



***Polycopié Pédagogique des Travaux
pratiques (TP)***

Matière :

Immunopathologie

Destiné aux étudiants

Niveau

Master -2- Génétique

Réalisé par

Dr. Yahia Massinissa - Maître de Conférences A - Université de Khenchela

Année Universitaire : 2023 - 2024

Canevas

Intitulé du Master : GENETIQUE

Semestre : S3

Intitulé de l'UE : METHODOLOGIE

Intitulé de la matière : IMMUNOPATHOLOGIE

Crédits :5

Coefficients :3

Objectifs de l'enseignement

Connaissances concernant le dysfonctionnement du système immunitaire en association avec des diverses pathologies.

Connaissances préalables recommandées

Immunologie

Contenu de la matière

I. Bases du système immunitaire :

1. Immunité cutanée
2. Immunité des muqueuses
3. Migration cellulaire/ homing
4. Hypersensibilité de type II-IV
5. Tolérance foeto-maternelle
6. Interactions système immunitaire et système nerveux et endocrinien

II. Système immunitaire en action

1. Immunité anti- infectieuse
2. Immunité des greffes et des tumeurs
3. Auto- immunité

Mode d'évaluation : *Contrôle continu, examen*

Références (*Livres et photocopiés, sites internet, etc*).

Table des matières

Liste des figures

Présentation de la matière

Sommaire

<i>TP 1 : Dissection de la souris et isolement des organes lymphatiques</i>	6
1.Principaux matériaux requis.....	8
1.1 Équipements.....	8
<i>TP 2 : Quantification de l'expression des gènes des cytokines (RT-PCR, évaluation de l'ARNm)</i>	12
1.Principaux matériaux requis.....	13
2.Protocole.....	14
2.I Isolement des splénocytes de souris.....	14
2.III - Isolement des cellules T.....	15
2.IV - Culture des cellules T.....	16
2.V. - Préparation de l'ARN	16
2.VI - Synthèse de l'ADNc	17
VIII - Électrophorèse en gel d'agarose d'un fragment d'ADN amplifié par PCR.....	20
<i>TP 3 : Mesure de la concentration de cytokine (ELISA)</i>	24
Quantification de l'INF γ par Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	25
Préparation des micro plaques (suite)	26
Procédure d'expérience	27
<i>TP 4 : Détection de la production de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux</i>	28
Réactifs, solution jetable nécessaires pour le TP 4.....	30
Réactifs	31
Articles jetables	31
Équipements	31
Protocole d'expérience	32
Marquage des marqueurs de surface.....	33

Liste des figures

Figure 1 : Vue de la face ventrale de la dissection.....	8
Figure 2 : Vue ventrale de la souris après incisions musculaires	10
Figure 3 : Cœur et appareil respiratoire	11
Figure 4 : Cœur et appareil respiratoire	11
Figure 5 : système d'électrophorèse sur Agarose	21
Figure 6 : Séquence d'ARNm de l'interféron γ de la souris	22
Figure 7 : Comparaison entre les séquences d'interféron γ souris et humaine.....	23
Figure 8 : Principe test d'ELISA.....	24
Figure 9 : microplaques pour ELISA	25
Figure 10 : principe de cytométrie en flux	29

Présentation de la Matière

L'immunopathologie est une branche de biologie médicale qui traite des réponses immunitaires associées aux maladies. Elle comprend l'étude de la pathologie d'un organisme, d'un système organique ou d'une maladie en ce qui concerne le système immunitaire, l'immunité et les réponses immunitaires. En biologie, il s'agit des dommages causés à un organisme par sa propre réponse immunitaire, à la suite d'une infection. Elle pourrait être due à un décalage entre l'agent pathogène et l'espèce hôte, et survient souvent lorsqu'un agent pathogène animal infecte un humain (p. ex., la grippe aviaire entraîne une tempête de cytokines qui contribue à l'augmentation du taux de mortalité).

