe II murin (36,37) mais aussi anti-BoLA classe II (39,37) montrent qu'il existe de nombreux déterminants antigéniques communs entre ces espèces mais aussi que la structure et la répartition de ces molécules de classe II bovine est comparable à celles des autres espèces. On a ici aussi une chaîne α d'environ 32000 de poids moléculaire et une chaîne β d'un poids moléculaire avoisinant 28000. On a aussi ici une chaîne invariante associée d'un poids moléculaire évalué à 30000.

La région classe II bovine a été appelée D par analogie au HLA-D. On a postulé que cette région chromosomique : BoLA-D contrôle la MLR (mixed lymphocyte reaction) chez le bovin (46). Une liaison étroite entre BoLA-A et D a aussi été rapportée (47).

L'étude du polymorphisme des molécules de la région D bovine par des techniques sérologiques est peu développée par manque d'allo-antisérums valables et suite aux difficultés inhérentes à l'emploi de cette technique (chapitre 2.1.2. c.).

L'utilisation dans cette étude d'anticorps monoclonaux anti H-2, anti-HLA ou même anti-BoLA classe II est souvent limitée car ces anticorps reconnaissent souvent des épitopes monomorphes ou peu polymorphes et un grand nombre d'allèles nous échappe donc (48).

L'utilisation de sonde de DNA de gène de classe II humain a permis de démontrer le polymorphisme des gènes de classe II bovin : 20 allèles DQ α , 17 allèles DQ β , 5 types alléliques des chaînes DR α et 25 des chaînes DR β (49).

2. MOYENS D'ETUDE DU POLYMORPHISME DU CMH

Le polymorphisme du CMH peut être étudié tant au niveau du génome qu'au niveau des produits de ses gènes. Chaque voie d'approche et chaque moyen d'investigation a ses avantages mais aussi ses limites si bien que pour une étude complète et approfondie du CMH, plusieurs sont nécessaires.

2.1. ANALYSES DES PRODUITS DU CMH

2.1.1. Introduction

Le polymorphisme très large de produits du CMH se traduit par des différences dans les séquences en acides aminés d'un allèle à l'autre. En conséquence, chaque produit est caractérisé par un ou plusieurs déterminants antigéniques soit séquentiel (enchaînement de résidus d'acides aminés successifs) soit conformationnel (regroupement de différents acides aminés en un même point de l'espace grâce aux replis dans l'espace de la chaîne protéique). Chaque produit allélique est donc défini par un ensemble de spécificités antigéniques, certaines sont dites privées car elles ne se retrouvent que sur un allèle, d'autres sont appelées spécificités antigéniques publiques car elles sont

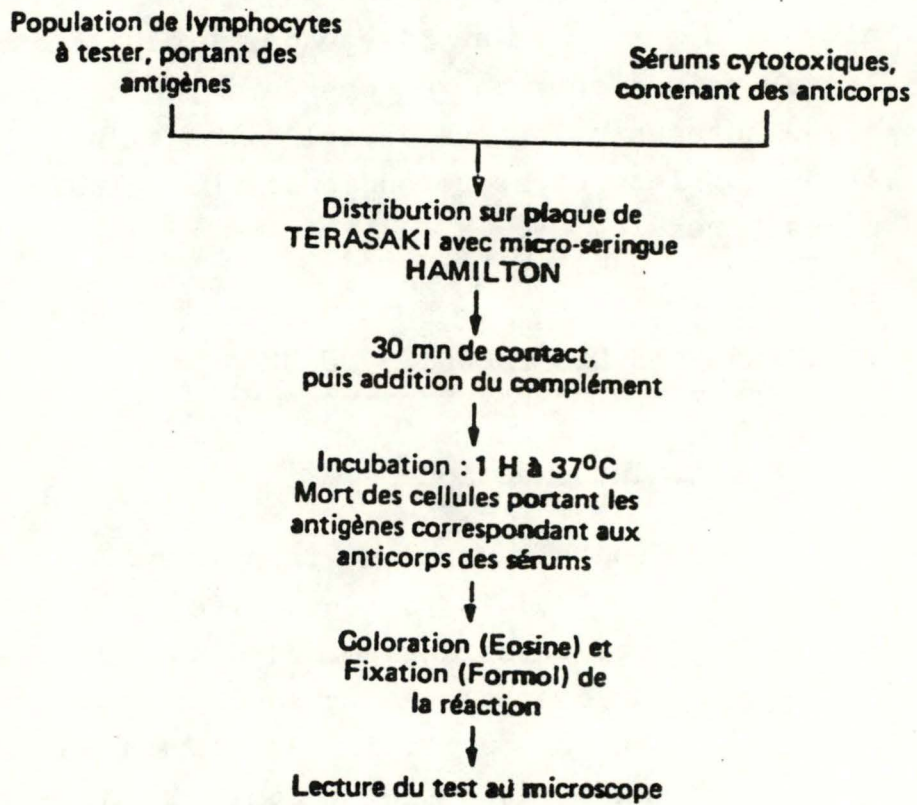


Figure 12: technique de la microlymphocytotoxicité complément dépendante utilisée en sérologie .

D'après H. Leveziel (3).

communes à plusieurs produits alléliques.

L'existence de "particularités" de structure, de conformation entre les divers produits du CMH sert l'analyse de leurs polymorphismes :

- soit à l'aide d'anticorps reconnaissant ces différences et permettant de les déceler chez d'autres individus : c'est l'approche sérologique;
- soit à l'aide de culture in-vitro où des cellules prolifèrent en réponse à des différences de produits du CMH : c'est l'approche cellulaire;
- soit par une approche biochimique concrétisant ces différences entre les produits du CMH par leurs séparations en fonction de leurs points isoélectriques ou par leur susceptibilité différentielle à la digestion enzymatique.

2.1.2. La sérologie (3,50)

a. Technique d'analyse

La technique sérologique la plus utilisée est la microlymphocytotoxicité complément dépendante développée par Terasaki et McClelland (1964) (figure 12) (51).

Les antisérums contenant les anticorps spécifiques des molécules HLA d'un hapotype déterminé sont mis en contact avec les

cellules à typer (des lymphocytes du sang périphérique). Ensuite, on incube la suspension cellulaire en présence de complément pour produire la lyse des cellules reconnues par les anticorps durant la première phase. On visualise le taux de mortalité cellulaire par coloration vitale au bleu de Trypan, par exemple.

On estime la réaction positive si plus de 50 % des cellules cibles sont mortes.

b. Production des antisérums

Quelle que soit l'origine de ces antisérums, on essaye de limiter leur polyspécificité. Les méthodes d'immunisation d'un animal par sa descendance ou l'inverse, de greffe de peau entre couples mère-descendant, permettent le mieux d'y arriver car donneurs et receveurs ont un haplotype commun. Il en va de même pour l'utilisation de sérums de vaches multipares sécrétant des anticorps anti-BoLA dirigés contre l'haplotype du fœtus reconnu par la mère.

Si on apporte la preuve de sa monospécificité, un seul allo-immun sérum suffit pour le typage mais, cette preuve n'est jamais complète. On ne peut que l'approcher par des études d'absorption sur différents types cellulaires. En pratique donc, la définition d'une spécificité est basée sur la comparaison de sérums classiques donnant des réactions similaires.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux permet d'éviter ce problème de polyspécificité car ils sont dirigés contre un seul déterminant, mais l'obtention d'un anticorps pour chaque spécificité n'est pas toujours possible.

c. Limites de la sérologie

La technique sérologique dans l'étude du polymorphisme des produits du CMH présente plusieurs limites :

- Dans la production des antisérums
.....

Si on n'utilise pas d'anticorps monoclonaux, la source d'anticorps n'est pas inépuisable. Ce qui oblige le manipulateur à refaire continuellement des immunosérums avec le risque de variabilité non contrôlée que ça comporte.

Un autre problème inhérent aux antigènes de classe II est que si la source d'immunosérum est la même que pour les antigènes de classe I, on obtient un mélange d'anticorps anti-classe II et anti-classe I. On doit éliminer les anti-classes I par des réactions d'absorption sur des cellules dépourvues de molécules de classe II.

- Dans l'analyse
.....

Pour les antigènes de classe I, l'expression étant large, l'obtention de cellules à analyser ne pose pas trop de problèmes.

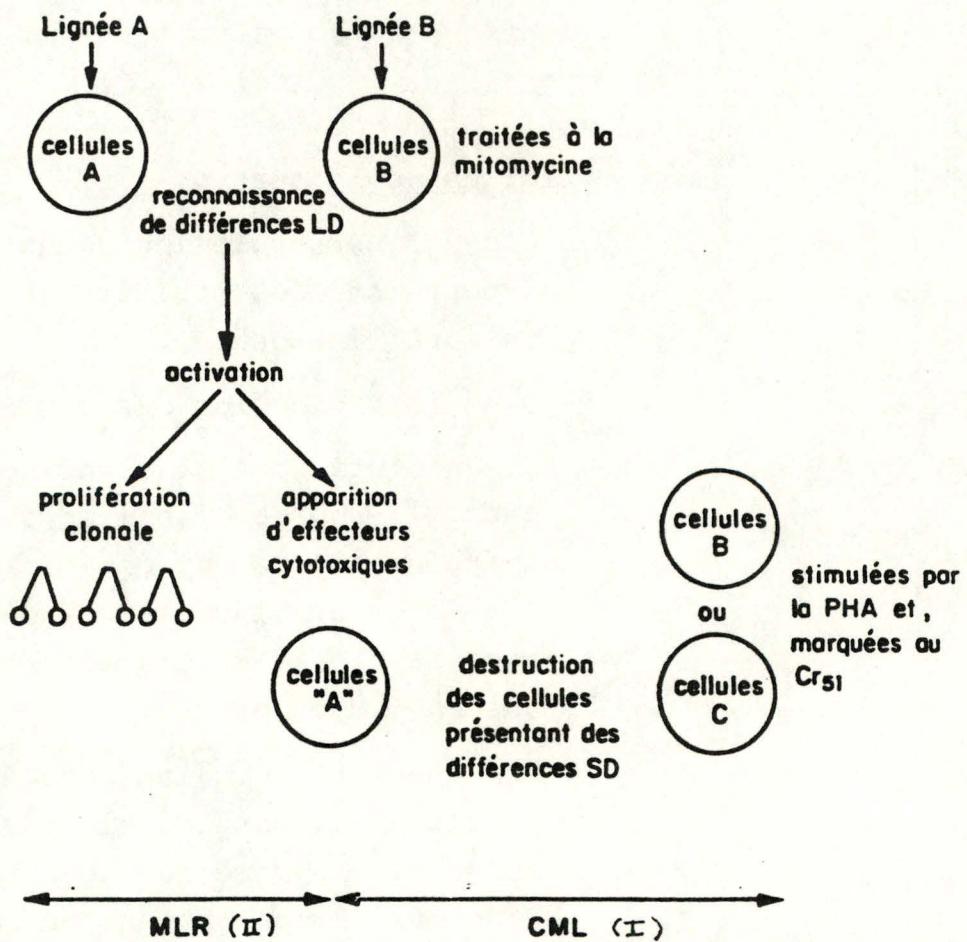


FIG. 13 — Relations entre la réaction lymphocytaire mixte (MLR) et la cytolyse à médiation cellulaire (CML).

D'après H. Leveziel (3).

Pour les molécules de classe II par contre, leur expression étant plus limitée, il faut avoir recours à des populations cellulaires enrichies en lymphocytes B.

Mais la principale limite de cette technique est que les solutions d'anticorps utilisées ne sont pas toujours bien contrôlées.

Elles reconnaissent donc peut être plusieurs spécificités différentes.

2.1.3. Les études cellulaires (3)

Deux techniques sont ici utilisées : la culture mixte lymphocytaire (MLR) permettant une analyse des antigènes de classe II et la cytotoxicité à médiation cellulaire (CML) dont l'importance traduit une différence entre les produits de classe I des cellules en présence.

a. Techniques

- la culture mixte lymphocytaire (MLR)

(figure 13)

Lorsque deux populations lymphocytaires provenant de deux donneurs différents entrent en contact, chacune d'elle va développer une réponse allogénique contre l'autre, caractérisée au début par une

prolifération lymphocytaire. C'est ce qu'on appelle la MLR (réaction lymphocytaire mixte).

On peut mesurer l'intensité de la réaction par l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA des cellules en division.

La réponse est rendue unidirectionnelle en traitant l'une des populations par des agents bloquant la division cellulaire (la mitomycine, les radiations X). L'autre population dite répondante est alors la seule capable de développer une réponse allogénique.

C'est une reconnaissance de différence au niveau des produits de classe II portés par les 2 populations lymphocytaires qui est à l'origine de la MLR.

Les loci contrôlant la MLR sont désignés comme "lymphocyte defined" (LD), par opposition aux loci serologiquement définis (SD).

- La cytotoxicité à médiation cellulaire

 (CML) (figure 13)

Tandis que les lymphocytes répondeurs prolifèrent, suite à la MLR, il apparaît dans la culture des lymphocytes cytotoxiques capables de détruire par interaction cellulaire directe des lymphocytes cibles provenant du donneur de cellules stimulantes.

Ce phénomène a été appelé cytotoxicité à médiation lymphocytaire. La lymphocytotoxicité est mesurée par la destruction de cellules cibles marquées au chrome 51.

Il ne peut y avoir lymphocytotoxicité que lorsque les cellules cibles sont différentes des cellules tueuses au niveau des loci de classe I.

b. Limites

Ces techniques cellulaires ne sont utilisables que si la population stimulante est de typage connu. On peut donc caractériser des animaux de cette manière mais on ne peut pas définir l'organisation génique du CMH sans autre étude préalable.

La principale limite de ces techniques cellulaires est que si la population répondante reconnaît des différences au niveau des produits du CMH dans la population stimulante, on ne sait pas si cette différence est due à un ou plusieurs produits du CMH. Ces techniques sont cependant fort utilisées pour définir différents sous-types à l'intérieur d'une spécificité sérologiquement définie (52).

2.1.4. Les techniques biochimiques

Diverses techniques biochimiques permettent d'étudier le polymorphisme des molécules du CMH, il s'agit principalement de l'isoélectrofocalisation (Ief) utilisé en une ou deux dimensions et de la digestion peptidique partielle.

a. Ief

Si la sérologie distingue les allèles en fonction d'épitopes caractéristiques portés par ceux-ci, ce qui correspond à des zones restreintes de la séquence en acides aminés de l'antigène; l'isoélectrofocalisation sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique (PI), c'est-à-dire en fonction de leurs structures primaires en acides aminés totales.

On peut donc distinguer par isoélectrofocalisation, deux allèles s'ils diffèrent en un acide aminé entraînant une différence de point isoélectrique de la protéine.

. Principe

.....

Les antigènes radiomarqués sont séparés des autres constituants cellulaires par immunoprécipitation (IP) à l'aide d'un anticorps spécifique et puis soumis à une électrophorèse dans un gradient de pH. Les protéines progressent à l'aide du champ électrique dans ce gradient jusqu'au moment où elles

atteignent un pH où elles sont neutres (PI de la molécule). A cet endroit, elles se stabilisent n'étant plus soumises aux forces électriques.

. Avantages et inconvénients
.....

L'utilisation d'anticorps monoclonaux monomorphes est très avantageuse, car il n'y a plus besoin de posséder un réactif par allèle. Les anticorps monomorphes permettent de ne perdre aucun allèle pour l'étude biochimique puisqu'ils reconnaissent une structure invariante pour tous les allèles (50).

Cette technique permet de détecter un maximum de spécificités (52).

Cette méthode demande peu de matériel et est assez rapide; c'est donc une méthode de choix par rapport au grand éventail de CML que l'on doit faire pour déterminer le même jeu de spécificités (53).

Des Ief en une dimension permettent de traiter en même temps un grand nombre d'échantillons.

Une grande partie des déterminations sont corrélées avec les données des CML, mais la biochimie a permis de mettre en évidence des sous-types jusqu'alors inconnus (54). Cela représente donc une aide pour montrer

que des antigènes décrits comme homogènes ne le sont en fait pas.

Cette approche représente donc un critère additionnel pour la classification officielle des antigènes de CMH.

Des électrophorèses de ce type nécessitent un étalonnage pour que des comparaisons entre gels fait à des moments différents soient possibles.

Le pouvoir de résolution des méthodes biochimiques est restreint du fait que si deux allèles ne diffèrent que par des acides aminés de même charge, ils ne seront pas discriminés dans un gradient de pH classique. Cette technique de séparation n'est donc efficace que pour des molécules ayant un PI sensiblement différent. (52).

Une autre limite de cette technique est due à la glycosylation des protéines du CMH. On est donc confronté à un polymorphisme postranscriptionnel qui sera décelé en Ief puisque des sucres chargés sont ajoutés à la protéine. Toute étude du polymorphisme par Ief nécessite alors une étape de déglycosylation qui est d'autant plus gênante qu'elle n'est jamais complète.

b. Digestion peptidique partielle (24)

. Principe
.....

Après séparation par immunoprécipitation des molécules du CMH, on peut les cliver en plusieurs fragments par des techniques spécifiques, qui coupent les protéines au niveau de séquences en acides aminés déterminées (sites de clivages). Ces méthodes sont enzymatiques (la papaïne, trypsine.... par exemple) mais aussi chimiques (acide formique, bromure de cyanogène, ...). Le résultat du clivage est mis sur gel SDS-Page pour l'analyse du nombre et de la taille des fragments obtenus. D'un allèle à l'autre, le pattern de clivage sera différent si les zones spécifiques de découpage ne se retrouvent pas aux mêmes endroits.

. Limites
.....

La limite de cette technique est que si un changement d'acide aminé n'entraîne pas l'apparition ou la disparition d'un site de clivage spécifique, cet alléломorphe ne sera pas distingué. On a intérêt à utiliser plusieurs méthodes de clivage pour recouvrir la plus grande partie de la protéine.

c. Limite commune aux techniques biochimiques

Ces techniques biochimiques permettent une analyse très fine du polymorphisme dû à un changement en acides aminés dans chacun des monomères des produits du CMH. Mais, le polymorphisme "conformationnel" dû à l'association des deux chaînes nous échappe, alors qu'avec des méthodes sérologiques et cellulaires appropriées, on pouvait l'étudier.

2.1.5. Etude génétique

La technique génétique utilisée dans le cadre de l'étude du polymorphisme des antigènes du CMH bovin est la RFLP (Restriction fragment length polymorphisme).

a. Principe

Cette technique utilise la propriété qu'ont des sondes provenant d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) du système HLA (ou autre) de s'apparier par réactions hétérologues à l'ADN génomique du CMH bovin.

En bref, cette technique consiste à préparer de l'ADN génomique d'un animal qui est ensuite clivé par un enzyme de restriction. Les fragments obtenus sont séparés sur gel d'agarose. Après dénaturation, ils sont transférés sur feuille de nitrocellulose puis mis en contact avec de l'ADNc du système HLA radiomarqué.

Les fragments capables de s'hybrider avec la sonde sont révélés par autoradiographie.

Si on répète ces opérations avec divers enzymes de restrictions, on pourra discriminer deux individus différents par leurs successions en bases azotées si cela se traduit par la perte et/ou l'obtention de divers sites de restrictions.

b. Limites

L'utilisation de la technique du RFLP pour l'étude du polymorphisme des produits du CMH présente de nombreuses limitations :

- de nombreux enzymes de restrictions différents sont nécessaires puisque seuls des points précis du génome sont étudiés. Un changement de base peut donc n'entraîner aucune modification au niveau des sites de restrictions utilisés, cette différence restera donc invisible;
- une bonne partie des sites de restrictions se trouvera dans des parties non codantes du génome puisque c'est l'étude de l'ADN génomique qui est réalisée où introns et exons sont présents.

Une partie du polymorphisme décelé ne correspondra à aucun polymorphisme au niveau des produits (55).

- Puisque cette technique est spécifique d'un haplotype, les données devront être collectées à partir d'un très grand nombre d'animaux avant que des relations entre les différents polymorphismes puissent être reconnus (56);
- l'efficacité des sondes d'ADNc humaine n'est pas idéale dans ces réactions hétérologues.
Il serait souhaitable d'obtenir des sondes d'ADNc bovines (56);
- le travail nécessaire est aussi important si pas plus que celui développé en sérologie (56);
- des réactions croisées entre sondes fait qu'il est difficile d'identifier positivement différents loci (56).

3. INTERET DE L'ETUDE DU CMH

3.1. CHEZ L'HOMME

C'est par l'étude approfondie du système HLA dans la population qu'on a révélé l'existence d'une corrélation entre la présence de tel ou tel haplotype de la région HLA et des anomalies immunitaires provoquant des troubles pathologiques.

Le haut degré de polymorphisme du système HLA permet de mieux connaître ces associations "HLA-maladies" et d'en trouver de nouvelles (57).

De plus, chez l'homme, l'étude du polymorphisme des antigènes HLA revêt un grand intérêt chirurgical dans le cadre des rejets de greffe d'organes ou de tissus et de la recherche de meilleures similitudes HLA entre donneur et receveur de greffons (58).

3.2. CHEZ LE BOVIN

Le premier intérêt de l'étude des produits de la région BoLA est de montrer l'organisation génique du CMH bovin, puis, d'en étudier le polymorphisme et enfin d'associer ce polymorphisme avec l'étude de susceptibilité ou de résistance à différentes maladies.

En effet, on a aussi décrit chez le bovin des associations "BoLA-maladies" (59,60,61), si on parvient donc à faire un typage de bovins en déterminant leurs haplotypes et même pourquoi pas les différents allèles qu'il présente pour chaque locus et si le parallélisme entre un "type" donné et la résistance ou la susceptibilité à une maladie est réalisé, on peut espérer par la sélection artificielle améliorer les caractères zootechniques des bovins pour une productivité maximale.

4. BUT DU TRAVAIL

Le but initial du travail était de mettre au point une technique d'analyse biochimique des antigènes de classe II bovins permettant de pallier les carences du typage classique de ces molécules.

La technique d'isoélectrofocalisation en une ou deux dimensions devrait permettre d'appréhender le polymorphisme de ces molécules, de l'étudier avec comme objectif à long terme de le mettre en relation avec tel ou tel critère zootechnique ou même avec une éventuelle susceptibilité à une maladie.

La condition "sine qua non" à la réussite de cette technique est l'obtention reproductible de molécules d'histocompatibilités purifiées sous forme détectable. Aussi, dans un premier temps, nous nous sommes efforcés de purifier ces molécules à partir de lysat cellulaire radiomarqué.

Les aléas de la technique de purification utilisée, à savoir l'immunoprécipitation au moyen d'un anticorps monoclonal spécifique nous ont contraints à focaliser la totalité de notre travail sur la mise au point de cette méthode et donc sur la compréhension des problèmes inhérents à son emploi.

MATERIEL ET METHODES

1. ANTICORPS MONOCLONAUX UTILISES

Les anticorps monoclonaux (Ac.Mo.) offrent parmi d'autres avantages :

- leur monospécificité
- la relative facilité avec laquelle ils peuvent être obtenus en grande quantité.

Ces molécules sont des outils très puissants notamment pour purifier spécifiquement des antigènes (50).

1.1. CARACTERISTIQUES DES ANTICORPS UTILISES

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre les antigènes d'histocompatibilité de classe II bovin dans le but de purifier ces molécules au départ d'un lysat de cellules radiomarquées.

Les immunoglobulines (Ig) utilisées sont :

B₂ VAL 7C7, JE 1B5 et L 2.06

B₂ VAL 7C7

Le B₂ VAL 7C7 est une IgG 2a murine monoclonal spécifique des molécules d'histocompatibilité de classe II bovin.

A l'origine, on le décrivait comme anticorps polymorphe à spécificité large, c'est-à-dire qu'il reconnaissait un déterminant antigénique supratypique (ou épitope public) (39).

Depuis, il a été typé par différents laboratoires comme anticorps monomorphe, c'est-à-dire qu'il reconnaîtrait un épitope commun à tous les allèles de classe II bovin. (Leveziel communication personnelle, 48)

Ces différences de résultats entre laboratoires peuvent s'expliquer de plusieurs manières :

- ce pourrait être la conséquence de disparités dans la fréquence génique des allèles reconnus par l'anticorps entre les différentes races utilisées par les différentes équipes (48).
- ou encore ces différences sont dues à ce que les techniques utilisées par les différents laboratoires n'ont pas la même sensibilité; l'une détecterait un animal positif là où une autre, moins sensible, ne le ferait pas (48).
- on pourrait également incriminer une variation dans la densité de l'antigène, d'un animal à l'autre, modifiant le point d'équivalence au cours d'un titrage antigène/anticorps et le polymorphisme observé pourrait être plutôt apparent que réel (48).

L 2.06

Le L 2.06 est un anticorps monoclonal (IgG1) spécifique des antigènes d'histocompatibilité de classe II humain de type HLA-DR. Il est décrit comme anticorps à spécificité monomorphe (62). Le clone cellulaire sécrétant a été obtenu à l'American Tissue Culture Collection (ATCC) et est depuis conservé au laboratoire.

JE 1B5

Le JE 1B5 est un anticorps monoclonal (IgG2a) spécifique des antigènes d'histocompatibilité de classe II bovin.

Il est monomorphe (J-J Letesson, communication personnelle).

1.2. OBTENTION DES ANTICORPS

Selon les cas, ces anticorps seront produits in vitro dans le milieu de culture ou in vitro dans une tumeur ascitique et seront utilisés soit tels quels soit après une purification adéquate.

1. Anticorps dans le surnageant de la culture.

L'utilisation de ce surnageant de culture pour l'immunoprécipitation n'est pas idéale. La raison principale est que l'on ne connaît pas la concentration exacte de l'anticorps qui est généralement faible. La concentration de L 2.06 est toutefois connue : 17 ug/ml (62).

2. Anticorps en ascite

L'hybride producteur est injecté dans la cavité péritonéale d'une souris Balb/C prétraitée par du Pristane (Aldrich). La tumeur ascitique qui se développe est récoltée soit par ponction régulière soit après sacrifice de l'animal. La concentration en anticorps de cette solution d'ascite est suffisante que pour l'utiliser en immunoprécipitation mais elle contient des contaminants protéiques.

3. Anticorps purifiés

On purifie une solution d'ascite par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose 4B-protéine A qui retient les anticorps par leur fragment Fc.

L'avantage de cette préparation est qu'on travaille avec une bonne concentration en anticorps que l'on peut déterminer avec précision. De plus, ce mode de purification élimine de nombreux contaminants.

2. PURIFICATION DE L'ANTIGENE PAR IMMUNOPRECIPITATION

Le but de la technique est de purifier les antigènes d'histocompatibilité de classe II bovin avec un anticorps spécifique à partir d'un lysat de cellules de sang périphérique dont les protéines ont été marquées métaboliquement avec un précurseur aminé radioactif.

Cette procédure nécessite différentes étapes :

- préparation des cellules
- marquage métabolique de leurs constituants protéiques.
- extraction des protéines membranaires.
- purification des molécules de classe II par immunoprécipitation.

2.1. PREPARATION DES CELLULES

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des cellules d'origines distinctes. Au départ, nous utilisions des cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocytes et monocytes) en vue de la mise au point d'une technique de routine pour le typage du CMH classe II bovin.

Vu les nombreuses difficultés rencontrées et pour tenter d'y remédier, nous avons travaillé avec d'autres types cellulaires : des splénocytes bovins et une lignée bovine myéloïde établie.

Les raisons de ce choix seront explicitées plus loin.

* Composition du tampon PBS (Phosphate Saline Buffer)

- KH_2PO_4	0,2g
- $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44g
ou Na_2HPO_4	1,15g
- NaCl	8g
- KCl	0,2g
- H_2O	1000 ml

mettre à pH 7,4

* Composition de la solution anticoagulante (PBS-EDTA)

- Tampon PBS
- Na_2 EDTA 1,5%

* Préparation du mélange Ficoll-Urografine

- Ficoll 400 7,65g
- Urografine 76% 19ml

Ajuster à pH 7,4 et mettre à densité 1,077
à l'aide d'un réfractomètre en ajoutant de l'eau
distillée ou de l'urografine selon les cas.

2.1.1. Préparation de cellules mononuclées du sang
périphérique (64) -----

Toutes les manipulations qui suivent sont effectuées stérilement.

- Le sang est prélevé au niveau de la veine jugulaire du donneur. On y ajoute tout de suite pour un dixième de son volume une solution anticoagulante* (PBS - EDTA).
- L'échantillon est divisé en aliquots de 50 ml et centrifugé à 1500g pendant 15 minutes.
- On observe après centrifugation une fine couche blanche appelée "buffy coat", à l'interface du plasma et du culot de globules rouges. Le "buffy coat" est constitué en majorité de cellules mononucléaires : des lymphocytes et des monocytes. Le culot, quant à lui, contient les globules rouges et les polynucléaires. Les "buffy coats" sont récoltés et dilués au minimum 2 fois dans du tampon PBS* (Phosphate Saline Buffer).
- Des aliquots de 20 ml de cette préparation sont déposés délicatement sur 15 ml d'un mélange Ficoll-Urografine* de densité 1,077 et centrifugés à 1000g pendant 25 minutes. On purifie ainsi les cellules qui "flottent" sur le mélange Ficoll-Urografine de densité supérieure à ces cellules.
Les polynucléaires et les globules rouges

(agrégés par le Ficoll) plus denses sédimentent dans le fond du tube.

- On récupère les cellules de l'interface qui sont ensuite lavées dans du PBS, pendant 10 minutes à 200g.
- Le culot de cellules est alors suspendu dans une solution de $\text{NH}_4 \text{Cl}$ 0,75% en eau distillée, pH 7,4.
Cette étape permet d'éliminer les globules rouges qui contamineraient encore la préparation; on centrifuge de manière à faire sédimer les cellules à 110g pendant 10 minutes.
- Les cellules mononuclées sont ensuite lavées 3 fois dans du tampon PBS pendant 10 minutes à 110g; on élimine par ces lavages les thrombocytes.
- Après comptage et dénombrement des cellules viables, les cellules sont resuspendues à concentration adéquate dans du milieu de culture.

2.1.2. La lignée myéloïde établie

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

Celle-ci est dérivée d'une infestation in vitro par des sporozoïtes de Theileria annulata de la

fraction adhérente d'une population mononucléée 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 (65).

Comme les monocytes bovins, ils expriment de nombreuses molécules d'histocompatibilité de classe I comme de classe II.

Ces cellules sont maintenues en culture à 37° en atmosphère riche en CO₂ (5%) dans un milieu RPMI 1640, 10% Foetal Calf Serum (FCS) sans antibiotique.