Lorsqu'un antigène étranger pénètre dans l'organisme, il y a une réponse spécifique ou non spécifique à cet antigène. Ces réactions sont dues au système immunitaire qui combat les antigènes étrangers, qu'ils soient mortels ou non. L'immunopathologie pourrait faire référence à la façon dont les antigènes étrangers causent le système immunitaire d'avoir une réponse ou des problèmes qui peuvent découler de la propre réponse immunitaire d'un organisme sur lui-même. Il y a certains problèmes ou défauts dans le système immunitaire qui peuvent conduire à une maladie plus grave. Ces maladies peuvent provenir de l'un des problèmes suivants. La première serait des réactions d'hypersensibilité, où il y aurait une réponse immunitaire plus forte que la normale. Il existe quatre types différents (type un, deux, trois et quatre), tous avec différents types et degrés de réponse immunitaire. Les problèmes qui découlent de chaque type varient de petites réactions allergiques à des maladies plus graves comme la tuberculose ou l'arthrite. Le deuxième type de complication dans le système immunitaire est l'auto-immunité, où le système immunitaire s'attaquerait à lui-même plutôt qu'à l'antigène. L'inflammation est un excellent exemple d'auto-immunité, car les cellules immunitaires utilisées sont auto-actives. Le diabète de type 1, la maladie d'Addison et la maladie cœliaque sont quelques exemples de maladies auto-immunes. Le troisième et dernier type de complication avec le système immunitaire est l'immunodéficience, où le système immunitaire n'a pas la capacité de combattre une certaine maladie. La capacité du système immunitaire à le combattre est soit entravée, soit totalement absente. Les deux types sont l'immunodéficience primaire, où le système immunitaire est absent d'un composant clé ou ne fonctionne pas correctement, et l'immunodéficience secondaire, où la maladie est obtenue d'une source extérieure, comme le rayonnement ou la chaleur, et ne peut donc pas fonctionner correctement. Les maladies qui peuvent causer une immunodéficience comprennent le VIH, le sida et la leucémie.

Chez tous les vertébrés, il existe deux types de réponses immunitaires : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée est utilisée pour combattre les antigènes non résistants et est donc considérée comme non spécifique. Il s'agit habituellement d'une réponse plus immédiate que le système immunitaire adaptatif, qui répond habituellement en quelques minutes ou quelques heures. Il est composé de barrières physiques tels que la peau, mais contient également des cellules immunitaires non spécifiques telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les basophiles. La deuxième forme d'immunité est l'immunité adaptative. Cette forme d'immunité nécessite la reconnaissance de l'antigène étranger avant qu'une réponse soit produite. Une fois l'antigène reconnu, une réponse spécifique est produite afin de détruire l'antigène spécifique. En raison de cette idée, l'immunité adaptative est considérée comme une immunité spécifique. Un élément clé de l'immunité adaptative qui la sépare de l'inné est l'utilisation de la mémoire pour combattre l'antigène à l'avenir. Lorsque l'antigène est introduit à l'origine, l'organisme n'a pas de récepteurs pour l'antigène, il doit donc les générer dès la première fois que l'antigène est présent. Le système immunitaire construit alors une mémoire de cet antigène, ce qui lui permet de reconnaître l'antigène plus rapidement à l'avenir et d'être en mesure de le combattre plus rapidement et plus efficacement. Plus le système est exposé à l'antigène, plus vite il développera sa réactivité.

TP 1

Dissection de la souris et isolement des organes lymphatiques

TP N°1: Dissection de la souris et isolement des organes lymphatiques

Durée : 1 séance

1.Étape 1 : Matériel et préparation

Matériel nécessaire :

- 1 blouse
- 1 paire de gants
- 1 bac de dissection et/ou table de dissection
- du papier absorbant
- 1 trousse de dissection : 1 scalpel, 1 sonde cannelée, plusieurs pinces, deux paires de ciseaux, des aiguilles de fixation
- chloroforme
- coton

2.Étape 2 : Dessection

2.1 Incisions cutanées

La souris est étendue sur la cuvette à dissection, la face ventrale tournée du côté de l'opérateur.