Elles prolifèrent dans des flacons de 500 ml jusqu'au stade de semi-confluence sous forme adhérente, ensuite elles commencent à se multiplier sous forme libre. Seules les cellules non adhérentes sont récoltées.

2.1.3. Préparation des splénocytes

- On prélève une rate complète d'un bovin fraîchement abattu.
- On stérilise ensuite la surface de la capsule splénique sous laquelle on prélève de la pulpe rouge.
- Après avoir découpé en petits morceaux cette pulpe rouge, on l'homogénéise au potter dans un tampon PBS à 0,15% d'EDTA.

Nous utilisons du PBS avec de l'EDTA pour limiter la formation d'agrégats cellulaires.

- L'homogénat est ensuite versé dans un tube où l'on laisse sédimenter pendant 10 minutes les morceaux fibreux que l'on ne peut dissocier.
- Le surnageant est ensuite traité de la même façon que pour la préparation de cellules mononuclées du sang périphérique (Ficoll-Urografine, lyse de globules rouges, lavages à faible vitesse) à la seule différence que les lavages s'effectuent en PBS 0,15% EDTA et qu'après les diverses remises en suspension, les agrégats sont séparés par filtration sur gaze.

2.1.4. Cellules stimulées à la phytohémagglutinine

a. Principe

Dans le but d'augmenter la densité des antigènes d'histocompatibilité à la surface de ces cellules, on peut les stimuler à la phytohémagglutinine (PHA). Cette lectine isolée de Phaseolus vulgaris est un mitogène non spécifique activateur des lymphocytes T entraînant une transformation lymphoblastique de ces cellules (66).

La PHA induit la production par les lymphocytes T transformés de l'interferon γ qui

augmenterait l'expression des antigènes d'histocompatibilité (67).

b. Procédé

Ainsi les cellules sont incubées à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules par ml dans un milieu RPMI 1640 10% FCS (sérum de veau foetal), 0,5g fungizone, $5 \cdot 10^{-5} M$ β_2 mercaptoethanol, 1% pénicilline-streptomycine, 1% glutamine avec 10 ug/ml de PHA, pendant 3 jours à 37°C dans une atmosphère avec 5% de CO_2 .

2.2. MARQUAGE DES CELLULES PAR INCORPORATION DE METHIONINE S^{35}

2.2.1. Principe

Le marquage se fait par introduction dans un milieu de culture, où les cellules sont incubées d'un acide aminé radiomarké.

Cet a.a. sera utilisé sans distinction par les cellules pour synthétiser leurs protéines qui seront de ce fait marquées isotopiquement.

Nous avons principalement utilisé la méthionine S^{35} , car l'énergie des particules β émise à partir du S^{35} est plus élevée que celle provenant du tritium de la leucine H^3 .

Avec la methionine S^{35} , la révélation par autoradiographie est donc moins longue que pour la leucine H^3 (voir chapitre 4.2.a).

Le marquage à la méthionine S^{35} se justifie aussi par le fait que cet acide aminé est présent dans les molécules de classe II humaines. Etant donné l'homologie qui existe entre les produits du CMH bovin et ceux du CMH humain, on peut supposer qu'elle se retrouve aussi dans les molécules de classe II bovines.

Ces molécules seront donc bien marquées isotopiquement à l'aide de ce précurseur marqué.

De plus, ce marquage métabolique ne modifie pas les propriétés antigéniques et physiques de la molécule.

2.2.2. Procédure (68)

- Les cellules, une fois débarassées des thrombocytes sont resuspendues dans du milieu de culture Minimal Eagle Medium (MEM) sans méthionine enrichi en sérum de veau foetal dialysé (5%) auquel on ajoute de la glutamine (1%) et des antibiotiques (1%).

Les cellules sont laissées ainsi à "jeûn" dans ce milieu sans méthionine pendant une heure dans une étuve à 37°C avec 5% de CO_2 .

- On ajoute ensuite 100 uci/ $10 \cdot 10^6$ cellules de méthionine S^{35} (DUPONT NEN product) (activité spécifique : 1086 uci/m mole).

- Les cellules sont incubées suivant les cas, soit à raison de $25 \cdot 10^6$ cellules/ml pendant 4-5 heures ou encore à la concentration de

$10 \cdot 10^6$ cellules/ml pendant 14-16 heures dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂.

- Dans le cas d'une stimulation à la PHA, les cellules sont incubées en présence du précurseur radioactif et du mitogène pendant 14-16 heures à 37°C avec 5% de CO₂.

2.3. EXTRACTION DES PROTEINES MEMBRANAIRES

Nous avons utilisé 2 détergents non-ioniques pour solubiliser les protéines membranaires sous une forme proche de leur état natif : le Nonidet P40 (NP40) et le Triton X114 (TX114).

Ces deux détergents sont utilisés pour lyser les cellules, car ils dispersent les constituants membranaires en provoquant la formation de micelles mixtes (association protéine/détergent). L'avantage du TX114 est qu'il est capable d'entraîner une séparation de protéines hydrophiles et des protéines hydrophobes. En effet, suite à une augmentation de température (20°C), on observe une fusion des petits micelles dispersés, ce qui provoque la formation de complexes micellaires de grande taille que l'on peut faire précipiter en une phase détergente qui se séparera de la phase aqueuse. On sépare ainsi les protéines détergent-solubles qui sont associées aux micelles de celles hydrosolubles qui ne le sont pas. Le NP40 lui aussi est susceptible de subir une séparation

* Composition du tampon de lyse NP40

- Tris-Cl 50mM
- NaCl 150mM
- NaN_3 5mM
- NP40 0,5%
- PMSF 0,2M

mettre à pH 7,2

Remarque : PMSF = Phénylméthyl sulfonyl fluoride
est inhibiteur de protease

* Composition du tampon de lyse TX114

- Tris-Cl 50mM
- MgCl_2 5mM
- TX114 0,5%

mettre à pH 7,2

avec l'inconvénient majeur que cette séparation de phase doit se faire à température dénaturante (60- 70°C), raison pour laquelle il n'est pas utilisé (69).

2.3.1. Lyse des cellules (69,70)

- Après incorporation du précurseur radioactif, les cellules marquées sont lavées 3 fois pendant 10 minutes à 110g dans du tampon PBS, 2mg/ml de méthionine non radioactive, 0,02% NaN_3 à 4° afin d'éliminer l'excès d'acides aminés marqués non incorporés.
- Le culot est resuspendu dans du tampon de lyse à raison de $25 \cdot 10^6$ cellules/ml pour le NP40^* et de $10 \cdot 10^6$ cellules/ml pour le TX114^* . La lyse s'effectue dans la glace fondante pendant 30 minutes.
- Ensuite pour éliminer les cellules non lysées et les noyaux, on centrifuge la préparation 10 minutes à 13000g à 4°.
- Le surnageant est récolté pour les étapes ultérieures.

2.3.2. Séparation des protéines membranaires à l'aide du Triton X114 (69)

- Le surnageant est placé 3 minutes dans un bain-marie à 37°C; puis centrifugé 2 minutes à 13000g à température ambiante; on obtient

* Composition du tampon de lavage de la phase détergente

- Tris-Cl 50mM

- Mg Cl₂ 5mM

mettre à pH 7,4

2 phases :

- une phase inférieure contenant les protéines membranaires
 - une phase supérieure qui contient les protéines hydrophiles.
- Après élimination de la phase supérieure, la phase détergente est "lavée" des derniers éléments hydrophiles qu'elle contient par resolubilisation dans 1ml de tampon de lavage de la phase détergente * à 4°C.
- Ensuite, on resépare les 2 phases en incubant la préparation 3 minutes à 37°C et en centrifugeant 2 minutes à 10000g.
- La phase supérieure est éliminée alors que la phase inférieure (phase détergente) est ramenée au volume initial à l'aide du tampon de lyse NP40.

2.4. MESURE DE LA RADIOACTIVITE

2.4.1. Principe de la scintillation liquide

Le comptage à scintillation liquide se base sur la mesure de la lumière émise par des photons provenant d'atomes qui ont été excités directement ou indirectement par les rayonnements.

L'échantillon radioactif est placé dans une solution contenant du solvant organique et des substrats scintillants.

Le solvant organique en plus de solubiliser les molécules de l'échantillon, transforme l'énergie cinétique des rayons en énergie électronique d'excitation. Cette énergie va alors être transférée aux molécules de scintillants qui sont des molécules fluorescentes ou phosphorescentes qui lorsqu'elles retombent d'un état excité au niveau fondamental, émettent des photons dans le visible. Cette lumière va passer dans une cellule photoélectrique qui va transformer la mesure du photon en impulsions électriques qui seront additionnées par l'appareil afin d'être comptées comme coups.

On conçoit que du rayonnement initial à l'impulsion électrique mesurée, de nombreuses pertes interviennent à différents niveaux.

On définit alors :

- cpm : le nombre de coups par minute indiqué par l'appareil de comptage.
- dpm : le nombre de désintégration par minute des atomes radioactifs
- l'efficacité du comptage : le rapport $\frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$

Tous les phénomènes qui réduisent l'efficacité du comptage porte le nom de "quenching".

2.4.2. Procédure de mesure de la radioactivité

a. Radioactivité précipitable

La mesure de la radioactivité précipitable permet de déterminer quelle est dans le lysat la part de radioactivité liée à des protéines.

- On découpe dans du papier de fibre de verre un carré de 1cm^2 sur lequel un volume déterminé d'échantillon est déposé.
- Il faut ensuite plonger successivement cette préparation dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% pendant 10 minutes à température ambiante, puis dans le même bain chauffé à 100°C pendant 10 minutes également.
- Le papier de fibre de verre est séché à température ambiante.
- Ensuite, on le place dans une fiole à comptage auquel on ajoute 4ml d'aqualumma (solvant + scintillant).
- La fiole est mise à compter dans un compteur β (Beckman LS-1801).

b. Radioactivité totale

Pour compter la radioactivité totale d'un échantillon, on met directement un volume déterminé de celui-ci dans une fiole à

comptage contenant 4ml d'aqualumma. La fiole est mise à compter dans un compteur β (Beckman LS-1801).

2.5. IMMUNOPRECIPITATION

2.5.1. Principe

On utilise ici la haute spécificité de l'anticorps monoclonal pour l'antigène qui nous intéresse en vue d'isoler cette molécule des autres protéines du lysat cellulaire.

Pour précipiter le complexe Antigène-Anticorps, on peut provoquer la formation d'un réseau de grande taille. Mais pour constituer un tel réseau précipitant, il faut soit utiliser des anticorps précipitants (les IgM par exemple) qui même en excès provoque la formation d'un tel réseau, soit dans le cas des immunoglobulines bivalentes (IgG par exemple) il faut un rapport de concentration adéquat des 2 réactifs (antigène et anticorps).

Dans le but d'éviter la recherche laborieuse d'un rapport de concentration adéquat entre anticorps et antigène pour provoquer la formation d'un réseau précipitant, on utilise souvent une autre méthode de précipitation. Celle qui est la plus courante est l'utilisation de pro-

Espèce	Classes fixatrices
Homme	IgG 1,2,4 IgA2 quelques IgM
Lapin	IgG Quelques IgM
Souris	IgG 2a, 2b, 3 Quelques IgG 1
Mouton	IgG 2
Chèvre	IgG
Rat	IgG
Cobaye	IgG 1,2
Bovins	-
Porc	-

Tableau 2 - Variation des classes d'immunoglobulines fixatrices de la protéine A selon les espèces

D'après Goding (71)

téine A fixée à un transporteur de grande taille non soluble. La protéine A ayant la propriété de se fixer sur la portion Fc de la plupart des IgG de mammifère. Toutefois, les classes et les sous-classes d'immunoglobulines fixatrices de la protéine A varient fortement d'une espèce à l'autre (voir tableau 2) (71).

On note que les IgG bovines ne se fixent pas ou peu sur la protéine A alors que la plupart des sous-classes d'IgG de souris s'y fixent bien.

La protéine A est une molécule présente à la surface de staphylocoques, elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique (PM 42000) liée de manière covalente à la couche de peptidoglycane de la paroi bactérienne (72).

2.5.2. Type de protéine A disponible et préparation pour l'immunoprécipitation

a. Nature de la protéine A insoluble

Plusieurs types de protéine A insoluble sont disponibles.

La première source de protéine A insoluble que nous avons utilisée est une souche de bactéries Staphylococcus aureus Cowan I (SAC) fixée. Cette souche est l'une des meilleures productrices de protéine A. Le problème de cet immunoabsorbant est qu'il possède à sa

* Composition du tampon SAC

- PBS 0,010M
- NP40 0,5%
- Methionine 2mM
- NaN_3 0,02%

mettre à pH 7,4

* Composition du tampon SAC, ovalbumine

- 1mg d'ovalbumine/ml de tampon SAC

surface de nombreuses structures sucrées et protéiques qui adsorbent non spécifiquement des protéines marquées du lysat cellulaire. Ces protéines adsorbées sont autant de contaminants qui seront présents à la fin de l'immunoprécipitation (87).

Pour contourner ce problème, nous avons utilisé du sepharose 4B protéine A (Pharmacia).

b. Préparation de la protéine A en vue de l'immunoprécipitation

Préparation du SAC 10%

- A 1g de SAC lyophilisé, on ajoute 10ml de PBS, NaN_3 0,1%.
- On lave 2 fois par une centrifugation de 10 minutes à 4000 rpm.
- Avec du PBS, NaN_3 0,1%, on resuspend le culot dans 10 fois son volume. Cette suspension est répartie en aliquot et conservée à -70°C .
- Ensuite, la suspension de SAC 10% est lavée 2 fois par centrifugation dans du tampon SAC.*
- Le culot est resuspendu dans 100 μl de tampon SAC, ovalbumine.*
- 100 μl de cette préparation de SAC 10% sont utilisés par immunoprécipitation proprement dite ou par "preclearing".

Préparation du sephorose 4B-protéine A

- La poudre de gel séché est rehydratée avec du tampon de lyse NP40.
(1g de gel sec emplit un volume de 3,5ml une fois réhydraté)
- 50 μ l de gel réhydraté est lavé 2 fois par centrifugation de 1 minute à 13000 rpm dans un tampon de lyse NP40 puis 1 fois dans du tampon de lyse NP40 ovalbumine (1mg/ml).
- On utilise 50 μ l de gel hydraté, lavé, pour un immunoprécipité proprement dit ou pour un "preclearing".

2.5.3. "Preclearing"

Principe

.....

On met l'extrait cellulaire en présence de l'immunoabsorbant de manière à éliminer la majorité des protéines qui s'y tient de façon non spécifique.

Procédure

-
- soit 100 μ l de SAC 10% en culot, soit 50 μ l de sepharose 4B protéine A en culot sont mis en présence de l'extrait cellulaire pendant 30 minutes à 4°C.
 - Après ce temps de contact, et une centrifugation, le surnageant est récupéré pour les étapes ultérieures d'immunoprécipitation.

2.5.4. Immunoprécipitation proprement dite

La procédure d'immunoprécipitation peut se découper en plusieurs étapes :

- a. Introduction du monoclonal
- b. Ajout du 2e anticorps : le Rabbit anti-mouse
- c. Adjonction de la protéine A insoluble
- d. Lavages du complexe immunoprécipité
- e. Elution des protéines retenues

a. Introduction du monoclonal

Un excès du monoclonal choisi (sous forme d'ascite ou d'anticorps purifié) est mis en contact avec le lysat "preclearé" ou non. L'incubation s'effectue 1 heure à 4°C.

b. Ajout du 2e anticorps : le Rabbit anti-mouse

Le rabbit anti-mouse (RAM) est un sérum polyclonal obtenu par immunisation d'un lapin avec des IgG de souris.

Cette 2ème étape est facultative mais elle offre une sécurité importante dans la fixation du complexe antigène-anticorps monoclonal à la protéine A. Les immunoglobulines du lapin ayant une excellente affinité pour la protéine A (tableau 2).

Le RAM est ajouté au lysat en léger excès par rapport au monoclonal. L'incubation est

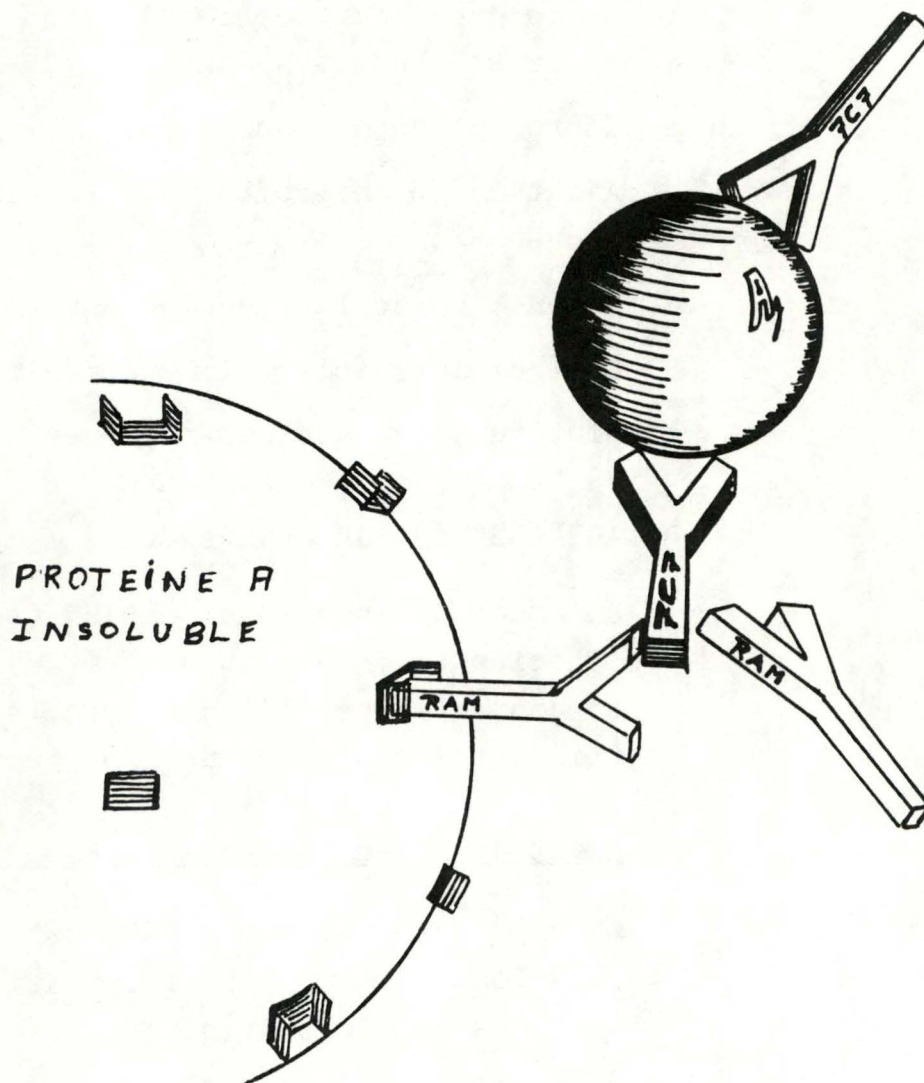


Figure 14 : illustration du complexe antigène - B₂ Val 7C7 - RAM - protéine A .

réalisée suivant les cas 1 heure ou 1 nuit à 4°C.

On forme ici un complexe antigène- AC.Mo-RAM

c. Adjonction de la protéine A insoluble

La préparation est mise en présence de 100 µl de SAC 10% en culot ou de 50 µl de sepharose 4B protéine A en culot pendant 1 heure. On forme ainsi le complexe protéine A-anticorps (1 ou 2) - antigène (figure 14).

d. Lavage du complexe immunoprécipité

En règle générale, cette étape de lavage sert à éliminer la majorité des contaminants protéiques qui se sont adsorbés non spécifiquement aux composants du culot.

Il faut ici trouver un compromis, en effet, le lavage doit être suffisamment efficace que pour éliminer les contaminants, mais il ne doit pas être trop drastique au risque de dégrader le complexe protéine A-Ac.Mo. (1 ou 2) - antigène.

Plusieurs lavages du culot sont réalisés par centrifugation de 2-3 minutes à 13000g. Des lavages plus ou moins drastiques peuvent être réalisés en fonction de la composition des tampons utilisés.

Au cours de ce travail, différentes séries de lavages ont été utilisées.

* Composition du tampon immunomix

- PBS pH 7,4
- Sérum albumine bovine (BSA) 5mg/ml
- Triton 1%
- Désoxycholate de sodium (DOC) 0,5%

* Composition du tampon Neufeld

- Sodium dodecyl sulfate (SDS) 0,1%
- NaCl 0,6M
- NP₄₀ 0,05%

mettre à pH 8,6

* Composition du tampon Net

- Tris-Cl 50mM
- NaCl 0,15M
- NaN₃ 0,02%
- EDTA 5mM

mettre à pH 7,5

* Composition du tampon TD

- Triethanolamine (Tea) 15mM
- DOC 0,5%

mettre à pH 8

* Composition du tampon TNS

- Tris-Cl 25mM
- NP₄₀ 0,1%
- SDS 0,1%

mettre à pH 8

1. Série des tampons SAC (lavage doux)
 - 2 x tampon SAC + ovalbumine (1mg/ml)
 - 1 x tampon SAC + ovalbumine (1mg/ml)
+ 0,1% SDS

2. Série des tampons immunomix (lavage dur)
 - 1 x tampon immunomix * 0,2 SDS
 - 1 x tampon immunomix 2M kcl
 - 1 x tampon Neufeld *
 - 1 x tampon Net *

3. Séries des tampons Net (lavage doux)
 - 1 x tampon Net* 0,15M + ovalbumine/mg/ml
 - 1 x tampon Net 0,5M + " "
 - 1 x tampon Net 0,25M + " "
 - 1 x tampon Net 0,15M + " "

4. Lavage en tampon TD (lavage moyen)
 - 5 x tampon TD*

5. Lavage TNS (lavage moyen à dur)
 - 5 x tampon TNS*

e. Elution des protéines retenues

§. Principe
.....

Cette étape consiste à dénaturer les protéines par l'action de divers agents. Pour dissocier les complexes antigènes (1 ou 2)-protéines A et pour décomposer l'antigène et l'anticorps en leurs sous-unités.

On peut réaliser cette élution de diverses manières, mais dans le but d'éviter une multiplication inutile d'étapes intermédiaires, on la fait dans un tampon préparatif à l'électrophorèse qui servira à l'analyse des échantillons. Ainsi, l'élution préparative aux gels SDS-Page se fera en chauffant à 100°C le culot de l'immunoprécipité en présence de fortes concentrations en sodium dodecyl sulfate (SDS) et de β_2 mercaptoéthanol. Celle préparant aux gels Ief se fera en remettant en suspension le culot de l'immunoprécipitation dans un tampon contenant de l'urée à forte concentration, des ampholines et du β_2 mercaptoéthanol.

§. Problème spécifique aux antigènes de classe II dans l'élution préparative au gel SDS-Page
.....

Si l'élution se fait à 100° en présence de forte concentration en SDS et β_2 mercaptoé-

thanol, la chaîne α se sépare mal de la chaîne β ; ceci serait dû au β_2 mercaptoéthanol qui, en présence d'une solution chaude de SDS, affecte la structure de la chaîne β , provoquant une augmentation de la liaison du SDS à cette chaîne qui migre moins vite en gel SDS-Page et donc se sépare moins bien de la chaîne α (73).

On doit donc modifier quelque peu cette procédure soit en éliminant le passage à 100°C mais alors on ne désagrège pas tous les complexes antigène-anticorps-protéine A ou encore, en omettant le β_2 mercaptoéthanol au risque de voir des agrégats de protéines ne pas se dissocier.

Une autre méthode d'éluion a donc été proposée : le clivage à l'acide (73). On peut aussi utiliser une méthode de clivage à pH basique décrite pour la préparation des antigènes d'histocompatibilités par chromatographie d'affinité (74).

§. Protocoles

- Elution et préparations des échantillons pour les gels SDS

* Composition du tampon échantillon SDS

- Tris 0,0625M
- SDS 2%

mettre pH 6,8

* Composition du tampon "5 x concentré"

- Tris-Cl 250mM
- SDS 10%
- Glycerol 50%
- β_2 mercaptoéthanol 10%
- Bleu de bromophénol 0,25%

1° Elution SDS, β_2 mercaptoéthanol,
chauffage à 100°

- Remettre en suspension le culot de l'immunoprécipité dans 20 ul de tampon échantillon SDS* auquel on a rajouté un tampon "5 x concentré"*;
- On chauffe cette suspension dans un bain-marie en ébullition (100°) pendant 5 minutes.

2° Elution SDS, β_2 mercaptoéthanol

- Même chose qu'en 1° sans ébullition. Le tampon échantillon SDS et le tampon "5 x concentré" sont laissés en contact 30 minutes à température ambiante.

3° Elution SDS, chauffage à 100°

- Même chose qu'en 1° sauf que le tampon échantillon SDS ne contient pas de β_2 mercaptoéthanol.

4° Elution par clivage à l'acide

- Remettre en suspension le culot de l'immunoprécipité dans une quantité déterminée d'HCl 0,2N de manière à descendre à pH 2,5.
Laisser agir l'acide 15 minutes à température ambiante.
- Rajouter ensuite une quantité équivalente de NaOH 0,2N de manière à retrouver un pH proche de 7.

* Composition du tampon TDN

- | | |
|--------|------|
| - Tea | 15mM |
| - Doc | 0,5% |
| - NaCl | 0,5M |

mettre à pH 11

* Composition du tampon échantillon Ief

- | | |
|--|------|
| - Urée | 9,5M |
| - NP ₄ O | 2% |
| - Ampholine pH 5-7 | 1,6% |
| - Ampholine pH 3,5,10 | 0,4% |
| - β ₂ mercaptoéthanol | 5% |

- Mettre alors une quantité de tampon "5 x concentré" de manière à le diluer 5 x.

5° Elution par tampon TDN

- Mettre en suspension le culot dans 200 ul du tampon TDN* et laisser agir 20 minutes.
 - Centrifuger et récupérer le surnageant duquel on va précipiter les protéines à l'acétone : mettre 6 volumes d'acétone à -20°C/ Volume de surnageant.
 - Le lendemain, on centrifuge cette préparation 15 minutes à 6000g. Puis on laisse évaporer l'acétone et on resuspend le culot de protéines déshydratées dans 20 ul de tampon échantillon SDS + 5 ul de tampon "5 x concentré".
- Elution et préparation des échantillons pour le gel Ief.
- Remettre le culot en suspension dans 25 ul de tampon échantillon Ief*. Laisser en contact 15 minutes à température ambiante pour la séparation du complexe immunoprécipité.

6° Après élution

- les échantillons sont centrifugés 2 minutes à 13000g, le surnageant est récolté avec précaution et sera déposé sur le gel.

3. PURIFICATION D'ANTIGENE PAR CHOMATOGRAPHIE D'AFFINITE ET MARQUAGE A L'IODE¹²⁵

3.1. PURIFICATION D'ANTIGENE PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

3.1.1. Préparation de l'extrait antigénique brut (74)

- 150g de ganglions mésentériques bovins sont broyés au hachoir mécanique (Moulinex) et récoltés à 4°C dans 150ml de tampon PBS + PMSF 0,2mM,
- la préparation est ensuite filtrée sur gaze double épaisseur,
- puis centrifugée 10 minutes à 400 RPM à 4°C pour sédimenter les cellules,
- le culot est resuspendu dans du PBS - PMSF 0,2mM, à 4°C,
- le surnageant est récolté et centrifugé 1 heure à 60000 RPM 4°C (rotor 60 Ti) pour sédimenter les constituants cellulaires,
- on resuspend le culot dans du tampon de lyse NP40, laissé 1 nuit à 4°C,
- après cette incubation, le lysat est centrifugé 1 heure à 36000 RPM et le surnageant constitue l'extrait antigénique brut.

3.1.2. Chromatographie d'affinité

- L'extrait antigénique est passé à raison de 15ml/heure sur des colonnes placées en série (74) :
 - . la colonne 1 : sert de préfiltre et contient du sepharose 4B.
 - . la colonne 2 : constituée de sepharose 4B couplé à des Ig murines. Elle permet de retenir les protéines se fixant non spécifiquement sur ces Ig.
 - . la colonne 3 : consiste également en du sepharose 4B couplé cette fois au monoclonal B₂ VAL 7C7 servant à purifier les antigènes BoLA de classe II.
- Les colonnes sont ensuite lavées individuellement avec du tampon de lyse NP40 (10 à 15 fois le volume de la colonne) puis avec du tampon TD pour éliminer les protéines non spécifiques avant d'être éluées avec du tampon TDN.
- L'éluat, contenant des protéines spécifiques, est alors immédiatement neutralisé par du TEA 0,5M pH 7,9.
- Les colonnes sont ensuite neutralisées par du tampon de lyse pH 8.
- Elles sont stockées à 4°C dans du tampon PBS NaN₃ 0,1%.
- 1ml d'éluat est concentré par une précipitation avec 6ml d'acétone à -20°C toute la nuit.

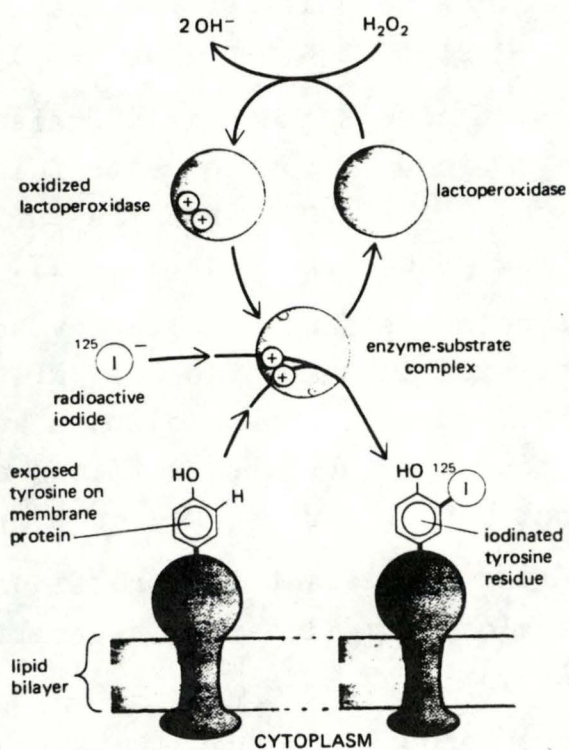


Figure 15 Selective labeling of proteins on the outside of the plasma membrane by lactoperoxidase-catalyzed iodination. As indicated, all reactions involving iodine are confined to the enzyme surface. The enzyme contains an iron atom at its active site that generates a free radical (in the tyrosine to be iodinated) as an intermediate in the reaction.