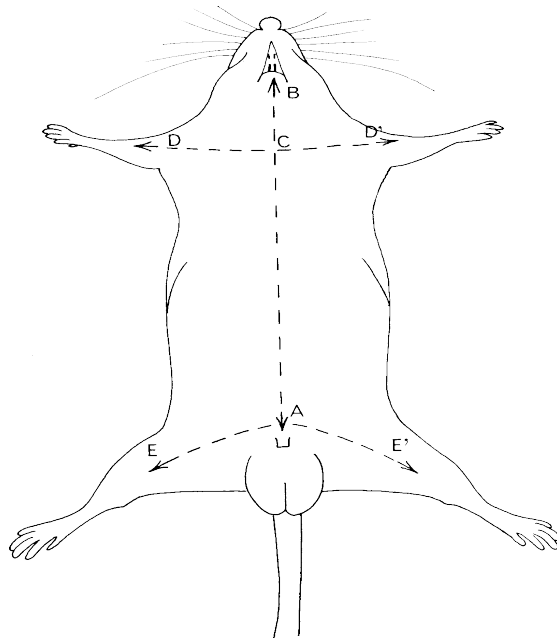


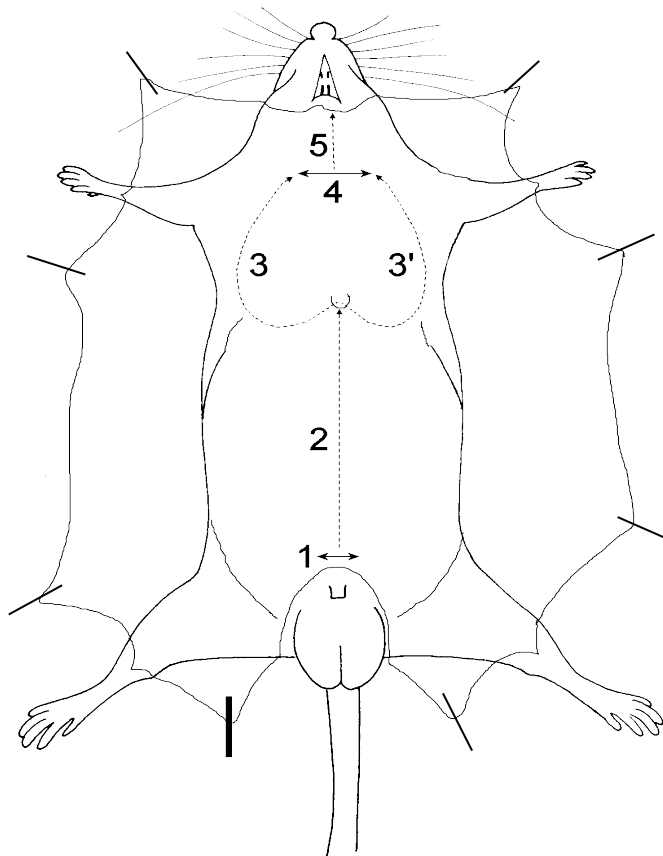
Figure 1 : Vue de la face ventrale de la dissection (GODINOT *et al.*, 2010).

- Etendre les membres et les fixer à la cuvette à l'aide d'épingles.
- Repérer l'orifice préputial chez les mâles ou l'orifice urinaire chez les femelles et inciser la peau avec des ciseaux fins.
- Dans l'ouverture, introduire une sonde cannelée, délicatement, jusqu'à la tête. Elle sert de guide aux ciseaux afin de ne pas percer la musculature et les viscères. Inciser.
- Au niveau du cou, faire attention aux glandes salivaires, très superficielles.
- Ouvrir de la même manière dans les membres antérieurs et postérieurs.
- Séparer à la main la peau de la musculature, la rabattre sur les côtés et l'épingler.

ouverture de la cavité abdominale et de la cage thoracique

2.2 Incisions musculaires :

- Pincer la paroi abdominale avec une pince en avant de l'orifice urinaire et faire une petite boutonnière avec des ciseaux. (1)
- Introduire une sonde cannelée jusqu'au thorax et inciser jusqu'à la pointe du sternum. (2)
- Découper le thorax selon (3) et (3') en faisant très attention au cœur et aux poumons ainsi qu'aux vaisseaux sanguins. Terminer d'ouvrir le thorax. (4)
- Inciser selon (5). Rabattre et épingler.



Ouverture de la cavité abdominale et de la cage thoracique

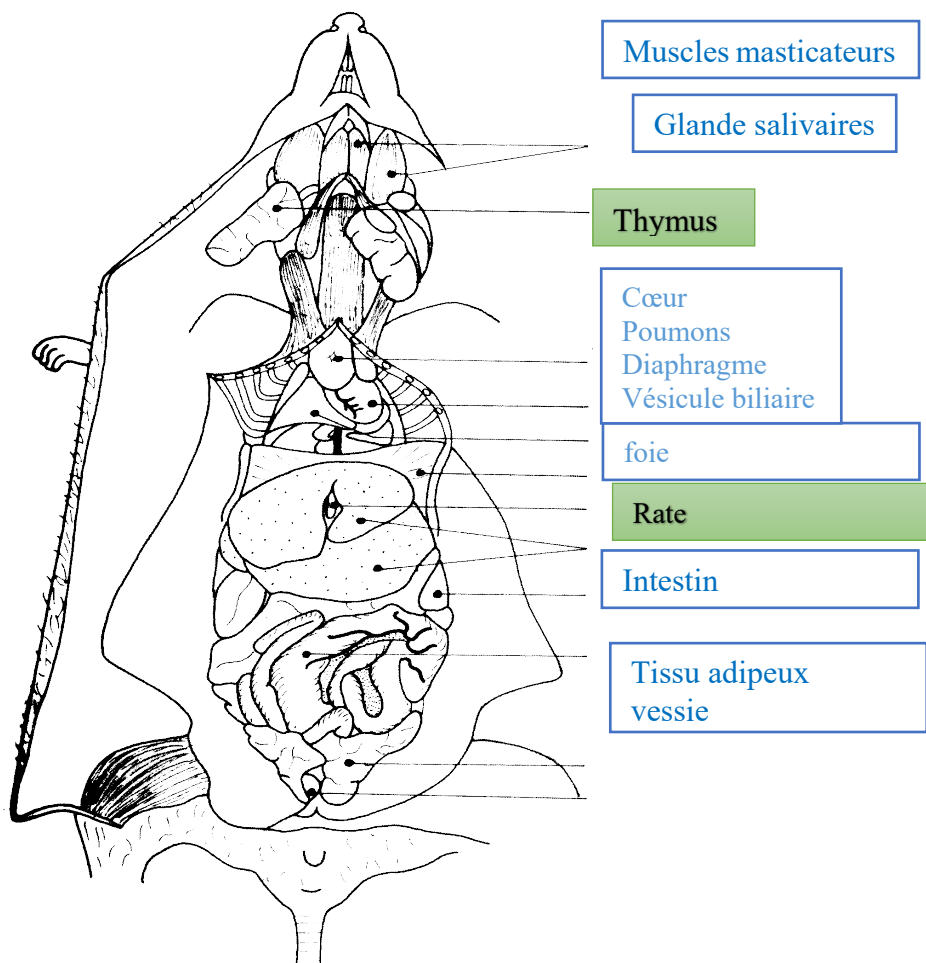


Figure 2 : Vue ventrale de la souris après incisions musculaires. (GODINOT *et al.*, 2010).