*D'APRÈS ALBERTS et al.
MOLECULAR BIOLOGY
OF THE CELL. (1983)*

- Ensuite, on centrifuge 15 minutes à 6000 RPM pour précipiter les protéines.
- Le "culot" protéique est alors resuspendu avec le tampon adéquat pour l'analyse électrophorétique.

3.2. MARQUAGE DES PROTEINES PURIFIEES A L'IODE ¹²⁵

3.2.1. Principe

Nous avons choisi le marquage de l'iode à l'aide de lactoperoxidase car c'est un marquage doux (75). En effet, contrairement à d'autres techniques mettant directement la protéine en présence d'un réducteur puissant (chloramine T), celle-ci n'abîme pas les protéines et garde les sites antigéniques intacts. La lactoperoxidase en présence d' H_2O_2 et d'iode ¹²⁵ catalyse la substitution d'une molécule d'hydrogène sur les acides aminés tyrosine et histidine de la protéine à marquer, par une molécule d'iode ¹²⁵. L'enzyme est une intermédiaire de la réaction; elle est oxydée par la transformation de H_2O_2 en $2OH^-$ et est alors chargée 2 fois positivement. Elle prend ensuite en charge une molécule d'I ¹²⁵ et la transfère sur une tyrosine ou une histidine qui sera ainsi marquée (figure 15).

* Composition du tampon Phosphate NP40

- Na H₂PO₄-H₂O 1,1M

- NP40 0,5%

mettre à pH 7,4

(28)

3.2.2. Protocole (76)

- Mettre dans un tube eppendorf 100 ug de l'antigène de classe II dans 100 ul de tampon phosphate NP40^{*}.
- Ajouter à cet eppendorf 5 ug de lactoperoxydase et transférer le tout dans une cupule contenant 500 uci de NaI¹²⁵ (Amersham).
- Démarrer la réaction en ajoutant 5 ul d'H₂O₂ (0,03%) fraîchement préparé.
- Laisser incuber 45 minutes à température ambiante en agitant plusieurs fois.
- Déposer tout le contenu du récipient sur une colonne sephadex G25 équilibrée et lavée successivement avec 10ml de tampon phosphate + 1mg/ml d'ovalbumine et avec 50ml de tampon phosphate NP40.
- Rincer la cupule réactionnelle 3 fois avec 100 ul de tampon phosphate NP40.
- Déposer 2 ml de tampon phosphate NP40 directement sur la colonne.
- Lorsque l'échantillon a complètement pénétré le gel, on dépose du tampon phosphate NP40 par fraction de 500 ul, et on récupère l'éluat dans des tubes cristal numérotés de 1 à 20.
- Chaque tube est compté au compteur Geiger pour estimer où se trouve la radioactivité associée aux protéines.

- On constate que dans les 3 premiers tubes se retrouve un pic de radioactivité qui correspond à la sortie des protéines marquées. On ne garde que ces tubes.

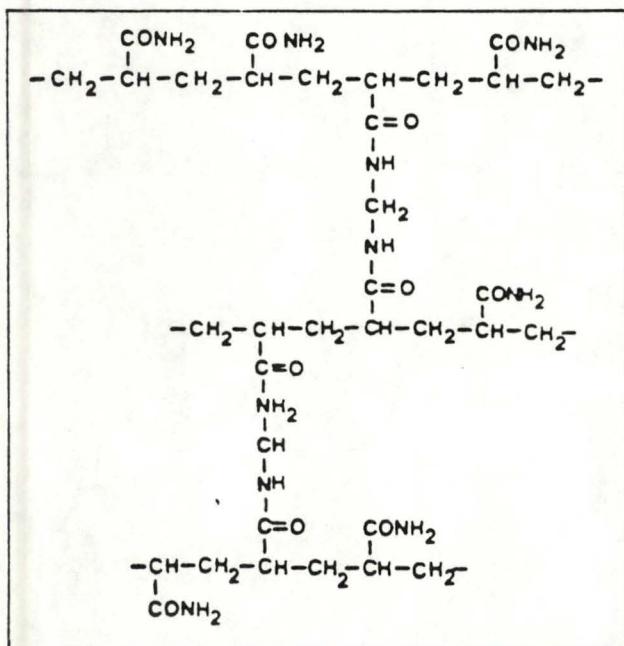


Fig.16 - Réseau issu de la polymérisation de l'acrylamide et de la N N'-Méthylèneacrylamide.

4. ANALYSE

4.1. PROCESSUS ELECTROPHORETIQUE

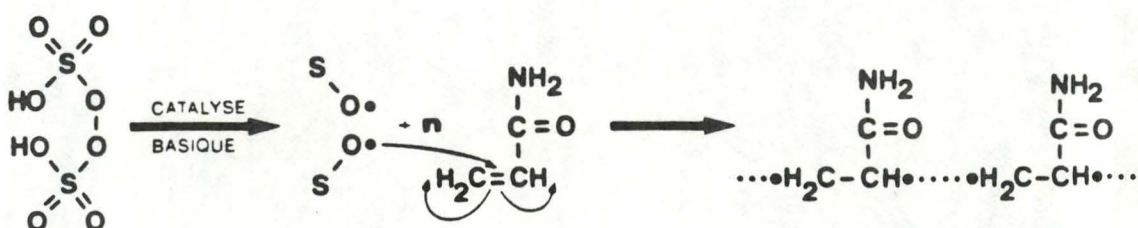
4.1.1. Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-page)

a. 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 des molécules en fonction de leur poids moléculaire avec une grande résolution et une grande reproductibilité.

- Gel de polyacrylamide

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, le persulfate (H_2SO_5) et le NN'-tétraméthylène-diamine (Temed) :



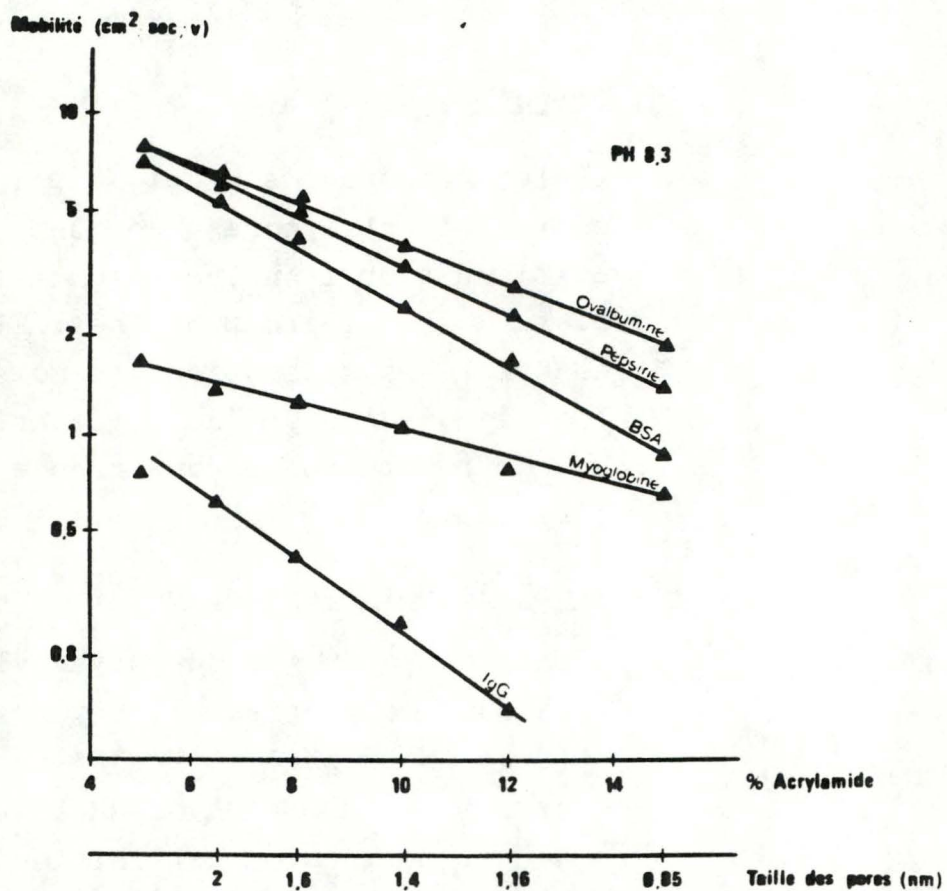


Fig.17- Graphique montrant la relation linéaire entre la mobilité des protéines et le % d'acrylamide des gels.
D'après Podulso et al. (77).

La réaction est inhibée en présence d'un excès d' O_2 ; on prendra donc soin d'éviter les contacts avec l'air.

La polymérisation de l'acrylamide sous forme de chaînes pontées par les molécules de NN'-méthylène bisacrylamide aboutit à la formation d'un réseau (figure 16).

La réticulation du gel dépend du pourcentage d'acrylamide et de bisacrylamide utilisé. Il est évident que la mobilité électrophorétique des protéines diminue si la taille des pores diminue (figure 17) (77).

Cependant, on remarque que l'influence de la taille des pores sur la mobilité varie d'une protéine à l'autre (77). Leur mobilité dépend également de leur charge et de leur taille.

- Rôle du SDS

Le sodium dodecyl sulfate est un détergent anionique $Na^+ \bar{O}SO_3-(CH_2)_{10}-CH_3$ qui a pour rôle de rompre la structure tridimensionnelle des protéines. Le SDS a une partie hydrophobe qui provoque le déroulement de la protéine car les portions hydrophobes de la protéine se lient au SDS et sont exposées vers l'extérieur.

Le SDS étant chargé négativement, il rend toutes les protéines négatives quelle que soit leur charge de départ. L'abondance des charges négatives dépend de la taille de la protéine mais pour une molécule donnée, elle

* Composition du gel de séparation 12 %

- Tris Cl 1,5M pH 8,0 2,5ml
- SDS 0,4%
- Acrylamide 30%*
- Bisacrylamide 0,8% 4ml
- Eau 3ml
- Temed pur 10ul
- Persulfate d'ammonium (APS) 0,5ml

* Composition de la solution d'acrylamide 30% -bisacrylamide 0,8%

- Acrylamide 28,38g portés à 100ml
- Bisacrylamide 1,62g avec de l'H₂O

est constante. La forme de l'association entre la protéine et le SDS étant également constante pour une protéine donnée, leur comportement électrophorétique sera alors uniforme.

Leur séparation en SDS-Page se fera uniquement selon leur différence de poids moléculaire.

On a montré qu'il existe une relation linéaire entre le rapport de la distance parcourue par la protéine au front de migration et le logarithme de son poids moléculaire (78).

b) Procédure (79)

Préparation des gels
.....

Le gel de séparation des protéines (running gel) est précédé d'un gel plus lâche appelé gel d'empilement (stacking gel). Le gel d'empilement sert à concentrer l'échantillon avant qu'il ne pénètre dans le gel de séparation.

1° Gel de séparation

- Les gels de séparation* à 12% d'acrylamide sont coulés en gels plats de 0,75 d'épaisseur, de 6cm de longueur, de 8cm de largeur.
- On place au-dessus de l'alcool isobutylique pendant le temps de polymérisation.

* Composition du gel d'empilement 3%

- Tris-Cl	0,5M	pH 6,8	
SDS	0,4%		1,25ml
- Acrylamide	30%		
Bisacrylamide	0,8%		0,5ml
- Eau			2,25ml
- Temed pur			5ul
- APS			0,5ml

* Composition du tampon d'électrophorèse

- Tris-Cl		25mM
- Glycérine		0,192M
- SDS		0,1%

* Protéines étalons de poids moléculaires
(C¹⁴ methylated mixture Amersham)

14.300	lysosyme méthylée
30.000	anhydrase carbonique méthylée
46.000	ovalbumine méthylée
69.000	sérum albumine bovine méthylée
92.000	phosphorylase méthylée
200.000	myosine méthylée

2° Gel d'empilement

- Le gel de séparation est ensuite surmonté d'1 cm de gel d'empilement* à 3% d'acrylamide.
- Dès que le gel d'empilement est coulé, on met un peigne à 10 puits et la polymérisation se fait en quelques minutes.

Electrophorèse

- On dépose dans chaque puits 20 ul d'échantillon préparé à l'aide du tampon échantillon SDS et du tampon "5 x concentré". Dans ce dernier, la glycérine sert à augmenter la densité de l'échantillon et le bleu de bromophenol, colorant de faible poids moléculaire, permet de situer le front de migration.
- Du tampon d'électrophorèse* est placé dans la cuve à électrophorèse (mini protean cell. Biorad).
- On applique alors un courant de 200 volts pendant plus ou moins 45 minutes.
- Parallèlement aux échantillons déposés, on fait migrer sur une des pistes du gel un mélange de protéines étalons radioactives de PM connus (C^{14} methylated mixture Amersham)*.

4.1.2. Electrophorèse bidirectionnelle

a. Principe général

On combine 2 techniques dans cette électrophorèse bidirectionnelle : l'isoélectrofocalisation en présence d'un détergent neutre et d'urée (agent dénaturant) dans une première dimension et le gel électrophorétique plat en présence de SDS (agent dénaturant) dans la deuxième dimension.

La séparation des protéines se fait en fonction de deux de leurs propriétés physiques indépendantes : leurs charges et leurs poids moléculaires.

b. Première dimension (IEF)

Principe de séparation

L'isoélectrofocalisation sépare les protéines en fonction de leurs charges. En effet, sous l'action d'un champ électrique, on fait migrer les protéines dénaturées par une forte concentration en urée dans un gradient de pH.

La protéine va migrer dans ce champ électrique en fonction de sa charge jusqu'à ce qu'elle atteigne un pH qui correspond à son point isoélectrique. Elle ne sera alors plus chargée et sera bloquée à cet endroit, n'étant plus soumise au champ électrique. On dit que la protéine a atteint son point d'équilibre.

Etablissement du gradient de pH

Le gradient de pH est créé par un mélange de polyampholytes ayant des points isoélectriques différents. Ces molécules sont de petites protéines synthétiques de bas poids moléculaire présentant des fonctions acides et basiques. Elles ont une capacité de tampon et de solubilité élevée au point isoélectrique, ainsi qu'une bonne conductivité (80). Dans le champ électrique, les ampholytes vont donc migrer jusqu'à leur point isoélectrique et produire un certain pH à cet endroit. Les ampholytes les plus acides vont se concentrer vers l'anode, les plus basiques vers la cathode.

La composition des ampholytes commercialisés ne donne pas un gradient de pH tout à fait linéaire, c'est pourquoi, il est intéressant de mélanger 2 lots d'ampholytes de firmes différentes (Dr Lecoq, communication personnelle, H.Erasme).

Lors de la préparation des gels, nous utilisons une résine échangeuse d'ions mixtes (l'amberlite MB-1 (LKB)) qui enlève les impuretés chargées qui risqueraient d'interférer avec la migration (Dr Lecoq, communication personnelle, H.Erasme).

* Composition du gel IEF

- Urée	9,2M	2,75g
- Acylamide	30%	0,665ml
Bisacrylamide	0,8%	
- 10% NP40		1,0ml
- Eau		0,78ml
- Ampholines pH 5-7.4%		400 u1
- Ampholines pH 3,5-10.2%		50 u1
- 10% APS		6 u1
- Temed		4 u1

ProcédurePréparation des gels IEF (81)
.....

- Mélanger les différents constituants * des gels.
- Il faut que l'urée soit dissoute, on y ajoute une cuillère d'amberlite (échangeurs d'ions) et on laisse agir 30 minutes à température ambiante.

Pour rappel

- . L'urée est utilisée à haute concentration, elle détruit les liens hydrophiles et déstabilise les ponts hydrogènes. Elle dénature et dissocie de ce fait les protéines.
- . Le NP₄₀ solubilise les protéines hydrophobes tels que les protéines membranaires.
- . Le β_2 mercaptoéthanol est un réducteur puissant empêchant la formation de ponts disulfures.

Préparation des tubes cylindriques
.....

- Les tubes ont une longueur de 15cm et un diamètre interne de 2,5mm.
- Avant l'utilisation des tubes, ils doivent être lavés soigneusement dans une solution d'acide (HCl 0,1N) à 100°C, ensuite rincés à l'eau distillée et séchés. Cette opération

* Composition du tampon basique pour l'IEF

- NaOH 0,02M

* Composition du tampon acide pour l'IEF

- H_3PO_4 0,01M

permet aux gels de s'accoler parfaitement aux tubes.

- Les tubes sont marqués à 13 cm, à l'une des extrémités et l'autre 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 longue aiguille très fine.
- Lorsqu'on coule les gels, on évite la formation de bulles en y appliquant une bonne pression.
- Les gels sont alors surmontés d'un "gel overlay" (urée 8M en eau distillée) pendant le temps de polymérisation.
- Ensuite le "gel overlay" est remplacé par 20 ul de tampon échantillon IEF.

Electrophorèse

La cuve électrophorétique est composée de deux parties.

La partie supérieure contient le tampon basique* dégazé et la partie inférieure contient le tampon acide*.

- On fait ici un prérun pour éliminer les contaminants chargés et pour équilibrer le gradient de pH. Pour se faire, on ajoute 20 ul de tampon IEF sur chaque gel et du Na OH 0,02M.

* Composition du "sample overlay"

- Urée 9M
- Ampholine pH 5-7 0,8%
- Ampholine pH 3,5-10 0,2%

On applique	200 V	pendant	15	minutes
	300 V	"	30	"
	400 V	"	30	"

- On arrête l'électrophorèse et on retire le Na OH.
- Pour l'électrophorèse proprement dite, on dépose les 20 ul d'échantillons du côté basique des gels qui sont surmontés de 10 ul de "sample overlay"* et de Na OH 0,02M.
- L'électrophorèse se fait pour un total de 4800 volts-heures à raison de 400 volts/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.

c. La deuxième dimension (SDS-Page)

Principe

Le gel SDS-Page comme expliqué précédemment sépare les protéines dénaturées par le SDS en fonction de leurs poids moléculaires.

En conséquence de ces 2 modes de séparation successifs, on aura différentes taches dans le gel SDS-Page de la 2ème dimension (2D).

Chaque tache correspondant à une protéine ou un groupe de protéines ayant un point isoélectrique et un poids moléculaire donné.

* Composition du tampon d'équilibration

- Tris 0,5-pH 6,8	25ml
- Glycerol	20ml
- SDS 10%	40ml
- β 2 mercaptoéthanol	10ml
- 0,05% BBP	5ml
- Eau	100ml

Procédure

.....

La préparation du gel SDS-Page se rapproche de celle de l'électrophorèse unidirectionnelle, excepté que dans le cas présent on coule les gels en grands gels plats de 1,5mm d'épaisseur, de 16cm de longueur et de 16cm de largeur.

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

Les gels de première dimension sont démoulés en injectant de l'eau avec une certaine pression du côté basique du gel cylindrique.

Les gels sont placés dans 5ml de tampon d'équilibration* pendant 30 minutes, ainsi les protéines séparées par IEF se chargeraient de SDS et pourront migrer dans le gel 2D.

Les gels de première dimension sont disposés ensuite sur les gels SDS-Page. Le côté sur lequel l'échantillon a été déposé est toujours mis à l'opposé des étalons. Le gel de première dimension est solidarisé au gel SDS par de l'agarose 1% en tampon échantillon SDS.

On place le gel 2D chargé dans une cuve à électrophorèse (Protean II cell, Biorad) avec du tampon électrophrétique.

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

* Composition de bain de DMSO et PPO

- Dimethyl sulfoxide (DMSO) 200ml
- Diphényl 2,5 oxazole (PPO) 60g

4.2. DETECTION

a. Autoradiographie (82)

Après séparation des antigènes marqués isotopiquement, le gel est placé dans 3 bains successifs de diméthyl sulfoxide (DMSO), puissant déshydratant, pendant 30 minutes.

Ensuite, on le place dans un bain de DMSO et PPO* pendant 4 heures ou toute la nuit. Le DMSO sert ici de solvant pour le PPO qui est un substrat scintillant. Le PPO pénètre donc dans le gel.

Ensuite, le gel est lavé à l'eau courante pendant 40 minutes pour le réhydrater et précipiter le PPO.

Le gel est alors placé entre 2 papiers de cellophane et séché au moins 5 heures sur un sécheur de gel relié à une pompe à vide.

Une fois sec, le gel est mis en sandwich entre 2 films (hyperfilm TM-MP, Amersham) dans l'obscurité et stocké dans une cassette à -70°C pour un temps d'exposition plus court.

Dans le cas de gel de protéines marquées à l'iode¹²⁵, le montage gel sec/films est placé entre des écrans renforcateurs. On améliore ainsi la sensibilité de la détection des échantillons marqués.

Après un 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).

* Solution de coloration au bleu de coomasie

- | | |
|---|-------|
| - bleu de coomasie
(brillant blue R 250) | 0,25g |
| - Méthanol | 45ml |
| - Eau distillée | 45ml |
| - Acide acétique glacial | 10ml |

* Solution de décoloration

- | | |
|--------------------|------|
| - Méthanol T | 30ml |
| - Acide acétique T | 10ml |
| - Eau distillée | 60ml |

b. Coloration au bleu de coomassie

Après séparation, sur gel SDS- Page, de protéines non marquées, le gel est fixé et coloré dans une solution de coloration au bleu de coomassie* pendant 30 minutes.

Ensuite, le gel est plongé dans une solution de décoloration*.

Après ce traitement, les protéines séparées seront marquées par le bleu de coomassie.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

" A tout argument s'oppose un argument égal "

Sextus empiricus

Hypotyposes pyrrhoniennes

0. PREAMBULES

0.1. AVIS AU LECTEUR

A ce point de notre rédaction, nous nous devons d'avertir le lecteur que la présentation des résultats ne suivra pas la découpe classiquement acceptée : Résultats - Discussion.

Pour des raisons de clarté, voire pour limiter la confusion, nous avons choisi de reprendre par ordre chronologique le cheminement à travers les méandres de l'immunoprécipité des molécules de classe II bovines par notre anticorps monoclonal (B₂ Val 7C7).

Chaque étape d'avancement du travail faisant alors l'objet d'une brève discussion, celle-ci servant de justification pour l'étape ultérieure.

Nous pensons qu'une telle découpe permettra une meilleure compréhension de notre démarche.

Au vu de la séquence suivie à chaque étape pour obtenir des informations (marquage métabolique immunoprécipité, analyse par électrophorèse SDS-Page, autoradiographie) et le temps nécessaire à son bon déroulement, nous avons souvent été obligés de surcharger le gel SDS-Page pour accélérer l'impression du film au risque de perdre une partie de l'information. Nous avons, pour des raisons de "timing", parfois dû concevoir un nouveau

protocole sans pouvoir tirer le meilleur parti des enseignements de l'expérience précédente.

0.2. CHOIX DE L'ANTICORPS B₂ Val 7C7

Entre autres anticorps monoclonaux anti-BoLA de classe II qui étaient à notre disposition, le B₂ Val 7C7 était le mieux caractérisé et le seul accepté internationalement puisqu'il a fait l'objet d'une publication à l'origine (39) et que des laboratoires étrangers l'ont déjà utilisé pour des expériences dont les résultats ont été publiés ou non (48,83).

A la question de savoir si ce monoclonal reconnaît réellement une spécificité monomorphe ou polymorphe, nous ne sommes pas en mesure de répondre avec certitude (voir Matériel et méthode, chapitre 1).

De toute façon, nous estimons qu'il reconnaîtra suffisamment d'allèles pour que l'étude du polymorphisme des molécules précipitées à l'aide de cet anticorps ait un sens. En effet, même s'il s'avère que le B₂ Val 7C7 est réellement polymorphe, c'est à spécificité très large, c'est-à-dire qu'il reconnaîtra un épitope partagé par de très nombreux allèles.

Le travail effectué dans le cadre de ce mémoire ne nous a pas permis d'aller jusqu'à l'étude du polymorphisme des molécules BoLA de classe II puisque l'immunoprécipité de cette molécule (première étape) n'a pas pu être mis véritablement au point. Dans le but de vérifier si

aucune amélioration n'aurait pu être obtenue par l'utilisation d'autres anticorps monoclonaux, nous avons ponctuellement employé le L2.06 et le JE.1B5. Mais puisqu'aucun élément encourageant n'a été obtenu durant ces investigations et pour ne pas alourdir ce manuscrit, ces résultats n'ont pas été présentés.

1. PREMIERE PARTIE

1.1. PREMIERE ETAPE : TRANSPOSITION DES CONDITIONS D'IMMUNOPRECIPITATION DES ANTIGNES DE CLASSE I aux antigènes de classe II

1.1.1. Expérience n° 1

Pour débiter la mise au point de l'immunoprécipité des antigènes de classe II bovins à l'aide du B₂ Val 7C7, nous avons reproduit des conditions utilisées pour l'immunoprécipitation des antigènes de classe I bovins à l'aide de l'anticorps monoclonal Thy 1 11B₂.

Le déroulement des tests est décrit en détail dans la fiche technique n° 1.

En bref, des cellules mononuclées du sang périphérique de bovin sont marquées métaboliquement pendant 4 heures par incorporation de méthionine S³⁵. Après une lyse en tampon de lyse NP40 et une étape de "preclearing", un aliquot du lysat cellulaire est immunoprécipité par addition d'ascite B₂ Val 7C7 suivie de Staphylococcus aureus utilisé comme immuno-adsorbant.

La seule modification apportée au protocole utilisé dans le cas des antigènes de classe I est l'emploi de lavages moins durs.

Au lieu des lavages durs de la série des tampons immunomix, on fait ici 2 lavages en tampon SAC et un lavage en tampon SAC, 0,1% SDS.

Cette précaution devant limiter le décrochage des antigènes de classe II au cours des lavages. En outre, pour les motifs évoqués en Matériel et méthode, l'élution de l'immunoprécipité se fera en tampon échantillon SDS à 100°C sans β₂ mercaptoéthanol.

FICHE TECHNIQUE N°1

Type de cellules utilisées : cellules mononucléées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S^{35}

- temps d'incubation : 4H00.

- concentration en cellules : $25 \cdot 10^6$ cell./ml.

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP40)							
Matériel utilisé	$5 \cdot 10^6$ DPM							
Préclearing	SAC 30', 4°							
1er AC -vol. -nature -tps/T°	10ul 11B ₂ ascite 1H, 4°	10ul 7C7 ascite 1H, 4°						
2e AC -vol. -nature -tps/T°	/							
Immuno- absorbant -nature -tps/T°	SAC 15', 4°							
Lavages	Série des tampons SAC							
Elution	tampon échant. SDS, 100°, P₂ Merc.							
Nbre DPM récupérés								
Nbre DPM mis sur gel								

échant : échantillon
merc : mercaptoéthanol

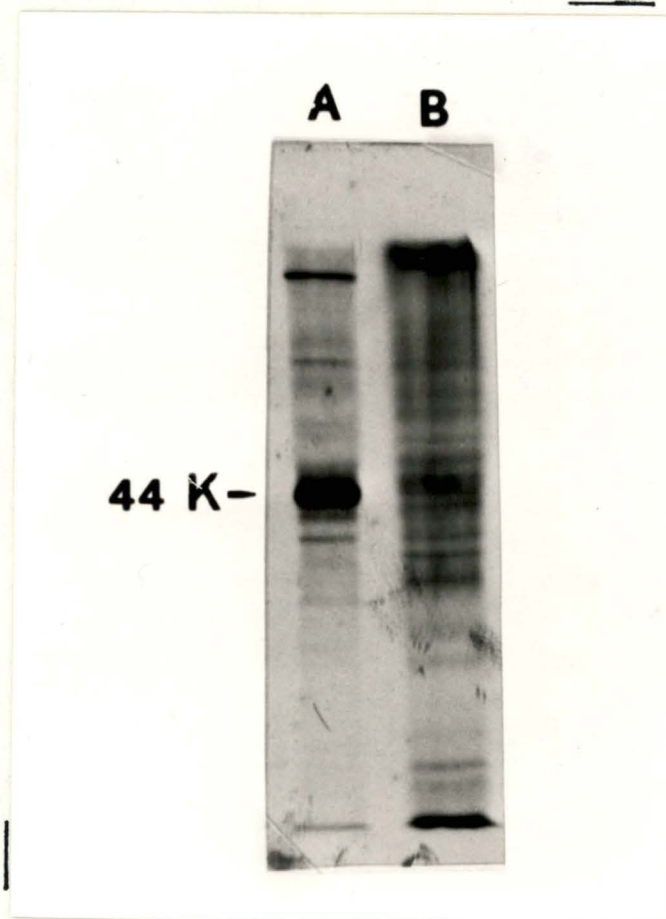


Photo n°1 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12%)
révélés à l'autoradiographie (3 jours d'impression).
La signification des pistes A et B est reprise dans
la fiche technique n°1.
La bande de la piste A notée à 44000 PM représente
les chaînes lourdes des molécules de classe I précipitées
par le Thy 1 11B₂.

a) Résultats

Les résultats sont présentés dans la photo n° 1 (après 3 jours d'impression).

Comme attendu, l'immunoprécipitation de l'antigène de classe I (piste A) donne une bande majoritaire aux environs de 44000 de poids moléculaire en plus de quelques contaminants. Le rapport signal/bruit de fond est bon. Puisque les étalons de poids moléculaire sont absents, c'est en comparant cette piste A avec d'autres immunoprécipités classe I réalisés dans les mêmes conditions en présence d'étalons de poids moléculaire que l'on peut indiquer le poids moléculaire de la chaîne lourde de classe I (44 Kd).

L'analyse de l'immunoprécipité (IP) de l'antigène de classe II (Piste B) montre une série de bandes étalées sur les 2/3 supérieurs du gel sans qu'aucune bande ne se détache réellement des bandes avoisinantes. De plus au sommet du gel, on peut noter une zone fortement marquée ainsi que des trainées verticales issues de cette zone apicale.

b. Discussion

Dans l'immunoprécipité de l'antigène de classe I (Piste A) seule la chaîne lourde après séparation des sous-unités donne un signal visible. La β_2 M normalement associée ne contient pas de méthionine (β_2); elle

restera donc invisible à l'autoradiographie dans les conditions de marquage utilisées ici. Pour rappel, en conditions normales, les IP d'antigènes de classe I sont soumis avant élution à des lavages plus drastiques que ceux utilisés ici, avec pour conséquence une nette réduction des bandes parasites. Dans le cas présent, l'utilisation du tampon SAC n'a pas suffi à éluer les contaminants.

Cette expérience nous montre que si les conditions d'immunoprécipitation semblent au point pour les antigènes de classe I, elles ne paraissent pas transposables aux antigènes de classe II. Il faut néanmoins s'assurer que ces antigènes sont bien exprimés par les cellules de l'animal utilisé.

Etant donné que personne ne peut affirmer que le B₂ Val 7C7 est un anticorps monomorphe ou polymorphe, nous sommes obligés de vérifier à chaque fois si l'animal est reconnu par ce monoclonal. Pour cette première expérience, faute d'avoir vérifié la positivité de l'animal, un doute subsiste quant à l'expression de "l'antigène B₂ Val 7C7" chez celui-ci.

FICHE TECHNIQUE N°2

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : 25.10⁶ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP40)							
Matériel utilisé	5.10 ⁶ DPM							
Préclearing	SAC 30' 4°							
1er AC -vol. -nature -tps/T°	10ul 7C7 ascite 1H, 4°							
2e AC -vol. -nature -tps/T°								
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	SAC 15', 4°							
Lavages	Série des tampons SAC							
Elution	tp éch. SDS, 100° B₂ merc.							
Nbre DPM récupérés	13000 DPM							
Nbre DPM mis sur gel	13000 DPM							

tp : tampon
éch : échantillon
merc : mercaptoéthano?

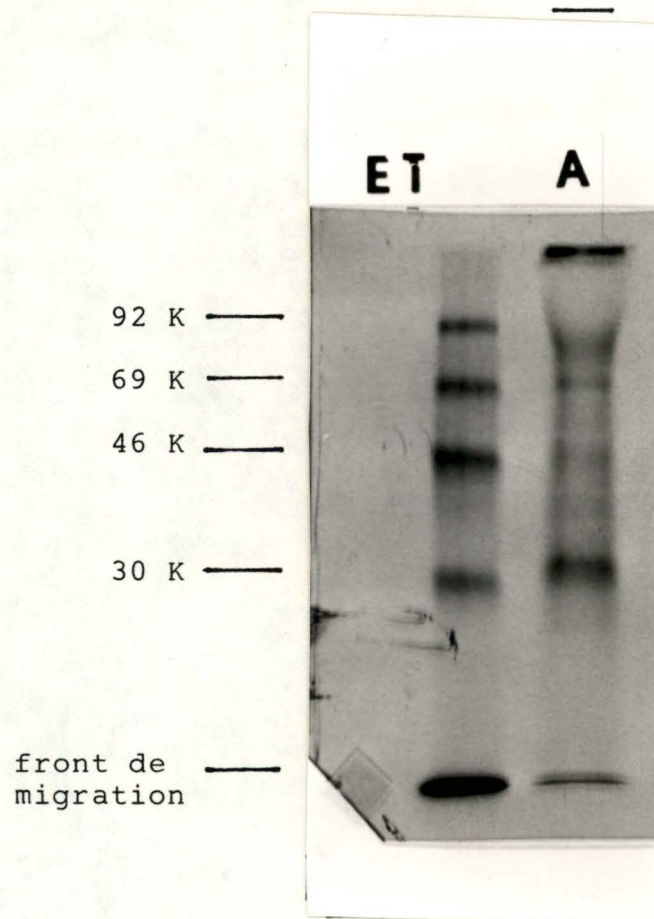


Photo n°2 : Résultat d'IP analysé sur gel SDS-Page (12%)
révélé à l'autoradiographie (9 jours d'impression).
ET : Piste des étalons de poids moléculaire.
La signification de la piste A est donnée dans la fiche
technique n°2.

1.1.2. Expérience n° 2

Nous avons répété le protocole de la première expérience en utilisant les cellules sanguines d'un animal exprimant des antigènes reconnus par le B₂ Val 7C7.

La fiche technique du protocole n° 2 est reprise ci-contre.

a) Résultats

Ces résultats sont présentés dans la photo n° 2.

Plusieurs points sont à noter : d'abord, le bruit de fond est toujours fort élevé; ensuite, pour chaque piste au sommet du gel de séparation, une bande fortement marquée est présente, on la rencontrait déjà au sommet de la piste B de la première expérience.

En outre, un signal se démarque légèrement du bruit de fond aux alentours de 30000 de poids moléculaire.

b) Discussion

La bande bien marquée que l'on observe aux alentours de 30000 de poids moléculaire peut correspondre soit à un contaminant protéique majeur, il se peut aussi que ce soit l'antigène de classe II dont on ne parviendrait pas à distinguer les deux sous-unités

constituantes dans nos conditions d'élution et d'analyse. Rappelons que les chaînes α , β de classe II ont un poids moléculaire relativement proche dont la détermination peut être perturbée par un traitement réducteur à 100°C lors de l'élution (73).

N'ayant pas appliqué ces conditions réductrices, nous pourrions nous attendre à avoir une meilleure résolution des deux sous-unités des antigènes de classe II, qui semblent ici confondue en une bande unique.

Quant au signal important au sommet du gel, soit il s'agit d'un contaminant majeur de haut poids moléculaire, soit c'est un précipité de protéines. Cette deuxième hypothèse est vraisemblable puisqu'on a fortement chargé le gel en protéines et que l'on travaille en conditions non réductrices. En cas de précipité protéique au sommet du gel, la quantité de protéines pénétrant et séparée sur le gel est fortement réduite avec pour conséquence un allongement du temps de détection.

1.1.3. Conclusion

En conclusion, les conditions optimales pour immunoprécipiter des antigènes de classe I bovin à l'aide de Thy 1 11B₂ ne sont pas directement extrapolables pour les antigènes de classe II bovin à l'aide du B₂ Val 7C7. Il faut donc

revoir les conditions pour l'immunoprécipitation de molécules de classe II.

Les questions qui restent posées sont :

1. La bande visible à 30000 de poids moléculaire est-elle un contaminant ou des antigènes de classe II imparfaitement séparés en leurs 2 bandes constitutives ?
2. Quelle est la nature de la zone fortement marquée au sommet du gel ?

FICHE TECHNIQUE N° 3

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : 25.10⁶ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP40)							
Matériel utilisé	5. 10 ⁶ DPM							
Préclearing	SAC 30' 4°							
1er AC -vol. -nature -tps/T°	10 ml 7C7 ascite 1H / 4°							
2e AC -vol. -nature -tps/T°								
Immuno- absorbant -nature -tps/T°	SAC 15' / 4°							
Lavages	Série des tampons SAC							
Elution	1 ^{er} éch. SDS, 20° B ₂ merc	1 ^{er} éch. SDS, 20° B ₂ merc	1 ^{er} éch. SDS, 100° B ₂ merc	1 ^{er} éch. SDS, 100° B ₂ merc				
Nbre DPM récupérés	21.792	22.842	30.360	25.776				
Nbre DPM mis sur gel	21.792	22.842	30.360	25.776				

1^{er} : tampon
éch : échantillon
merc : mercapto éthanol

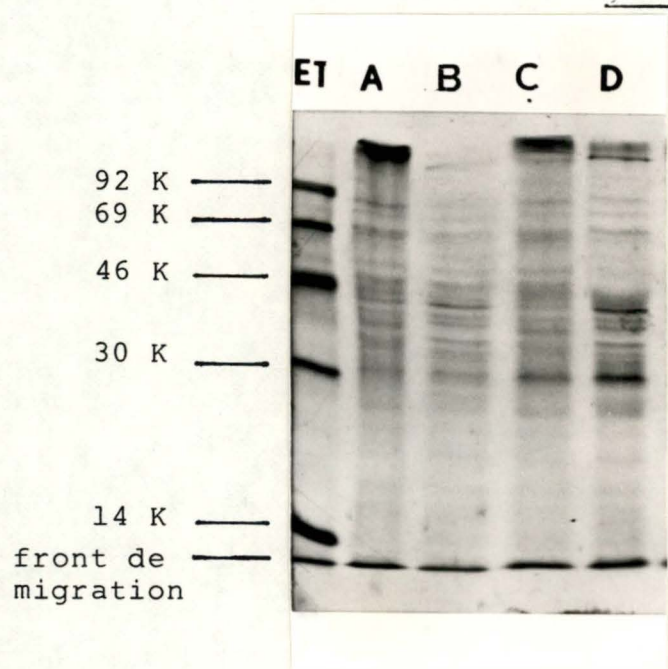


Photo n°3 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12%) révélés par l'autoradiographie (9 jours d'impression
 ET : Piste des étalons de poids moléculaire.
 La signification des pistes A,B,C et D est donnée dans la fiche technique n°3.

1.2. DEUXIEME ETAPE : EFFET DES CONDITIONS D'ELUTION SUR

LA BANDE DE 30000 DE POIDS MOLECULAIRE
ET SUR LA ZONE FORTEMENT MARQUEE DU
SOMMET DU GEL

Nous avons tenté d'analyser le comportement de la zone fortement marquée du sommet du gel et de la bande qui nous intéresse autour de 30000 de poids moléculaire dans différentes conditions d'élutions.

Les conditions d'immunoprécipitation sont précisées dans la fiche technique n° 3.

Le protocole est identique à celui utilisé précédemment sauf que les lavages sont effectués 3 fois en tampon SAC sans SDS. Cette série de lavage est encore moins drastique que ceux utilisés dans la première expérience.

Les diverses modalités d'élution choisies se passeront toutes en présence de SDS, mais se distingueront par le passage ou non à 100°C et par la présence ou non de β_2 mercaptoéthanol.

a) Résultats

Les résultats sont présentés en photo 3.

On note que quel que soit le type d'élution, les contaminants restent nombreux et semblent de même type sur toutes les pistes.

Les 4 pistes présentent un signal distinct aux alentours de 30000. Ce signal est plus particulièrement visible pour les deux élutions avec passage à 100°C. de l'immunoprécipité (piste C et D). Le nombre de DPM récupéré dans ces deux échantillons est d'ailleurs plus élevé.

De plus, on constate qu'à chaque fois que du β_2 mercaptoéthanol est ajouté à l'échantillon (piste B, D), la zone fortement marquée dans la partie supérieure du gel disparaît.

b) Discussion

La zone fortement marquée au sommet des pistes disparaissant en condition réductrice, il semble donc bien que ce signal ne soit pas dû à des protéines de haut poids moléculaires mais à des précipités de protéines au sommet du gel.

Si nous récapitulons : le fait de chauffer à 100°C l'échantillon permet une élution plus efficace (C, D) et le β_2 mercaptoéthanol empêche la précipitation de protéines au sommet des gels de séparation, mais l'utilisation simultanée de ces deux conditions est à éviter pour une meilleure visualisation des sous-unités de la molécule de classe II. En conséquence, chaque fois qu'une grande quantité de matériel sera utilisée dans un immunoprécipité, pour éviter les précipitations de protéines consécutives à un surcharge du gel, nous utiliserons des conditions d'élution réductrice à froid. Par contre, si un faible taux de radioactivité est utilisé dans un immunoprécipité, on chauffera l'échantillon à 100°C dans du tampon échantillon SDS dépourvu de β_2 mercaptoéthanol pour éluer un maximum de matériel.

Au cours de cette expérience, on n'est malheureusement pas parvenu à vérifier que la bande majoritaire proche du poids moléculaire de 30000 est réellement

unique ou bien résulte de la comigration des deux sous-unités de nos antigènes de classe II. Et, étant donné le nombre important de contaminants, il est toujours impossible d'affirmer s'il s'agit de notre molécule de classe II ou non.

FICHE TECHNIQUE N° 4

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : 25.10⁶ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP40)							
Matériel utilisé	5.10 ⁶ DPM							
Préclearing	SAC 30' 4°							
1er AC -vol. -nature -tps/T°	10 µl FC7 ascite 1H/4°							
2e AC -vol. -nature -tps/T°								
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	SAC 15'/4°							
Lavages	series des lavages immunomix							
Elution	th. éch. SDS, 100° B ₂ merc.							
Nbre DPM récupérés	4000							
Nbre DPM mis sur gel	4000							

th = tampon
éch : échantillon
merc : mercaptoéthanol

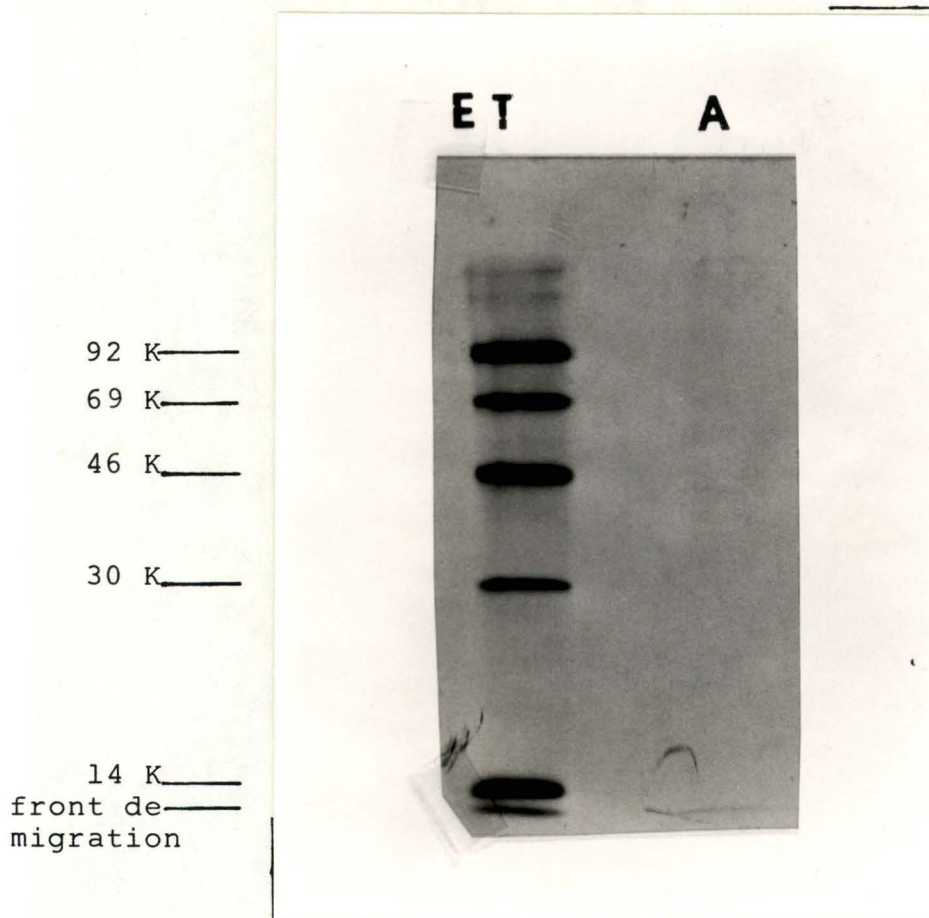


Photo n°4 : Résultat d'IP analysé sur gel SDS-Page (12%)
révélé à l'autoradiographie (10 jours d'impression).

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

La signification de la piste A est donnée dans la fiche
technique n°4.

1.3. TROISIEME ETAPE : ESSAI D'ELIMINATION DES CONTAMINANTS

Plusieurs approches s'offraient à nous. Nous pouvions, soit après immunoprécipitation par des lavages adéquats tenter d'éliminer les protéines non spécifiques résiduelles, soit avant la précipitation, sélectionner une fraction protéique détergent soluble susceptible d'être relativement enrichie en antigènes de classe II, ou en tout état de cause déplétée de nombreux contaminants hydrosolubles.

1.3.1. Utilisation de lavages drastiques

Dans le but de diminuer les fixations non spécifiques, la première mesure envisagée est la modification des conditions de lavage.

Pour ce faire, on a utilisé une série de lavages qui donne d'excellents résultats pour l'immunoprécipitation des antigènes de classe I à l'aide du monoclonal Thy 1 11B₂. Nous avons réalisé la même expérience que celle présentée sur la piste A de la photo n° 2, sinon que les lavages réalisés ici sont ceux de la série des lavages en tampon immunomix. Cette succession de tampons à forte molarité et contenant du SDS devant assurer un maximum d'élimination des protéines contaminantes.

Pour plus de détails sur le protocole suivi, voir la fiche technique n° 4.

a) Résultats

Ces résultats sont présentés dans la photo n° 4.

Après 10 jours de développement, alors que les étalons de poids moléculaire sont nets, ni les antigènes immunoprécipités ni les contaminants ne sont détectables (Piste A).

b) Discussion

Ne pouvant attendre plus longtemps l'arrivée d'un signal, nous devons conclure que ces lavages sont trop drastiques. Nous devons donc envisager une autre méthode pour la suppression des contaminants. Notre choix s'est porté sur la séparation de phase grâce au tampon de lyse au TX 114, tout en utilisant des lavages peu drastiques.

1.3.2.1. Mise au point de la séparation de phase au TX 114

Pour vérifier l'efficacité de cette séparation de phase, nous avons réalisé une électrophorèse en deux dimensions (Ief / SDS- Page).

Des cellules mononucléées marquées métaboliquement à la méthionine S^{35} ont été lysées en tampon de lyse au TX 114. Après séparation de phase, un aliquot de la phase détergente ($0,9 \cdot 10^6$ Dpm) et un aliquot de la phase aqueuse ($1,2 \cdot 10^6$ Dpm) sont précipités à l'acétone, resuspendus en tampon Ief et mis sur les gels de première dimension.

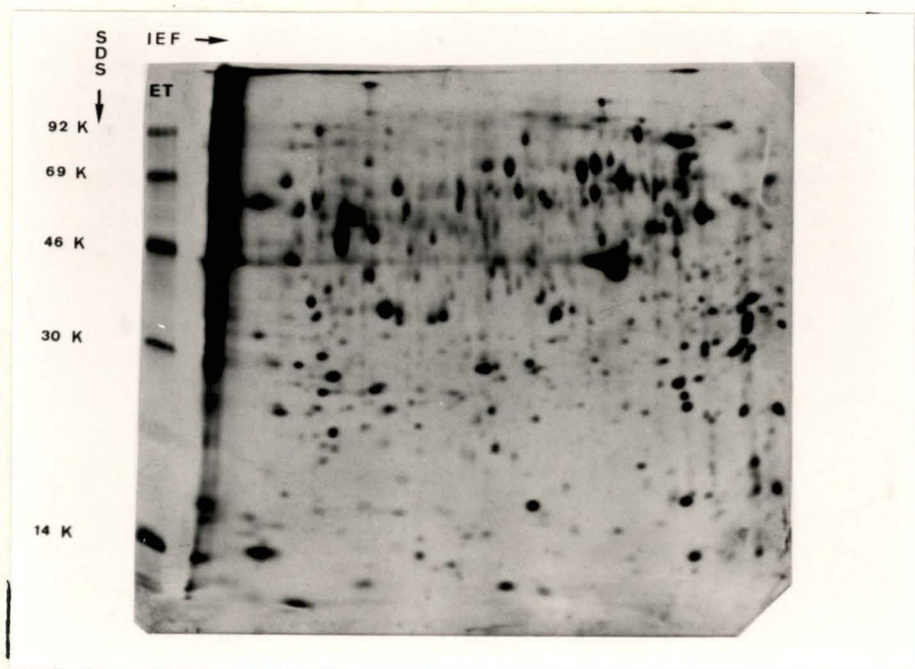


Photo n°5 : Electrophorèse en 2 dimensions (Ief/SDS-Page) de la phase aqueuse ($1,2 \cdot 10^6$ DPM) obtenue après lyse de cellules (marquées à la méthionine S^{35}) à l'aide du tampon de lyse TX114.

La révélation s'est faite par autoradiographie.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

Les sens Ief et SDS-Page sont indiquées par des flèches.

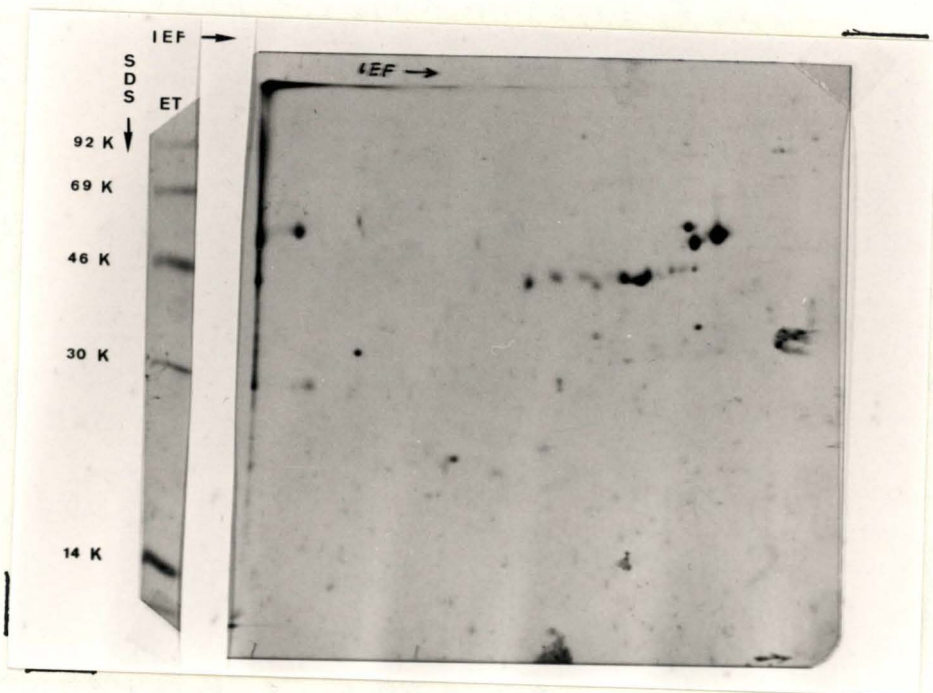


Photo n°6 : Electrophorèse en 2 dimensions (Ief/SDS-Page) de la phase détergente ($0,9 \cdot 10^6$ DPM) obtenue après lyse de cellules (marquées à la méthionine S^{35}) à l'aide du tampon de lyse TX114.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

Les sens Ief et SDS-Page sont indiqués par des flèches.

La révélation s'est faite par autoradiographie.

a) Résultats

Ces résultats sont visibles sur les photos n° 5 et n° 6.

Bien que les temps d'impression ne soient pas identiques, on observe que la radioactivité se répartit en un plus grand nombre de "spots" dans la phase aqueuse (photo n° 5). Malgré le temps plus court d'exposition de l'autoradiographie de la phase détergente (photo n° 6), on n'y retrouve pas les tâches majoritaires détectées dans la phase aqueuse (photo n° 5).

b) Discussion

Au vu des résultats, la séparation des protéines membranaires et des protéines hydrosolubles à l'aide de la technique de séparation au TX 114 semble efficace.

Toutefois, seules les protéines à point isoélectrique acide sont rentrées dans le gel puisqu'il s'agit d'une première dimension réalisée dans un gradient de pH 4-7. Les protéines "basiques" qui ne pénètrent pas dans le gel de première dimension provoquent la longue traînée proche des étalons de poids moléculaire dans le sens SDS-Page. Vu la différence d'intensité des deux traînées dans les deux phases, on peut estimer que malgré le temps de développement plus court, nous aurons également beaucoup moins de protéines du côté basique dans la phase détergente.

FICHE TECHNIQUE N° 5

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S^{35}

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : $25 \cdot 10^6$ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat Total (NP40)	Phase détergente (TX 114)	Phase aqueuse (TX 114)					
Matériel utilisé	$5 \cdot 10^6$ DPM	$2 \cdot 10^6$ DPM	$2 \cdot 10^6$ DPM					
Préclearing	SAC 30', 4°	SAC 30', 4°	SAC 30', 4°					
1er AC -vol. -nature -tps/T°	5ul 7C7 ascite 1H, 4°	15ul 7C7 ascite 1H, 4°	5ul 7C7 ascite 1H, 4°					
2e AC -vol. -nature -tps/T°								
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	SAC 15', 4°	SAC 15', 4°	SAC 15', 4°					
Lavages	lavage en tampon TD							
Elution	tp éch.	SDS β ₂ merc	20°					
Nbre DPM récupérés	16 000	18 000	12 000					
Nbre DPM mis sur gel	16 000	18 000	12 000					

tp : tampon
éch : échantillon
merc : mercaptoéthanol

92 K —
69 K —
46 K —
30 K —
14 K —
front de
migration —

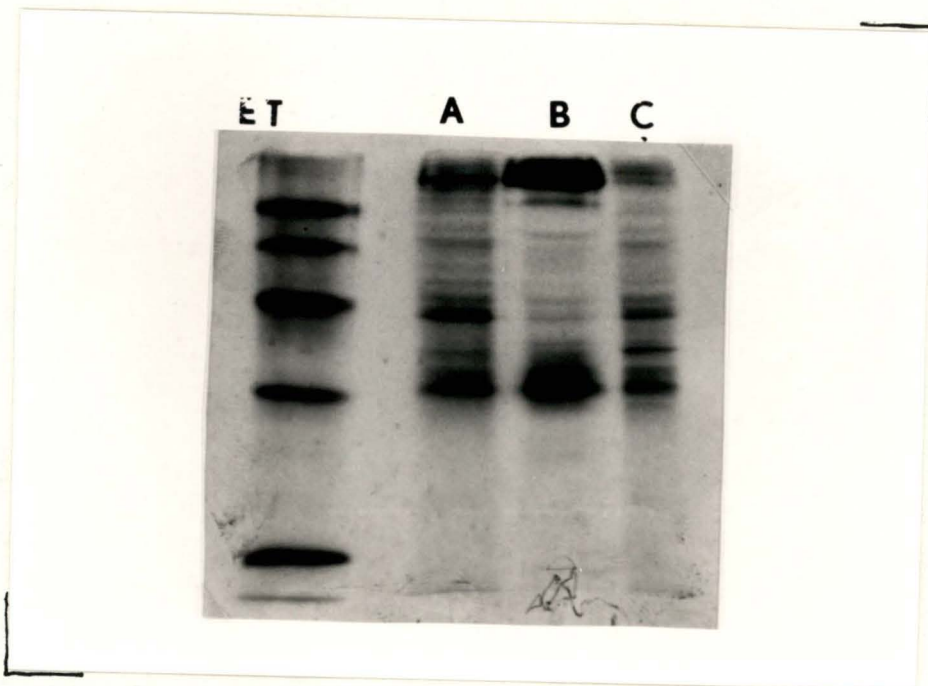


Photo n°7 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12%)
révélés à l'autoradiographie (8 jours d'impression).
ET : Piste des étalons de poids moléculaire.
La signification des pistes A,B,C est donnée dans la
fiche technique n°5.

1.3.2.2. Comparaison d'immunoprécipités réalisés sur une phase détergente et sur un lysat total

Etant donné la bonne séparation des protéines détergentes - solubles et des protéines hydrosolubles grâce à la technique au TX 114, nous avons réalisé des immunoprécipités sur chacune des phases obtenues et sur un lysat total provenant d'une lyse de cellule au NP40 (comme contrôle). Ceci dans le but de voir si l'immunoprécipitation à partir d'une phase détergente réduit le bruit de fond, et comment se comporte dans ces conditions la bande majoritaire d'un poids moléculaire d'environ 30000.

La quantité de matériel utilisée au départ a été augmentée pour tenter de diminuer le temps d'impression à l'autoradiographie.

Les lavages effectués sont empruntés à la technique de préparation des antigènes de classe II sur colonne d'affinité : les lavages en tampon Triéthanolamine pH 8.0, Desoxycolate de Na (lavage TD).

L'éluion a été réalisée en tampon échantillon SDS avec β_2 mercaptoéthanol à température ambiante.

Pour plus de détails sur le protocole suivi, voir la fiche technique n°5.

a) Résultats

Ils sont présentés dans la photo n° 7.

Grosso modo les mêmes bandes contaminantes se retrouvent dans toutes les pistes. Elles sont toutefois atténuées dans l'immunoprécipité réalisé à partir d'une phase détergente (Piste B).

La bande de 30000 de poids moléculaire est très nette dans chacune des pistes. Surtout dans la piste B où le rapport signal / bruit de fond est nettement amélioré.

On ne peut toujours pas discerner une "séparation" de cette bande en deux sous-unités distinctes.

On observe au sommet de la piste de l'immunoprécipité réalisé sur une phase détergente (Piste B) un précipité important.

b) Discussion

Les immunoprécipités réalisés à partir d'une phase détergente et utilisant des lavages "moyens" présentent un bruit de fond nettement diminué (même si celui-ci n'est pas idéal) tout en respectant un signal dont le poids moléculaire avoisine 30000 (Piste B).

Il semble donc que cette bande soit précipitée spécifiquement par le B₂ Val 7C7, d'autant plus que l'on ne la retrouve pas quand on utilise le Thy 1 11B₂ sur le même lysat cellulaire dans les mêmes conditions.

Mais n'ayant pu mettre en évidence dans différentes conditions 2 et non 1 seule bande dont les poids moléculaires sont proches de 30000, on ne peut pas affirmer que cette molécule correspond à nos antigènes de classe II dissociés. Peut être est-ce la chaîne invariante associée qui est parfois coprécipitée avec les antigènes de classe II et qui chez l'homme est très riche en méthionine (29). Ce qui expliquerait la forte intensité de cette bande qui "masque" peut-être les 2 chaînes de l'antigène de classe II d'un poids moléculaire tout proche et moins marquées par la méthionine S³⁵.

DEUXIEME PARTIE

2. DENSITE ANTIGENIQUE DES CELLULES UTILISEES POUR LE MARQUAGE ISOTOPIQUE

Le manque de résultat positif est peut être dû à ce que peu de cellules du sang périphérique présentent l'antigène de classe II (lymphocytes B, monocytes, lymphocytes T activés). Pour tester cette hypothèse il a donc fallu faire un marquage métabolique à partir de cellules présentant une densité plus importante en antigènes de classe II.

2.1. IMMUNOPRECIPITATION A PARTIR DE CELLULES MYELOIDES ETABLIES (R 328 TA 1AD)

Sachant que le B₂ Val 7C7 est utilisé avec succès pour purifier par chromatographie d'affinité des antigènes de classe II bovin (photo n°17), nous avons décidé d'utiliser pour un protocole d'immunoprécipitation le support solide servant à la chromatographie d'affinité à savoir du sépharose 4B couplé avec du B₂ Val 7C7.

De plus, nous avons travaillé à partir de cellules d'une lignée myéloïde bovine établie (R 328 TA 1AD) riche en antigènes de classe II.

Nous testons ainsi si le manque de signal était dû à une pauvreté en antigènes de classe II sur les cellules mononuclées du sang périphérique.