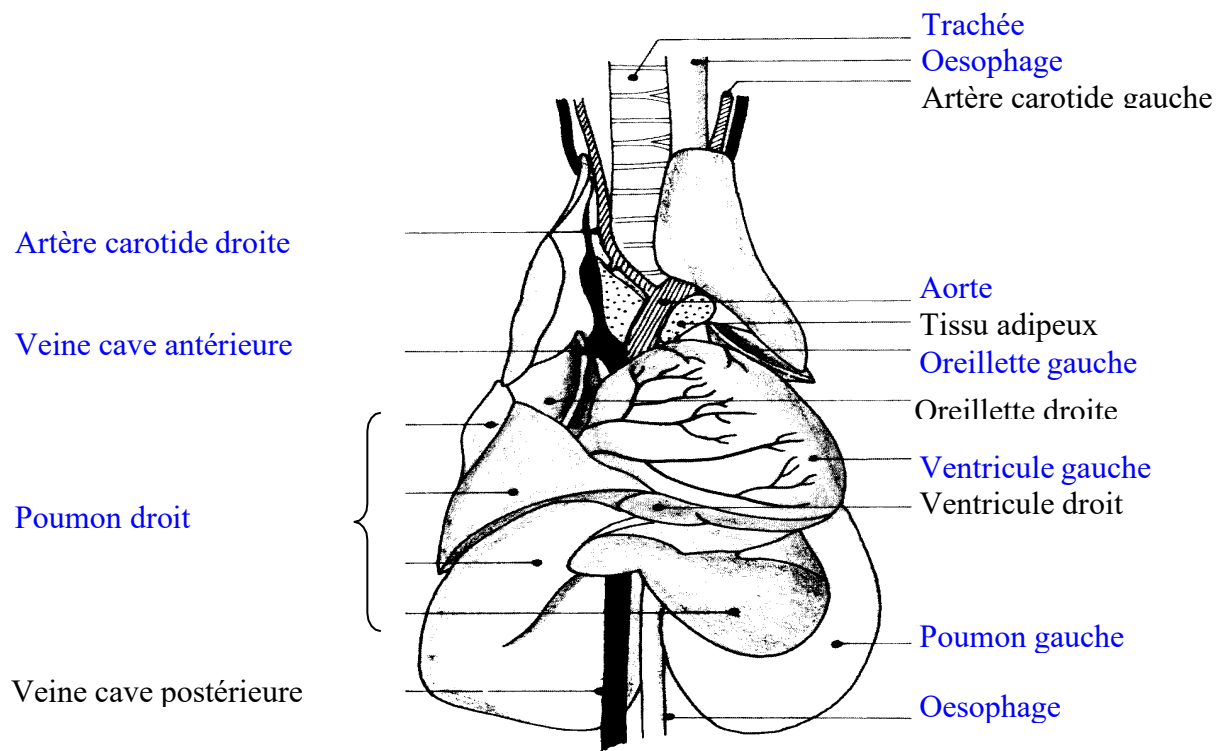


Figure 3 : Cœur et appareil respiratoire (GODINOT *et al.*, 2010).

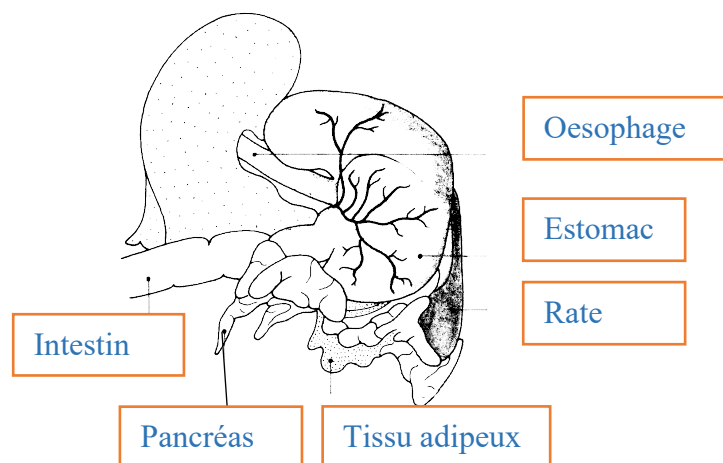


Figure 4 : Cœur et appareil respiratoire (GODINOT *et al.*, 2010).

TP N°2

Quantification de l'expression
des gènes des cytokines (RT-
PCR, évaluation de l'ARNm)

Tp N°2 : Quantification de l'expression des gènes des cytokines (RT-PCR, évaluation de l'ARNm)

Durée : 3 séances

Le but de cet atelier pratique est de déterminer les niveaux de cytokine par deux méthodes différentes : mRNA quantitative RT-PCR et technique ELISA.

L'objectif de cette session de laboratoire de 3 jours est de démontrer la puissance et les limites de ces deux approches, qui peuvent être appliquées à la fois dans la recherche fondamentale et clinique.

1. Principaux matériaux requis

1.1 Équipements

- Spectrophotomètre UV.
- Thermocycleurs.
- Micro-centrifugeuse avec contrôle de vitesse variable.
- Lecteur de plaques microtitrage.

2.2 Réactifs et tampons

NB : *l'eau utilisée dans ces protocoles doit être stérile, désionisée, de l'eau distillée. Tous les réactifs, plastique- et la verrerie doit être stérile.*

- Ethanol (75 %) keep at - 20°C.
- Isopropanol à 80 %.
- Taq DNA Polymerase (GeneAmp, Perkin-Elmer Cetus).
- 10 X TBE buffer: 0.89 M Tris; 0.89 M boric acid; 20 mM EDTA (pH = 8.3).
- Echelle intelligent
- Agarose NA (17-0554-01, -02, -03).
- 6X loading dye: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing 0.25 % bromophénol blue and xylene cyanol and 30 % glycerol.
- MgCl₂ 25 mM (sterile aqueous solution). dNTP (25 mM each dNTP in sterile water).

- 10X PCR buffer : 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 (25°C), 500 mM KCl 0.01% (w/v) gélatine (Sigma, n°G2500).
- TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) et 0.1 mM EDTA.
- Trizol (Invitrogen)
- Microtiter paltes Maxisorb
- PBS: 0.15 M Sodium chloride containing 0.01 M phosphate buffer pH 7.4.
- PBS-Tw: 0.15 M Sodium chloride containing 0.01 M phosphate buffer pH 7.4 and 0.05 % Tween 20.
- PBS-Tw-BSA: PBS-Tw solution containing 0.1 % bovine albumin. Enzyme-antibody conjugate diluted in PBS-BSA-Tw.
- Peroxidase substrate: Tetramethyl benzidine and hydrogen peroxide.

2.Protocole:

2.I. Isolement des splénocytes de souris

1. Les souris sont scarifiées.
2. Dans un capuchon, les animaux sont disséqués et la rate est prise.
3. Les rate sont dilacérées dans une boîte de Pétri contenant 5 ml de RPMI et 5 % de FCS en utilisant deux lames stériles en verre poli.
4. La suspension cellulaire est transférée dans un tube de 15 ml contenant 5 ml de RPMI et 5 % FCS.
5. Après 5 minutes sur la glace, la suspension cellulaire est décantée dans un nouveau tube de 15 ml.
6. Centrifuger (5 minutes à 300 x g) à 4 °C.

2.II - Lyse des érythrocytes

1. Décanter le surnageant.
2. Désorganiser la pile de cellules en « rayant » le tube.
3. Remettre les cellules dans le tampon de M-lyse qui a été dilué à 1X avec stérile eau distillée et rapidement vortex le tube.