FICHE TECHNIQUE N°6

Type de cellules utilisées : cellules de la lignée myéloïde établie
(R₃³²⁸ TA 1AD)

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : 25.10⁶ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé			Phase détergente (TX 114)		Lysat total (NP 40)			
Matériel utilisé			2,5. 10 ⁶ cellules 1,3. 10 ⁶ DPM		2,5. 10 ⁶ cellules 10. 10 ⁶ DPM			
Préclearing			Sé/r. 4B IgG murine 30', 4°	SAC 30', 4°	Sé/r. 4B IgG murine 30', 4°	SAC 30', 4°		
1er AC -vol. -nature -tps/T°			100ul sé/r. 4B 7C7 1H, 4°	5ul 7C7 ascite 1H, 4°	100ul sé/r. 4B 7C7 1H, 4°	5ul 7C7 ascite 1H, 4°		
2e AC -vol. -nature -tps/T°			/	/	/	/		
Immuno- absorbant -nature -tps/T°			/	SAC 15', 4°	/	SAC 15', 4°		
Lavages			Série de lavages en tampon TD					
Elution			tampon TDN	tp éch SDS 20° β ₂ merc	tampon TDN	tp éch SDS 20° β ₂ merc		
Nbre DPM récupérés			2500	8000	1800	12000		
Nbre DPM mis sur gel			2500	8000	1800	12000		

sé/r : sépharose
 tp : tampon
 éch : échantillon
 merc : mercaptoéthanol

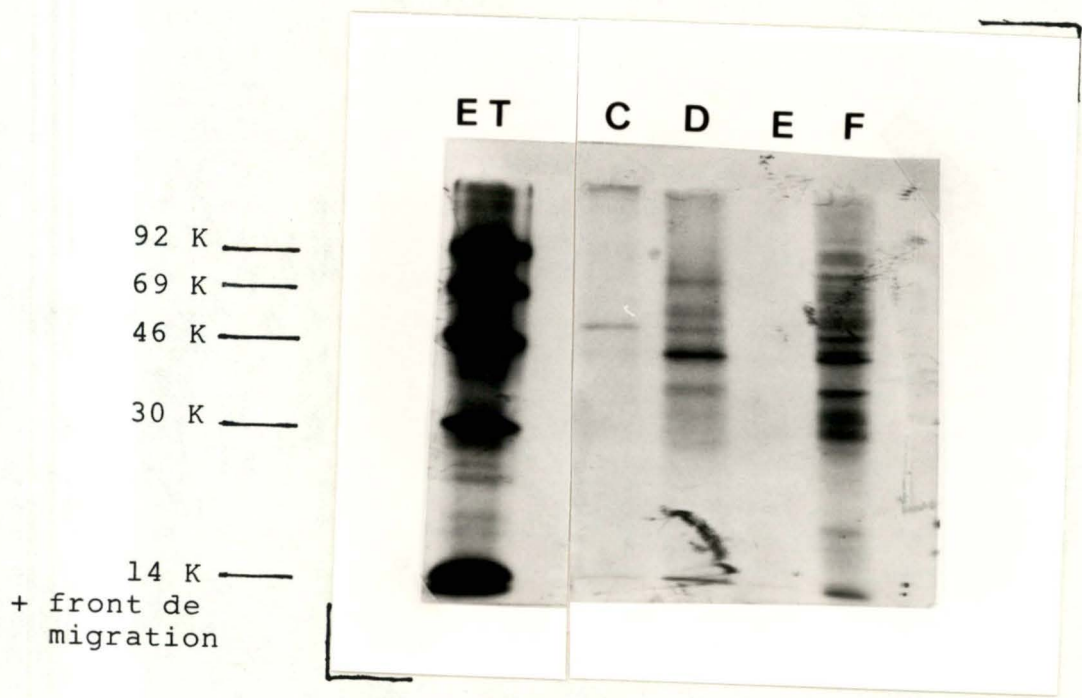


Photo n°8 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12%) révélés à l'autoradiographie (9 jours d'impression).
 ET : Piste des étalons de poids moléculaire.
 La signification des pistes C,D,E et F est donnée dans la fiche technique n°6.

Les détails du protocole sont dans la fiche technique n° 6.

En bref : Des cellules de la lignée myéloïde ont été marquées à la méthionine S^{35} . Nous comparons des immunoprécipités réalisés à partir d'un lysate total et ceux faits au départ d'une phase détergente dans le but de continuer la prospection de cette voie d'élimination des contaminants.

Une moitié de chaque lysat est utilisée pour faire l'immunoprécipité à l'aide du sepharose 4B - B₂ Val 7C7, une autre moitié est utilisée dans une séquence d'immunoprécipitation classique utilisant le SAC comme support solide. Pour les immunoprécipités réalisés à l'aide de sépharose 4B - B₂ Val 7C7, le "preclearing" a été réalisé à l'aide de sépharose 4B couplé à des immunoglobulines de souris. Ces mêmes immunoprécipités ont été élués à l'aide de tampon TDN utilisé comme tel pour la purification par chromatographie d'affinité. Dans ce dernier cas, l'éluat n'étant pas préparé pour l'électrophorèse SDS-Page, il faut précipiter les protéines à l'acétone avant de les remettre en suspension dans du tampon échantillon SDS avec β_2 mercaptoéthanol.

Pour mieux comparer les résultats d'immunoprécipitation obtenus à partir de la phase détergente à ceux obtenus à partir d'un lysat total, nous ne sommes pas partis d'un nombre de DPM déterminé mais d'un nombre identique de cellules lysées qui ont été marquées dans les mêmes conditions.

a) Résultats

Les résultats sont présentés dans la photo n° 8.

Alors que le temps de révélation est déjà long (voir surimpression des étalons de poids moléculaire), on observe que les immunoprécipités réalisés à l'aide du sépharose 4B couplé au B₂ Val 7C7 (Piste C et E) ne présentent encore aucun signal.

On note par contre, que l'immunoprécipité réalisé selon une séquence classique utilisant le SAC comme immunoabsorbant, à partir d'un lysat total (Piste F) présente entre autres deux bandes ayant un poids moléculaire qui correspond à celui des deux sous-

unités des antigènes de classe II. Malheureusement, de nombreux contaminants sont encore présents dans cette piste. L'immunoprécipité réalisé classiquement aussi mais au départ d'une phase détergente (Piste D) présente moins de bruit de fond, mais l'intensité des 2 bandes qui nous intéressent diminue aussi fortement.

b) Discussion

La très faible efficacité des immunoprécipités réalisés à partir du sépharose 4B - B₂ Val 7C7 doit être due au moins en partie au mode d'élution. Comme nous le montrerons plus tard, l'efficacité de celui-ci semble faible alors qu'en chromatographie d'affinité, il donne d'excellents résultats. De plus, sans que nous puissions expliquer pourquoi, nous avons perdu une grande quantité de radioactivité au cours de l'étape de précipitation à l'acétone nécessaire à la préparation des échantillons pour l'électrophorèse SDS- Page.

Ce résultat intéressant a été obtenu sur un immunoprécipité réalisé classiquement à partir d'un lysat total. Il montre encore de nombreux contaminants, mais aussi deux molécules qui présentent le profil des deux chaînes séparées des antigènes d'histocompatibilité de classe II. Si l'on fait préalablement à l'immunoprécipité une séparation des protéines détergents - solubles de celles qui ne le sont pas, on diminue le nombre de contaminants mais l'intensité des deux bandes marquées proches de 30000 de poids moléculaire faiblit aussi.

Comme il n'y a pas de raison que l'immunoprécipité soit moins efficient dans la phase détergente (la portion détergent soluble est resuspendue en tampon de lyse NP40), il faut en conclure que cette phase détergente contient moins d'antigènes de classe II. Une telle perte sélective de molécules de classe II a été décrite par ailleurs (85).

Si on parvenait à éliminer les contaminants par lavage, il serait donc beaucoup plus intéressant de partir d'un lysat total plutôt que d'une phase détergente.

La présence de nombreux contaminants dans l'immunoprécipité réalisé à partir d'un lysat total (Piste F) peut s'expliquer en partie par le comportement particulier des protéines de ces cellules. En effet, il est généralement admis sur base d'observations empiriques que les protéines des lignées de cellules transformées sont "collantes".

Nous sommes donc parvenus à un résultat relativement positif : l'obtention de deux bandes de poids moléculaire proche de 30000 entourées de nombreux contaminants protéiques de tailles variables.

Mais cet immunoprécipité a été réalisé à partir d'une suspension cellulaire présentant les antigènes de classe II en grande quantité et non à partir des cellules mononuclées du sang périphérique. Or, dans le but de passer au typage de routine des bovins, c'est sur ces dernières cellules que la mise au point doit être réalisée. Nous devons reprendre sur ces cellules cette mise au point tout en essayant de résoudre les problèmes de contamination.

FICHE TECHNIQUE N° 7

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique stimulées à la PHA

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 14-16H (avec PHA)

- concentration en cellules : $10 \cdot 10^6$ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP 40)		Phase détergente (TX 44)					
Matériel utilisé	5.10 ⁶ cellules 100.10 ⁶ DPM		5.10 ⁶ cellules 8.10 ⁶ DPM					
Préclearing	SAC 30' / 4°							
1er AC -vol. -nature -tps/T°	20 ul FC7 ascite 1H / 4°		15 ul FC7 ascite 1H / 4°					
2e AC -vol. -nature -tps/T°								
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	SAC 15' / 4°							
Lavages	lavage en temp. net	lavage en temp. TD	lavage en temp. net	lavage en temp. TD				
Elution	tampon 20°		échantillon B2 merc		SDS			
Nbre DPM récupérés	210000	115000	22000	40000				
Nbre DPM mis sur gel	210000	115000	22000	40000				

tamp : tampon
merc : mercapto éthanol

92 K —
69 K —
46 K —

30 K —

14 K —
front de
migration —

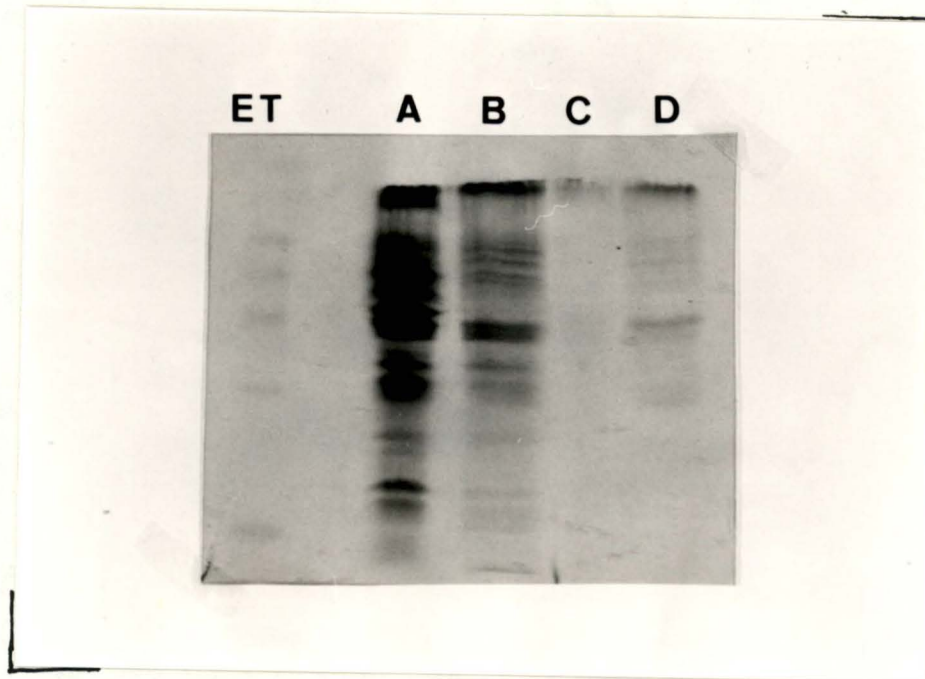


Photo n°9 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12%)
révélés à l'autoradiographie (1 jour d'impression).
ET : Piste des étalons de poids moléculaire.
La signification des pistes A,B,C,D est donnée dans
la fiche technique n°7.

2.2. IMMUNOPRECIPITATION A PARTIR DE CELLULES MONONUCLEES DU SANG PERIPHERIQUE STIMULEES A LA PHA

Puisque nous avons obtenu un immunoprécipité intéressant sur des cellules d'une lignée riche en antigènes de classe II, nous avons provoqué l'augmentation de l'expression de ces molécules de classe II sur des cellules mononuclées du sang périphérique en les stimulant à la PHA.

Les détails de protocole sont présentés dans la fiche technique n° 7.

L'incorporation de la méthionine S^{35} dans les cellules stimulées s'est faite pendant un temps d'incubation de 14-16 heures en présence de PHA. Une augmentation du temps d'incubation en présence de l'isotope radioactif peut se justifier dans le cas d'un éventuel turn-over lent des molécules de classe II qui, de ce fait, ne seraient pas marquées en suffisance lors d'une incubation courte. Cette modification du temps d'incubation constitue plus une sécurité qu'une nécessité, en effet, de nombreux IP d'antigènes de classe II humains, murins, ovins et même bovins ont été réalisés à partir d'une incorporation de l'acide aminé radioactif pendant 4 heures. Néanmoins, nous avons suivi ici la technique décrite par C. Cotinot (83).

Après marquage, les cellules ont été lysées pour une partie en tampon de lyse NP40, par une autre en tampon de lyse TX114 suivi de l'étape de séparation des phases détergentes et aqueuses.

Vu la quantité importante de matériel mis dans l'immunoprécipité, un plus grand volume d'ascite sera utilisé.

On compare l'efficacité de deux lavages : les lavages en tampon Net (lavages doux) et les lavages en tampon TD (lavages moyens).

L'élution a été réalisée à température ambiante à l'aide de tampon échantillon SDS et de tampon "5 x concentré" avec β_2 mercaptoéthanol.

a) Résultats

Les résultats sont présentés dans la photo n° 9.

Le nombre de DPM mis sur le gel est certainement exagéré, les contaminants sont en général déjà bien visibles alors que les étalons de poids moléculaire sont à peine décelables. De plus, alors que les pistes A et B sont bien nettes, les pistes C et D ne présentent pas encore de signal significatif.

La première chose qui frappe, à l'observation de cette image, c'est la contamination importante dans les pistes A et B. Les pistes C et D présentent un plus faible bruit de fond.

On observe dans les pistes A et B un double signal autour de 30000 de poids moléculaire qui correspondrait à des molécules de classe II. La séparation entre les deux bandes est ici moins nette (voir flèche). Pour un temps d'impression du fil d'autoradiographie plus long, on observe les mêmes bandes dans les pistes C et D (résultats non présentés).

On note également que le lavage en tampon TD limite le bruit de fond lorsque l'on compare les pistes A et B. Une perte accidentelle de matériel au cours de l'éluion de l'échantillon nous empêche de faire la même comparaison entre les pistes C et D.

Le rapport signal/bruit de fond est très faible dans les pistes A et B, il l'est moins dans les pistes C et D mais cette amélioration n'est pas très importante puisqu'il semble qu'on perd beaucoup du signal à 30000 de poids moléculaire dans les IP réalisés à partir d'une phase détergente.

b) Discussion

La stimulation à la PHA renforce le double signal autour de 30000 de poids moléculaire, mais le bruit de fond est augmenté d'autant. Ceci peut s'expliquer de la manière suivante : la PHA est un stimulateur blastogénique non spécifique stimulant directement les cellules T et de manière indirecte, les cellules B. Si on augmente, par cette méthode, la quantité de molécules de classe II marquées, beaucoup d'autres protéines seront aussi stimulées dans leur synthèse (66). Ces dernières protéines sont susceptibles de devenir autant de contaminants. Une preuve de ce que la PHA augmente la synthèse de nombreuses protéines est que l'incorporation de l'acide aminé radiomarké est nettement augmenté : $5 \cdot 10^6$ cellules non stimulées à la PHA donne un lysat contenant entre 4 et $8 \cdot 10^6$ DPM, alors qu'un lysat provenant de $5 \cdot 10^6$ cellules stimulées à la PHA dans nos conditions contient environ $100 \cdot 10^6$ DPM.

Cette grande quantité de contaminants ne nous permet pas d'affirmer avec certitude que les molécules se trouvant aux alentours de 30000 de poids moléculaire soient les sous-unités constitutives des molécules de classe II.

Puisque ni des lavages plus drastiques, ni la séparation de phase précèdent l'immunoprécipitation ne résoud pas de manière satisfaisante le problème de bruit de fond, nous devons abandonner ces voies et en prospecter de nouvelles.

TROISIEME PARTIE

3. ELIMINATION DES CONTAMINANTS

3.1. CHOIX DU SUPPORT SOLIDE ET DE LA QUANTITE DE MATERIEL AU DEPART DE L'IMMUNOPRECIPITE

Jusqu'ici, nous avons été confrontés à d'importants problèmes de contaminations, auxquels nous n'avons pu trouver de solutions satisfaisantes. Il nous faut donc explorer de nouveaux moyens : la quantité de matériel radioactif utilisé par IP peut être réduite, l'immunoadsorbant peut être traité de manière particulière ou on peut en changer, enfin la nature de la suspension d'anticorps peut être modifiée.

A propos de l'immunoadsorbant, le SAC est constitué de bactéries totales qui comportent à leur surface de nombreuses structures susceptibles d'adsorber les protéines marquées du lysat cellulaire. On peut limiter ces adsorptions non spécifiques, principalement de type électrostatique (87) en lavant ces bactéries de manière drastique. On peut aussi éviter l'utilisation du SAC et prendre alors comme immunoadsorbant du sépharose 4B couplé à de la protéine A.

En ce qui concerne la nature de la solution d'anticorps utilisée, les ascites contenant des contaminants

Glycoproteins	Thymocytes	Peripheral lymphocytes		
		Helper T	Cytotoxic T	B
Ig	—	—	—	7×10^4
Class I	—†	2×10^5	2×10^5	2×10^5
Class II	—	—	—	2.4×10^5
Thy-1	10^{6*}	—	—	—
L-CA	7×10^4	10^5	10^5	10^5
LSGP	10^5	1.5×10^5	1.5×10^5	—
Pan T (Ly-1)	2×10^4	5×10^4	5×10^4	—
T _{helper} gp	$1.5 \times 10^{4*}$	3×10^4	—	—
T _{cyto/suppr} gp	4×10^4	—	10^5	—
MRC OX-2	2×10^4	—	—	5×10^3

Tableau 3 : estimation de la densité de différentes glycoprotéines à la surface des lymphocytes.

D'après Williams et al. (86)

protéiques de diverses natures, des agrégations de protéines suivies d'adsorptions non spécifiques peuvent se produire. On peut pallier cet inconvénient en utilisant des anticorps purifiés.

Jusqu'à présent, au départ d'un IP, nous utilisons souvent une quantité de lysat correspondant à $5 \cdot 10^6$ cellules marquées. On peut penser raisonnablement diminuer la quantité de matériel radioactif à partir duquel l'IP est réalisé, ce qui permettrait de réduire le bruit de fond tout en ayant suffisamment de molécules de classe II. En effet, un bon IP d'antigènes de classe I à l'aide du Thy 1 11B₂ est réalisé à partir d'un lysat cellulaire contenant $1 \cdot 10^6$ DPM. Or, si près de 100 % des cellules mononuclées du sang périphérique portent des antigènes de classe I, entre 40 et 50 % de ces cellules présentent des antigènes de classe II reconnus par le B₂ Val 7C7 (Résultats non présentés). De plus, en général, les cellules du sang périphérique (chez l'homme) portent autant de molécules de classe II que des molécules de classe I (tableau n° 3) (86).

On peut donc penser qu'en utilisant un lysat cellulaire contenant entre 3 et $5 \cdot 10^6$ DPM, on aura assez de molécules de classe II pour réaliser un immunoprécipité avec le B₂ Val 7C7.

Pour vérifier ces différentes hypothèses, nous avons fait des IP à partir d'un lysat total de cellules marquées à la méthionine S^{35} . L'incubation a été réalisée 14-16 heures en présence du précurseur radioactif. Le SAC utilisé comme immuno-adsorbant a été lavé selon la procédure décrite par BRL : laver une fois dans du tampon PB5, 3 % SDS, 10 % β_2 mercaptoéthanol chauffé à 95°C pendant 30 minutes (Dr Mainferme, communication personnelle). Ensuite, la série de lavage classique en tampon SAC est utilisée. On

FICHE TECHNIQUE N° 8

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 14-16H

- concentration en cellules : $10 \cdot 10^6$ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP 40)							
Matériel utilisé	$10 \cdot 10^6$ DPM	$5 \cdot 10^6$ DPM	$2.5 \cdot 10^6$ DPM	$5 \cdot 10^6$ DPM				
Préclearing	SAC lavé drastiquement 30', 4°			Séph. Prot. A. 30', 4°				
1er AC -vol. -nature -tps/T°	25ul (0,87 mg/ml) 7C7 purifié 1H, 4°							
2e AC -vol. -nature -tps/T°								
Immuno- absorbant -nature -tps/T°	SAC lavé drastiquement 15' / 4°			Séph. Prot. A. 30' / 4°				
Lavages	Série des tampons TD							
Elution	T _h éch SDS 20° β ₂ merc.							
Nbre DPM récupérés	90000	45000	20000	6500				
Nbre DPM mis sur gel	29600	25000	20000	6500				

séph = sépharose
 prot = protéine
 T_h = tampon
 éch = échantillon
 merc = mercaptoéthanol

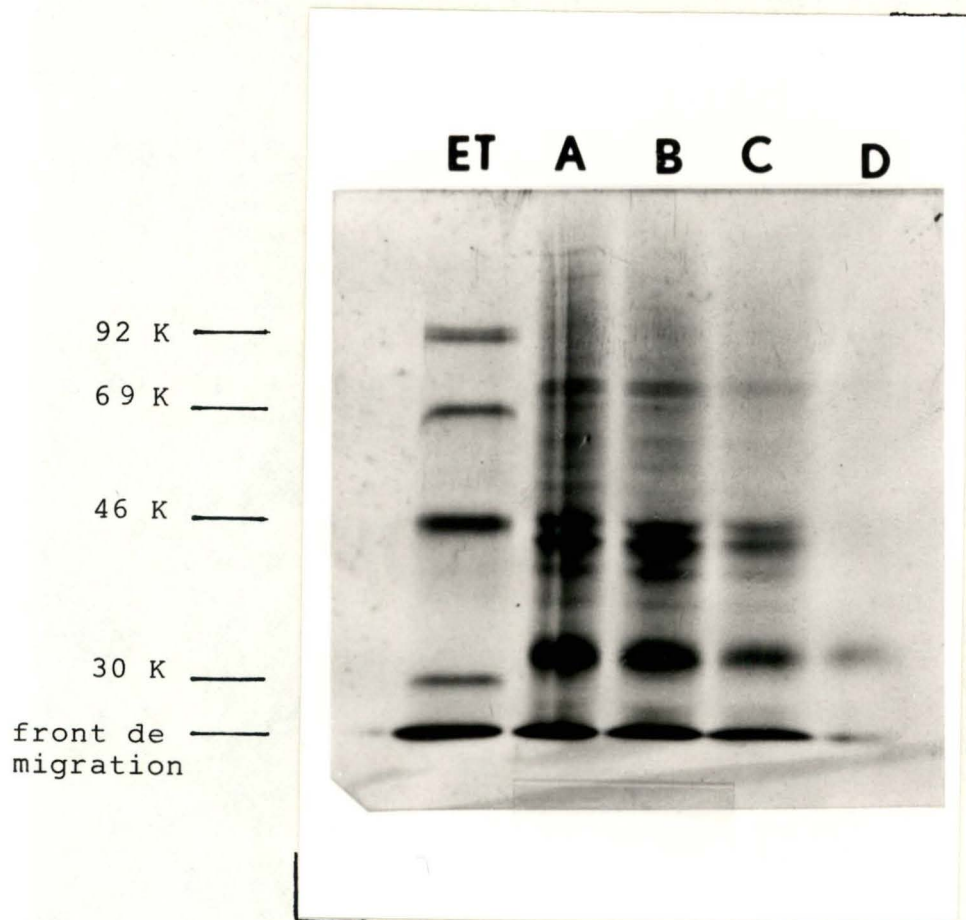


Photo n°10 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (10%) révélés à l'autoradiographie (4 jours d'impression)
La signification des pistes A,B,C et D est reprise dans la fiche technique n°8.
ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

utilisera des quantités décroissantes de matériels radioactifs en conjonction avec le SAC lavé. On essayera aussi le sépharose 4B - protéine A.

Pour tous ces essais, 25 μ l de B₂ Val 7C7 purifié (0,87 mg de protéines / ml de solution) seront employés. Les lavages se font en tampon TD et l'élu^{tion} est effectuée en tampon échantillon SDS avec B₂ mercaptoéthanol à température ambiante.

Plus de détails à propos du protocole suivi seront trouvés dans la fiche technique n°8.

a) Résultats

Les résultats sont présentés dans la photo n° 10.

En admettant que la bande située aux alentours de 30000 de poids moléculaire représente des molécules de classe II, le rapport signal / bruit de fond est nettement amélioré lorsque le support de la protéine A est du sépharose 4B (Piste D)

(Comparez ce résultat à ceux obtenus en utilisant le SAC comme immunoadsorbant (Pistes A, B et C)). De plus, les diminutions de la quantité de matériel radioactif de départ des IP réduit le bruit de fond tout en maintenant un signal suffisant. Ce signal d'un poids moléculaire légèrement supérieur à 30000 est unique.

La deuxième bande attendue sous la première n'est pas visible dans la zone de séparation des protéines de notre gel. On note aussi que le front de migration est très marqué.

b) Discussion

La présence d'un signal unique et non double aux environs de 30000 de poids moléculaire peut

s'expliquer de plusieurs manières :

- soit il s'agit d'un contaminant n'ayant rien de commun avec l'antigène de classe II. C'est peu probable parce qu'alors, où serait passée cette molécule de classe II déjà précipitée spécifiquement préalablement.
- soit il s'agit des deux sous-unités des antigènes de classe II qui pour une raison inconnue n'auraient pu être séparées en fonction de leurs tailles sur notre gel SDS - Page et ainsi être discriminées.
- soit il s'agit des chaînes lourdes (α) des molécules de classe II qui seules sont distinguées dans ce gel 10 %. La chaîne légère (β) se trouvant alors dans le front de migration.

Au vu des résultats, on peut conclure que pour éliminer une majorité de contaminants, on a intérêt à utiliser comme immuno-adsorbant du sépharose 4B - protéine A et à faire l'IP à partir d'une quantité de lysat correspondant à un nombre de DPM plus limité. Dorénavant, nous emploierons aussi du B₂ Val 7C7 purifié toujours dans le but de diminuer les phénomènes d'adsorptions non spécifiques sources de contaminations.

FICHE TECHNIQUE N° 9

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 14-16H

- concentration en cellules : $10 \cdot 10^6$ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Phase détergente (TX 114)		Lysat total (NP 40)					
Matériel utilisé	$0,5 \cdot 10^6$ DPM		$3 \cdot 10^6$ DPM					
Préclearing	sépharose protéine A 30' / 4°		sépharose protéine A 30' / 4°					
1er AC -vol. -nature -tps/T°	25 ul (0,87mg/ml) 7C7 purifié 1h / 4°		25 ul (0,87mg/ml) 7C7 purifié 1h / 4°					
2e AC -vol. -nature -tps/T°								
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	sépharose prot. A 15' / 4°		sépharose protéine A 15' / 4°					
Lavages	Série des tampons TD		Série des tampons TD					
Elution	1h éch. 50% 100° merc		élution à "l'acide"	1h éch. 50% 100° merc				
Nbre DPM récupérés	900		3000	5000				
Nbre DPM mis sur gel	900		3000	5000				

prot. : protéine
 tp : tampon
 éch : échantillon
 merc : mercaptoéthanol

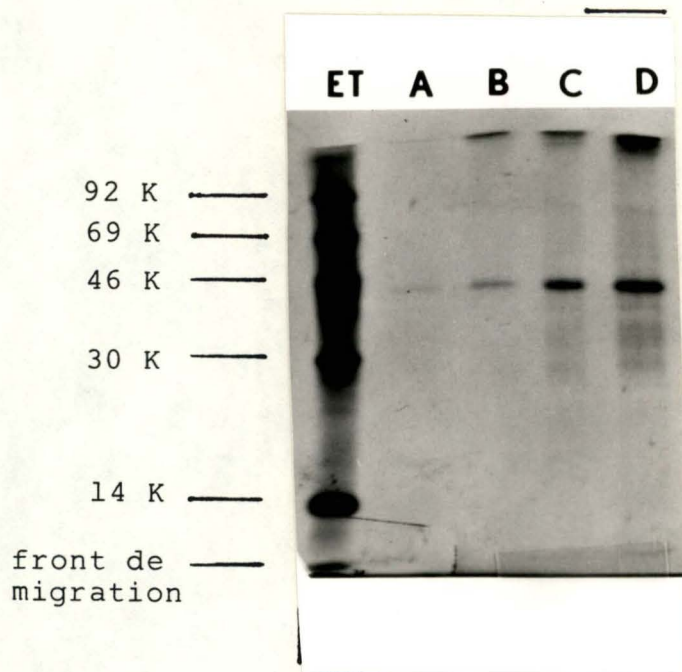


Photo n°11 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12%) révélés à l'autoradiographie (10 jours d'impression)
 La signification des pistes A,C et D est donnée dans la fiche technique n°9.
 ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

3.2. APPLICATION DU PROTOCOLE CHOISI A DEUX TYPES DE LYSATS ET DEUX TYPES D'ELUTIONS

Le détail du protocole des IP est présenté dans la
fiche technique n° 9.

Tirant les enseignements de l'expérience précédente,
nous avons réalisé, à partir du même type de cellules
marquées à la méthionine S³⁵, des IP sur des lysats
totaux et à titre indicatif sur une phase détergente.

La phase solide utilisée pour le preclearing et la précipitation est du sépharose 4B - protéine A.

Vu le peu de DPM utilisé au départ de chaque IP, nous avons
utilisé une élution en tampon échantillon SDS sans β_2
mercaptoéthanol, chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Nous
avons également testé en parallèle un autre type d'élution :
le clivage à l'acide afin de vérifier son efficacité sur
la dissociation du complexe précipitant et sur la sépara-
tion en électrophorèse des deux chaînes de la molécule de
classe II.

a) Résultats

Les résultats sont présentés sur la photo n° 11.

On note un faible précipité de matériel radioactif
au sommet de chacune des pistes, et il est plus
intense à chaque fois que le nombre de DPM dans les
éluats déposés sur le gel augmente.

Chaque piste présente aussi un contaminant majeur
unique proche de 45000 de poids moléculaire. Celui-
ci est plus intense si l'immunoprécipité est réa-
lisé à partir d'un lysat total (Pistes C et D).

Deux bandes autour de 30000 de poids moléculaire
assez diffuses apparaissent dans les pistes C et D.

Ce signal est faible dans les pistes C et D mais est pratiquement inexistant dans la piste A.

b) Discussion

Le précipité au sommet de chaque piste est dû à l'utilisation de conditions non réductrices dans la préparation de l'échantillon au gel SDS - Page.

Le contaminant d'un poids moléculaire proche de 45000 déjà rencontré ailleurs (photos n° 2,7,8,9) pourrait être l'actine souvent décrite dans des IP réalisés dans des conditions semblables (26,62).

L'IP réalisé à partir d'une phase détergente (Piste A) nous amène aux mêmes conclusions que précédemment : si l'étape de séparation de phase permet d'éliminer fortement les contaminants, on perd aussi énormément du signal autour de 30000 de poids moléculaire.

Les immunoprécipités réalisés à partir d'un lysat total par contre donne un signal qui ressemble à celui attendu pour les deux chaînes des antigènes de classe II (Pistes C et D). Ce signal est faible en comparaison à celui présenté par les contaminants de 45000 PM.

L'emploi d'une technique "à l'acide" n'apporte aucune amélioration ni en ce qui concerne l'élution, ni en ce qui concerne la séparation des sous-unités α et β lors de l'électrophorèse.

3.3. CONCLUSION PARTIELLE

Le problème des adsorptions non spécifiques a été en grande partie résolu puisque malgré le temps très long d'impression du film (voir intensité des étalons), il ne reste qu'un contaminant majeur (45000 PM). Ce résultat permettrait d'envisager l'étude du polymorphisme des produits de classe II en gel d'électrophorèse en deux dimensions : Ief / SDS- Page, à condition d'amplifier le signal spécifique des produits de classe II.

Le principal problème auquel nous devons maintenant nous atteler, est de découvrir pourquoi si peu de molécules de classe II marquées sont obtenues en fin d'IP. Le signal qu'elles émettent est si faible, qu'il n'est pas exploitable en Ief.

A quoi pourrait-on attribuer le manque de signal ?

- A une mauvaise efficacité du marquage ?
- A une perte au cours du preclearing ?
- A un mauvais captage de l'antigène par notre anticorps ?
- A une mauvaise fixation du monoclonal sur la protéine A insoluble ?

QUATRIEME PARTIE

4. DETERMINATION DE LA CAUSE DE LA FAIBLESSE DU SIGNAL PRESENTEE PAR DES ANTIGENES DE CLASSE II BOVINS

" De la considération des obstacles
vient l'échec,
de la considération des moyens
vient la réussite."

Pantcha - Tantra.

Nous tenterons au cours de cette partie de répondre aux interrogations posées en fin du chapitre précédent.

4.1. FIXATION DU B₂ Val 7C7 SUR LA PROTEINE A : EMPLOI D'UNE PROCEDURE INDIRECTE

En tout état de cause, le monoclonal fixe normalement de manière efficiente la protéine A. En effet, cette dernière a été utilisée après couplage à de l'or colloïdal comme traceur des molécules de classe II détectée par le B₂ Val 7C7 en microscope électronique (39).

Cependant, une technique n'étant pas l'autre, il se peut que l'emploi d'un second anticorps (RAM) améliore l'efficacité de l'IP par la protéine A.

FICHE TECHNIQUE N° 10

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : 25.10⁶ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Phase détergente (TX 114)		Lysat total (NP 40)					
Matériel utilisé	0,5. 10 ⁶ DPM		3. 10 ⁶ DPM					
Préclearing	seph. Prot. A		seph. Prot. A					
1er AC -vol. -nature -tps/T°	25 ul 0,87 mg/ml FC7 purifié 1H, 4°		25 ul 0,87 mg/ml FC7 purifié 1H, 4°					
2e AC -vol. -nature -tps/T°	100 ul 0,33 mg/ml RAM 14H, 4°		100 ul 0,33 mg/ml RAM 14H, 4°					
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	seph. Prot. A 15'/4°		seph. Prot. A 15'/4°					
Lavages	Série des lavages TD		Série des lavages TD					
Elution	tp éch. SDS 100° B ₂ merc		tp éch. SDS 100° B ₂ merc					
Nbre DPM récupérés	6000		7.400					
Nbre DPM mis sur gel	6000		7400					

seph : sépharose
prot : protéine
tp : tampon
éch : échantillon
merc : mercaptoéthanol

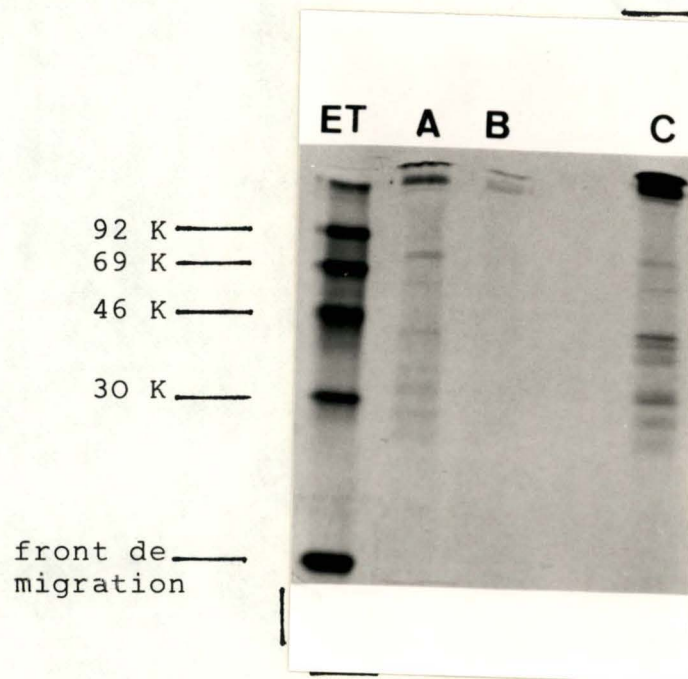


Photo n°12 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12% révélés à l'autoradiographie (10 jours d'impression).

La signification des pistes A,C est donnée dans la fiche technique n°10.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

A partir d'un lysat cellulaire marqué, nous avons entrepris des IP sur lysat total et sur phase détergente à l'aide du B₂ Val 7C7. Après adjonction de l'anticorps monoclonal, on ajoute le RAM en léger excès par rapport au B₂ Val 7C7 (1,5/1).

Le support précipitant est du sépharose 4B - protéine A. L'élution est réalisée en tampon échantillon SDS sans B₂ mercaptoéthanol chauffé à 100°C pendant 5 minutes.

Les détails du protocole sont présentés dans la fiche technique n° 10.

a) Résultats

Ils sont présentés dans la photo n° 12.

On observe un précipité au sommet de chaque piste. L'immunoprécipité réalisé à partir d'un lysat total (Piste C) présente outre quelques contaminants, 2 bandes bien visibles aux alentours de 30000 de poids moléculaire. Les deux mêmes bandes sont présentes dans l'immunoprécipité réalisé à partir d'une phase détergente (Piste A) mais d'intensité plus faible. Le rapport signal / bruit de fond n'est pas amélioré si on fait une séparation de phase (Piste A) ou pas (Piste C).

b) Discussion

Le précipité présent au sommet du gel est dû à l'utilisation de conditions non réductrices dans la préparation des échantillons au gel SDS- Page. En fait, vu le peu de matériel mis au début de l'immunoprécipité, nous pensions indispensable de porter le culot de l'immunoprécipité à ébullition pour éluer un maximum de matériel, nous ne pouvions alors

utiliser des conditions réductrices pour des raisons évoquées par ailleurs (Matériel et méthodes). Pour les mêmes raisons, nous ne savions pas non plus, si nous pouvions mettre le culot d'immunoprécipité en condition réductrice après le chauffage. Cet essai sera fait plus tard.

Toutefois, on observe qu'avec le RAM ajouté ici, les 2 bandes représentant les deux sous-unités des molécules de classe II (\pm 30000 PM) sont bien nettes surtout si l'IP est réalisé à partir d'un lysat total (Piste C). Ce deuxième anticorps peut être comparé à une sécurité qui relie le B₂ Val 7C7 au sépharose 4B - protéine A. A partir d'ici, nous conserverons cette étape supplémentaire. Par contre, la séparation de la phase détergente, précédent l'immunoprécipitation n'améliorant pas le rapport signal / bruit de fond dans les conditions reprises ici, nous abandonnerons définitivement cette voie d'approche.

4.2. EVALUATION DE LA PERTINENCE DU PRECLEARING ET DE L' EFFICACITE DU TAMPON D'ELUTION TDN pH 11

4.2.1. Première approche

Une deuxième question à laquelle il fallait répondre était de savoir si l'étape du "preclearing" était utile et si elle ne limitait pas la quantité d'antigènes de classe II présente dans le lysat ?

Pour répondre à ces interrogations, nous disposions d'un lysat de splénocytes marqués à la méthionine S³⁵. L'incubation a été effectuée durant 4 heures. L'avantage de l'utilisation de ces splénocytes consiste en ce que toutes ces cellules portent des antigènes de classe II.

Tous les IP ont été réalisés à partir d'un lysat total. Seule une moitié d'entre eux ont subi l'étape du "preclearing", l'autre moitié sert de contrôle. Nous avons diminué la quantité de B₂ Val 7C7 purifié utilisé estimant que nous étions en trop large excès. Nous risquions alors de saturer la protéine A insoluble par des monoclonaux non liés à l'antigène. Ce risque est cependant limité puisque ce sont les complexes anticorps - antigènes qui se lient préférentiellement à la protéine A.

Les lavages ont été effectués en tampon Tris- Cl 25mM pH 8.0; 0,1 SDS; 0,1% NP40 (19). Une première élution a été réalisée à l'aide du tampon TDN. Cette élution nous permettait après précipitation à l'acétone de resuspendre le culot de protéines dans un tampon échantillon SDS avec B₂ mercaptoéthanol et d'éviter ainsi une précipitation de protéines au sommet du gel de séparation (photo n° 13). Cependant, pour vérifier l'efficacité de cette élution, nous avons récupéré le culot de l'IP pour le soumettre à une deuxième élution, classique celle-ci, à l'aide de tampon échantillon SDS sans B₂ mercaptoéthanol chauffé à la température de 100°C. Cet éluat a été ensuite analysé sur gel SDS-Page (photo n° 14). De plus, face au dilemme de l'emploi ou non du B₂ mercaptoéthanol (l'omission entraînant un précipité au sommet du gel, et l'adjonction lors de l'élution provoquant une moins bonne séparation des chaînes lourdes et légères), nous avons tenté l'effet de ce réducteur si on l'ajoute après l'élution de l'échantillon.

FICHE TECHNIQUE N°11

Type de cellules utilisées : splénocytes

Marquage métabolique - isotope : méthionine S^{35}

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : $25 \cdot 10^6$ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP40)			Lysat total (NP40)				
Matériel utilisé	$3 \cdot 10^6$ DPM			$3 \cdot 10^6$ DPM				
Préclearing				Séparation protéine A 30'/4°				
1er AC -vol. -nature -tps/T°	5 µl 0,87 mg/ml 7C7 purifié 1H/4°			5 µl 0,87 mg/ml 7C7 purifié 1H/4°				
2e AC -vol. -nature -tps/T°	20 µl 0,33 mg/ml RAM 14H/4°			20 µl 0,33 mg/ml RAM 14H/4°				
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	Séparation protéine A 15'/4°			Séparation protéine A 15'/4°				
Lavages	Série des tampons TNS			Série des tampons TNS				
Elution	1 1/2 TON			1/2 TON				
	2 1/2 éch SDS 100° 15 min			1/2 éch SDS 100° 15 min				
Nbre DPM récupérés	1 20 000			10 000				
	2 100 000			10 000				
Nbre DPM mis sur gel	1 20 000			10 000				
	2 20 000			10 000				

1/2 = tampon
éch = échantillon

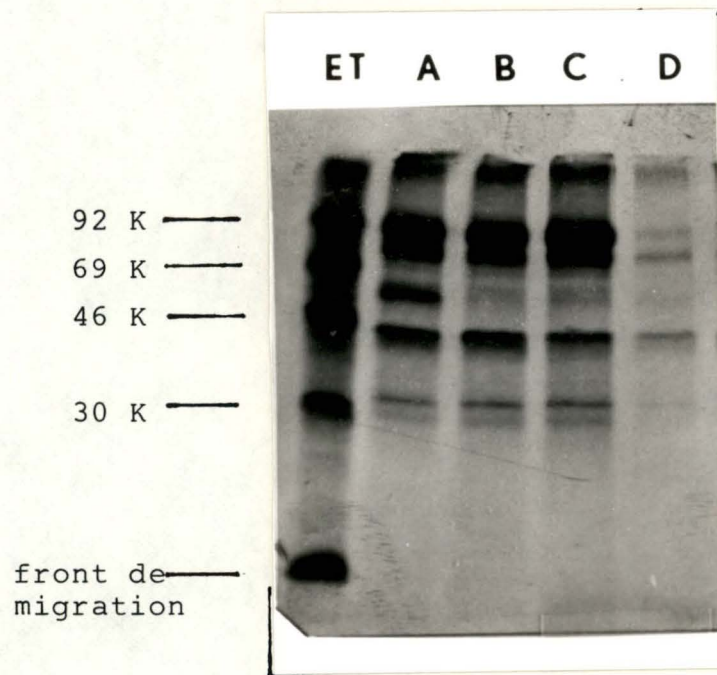


Photo n°13 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12% révélés par autoradiographie (8 jours d'impression).

La signification des pistes A et D est donnée dans la fiche technique n°11.

Le matériel mis ici sur le gel a été obtenu après la première élution du culot d'IP (tampon TDN).

Les pistes B et C ne sont pas reprises dans la discussion des résultats.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

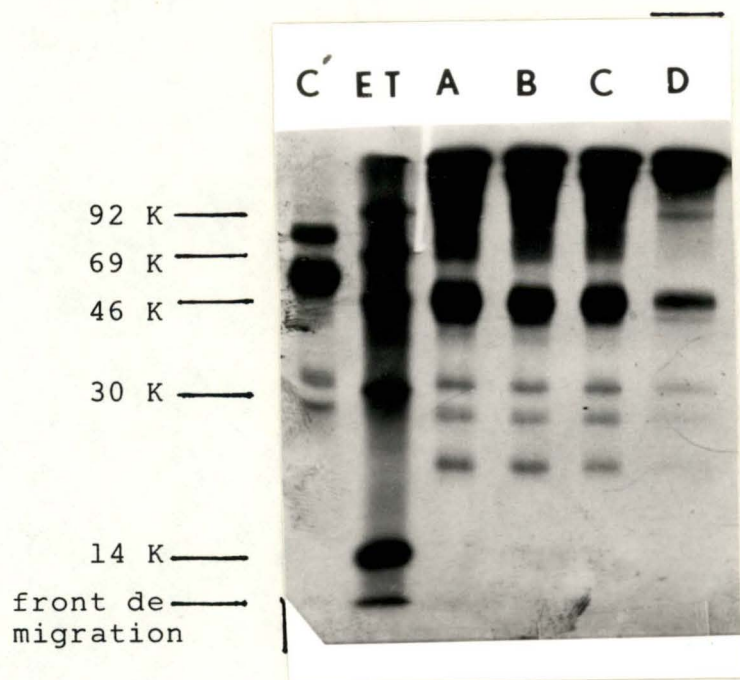


Photo n°14 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12% révélés à l'autoradiographie (8 jours d'impression).

La signification des pistes A et D est donnée dans la fiche technique n°11.

Le matériel mis ici sur gel a été obtenu après la deuxième élution du culot d'IP (tampon échantillon SDS, 100°).

Les pistes B et C ne sont pas reprises dans la discussion des résultats (ce sont pratiquement des duplicata de la piste A excepté que les 1ers et 2èmes anticorps n'ont pas été mis suivant la même séquence).

La piste C' correspond à un aliquot du matériel mis sur la piste C auquel on a ajouté du B₂ mercaptoéthanol à froid.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

Le détail du protocole est mis dans la fiche technique n° 11.

a) Résultats

Les résultats sont présentés sur les photos n° 13 et n° 14.

La première chose à noter, est que le nombre de DPM récupéré après l'élution à l'aide du tampon TDN est très faible comparé à celui obtenu après une seconde élution du même culot d'immunoprécipitation. La première élution semble donc fort inefficace, et cela se confirme à la comparaison des photos n° 13 et n° 14.

§. Photo n° 13
.....

Puisque le tampon TDN n'élue pas toute (loin s'en faut) la radioactivité associée au sépharose 4B, cette photo peut être considérée comme étant le résultat d'un lavage drastique qui élimine partiellement quelques contaminants. Ceux-ci sont de même nature mais d'intensité variable avec (Piste D) et sans "preclearing" (Piste A).

Un faible signal proche de 30000 de poids moléculaire indique qu'une partie des produits de classe II est enlevée à cette étape (Pistes A, D).

§. Photo n° 14
.....

Lorsque l'on compare la deuxième élution de l'IP avec (Piste D) et sans (Piste C) étape de "preclearing" deux points sont à remarquer :

1. Le "preclearing" réduit considérablement les contaminants particulièrement la zone diffuse au sommet du gel (Cet effet est également concrétisé si l'on considère le nombre de DPM récupéré après "preclearing" qui est 10 fois moindre qu'en l'absence de cette étape).
2. L'étape de preclearing entraîne également une réduction très nette des deux bandes situées aux alentours de 30000 PM.

En ce qui concerne l'effet de l'ajout du β_2 mercaptoéthanol après élution, les résultats sont repris sur la piste C'. Cette piste contient un aliquot de l'échantillon analysé en C auquel du β_2 mercaptoéthanol a été ajouté. Cette piste ne présente pas un précipité au sommet du gel comme observé en C et D.

En outre, on observe sur cette piste C' que ces conditions réductrices imposées après passage des protéines à haute température en présence de SDS n'affecte en rien la séparation des 2 chaînes dissociées des antigènes de classe II. Par contre, ce traitement semble affecter la migration du contaminant ayant un poids moléculaire inférieur à 25000 en C, qui disparaît sur la piste C'. De même, le contaminant qui en C se situait autour de 46000 PM se retrouve entre 46000 et 69000 PM. On observe aussi dans la piste C' un contaminant situé entre 69000 et 93000 PM.

b) Discussion

De nombreux enseignements peuvent être tirés de cette expérience :

- Tout d'abord, penchons nous sur l'utilité du "preclearing".

Celui-ci diminue fortement l'intensité des contaminants, mais aussi celle des 2 bandes d'un poids moléculaire proche de 30000; profil qui correspond à celui que nous attendons pour les deux sous-unités séparées des antigènes de classe II.

Perdrait-on sélectivement une grande quantité des molécules de classe II à cette étape ? Nous le vérifierons dans l'étape suivante.

- Deuxième enseignement; l'élution en tampon TDN est inefficace. Cette étape peut alors être comparée à un lavage drastique qui permet une élimination partielle des contaminants, sans pour autant éluer trop de matériel spécifique. Rappelons cependant que c'est ce même tampon qui est utilisé (avec succès) pour purifier les molécules de classe II par chromatographie d'affinité.
- On constate également que le fait de rajouter du β_2 mercaptoéthanol après élution en tampon échantillon SDS chauffé à 100°C supprime le précipité du sommet du gel et n'affecte pas la séparation en gel SDS- Page des chaînes α et β dissociées. Par contre, il modifie de manière inexplicée le le comportement électrophorétique de différents

FICHE TECHNIQUE N°12

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : 25.10⁶ cell./ml

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP 40)				Lysat total (NP 40)			
Matériel utilisé	3.10 ⁶ DPM				3.10 ⁶ DPM			
Préclearing	Sépharose Protéine A 30'/4° 30'/20°							
1er AC -vol. -nature -tps/T°	5ul (0,87 mg/ml) 7C7 purifié 1H/4° 1H/20°				5ul (0,87 mg/ml) 7C7 purifié 1H/4° 1H/20°			
2e AC -vol. -nature -tps/T°	20ul 0,33 mg/ml R A M 14H/4° 14H/20°				20ul 0,33 mg/ml R A M 14H/4° 14H/20°			
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	Séph. Protéine A 1H/4° 1H/20°				Séph. Protéine A 1H/4° 1H/20°			
Lavages	Série des tampons T N S				Série des tampons T N S			
Elution	tp éch. SDS 100° sans β ₂ merc + β ₂ merc à froid				tp éch. SDS 100° sans β ₂ merc + β ₂ merc à froid			
Nbre DPM récupérés	3.500	5200			8000	10000		
Nbre DPM mis sur gel								

Séph = sépharose
 tp = tampon
 éch = échantillon
 merc = mercaptoéthanol

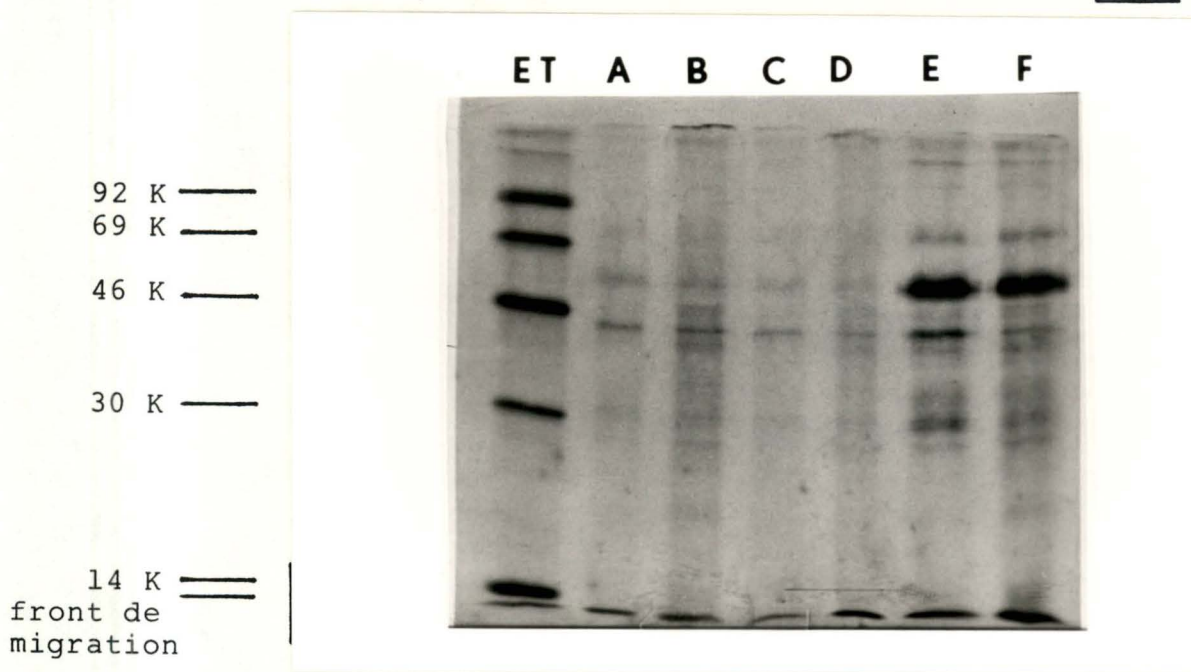


Photo n°15 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page (12% révélés par autoradiographie (10 jours d'impression).

La signification des pistes A,B,E et F est donnée dans la fiche technique n°12.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

Les pistes C et D ne sont pas reprises dans la discussion des résultats.

contaminants. Dorénavant nous préparerons tous nos échantillons de cette manière.

4.2.2. Effet d'un changement de température et vérification du problème inhérent au "preclearing"

L'expérience qui suit a été construite dans le but de vérifier si le "preclearing" provoque ou non des pertes sélectives des antigènes de classe II et si, le fait de travailler à 20 ou 4°C modifie d'une quelconque manière les résultats d'immunoprécipitations.

Après marquage métabolique des cellules à la méthionine S^{35} , nous les avons lysées en tampon de lyse NP40.

Différents IP utilisant le B₂ Val 7C7 comme premier anticorps, le RAM comme deuxième anticorps et le sépharose 4B - protéine A comme immunoabsorbant, ont été réalisés, les uns à 20°C, les autres à 4°C à chaque fois en comparant avec et sans "preclearing".

L'élution est réalisée en tampon échantillon SDS sans β_2 mercaptoéthanol chauffé à 100°C. A froid, on ajoute du β_2 mercaptoéthanol pour 5 % en concentration finale.

Les détails du protocole sont dans la fiche technique n° 12.

a) Résultats

Les résultats sont observés dans la photo n° 15.

Tout d'abord, on constate que l'IP soit fait

à 4°C (Pistes A et E) ou à 20°C (Pistes B et F), cela ne change rien au résultat.

Par contre, si l'IP est fait sans "preclearing" (Pistes E et F), les bandes d'un poids moléculaire proche de 30000 sont plus intenses que dans les IP ayant subi un "preclearing" (Pistes A, B). De plus, dans les pistes E et F, on retrouve les contaminants observés sur la piste C' de la photo n° 14 (A savoir une bande majeure entre 45 et 66000 PM et une bande plus faible entre 66 et 93000 PM).

b) Discussion

La température n'ayant aucun effet sur le résultat des immunoprécipités (tout au moins pour les deux conditions tentées ici), nous continuerons à travailler à 4°C puisque cette température contribue à limiter l'action des protéases.

Au vu de la diminution d'intensité des bandes proches de 30000 de poids moléculaire enregistrée suite à l'introduction d'une étape de "preclearing", il semble bien que de grandes quantités d'antigènes de classe II sont perdues à cette étape.

De plus, ce "preclearing" semble aussi éliminer une bande autour de 60000 de poids moléculaire. Il se pourrait que cette protéine soit de l'antigène de classe II non dissocié en ses sous-unités constituantes (poids moléculaire estimé : 58000).

Si cela s'avère exact, alors l'utilisation d'une étape de "preclearing" aboutirait à une déplétion intense en antigène de classe II; molécules qui ne seraient donc plus disponibles lors de l'IP proprement dite.

4.2.3. Lavage d'un culot de "preclearing"

Dans l'expérience précédente, nous avons constaté une déplétion nette lors du "preclearing" à la fois des bandes de ± 30000 PM et d'une bande contaminante à 60000 PM.

Nous allons vérifier en lavant un culot de "preclearing" si ces molécules sont bien absorbées sur la protéine A insoluble.

3.10^6 DPM d'un lysat cellulaire total marqué à l'aide de méthionine S^{35} a été mis en contact avec 50 ul de sépharose 4B - protéine A durant 30 minutes.

Ensuite, le culot a été lavé 5 fois en tampon Tris-Cl 25 mM pH 8.0; 0,1% SDS; 0,1 % NP40. Le résultat de cette expérience est élué en tampon échantillon SDS chauffé à 100°C auquel du β_2 mercaptoéthanol a été ajouté à froid.

A titre comparatif, un même "preclearing" a été réalisé et mis sur gel après élution directe, sans étape de lavage.

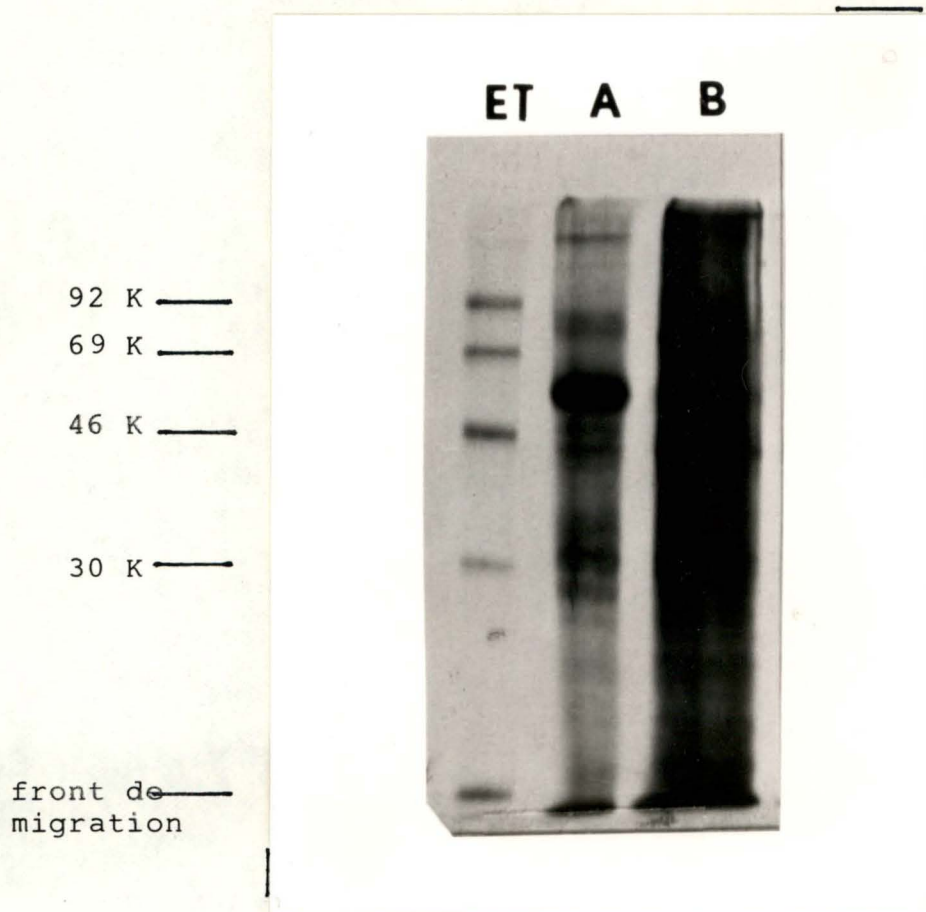


Photo n°16 : Culots de preclearing analysés sur gel SDS-Page (12%) et révélés par autoradiographie (10 jours d'impression).

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

A : Culot de "preclearing" réalisé à partir d'un lysat de cellules marquées à la méthionine S^{35} . Avant d'être élué puis mis sur un gel, il a été lavé à l'aide du tampon TNS (15000DPM sont déposés sur le gel).

B : Culot de "preclearing" réalisé à partir d'un lysat de cellules marquées à la méthionine S^{35} . Il a été directement élué puis mis sur gel ($3 \cdot 10^5$ DPM ont été récupérés, 50%DPM a été mis sur le gel).

a) Résultats

Ils sont présentés dans la photo n° 16.

Le culot de "preclearing" non lavé et élué (Piste B) présente en grande quantité (cfr. le nombre de DPM récupérés après élution) des contaminants de tous les poids moléculaires.

Par contre, le culot de "preclearing" une fois lavé puis élué (Piste A) ne présente plus que quelques bandes contaminantes majoritaires. Les principales se situent autour de 30000 de poids moléculaire, autour de 46000 PM, de 60000 PM et de 90000 PM.

b) Discussion

Il est logique que nous trouvions de très nombreux contaminants de tous poids moléculaires à partir d'un "preclearing" non lavé, élué, puisque entre les molécules qui s'adsorbent non spécifiquement sur le sépharose 4B - protéine A, on trouve toutes les protéines qui occupent passivement l'espace mort du gel de sépharose. Dans cet espace, on perd donc naturellement des protéines du lysat cellulaire. Le tout est de savoir si la perte des antigènes de classe II que nous observons est due à ce phénomène passif ou à une adsorption importante des produits de classe II sur notre support solide ? C'est pour répondre à cette interrogative que nous

avons lavé un preclearing avant de l'éluer et de le mettre sur gel (Piste A). L'observation de cette piste nous révèle que quelques protéines s'adsorbent solidement sur le support solide. Parmi les principales, nous retiendrons : une protéine inconnue entre 66000 PM et 93000 PM, une autre entre 46000 PM et 66000 PM, deux autour de 46000 PM et enfin deux autour de 30000 PM. Pour autant que les molécules présentant un poids moléculaire proche de 30000 soient des antigènes de classe II, cette expérience prouverait que ces molécules s'accrochent au sépharose 4B - protéine A. Une perte importante en produits de classe II se produit donc à cette étape, une sorte d'épuisement précoce du lysat en ces antigènes. Une autre molécule qui semble adhérer fortement à la protéine A insoluble a un poids moléculaire proche de 60000. Elle attire notre attention car on a déjà observé cette protéine sur des IP réalisés à partir d'un lysat cellulaire non "preclearé" (photo n° 14). Elle était décrite alors comme contaminant majeur. Comme nous en avons déjà discuté par ailleurs, il se pourrait que cette bande représente des antigènes de classe II non dissociés en leurs chaînes constitutives α et β (PM estimé : 58000). Dans ce cas, une très importante quantité de ces molécules seraient perdues au cours de l'étape du "preclearing". Il serait toutefois très étonnant que dans

les conditions d'éluion et de préparation au gel SDS- Page utilisées ici, nous ne séparions les chaînes α et β des molécules de classe II.

Une autre protéine observée sur la piste A et déjà rencontrée dans des résultats d'IP réalisés à partir de lysat cellulaire non "preclearé" a un poids moléculaire proche de 90000.

Il est logique que les bandes qui apparaissent où sont plus intenses lorsque l'étape du "preclearing" est omise se retrouvent dans l'éluat d'un culot de "preclearing" lavé. Le but du preclearing apparaît ici nettement : éliminer des protéines qui s'adsorbent fortement sur la phase solide. Dans le cas des molécules de classe II bovins cependant, il semble que cette étape soit à supprimer puisque ces protéines semblent adhérer au sépharose 4B - protéine A.

4.3. TENTATIVE D'UTILISATION D'ANTIGENES DE CLASSE II PURIFIES, MARQUES DANS LA MISE AU POINT DE LEUR IMMUNOPRECIPITATION

A ce stade du travail, nous avons décidé de purifier des antigènes de classe II bovins sur une colonne de sépharose couplée à du B₂ Val 7C7 et de marquer ces molécules.

Tout ceci, afin de pouvoir mettre au point l'IP à partir d'un matériel présentant moins de variabilités que des lysats cellulaires marqués provenant d'animaux différents. Nous tenterons donc de définir des conditions optimales d'immunoprécipitations à partir des molécules de classe II purifiées.

4.3.1. Purification des molécules de classe II par chromatographie d'affinité

Nous avons purifié des antigènes de classe II bovins à partir de ganglions mésentériques récoltés à l'abattoir.

La technique de purification utilisée est la chromatographie d'affinité. Pour ce faire, du B₂ Val 7C7 a été couplé à du sépharose. Pour vérifier le taux de purification des produits de classe II, un aliquot de l'éluat obtenu est analysé en condition réductrice sur un gel SDS-Page et révélé au bleu de coomasie. La même séquence de manipulation a été utilisée pour purifier de l'antigène de classe I du même animal à l'aide du monoclonal Thy 1 11B₂. Ceci afin de comparer le taux de purification de chacune des protéines par la même méthode.

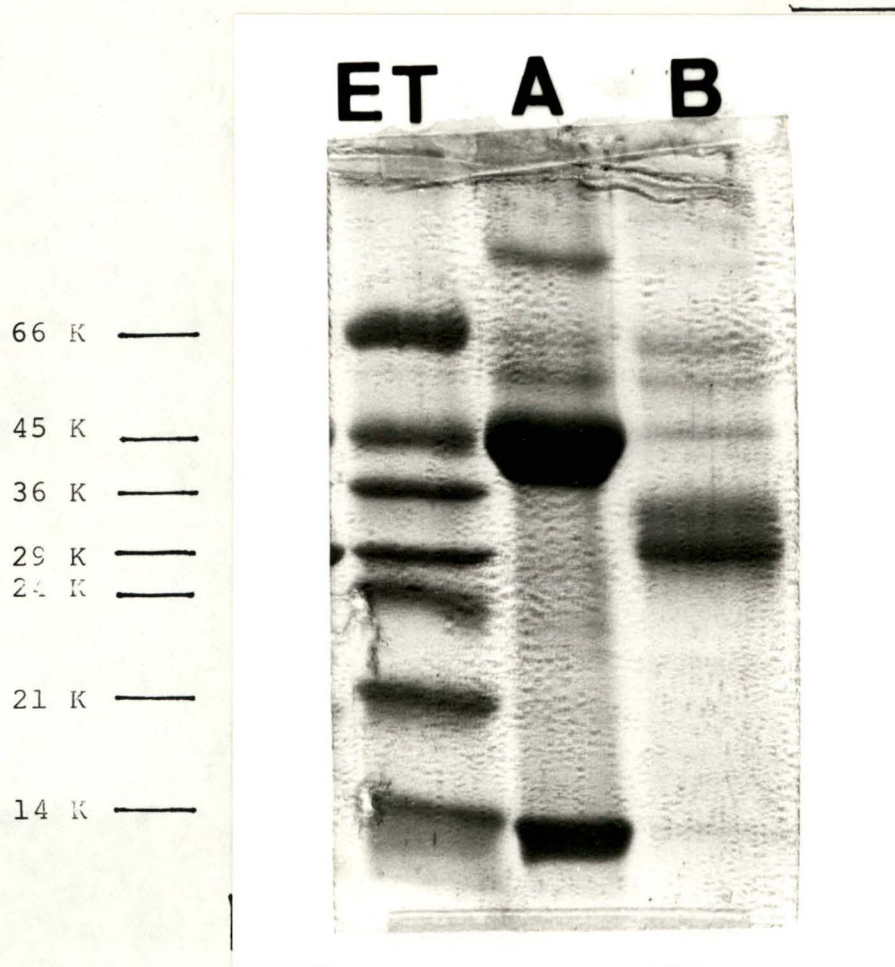


Photo n°17 : Résultats de la purification d'antigènes d'histocompatibilité bovin par chromatographie d'affinité analysés sur gel SDS-Page (12%) en condition réductrice. La révélation a été faite par coloration au bleu de coomasie.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

A : Piste des antigènes de classe I purifiés à l'aide du monoclonal Thy 1 11B₂.

B : Piste des antigènes de classe II purifiés à l'aide du monoclonal B₂ Val 7C7.

a) Résultats

Ceux-ci sont présentés dans la photo n° 17.

La purification des antigènes de classe I (Piste A), outre quelques faibles contaminants de haut poids moléculaire, présente une bande à 44000 et une autre à 14000. Ces deux bandes représentent respectivement la chaîne lourde des antigènes de classe I et la B₂ M associée.

La purification des antigènes de classe II par cette technique (Piste B) semble également très efficace. On peut observer deux bandes majoritaires aux environs de 30000 PM. On note cependant la présence de quelques contaminants de poids moléculaire plus importants mais présentant un signal plus faible que celui des antigènes de classe II.

b) Discussion

La technique de purification des antigènes d'histocompatibilités bovins par chromatographie d'affinité donne donc d'excellents résultats. Et cette méthode est valable tant pour les antigènes de classe I que pour les antigènes de classe II.

Il est étonnant de constater que les IP qui sont réalisés dans des conditions proches ne donnent eux, pas de résultats satisfaisants.

Faut-il changer le mode de préparation du lysat cellulaire ? En effet, plusieurs ultracentrifugations sont effectuées avant la chromatographie. Ces étapes permettent

peut-être d'éliminer des contaminants hydro-solubles (88). Le lysat ne subit aucune surgélation avant son interaction avec l'anti-corps lors de la chromatographie. Faut-il éviter l'étape de surgélation du lysat radio-actif ? En effet, d'après Godin, une succession de surgélations / décongélations du lysat entraîne des phénomènes d'agréga-tions protéiques (87). Faut-il encore coupler du B₂ Val 7C7 à du sépharose 4B pour l'utiliser en immunoprécipitation ? Ces hypothèses ont été envisagées mais non réalisées. En effet, dans le temps qui nous était imparti, nous avons voulu vérifier d'autres paramètres qu'il nous paraissait plus important d'aborder; dont notamment, la standardisation de l'origine des antigènes, et le pistage des antigènes de classe II lors de toutes les étapes de purification.

En ce qui concerne les contaminants observés, il est plus que vraisemblable que les deux bandes identiques retrouvées dans la piste A et la piste B aux alentours de 60000 PM soient dues au β_2 mercaptoéthanol (89). On retrouve en outre, dans la piste B, un contaminant de 44000 PM que l'on a déjà observé auparavant dans les analyses des IP. Enfin, des bandes contaminantes de hauts poids moléculaires apparaissent sur cette piste B. Nous discuterons plus longuement de ceux-ci ultérieurement.

4.3.2. Marquage à l'Iode¹²⁵ des molécules de classe II purifiées

Les protéines de classe II purifiées ont été marquées à l'I¹²⁵ dans le but de mettre au point des conditions optimales d'immunoprécipitation plus rapidement. En effet, en suivant, au cours de la séquence d'immunoprécipitation le taux de radioactivité (lié presque exclusivement aux produits de classe II), nous pensions pouvoir localiser les étapes où des pertes éventuelles de molécules de classe II auraient pu se produire. Dès lors, nous ne devions plus passer par l'analyse en SDS- Page suivie d'une révélation à l'autoradiographie qui consomme énormément de temps.

La méthode de marquage utilisée ici est enzymatique. Plus précisément, c'est sur la technique à la lactoperoxidase que notre choix s'est porté. Tout d'abord parce que c'est un marquage assez doux qui permet de ne pas altérer la protéine et ainsi ses sites antigéniques. Ensuite parce qu'il est souvent utilisé dans la littérature comme marquage préalable à l'immunoprécipitation des molécules d'histocompatibilité chez diverses espèces (19,48,...).

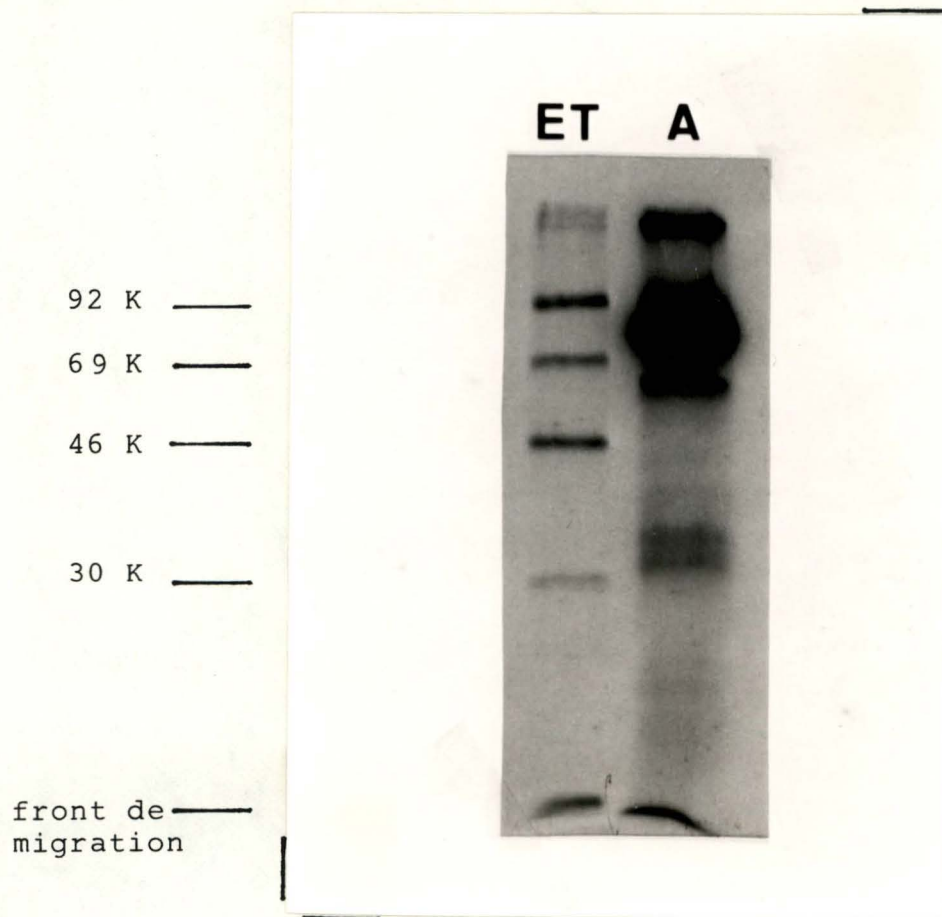


Photo n°18 :

A : Résultats du marquage à l'I¹²⁵ des antigènes de classe II purifiés, analysés sur gel SDS-Page (12%) en condition réductrice. La révélation a été réalisée par autoradiographie (5 jours d'impression).

(45000 CPM ont été mis sur le gel)

ET: Piste des étalons de poids moléculaire.

Nous avons marqué 100 ug d'antigènes de classe II bovins (stockés à - 20°C) à l'I¹²⁵ à l'aide de lactoperoxidase. Nous avons analysé sur un gel SDS-Page en condition réductrice l'équivalent de 45000 CPM TCA précipitable afin de vérifier si ce sont bien les produits de classe II qui sont marqués. Le gel, après séchage, est révélé par autoradiographie.

a) Résultats

Ils sont présentés dans la photo n° 18.

Nous observons 2 bandes légèrement marquées au dessus de 30000 de poids moléculaire. De plus, 3 contaminants de hauts poids moléculaires et très marqués sont visibles. Le premier contaminant majeur a un poids moléculaire légèrement inférieur à 69000, le second a un poids moléculaire se situant entre 69000 et 92000, le dernier se situe aux environs de 200000 PM.

b) Discussion

Le profil en gel SDS- Page des produits de classe II observé ici après marquage est tout à fait différent de celui obtenu après purification par chromatographie. Ici, les produits de classe II semblent être minoritaires par rapport aux contaminants de haut poids moléculaire.

Plusieurs tentatives d'explications peuvent ici être avancées :

- Une première étant que les contaminants seraient plus marqués que les produits de

classe II, pour des questions d'accessibilités à l'enzyme. Cela suppose un caractère hydrosoluble des contaminants. Le caractère liposoluble des molécules de classe II entraînant leur incorporation dans les micelles de détergent, cette incorporation pouvant se faire dans un sens ou l'autre et provoquer leur encapsulation.

- Une seconde explication plus plausible serait que suite au stockage des antigènes de classe II purifiés à -20°C , des phénomènes d'agrégaions de protéines se soient produits (87).
- Une troisième possibilité est liée à l'observation suivante : pour concentrer les produits de classe II purifiés, nous avons précipité ces molécules à l'aide d'acétone. Ensuite, le culot est resuspendu dans le tampon phosphate NP_4O adéquat pour le marquage. Or, au cours de cette dernière opération, une grande quantité de matériel n'a pu être redissoute. L'expérience fut répétée plusieurs fois, toujours avec le même résultat. Une part importante de matériel protéique a donc dû être perdu à cette étape. Or, si la lactoperoxidase n'a pas assez de substrat, elle risque de se marquer elle-même (75). Celle-ci ayant un poids moléculaire de 93000, cet "automarquage" expliquerait partiellement l'intensité du signal obtenu entre 66000 et 93000 PM.

En conséquence de ce profil inattendu, nous n'avons pas pu exploiter ce matériel comme souhaité.

Cependant, à partir de ce matériel disponible, nous avons réalisé des IP dans le but d'analyser dans diverses conditions le comportement des différentes protéines marquées (résultats non présentés). Les résultats de cette expérience confirment différentes observations déjà réalisées auparavant. A savoir que les 2 bandes proches de 30000 PM sont bien précipitées dans nos conditions d'IP (fiche technique n° 11), que l'étape du "preclearing" nous fait perdre une grande partie des antigènes de classe II. Nous constatons également que les contaminants décrits après le marquage des antigènes de classe II purifiés sont encore présents ici après une précipitation spécifique de ces antigènes. De plus, comme déjà dit, l'étape du "preclearing" semble éliminer spécifiquement une bonne partie du contaminant ayant un poids moléculaire se situant entre 46000 et 66000.

CINQUIEME PARTIE

5. DETERMINATION DU PATTERN DE BANDES SPECIFIQUEMENT PRECIPITEES PAR LE B₂ Val 7C7 ET TENTATIVE DE DEFINITION DE LA NATURE DU CONTAMINANT DE 60000 PM.

Si le temps ne nous avait pas été compté, de nombreuses expériences auraient encore pu être entreprises.

Mais avant de clôturer nos manipulations, deux choses nous tenaient particulièrement à coeur. Tout d'abord, nous avons tenté de déterminer si la bande contaminante proche de 60000 de poids moléculaire constitue oui ou non un agrégat des sous-unités des produits de classe II. Ensuite, nous avons voulu montrer que le pattern de bandes que nous précipitons est spécifiquement obtenu par le B₂ Val 7C7.

5.1. TENTATIVE DE DEFINITION DE LA NATURE DU CONTAMINANT DE 60000 PM.

Pour tester si le contaminant observé aux environs de 60000 de poids moléculaire est un agrégat des deux sous-unités α et β des antigènes de classe II, deux méthodes étaient à notre disposition :

- l'utilisation pendant l'immunoprécipitation d'une molécule qui en méthylant les résidus SH bloque la formation d'agrégats par ponts disulfurés. Cette molécule c'est l'Iodoacétamide.

FICHE TECHNIQUE N° 13

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine s^{35}

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : $25 \cdot 10^6$ cell./ml.

Pistes	A	B	C	D	E	F	0	H
Nature du lysat utilisé	Lysat total (NP40)					Lysat total (NP40) + Iodoacétamide	Lysat total (NP40)	
Matériel utilisé	3. 10^6 DPM							
Préclearing								
1er AC -vol. -nature -tps/T°	5 ul (0,87 mg/ml) FC7 purifié 1H / 4°							
2e AC -vol. -nature -tps/T°	20 ul 0,33 mg/ml RAM 1H / 4°							
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	sépha rose protéine A 15' / 4°							
Lavages	Série des tampons TNS							
Elution	tampon échantillon SDS 100°					B₂ merc 0% B ₂ merc af. 2% B ₂ merc af. 4% B ₂ merc af. 8% B ₂ merc af. 20% B ₂ merc af. Iodoacétamide 2% B ₂ merc af. 2% B ₂ merc af.		
Nbre DPM récupérés	9000 DPM					9000	2000	
Nbre DPM mis sur gel	9000 DPM					9000	2000	

merc. : mercaptoéthanol
af. : à froid

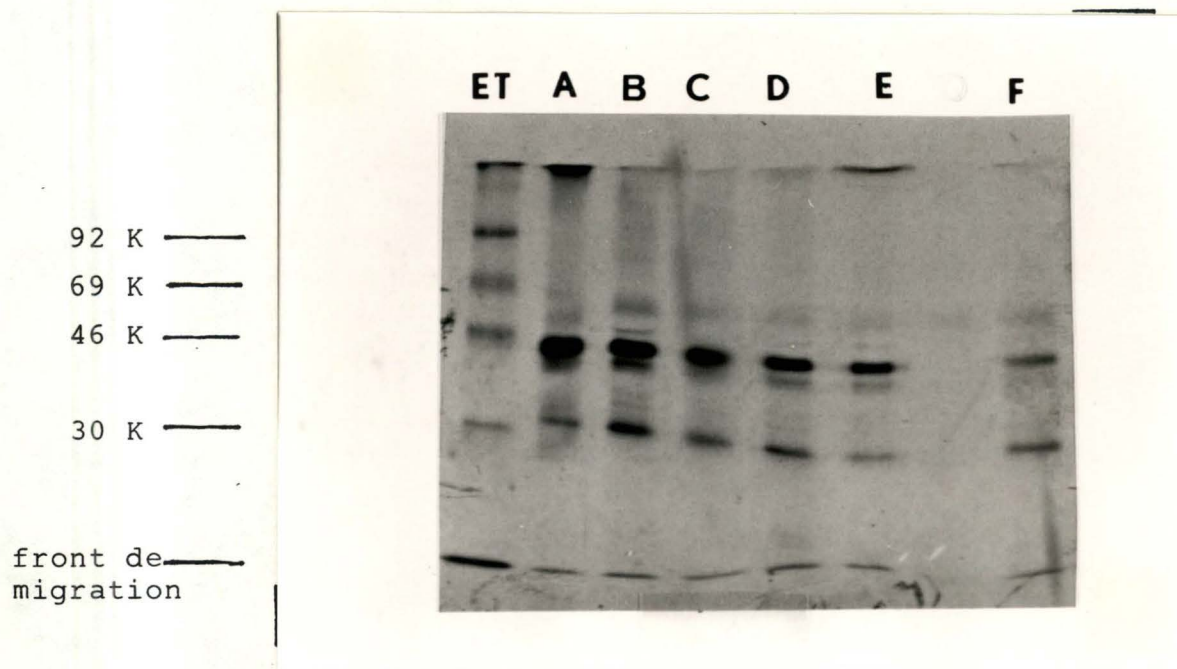


Photo n°19 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page(12%)
révélés à l'autoradiographie (8 jours d'impression).

La signification des pistes A,B,C,D,E,O,F est reprise
dans la fiche technique n°13.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

- l'adjonction de quantités croissantes de β_2 mercaptoéthanol à l'éluat pour réduire les ponts disulfures.

Les points clés du protocole sont repris dans la fiche technique n° 13.

En bref, 5 IP furent réalisés à partir de 3.10^6 DPM d'un lysat de cellules marquées à la méthionine S^{35} . Le monoclonal utilisé est le β_2 Val 7C7 et comme immunoadsorbant, c'est le sépharose 4B - protéine A qui a été choisi. Les lavages furent effectués en tampon Tris 25 mM pH 8.0; 0,1 % SDS; 0,1 % NP40.

L'éluotion a été réalisée en tampon échantillon SDS sans β_2 mercaptoéthanol chauffé à 100°C. Ces éluats d'IP furent ensuite poolés puis reséparés afin d'y mettre 0 %, 2 %, 4 %, 8 % et 20 % de β_2 mercaptoéthanol avant de les déposer sur gel.

De plus, un contrôle fut réalisé utilisant exactement les mêmes étapes sauf que le β_2 Val 7C7 a été omis.

Un dernier IP a été réalisé, identique aux 5 premiers sinon que 5 mM d'iodoacétamide ont été ajoutés au tampon de lyse NP40 et au tampon échantillon SDS (90).

a) Résultats

Ils sont présentés dans la photo n° 19.

On note que quel que soit le taux de β_2 mercaptoéthanol (pistes A à E), le profil de l'IP est identique : une bande proche de 30000 de poids moléculaire, deux autres proches de 46000 et enfin une troisième plus faible proche de 60000.

Le seul changement notable qui peut être observé, est que, lorsque l'on ne met pas de β_2 mercaptoéthanol, un précipité au sommet du gel est observé ainsi que lorsqu'on met 20 % de ce réducteur.

La piste 0 qui constitue le contrôle ne présente que la faible bande proche de 60000 de poids moléculaire.

La piste F est semblable aux 5 premières.

b) Discussion

Tout d'abord, il semble que la bande proche de 60000 de poids moléculaire, plus faible ici que lors d'IP antérieurs, n'est pas affectée par une augmentation de la concentration de β_2 mercaptoéthanol dans l'éluat (A et E) ni par l'utilisation d'iodoacétamide (F). De plus, c'est la seule bande qui se retrouve dans le contrôle (Piste 0). Il semble donc qu'elle corresponde à un contaminant qui s'adsorbe sur le complexe RAM - protéine A insoluble formé et ne soit donc pas des antigènes de classe II non dissociés en leurs sous-unités.

Si on compare le contrôle (Piste 0) avec les autres IP, il semble que les trois autres bandes correspondent à des molécules précipitées spécifiquement par le B_2 Val 7C7.

La bande proche de 30000 de poids moléculaire reste unique et ne se dissocie pas en deux bandes distinctes. Des auteurs ont décrit des profils d'IP semblables à des IP d'antigènes de classe II bovins (38) et expliquaient cette non distinction des sous-unités de la protéine par l'utilisation de conditions réductrices. Cette explication ne nous satisfait pas puisque déjà par le passé, nous sommes parvenus à dissocier en condition réductrice les deux sous-unités des produits de classe II (photo n° 14).

FICHE TECHNIQUE N°14

Type de cellules utilisées : cellules mononuclées du sang périphérique

Marquage métabolique - isotope : méthionine S³⁵

- temps d'incubation : 4H00

- concentration en cellules : 25.10⁶ cell./ML

Pistes	A	B	C	D	E	F	G	
Nature du lysat utilisé	Lysat total (N P 40)							
Matériel utilisé	3 . 10 ⁶ D P M							
Préclearing	séph. prot. A 30' / 4°		séph. prot. A 30' / 4°		séph. prot. A 30' / 4°		séph. prot. A 30' / 4°	
1er AC -vol. -nature -tps/T°	10 ul 11 β ₂ ascite 1H / 4°				5 ul (0,87 mg/ml) 7C7 purifié 1H / 4°			
2e AC -vol. -nature -tps/T°	20 ul 0,33 mg/ml R A M 1H / 4°							
Immuno-absorbant -nature -tps/T°	séparation protéine A 15' / 4°							
Lavages	série des tampons immunomix		série des tampons TNS		série des tampons immunomix		série des tampons TNS	
Elution	tampon échantillon SDS 100° puis β ₂ merc. à froid							
Nbre DPM récupérés	8800	14000	6000	11000	3600	5000	3600	5000
Nbre DPM mis sur gel	8800	14000	6000	11000	3600	5000	3600	5000

séph. : séparation
prot. : protéine
merc. : mercaptoéthanol

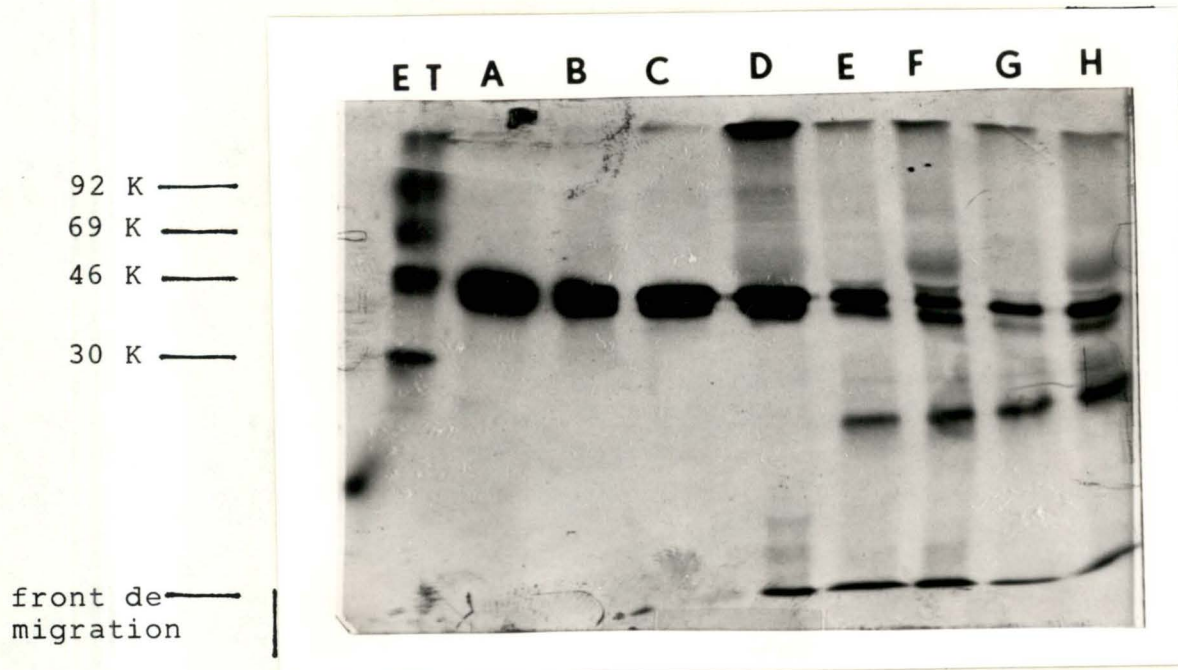


Photo n°20 : Résultats d'IP analysés sur gel SDS-Page(12%)
 révélés à l'autoradiographie (8 jours d'impression).

La signification des pistes A,B,C,D,E,F,G,H est reprise
 dans la fiche technique n°14.

ET : Piste des étalons de poids moléculaire.

5.2. DETERMINATION DU PATTERN DE BANDES SPECIFIQUEMENT PRECIPITE PAR LE B₂ Val 7C7

Pour vérifier si le pattern de bandes que nous obtenons est bien spécifique du B₂ Val 7C7, nous avons déjà fait un contrôle (Piste 0, photo 19). L'autre contrôle qui nous manque encore, consiste en l'utilisation dans des conditions identiques d'un monoclonal différent. Nous avons choisi le Thy 1 11B₂ (anti-BoLA de classe I).

Les détails du protocole sont expliqués dans la fiche technique n° 14.

En bref, 4 IP furent réalisés avec le Thy 1 11B₂, 4 autres avec le B₂ Val 7C7. Pour chaque anticorps, deux IP subirent l'étape du "preclearing", deux autres non. Deux types de lavages ont été utilisés : le lavage en tampon immunomix très efficace pour l'IP des molécules de classe I et le lavage en tampon TDN plus un passage à pH 11 qui donnait des résultats acceptables pour l'IP des molécules de classe II.

L'éluat est réalisé en tampon échantillon SDS sans B₂ mercaptoéthanol. Le culot est chauffé à 100°C et seulement après refroidissement de l'éluat, nous rajoutons du B₂ mercaptoéthanol.

a) Résultats

Les résultats peuvent être observés sur la photo n° 20.

Tout d'abord, il faut noter que l'électrophorèse ne s'est pas faite dans les meilleures conditions. Cela s'observe par la déformation de la piste des étalons de poids moléculaires et par la disparition du front de migration de trois des pistes.

Tout cela est dû à la cassure d'une des plaques de verre soutenant le gel durant l'électrophorèse. L'estimation des faibles PM se fera donc par comparaison à ce qui a été obtenu dans d'autres expériences.

Les IP réalisés à l'aide du Thy 1 11B₂ (Pistes A, B, C et D) présentent une bande unique autour de 46000 de poids moléculaire et ce, quel que soit le lavage utilisé. Un même résultat est obtenu que l'étape du "preclearing" soit omise ou non.

Les IP réalisés à l'aide du B₂ Val 7C7 quant à eux présentent le même pattern de bandes que dans l'expérience précédente : une bande autour de 30000 de poids moléculaire, deux autres proches de 46000. La seule variation enregistrée est la disparition d'une faible bande proche de 60000 de poids moléculaire si le "preclearing" est réalisé.

b) Discussion

Lorsqu'on compare les IP obtenus à partir du Thy 1 11B₂ de ceux obtenus à partir du B₂ Val 7C7, on peut affirmer que la bande de 30000 de poids moléculaire bien qu'unique est spécifiquement précipitée par le B₂ Val 7C7.

Les bandes proches de 46000 le sont également puisque d'après le contrôle réalisé dans l'expérience précédente (photo n° 19, piste 0), aucune bande ne se trouve à cette hauteur si le B₂ Val 7C7 est omis. Ces protéines semblent donc "copurifiées" avec les antigènes de classe II. Ce phénomène n'est pas inconnu puisqu'il a été décrit chez la souris (91).

D'après les auteurs qui ont décrit ces faits, ces protéines sont associées intracytoplasmiquement aux produits de classe II et sont ainsi copurifiées avec eux. De telles protéines copurifiées ne sont pas observées avec les molécules de classe I, tout au moins dans les conditions utilisées ici. En effet, pour ces IP, seule la chaîne lourde des produits de classe I d'un poids moléculaire de 44000 est visible. L'épaisseur de la bande s'explique par la grande quantité de matériel utilisé au départ de l'immunoprécipité.

Cette comparaison entre des résultats obtenus à l'aide de deux monoclonaux différents et le contrôle négatif réalisé dans l'expérience précédente nous permet d'affirmer que le RAM n'est responsable de la précipitation d'aucune bande observée.

Deux observations intrigantes ont toutefois été réalisées au cours de cette expérience :

1. La première est que les lavages immunomix dans ces conditions-ci ne décrochent plus le complexe antigène- anticorps précipité contrairement à ce qui a été observé auparavant (chapitre 1.3.1.). Ceci est explicable car on utilise maintenant le RAM, jouant le rôle d'une sécurité dans l'accrochage du complexe antigène / anticorps à la protéine A.
2. La deuxième est que le preclearing ne semble pas altérer l'intensité de la bande unique de 30000 PM alors que lorsque nous obtenions deux bandes distinctes, nous avons démontré que le preclearing diminuait fortement leur intensité, comme si les

protéines de classe II s'adsorbaient sur le sépharose 4B - protéine A.

Cette différence de comportement s'expliquerait-elle par le fait que la bande unique observée ne correspondrait pas à des produits de classe II mais à un contaminant ?

Si oui, comment expliquer que d'une fois à l'autre, on ne parvient pas à obtenir le même pattern de bandes dans des conditions fort proches. Existe-t-il des variables incontrôlées qui ne nous sont pas connues ?

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSIONS

Suite aux nombreuses expériences accumulées, une discussion plus approfondie peut être entreprise.

Il est impossible ici de passer en revue toutes les données, ainsi devrons-nous nous contenter de commenter quelques uns des éléments marquants.

1.1. LES ANTIGENES DE CLASSE II

Il est pratiquement indiscutable que les bandes observées autour de 30000 de poids moléculaire correspondent à des antigènes de classe II. Tout d'abord parce que le profil correspondant à 2 bandes proches de 30000 de PM est très semblable à celui des chaînes α et β des antigènes de classe II précipités chez d'autres espèces et purifiés par chromatographie d'affinité chez le bovin. Ensuite, parce que lorsque l'on n'a qu'une seule bande (proche de 30000 de PM), celle-ci est spécifiquement précipitée par le B₂ Val 7C7 (Ac.Mo. spécifique de classe II), puisque ni le Thy 1 ll B₂, ni le RAM, ne font apparaître une telle bande en immunoprécipitation. Une question qui reste jusqu'à présent en suspens, est de savoir pourquoi le pattern de bandes autour de 30000 de PM est parfois dédoublé, parfois unique.

1.2. LES BANDES CONTAMINANTES

De nombreuses bandes contaminantes sont souvent coprécipitées par le B₂ Val 7C7, nous pourrions donc parler de bandes associées. En effet, ces contaminants semblent spécifiques du B₂ Val 7C7 puisque ni le Thy 1 11B₂, ni le RAM ne précipitent de telles bandes dans les mêmes conditions.

Pourquoi existe-t-il une telle différence entre les antigènes de classe I et les antigènes de classe II dans ces phénomènes de coprécipitation ? Est-ce dû à la différence fondamentale de fonction de ces molécules ? En effet, les complexes, produit de classe I / antigène associé, sont des cibles pour des cellules effectrices. Par contre, les produits de classe II associés à des peptides antigéniques semblent intervenir comme molécules "signal" durant l'activation des cellules B au repos (91).

Quelles sont ces bandes associées ?

Un premier contaminant, que nous observons souvent, se situe aux environs de 44000 de poids moléculaire. Ce contaminant est très souvent décrit de par la littérature comme étant de l'actine associée intracytoplasmiquement semble-t-il aux antigènes de classe II (91,92). Certains (92) signalent, outre l'actine, un contaminant majeur à 200000 de PM que nous avons pour notre part rarement mis en évidence. Ce contaminant serait de la myosine.

D'autres auteurs ont décrit chez la souris que les antigènes de classe II I-A (équivalent HLA-DQ) peuvent former un complexe de 200000 de PM avec une protéine

associée à la membrane. Ils ont également montré que les antigènes de classe II I-E (équivalent HLA-DR) s'associent avec des multimères de protéines de 15000 de PM pour donner des complexes de 45, 60, 75 et 90 Kd. La nature de ce multimère est inconnue (93). Pour notre part, nous avons fréquemment rencontré des contaminants à des PM similaires. Mais, dans ce cas, les complexes n'étant pas dissociés en condition réductrice, il faudrait que ces associations soient d'une autre nature que des ponts disulfures.

A propos de la bande proche de 60000 de PM, une molécule semblable coprécipitée avec les antigènes de classe II a été décrite chez la souris (91). Il s'agirait d'une protéine Kinase, ce qui renforce l'idée que ces antigènes de classe II servent d'intermédiaire dans l'activation des cellules B (91).

On peut difficilement envisager que parmi les bandes contaminantes proches de 75000 de PM, on puisse trouver des chaînes lourdes d'IgM.

D'une part, parce que la protéine A fixe mal les IgM (71), d'autre part, on ne retrouve pas de contaminant correspondant à la chaîne légère qui devront lui être associée (25 Kd) .

Quoi qu'il en soit, d'un IP à l'autre, les contaminants observés ne sont pas toujours identiques en matière ou en intensité. Ceci peut être imputable à l'impossibilité de travailler dans des conditions exactement similaires d'un IP à l'autre. De nombreuses variables sont mal contrôlées (Différences d'état d'activation des cellules d'un animal à l'autre, différence de vieillissement du lysat cellulaire, ...), peut-être en

existe-t-il d'autres insoupçonné jusqu'ici. Une hypothèse intéressante dans l'explication de cette inconstance dans les phénomènes de coprécipitation est liée au fait que le B₂ Val 7C7 est peut-être polymorphe "large". En effet, on a décrit la présence de contaminants distincts associés aux produits de classe II murins I-A et I-E (93). Or, des sous-populations de produits de classe II équivalents aux I-A et I-E murines ont été décelées chez les bovins (95). Si le polymorphisme "large" du monoclonal peut être attribué à la reconnaissance inconditionnelle (haplotype indépendante) d'un des types d'antigènes de classe II (I-A like ou I-E like) adjoint à la reconnaissance conditionnelle (haplotype dépendante) de l'autre type de molécules et si les molécules reconnues diffèrent d'individus à individus; dès lors, les molécules coprécipitées pourraient également être différentes selon les animaux.

1.3. PROBLEME DU "PRECLEARING"

Il semble que le "preclearing" à l'aide de protéine A insoluble épuise le lysat en antigènes de classe II. Comment expliquer que ces molécules s'adsorbent si fortement à la protéine A ?

- parce qu'elles contiennent un site analogue à celui qui permet aux immunoglobulines de s'adsorber sur cette protéine A?
- parce qu'elles sont, elles-mêmes, associées à des protéines intramembranaires qui s'adsorbent sur la

protéine A insoluble? Cette protéine serait peut-être le contaminant d'un poids moléculaire estimé à 60000 et qui s'adsorbe fortement sur le sépharose 4B - protéine A? (Photo n° 16).

2. PERSPECTIVES

L'étude de la nature des protéines co-précipitées avec les antigènes de classe II ouvre des perspectives d'avenir très intéressantes dans le cadre de l'hypothèse selon laquelle les antigènes de classe II interviendraient comme molécules "signal" durant l'activation des cellules B au repos.

Par contre, dans le cas qui nous préoccupe ici, c'est-à-dire l'analyse du polymorphisme des antigènes de classe II bovins par Ief, ces contaminants nous empêchent de travailler dans la technique de l'Ief à une dimension.

Il faudra donc parvenir à éliminer ces contaminants par des techniques différentes et peut-être plus appropriées comme la centrifugation à très haute vitesse du lysat cellulaire dans le but d'éliminer les contaminants hydrosolubles (88) (étape qui est réalisée dans la purification par chromatographie d'affinité) ou encore par des lavages adéquats (tampon de lavage contenant de l'Hepes qui permettrait l'élimination de l'actine (94)).

Une voie parallèle à l'élimination des contaminants serait d'amplifier le signal spécifique en limitant la perte par "preclearing". On pourrait utiliser comme support solide précipitant, du B₂ Val 7C7 couplé à du sepharose 4B; dans ce cas, le "preclearing" s'effectuerait à l'aide d'un monoclonal de même isotype que le B₂ Val 7C7 couplé à un même support solide.

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes peu à peu rendus compte des difficultés que représentaient l'immunoprécipitation des molécules de classe II bovines par rapport aux

molécules de classe I de la même espèce. Nous avons tracé aussi quelques voies importantes dans la compréhension des difficultés rencontrées et dans les moyens qu'il faudrait employer pour les surmonter.

C'est sur base de toutes ces remarques que nous pouvons envisager la réussite proche de la mise au point de l'immunoprécipité des produits de classe II bovins à l'aide du B₂ Val 7C7 et de tout autre monoclonal anti-BoLA classe II. C'est seulement quand cette mise au point sera effective qu'enfin nous pourrons entreprendre l'étude du polymorphisme de ces molécules par Ief.

B I B L I O G R A P H I E

1. ABASTADO J.P.
Les molécules HLA prennent du relief.
La recherche n° 197; Vol. 19; 382-383 (1988).
2. MURPHY D.B.
Overview : the murine MHC.
In : Handbook of experimental immunology
Blackwell scientific publications Chap. 100 (1986).
3. LEVEZIEL H.
Le complexe d'histocompatibilité chez l'homme et
chez les animaux.
Ann. Genet. Sél. anim. 11; 281-356 (1979).
4. VAIMAN M.
Le complexe majeur d'histocompatibilité chez les animaux.
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed. Dausset J. et Pla M.
Flammarion; 38-58 (1985).
5. DAUSSET J.
Introduction
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed. Dausset J. et Pla M.
Flammarion; 1-10 (1985).
6. DEGOS L.
Le système HLA
Médecine / Sciences 3; 616-617 (1987).
7. KAHN A.
La troisième dimension pour les molécules de classe I
du complexe majeur d'histocompatibilité : un cristal
HLA - A₂.
Médecine / Sciences 4; 52-54 (1988).

8. KOURILSKY P., CLAVERIE J.M.
Le modèle du soi peptidique.
Médecine / Sciences 4; 177-183 (1988).
9. PARHAM P.
Presentation and processing of antigens in Paris.
Immunology today 9; 65-68 (1988).
10. BODMER W.F.
Evolutionary significance of the HLA system -
Nature 237; 139-145 (1972).
11. BRODSKY F.M., STONE W.A. and PARHAM P.
of cows and Men. A comparative study of histocompatibility antigens.
Human Immunology 3; 143-152 (1981).
12. FELLOUS M.
Le groupe de liaison génétique du complexe HLA.
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed. Dausset J. et Pla M.
Flammarion; 69-72 (1985).
13. HAUPTMANN G., GOETZ J. et BURING-LAMBERT.
Le complexe HLA, classe III.
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed. Dausset J. et Pla M.
Flammarion; 120-136 (1985).
14. KLEIN J., FIGUEROA F., NAGY Z.A.
Genetics of the major histocompatibility
Complex : the final act.
Ann. Rev. Immunol. 1; 119-142 (1983).
15. COLLIGAN J.E., KINDT T.J.
Class I MHC antigens of mouse and human
in : Handbook of experimental immunology.
Blackwell scientific publications. Chap. 21 (1986).

16. CUSHLEY W., OWEN M.
Structural and genetic similarities between immunoglobulins and class I histocompatibility antigens.
Immunology today 4; 88-92 (1983).
17. SMITH L., STEINMETZ M., HOOD L.
The major histocompatibility complex of the mouse.
In : Handbook of experimental immunology.
Blackwell scientific publication. Chap. 87 (1986).
18. KAUFMAN J.F., AUFRAY C., KORMAN A.J., SHACKELFORD D.A., STROMINGER J.
The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex.
Cell 36; 1-13 (1984).
19. PURI N.K., GOGOLIN-EWENS K.J., BRANDON M.
Monoclonal antibodies to sheep MHC class I and class II molecules : biochemical characterization of three class I gene products and four distinct subpopulations of class II molecules.
Veterinary Immunology and Immunopathology 15; 59-86 (1987).
20. PARHAM P.
Histocompatibility typing. Mac is back in town.
Immunology today 9; 127-130 (1988).
21. ROITT I., BROSTOFF J., MALE D.
Immunologie fondamentale et appliquée.
Ed. Medsi sous la direction de W.H. Fridman (1985).
22. DEGOS L.
Système HLA, molécules de classe II.
Médecine / Sciences 4; 118-119 (1988).

23. COLOMBANI J.
Complexe majeur d'histocompatibilité et réponse
immunitaire.
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed. Dausset J. et Pla M.
Flammarion; 173-191 (1985).
24. CHARRON D.
Biochimie et expression moléculaire des produits HLA.
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed. Dausset J. et Pla M.
Flammarion; 138-153 (1985).
25. TROWSDALE J.
The human HLA-D region - A summary.
Veterinary Immunology and Immunopathology 17; 223-230
(1987).
26. CHARRON D.J., Mc DEVITT H.O.
Characterization of HLA-D region antigens by two -
dimensional gel electrophoresis.
J. exp. Med. 152; 18-36 (1980).
27. MARKERT M.L., CRESSWELL P.
Herman B Cell alloantigens : α subunit variability
The Journal of Immunology 128; 1999-2003 (1982).
28. SHACKELFORD D.A., STROMINGER J.L.
Demonstration of structural polymorphism among HLA-DR
light chains by two - dimensional gel electrophoresis.
J. exp. Med. 151; 144-165 (1980).
29. MACHAMER C.E., CRESSWELL P.
Biosynthesis and glycosilation of the invariant chain
associated with HLA-DR antigens.
The Journal of immunology 129; 2564-2569 (1982).

30. SHACKELFORD D.A., STROMINGER J.L.
Analysis of the oligosaccharides on de HLA-DR and DC 1B cell antigens.
The Journal of immunology 130; 274-288 (1983).
31. LECHLER R.I.
MHC class II molecular structure - permitted pairs ?
Immunology today 9; 76-78 (1988).
32. DAAR A.S., FUGGLE S.V., FABRE J.W., TING A., MORRIS D.J.
The detailed distribution of MHC classe II antigens in Normal humans organs.
Transplantation revieww 38; 293-298 (1984).
33. NATALI P.G., RUSSO C., AH KAN Ng., GIACOMINI P.,
INDIVERI F., PELLEGRINO M.A., FERRONE S.
Tissue distribution of human Ia kike anigens.
In : Ia antigens. Vol. II. Man and obher species.
Ed. Ferrone S., David C.S. CRC Press (19).
34. SPOONER R., LEVEZIEL H., GROSCLAUDE F., OLIVIER R.A.,
VAIMAN M.
Evidence for a possible major histocompatibility complex (BoLA) in Cattle.
Journal of Immunogeneties 5; 335-346 (1978).
35. AMORENA B., STONE W.H.
Serologically defined (S.D.) locus in Cattle.
Science 201; 159-160 (1978).
36. HUANG-XUAN M., CHARRON D., ZILBER M.J., LEVY D.
Biochemical charecterization of class II Bovine major histocompatibility complex antigens using cross - reactive antibodies.
Immunogenetics 15; 621-624 (1982).

37. EMERY D.L., PURI N.U., DUFTY J.H., GORREL M.D.,
BRANDON M.R.
A fonctionnal and biochemical analysis of bovine
class II MHC antigens using monoclonal antibodies.
Veterinary immunology and immunopathology 16;
215-234 (1987).
38. DAVIS W.C., MARUSI S., LEWIN H.A., SPLITTER G.A.,
PERRYMAN L.E., Mc GUIRE T.C., GORHAM J.R.
The development and analysis of species specific
and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte
differentiation antigens and antigens of the major
histocompatibility complex for use in the study of
the immune system in Cattle and other species.
Veterinary immunology and immunopathology 15;
337-372 (1987).
39. LETESSON J.J., COPPE P., LOSTRIE-TRUSSART N.,
DEPELCHIN A.
A bovine Ia like antigen detected by a xenogenic
monoclonal antibody.
Animal blood groups and biochemical genetics 14;
239-250 (1983).
40. LETESSON J.J., COPPE P., LOSTRIE-TRUSSART 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).
41. FRIES R., HEDINGER R., STRANZINGER G.
Tentative chromosomal localization of the bovine major
histocompatibility complex by in situ hybridization.
Animal genetics 17; 287-294 (1986).

42. VAIMAN M.
MHC in farm animals.
Animal genetics 18; supplement 1; 7-10 (1987).
43. STEAR M.J., NEWMAN M.J., NICHOLAS F.W.
Two closely linked loci and one apparently independent
locus code for bovine lymphocyte antigens.
Tissue antigens 20; 289-295 (1982).
44. HUANG-XUANG M., LEVEZIEL H., ZILBER M.T., PARODI A.L.,
LEVY D.
Immunochemical characterization of major histocompati-
bility antigens in Cattle.
Immunogenetics 15; 207-211 (1982).
45. TEALE A.J., MORRISON W.I., GODDEERIS B.M., GOOCOCK C.M.,
STAGG D.A., SPOONER R.L.
Bovine alloreactive cytotoxic cells generated
in vitro : target specificity in relation to BoLA
phenotype.
Immunology 55; 355-362 (1985).
46. USINGER W.R., CURIE-COHEN M., STONE W.H.
Lymphocyte- defined loci in Cattle.
Science 196; 1017-1018 (1977).
47. USINGER W.R., CURIE-COHEN M., BENFORADO K., PRINGNITZ D.,
ROWE R., SPLITTER G.A., STONE W.H.
The bovine major histocompatibility complex (BoLA) :
close linkage of the genes controlling serologically
defined antigens and mixed lymphocyte reactivity.
Immunogenetics 14; 423-428 (1981).
48. MACKIE J.T., STEAR M.J., DAVIS W.C., BATH M.L.
Monoclonal antibodies to bovine major histocompatibility
system antigens.
Soumis pour publication dans experimental and clinical
Immunogenetics.

49. SIGURDARDOTTIR S., LUNDEN A., ANDERSSON L.
Restriction fragment length polymorphism of DQ and DR class II genes of the bovine major histocompatibility complex.
Animal genetics 19; 133-150 (1988).
50. LEPAGE V., RAFFOUX C.
Polymorphisme serologique des antigènes de classe II : les séries alléliques DR, DQ, DP.
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed.: Dausset J. et Pla M. Flammarion; 89-100 (1985).
51. TERASAKI P.L., Mc CLELLAND J.D.
Microdroplets assay of human cytotoxins.
Nature 204; 998-1000 (1964).
52. VAN DER POEL J.J., MOELDERS H., THOMPSON P., PLOEGH H.L.
Definition of four HLA-A₂ subtypes by CML typing and biochemical analysis.
Immunogenetics 17; 609-621 (1983).
53. NEEFJES J.J., BREUR-VRIESENDORP B.S., VAN SEVENTER G.A., IVANYI P., PLOEGH H.L.
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).
54. YANG S.Y. et al.
Comparison of one dimensional Ief patterns for serologically detectable HLA-A and B allotypes.
Immunogenetics 19; 217-231 (1984).
55. ANDERSON L., BOHME J., RASK L., PETERSON P.A.
Genomic hybridization of bovine classe II major histocompatibility genes : 1. Extensive polymorphism of DQ α and DQ β genes.
Animal genetics 17; 95-112 (1986).

56. WILLIAMS J.L., BROWN P., SPOONER R.L.
Approach to MHC polymorphism in Cattle.
Animal genetics 19; supplement 1; 36-38 (1988).
57. HORS J.
HLA et maladie
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed.: Dausset J. et Pla M.
Flammarion; 227-256 (1985).
58. BUSSON M.
Le complexe HLA et les transplantations d'organes.
In : HLA, le CMH de l'homme. Ed.: Dausset J. et Pla M.
Flammarion ; 257-279 (1985).
59. LEWIN H.A., STEWART J.A., WU M.C.
Association between the bovine lymphocyte antigen
(BoLA) system and subclinical progression of bovine
leukaemia virus infection.
Animal genetics 18; supplement 1; 17-18 (1987).
60. STEAR M.J., NEWMAN M.J., NICHOLAS F.W., BROWN S.C.,
HOLROYD R.G.
Thick resistance and the histocompatibility system.
Aust. J. Exp. Med. Sci. 62; 47-52 (1984).
61. SOLBER H., SPOONER R.L., LIE O.
A possible influence of the MHC on mastitis.
Second World Congress on genetics applied to
livestock production. Madrid.
7; 368-371 (1982).
62. CHARRON D.J., Mc DEVITT H.O.
Analysis of HLA-D region associated molecules with
monoclonal antibody.
Proc. Natl., Acad. Sci., USA 76; 6567- 6571 (1979).

64. CARLSON G.P., KANEKO J.J.
Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood.
Proc. Soc. exp. biol. Med. 142; 853-856 (1973).
65. LEIBOLD W., BUSCHER G., LETESSON J.J., UCHANSKA-
ZIEGLER B., DAVIS W., FRIEDOFF K.T.
Different subsets of bovine mononuclear cells from one
individual established as lymphoblastoid cell lines
(Bo LCL) in vitro. Submitted to the 1st international.
Veterinary immunology Congress, 1986, Guelph, Canada.
66. LING N.R., KAY J.L.
Metabolic changes during lymphocyte stimulation
In : Lymphocyte stimulation. Ed. north Holland/
american elsevier ; 303-355 (1975).
67. 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).
68. JONES P.P.
Analysis of H-2 and Ia molecules by two- dimensional
gel electrophoresis.
The Journal of experimental medicine 146; 1261-1279
(1977).
69. BORDIER C.
Phase separation of integral membrane proteins in
Triton X-114 solution.
The Journal of biological chemistry 256; 1604-1607
(1981).
70. SILVER, HOOD.
Detergent solubilized H-2 alloantigens is associated
with a small molecular weight polypeptide.
Nature 249; 769 (1974).
71. GODING J.W.
Use of Staphylococcal protein A as an immunological
reagent.
Journal of immunological Methods 20; 241-253 (1978)

72. KESSLER S.W.
Use of Protein A bearing Staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells.
Methods in enzymology 73; Part B (1981).
73. COHEN B.B., MOXLEY M., CRICHTON D., DEANE D.L., STEEL C.M.
A mild procedure for separating polypeptide chains prior to immunoprecipitation and western blotting analysis.
Journal of Immunological methods 75; 99-105 (1984).
74. AARON P., TURKEWITZ C.P., SULLIVAN M.F., MESCHER M.F.
Large Scale purification of murine I-A^k and I-E^k antigens and characterization of the purified proteins.
Molecular immunology 20; 1139-1147 (1983).
75. THORELL J.I., JOHANSSON B.G.
Enzymatic iodination of polypeptides with I¹²⁵ to High specific activity.
Biochim. Biophys. Acta, 251; 363-369 (1971).
76. MARCHALONIS J.J., CONE R.E., SANTER V.
Enzyme iodination. A probe for accessible surface Proteins of normal and neoplastic lymphocytes.
Biochem. J. 124; 921-927 (1971).
77. PODUSLO J.F., RODBARD D.
Molecular Weight estimation using sodium Dodecyl Sulfate-Pore Gradient Electrophoresis.
Analytical Biochemistry 101; 394-406 (1980).
78. WEBER, OSBORN
Journal Biol. chem. 244; 4406 (1969).
79. LAEMMLI U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature 227; 680-685 (1970).

80. RIGHETTI P.G., DRYSDALE J.W.
Theory and fundamental aspects of IEF.
In : Isoelectric focusing. Laboratory techniques
in biochemistry and molecular biology.
Ed. : T.S. Work., E. Work; 357-373 (1980).
81. O'FARRELL P.H.
High resolution two-dimensional electrophoresis of
proteins.
The Journal of Biological Chemistry 250; 4007-4021
(1975).
82. BRAVO R.
In : Two-dimensional gel electrophoresis : A guide
for beginners.
Two-dimensional gel electrophoresis of proteins.
Ed. : R. Bravo, J.E. Celis (Academic Press); 3-36
(1984).
83. COTINOT C.
Contribution à l'étude des antigènes du complexe
majeur d'histocompatibilité bovin. Production d'Ac.Mo.
Expression des antigènes de classe I par les
embryons préimplantatoires.
Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de
3e cycle (1984).
84. GROVES M.L., GREENBERG R.
Complete amino acid sequence of bovine β_2 -micro-
globuline.
J. Biol. Chem. 257; 2619-2626 (1982).
85. NEEFJES J.J., DOXIADIS I., STAM N.J., BECKERS C.J.,
PLOEGH H.L.
An analysis of class I antigens of man and other
species by one dimensional Ief and immunoblotting.
Immunogenetics 23; 164-171 (1986).

86. WILLIAMS A.F., BARCLAY A.N.
Glycoprotein antigens of the lymphocyte surface and their purification by antibody affinity chromatography.
In : Handbook of experimental immunology.
Blackwell scientific publications, chap. 22; (1986).
87. GODING J.W.
Membrane and Secretory immunoglobulins : structure, biosynthesis, and assembly.
In : Handbook of experimental immunology.
Blackwell scientific publications, chap. 20 (1986).
88. HERRMANN S.H., MESCHER M.F.
Secondary Cytolytic T lymphocytes stimulation by purified H-2K^k in liposomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78; 2488 (1981).
89. TASHEVA B., DESSEV G.
Artifacts in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis due to 2 - mercaptoéthanol.
Analytical biochemistry 129; 98-102 (1983).
90. DALLMAN M.J., THOMAS M.L., GREEN J.R.
MRC OX-19 : a monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments in vitro proliferative responses.
Eur. J. Immunol. 14; 260-267 (1984).
91. NEWELL M.U., JUSTEMENT L.B., MILES C.R., FREED J.H.
Biochemical characterization of proteins that co-purify with class II antigens of the murine MHC.
The Journal of immunology 140; 1930-1938 (1988).

92. KRIEGER J., JENIS D.M., CHESNUT R.W., GREY H.M.
Studies on the capacity of intact cells and purified Ia from different B cell sources to function in antigen presentation to T cells.
The Journal of immunology 14; 388-394 (1988).
93. WEIGLE W.O
Factors and events in the activation, proliferation, and differentiation of B cells.
In : CRC Critical Reviews in Immunology
Vol. 7 Iss. 4; 285-324 (1987).
94. MOOSIC J.P., NILSON A., HAMMERLING G.J., Mc KEAN D.J.
Characterization of the 31 K polypeptide, Associated with I-A Subregion Ia antigens.
The Journal of immunology 125; 1463-1469 (1980).
95. LEVY D., HOANG-XUAN M., ZILBER M.
Biochemical analysis of products of the bovine major histocompatibility complex.
In : The ruminant immune system in health and disease.
Ed. W. Ivan Morrison; 152-167 (1988).

A B R E V I A T I O N S U T I L I S E E S

CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
IEF	: Isoélectrofocalisation
PI	: point isoélectrique
Ac	: anticorps
Ag	: antigènes
Mo	: monoclonal
IP	: immunoprécipitation
PM	: poids moléculaire
CML	: cell mediated lysis
MLR	: mixed lymphocyte reaction
Ig	: immunoglobuline
SDS	: sodium dodécyl sulfate
SDS-Page	: sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: phosphate buffer saline
PHA	: Phytohémagglutinine
HLA	: human leukocyte antigen
BoLA	: Bovine leukocyte antigen
NP40	: nonided P 40
TX 114	: Triton X 114
TCA	: trichloroacetic acid
SAC	: <u>Staphylococcus aureus</u> souche Cowan I
RAM	: rabbit anti-mouse
β_2^M	: β_2 microglobuline
PPO	: diphényl 2,5 oxazole
DMSO	: diméthylsulfoxyde
I^{125}	: Iode 125