Remarque : Nous recommandons d'utiliser 2 ml de solution 1X M-Lyse par rate traitée (environ 1 ml de 1X H-Lyse par 25 millions de splénocytes).

4. Incuber les cellules à température ambiante jusqu'à la fin de la lyse des globules rouges (10 minutes).

Ceci est facilement observé par un assombrissement de la couleur du fluide et l'élimination de la turbidité. L'exposition au tampon M-lyse pendant de plus longues périodes (c.-à-d. 30 minutes) réduira la viabilité cellulaire et le rendement total des leucocytes.

5. Laver les cellules en remplissant le tube avec le tampon de lavage 1X

Remarque : Le tampon de lavage doit être dilué avec de l'eau stérile à 1X avant utilisation.

6. Centrifuger les cellules pendant 10 minutes à 200 x g. Resuspendre les cellules en 1 ml de tampon de lavage de colonne 1X.

2.III - Isolement des cellules T

1. Pour chaque colonne à utiliser, préparer 20 ml de tampon de lavage de colonne 1X en mélangeant 2,0 ml de tampon de lavage de colonne 10X avec 18 ml d'eau distillée stérile.

Les colonnes ont une capacité de charge maximale de 100×10^6 cellules au total.

2. La colonne est placée dans un porte-colonne ou un support à anneaux. Le capuchon supérieur de la colonne est d'abord retiré pour éviter d'aspirer de l'air dans le bas de la colonne. Ensuite, le capuchon inférieur est retiré. Le liquide contenu dans la colonne peut s'écouler dans un récipient à déchets. Au cours de ce processus, l'extrémité extérieure de la colonne doit être rincée avec 70 % d'alcool pour assurer le traitement stérile de la colonne.

3. Le contenu de la colonne est ensuite lavé avec un total de 6 ml de tampon de lavage de colonne 1X et cet éluant est également laissé s'écouler dans le récipient à déchets. La colonne est maintenant prête à être chargée avec des cellules.

4. Le récipient à déchets est remplacé par un tube centrifuge stérile de 15 ml.

5. Une fois le tampon de la colonne vidé au niveau du filtre blanc, la suspension de cellules de 1 ml est appliquée en haut de la colonne. Les cellules entrent dans la colonne et déplacent le tampon de lavage contenu dans la colonne, qui est recueilli dans le tube de centrifugation stérile.

6. Les cellules, maintenant suspendues dans la colonne, sont incubées à température ambiante pendant 10 minutes.

7. Après l'étape d'incubation, les cellules T sont éluées de la colonne avec 4 aliquotes (2 ml chacune) de tampon de lavage de colonne 1X.
8. Les cellules T recueillies sont centrifugées à 250 x g pendant 5 minutes.
9. Jeter le surnageant et remettre la pastille dans 10 ml de RPMI contenant 5 % de FCS.
10. Compter les cellules sur un hémocytomètre à l'aide de Trypan blue.

2.IV - Culture des cellules T

1. Ajouter 10 ml de cellules en suspension à 10^6 /ml dans une fiole de culture.
2. Ajouter le PMA (ester Phorbol) à la concentration finale de 10 ng/ml et l'ionomycine à la concentration finale de 500 ng/ml.
3. Incuber à 37 °C avec 5 % de CO₂ pendant 4 heures (pour la méthode RT-PCR) ou pendant la nuit (pour la méthode ELISA).

2.V. - Préparation de l'ARN

1. Après une incubation de 4 heures, compter les cellules sur un hémocytomètre à l'aide de Trypan bleu.
2. Calculer le volume de la suspension correspondant à 10 millions de cellules.
3. Verser la suspension dans un tube stérile de 15 ml.
4. Centrifuger la suspension pendant 5 minutes à 1200 tr/min.

Des précautions spéciales doivent être observées pour éviter la dégradation des ARNm par les RNAses. Les réactifs et les produits en plastique ou en verre qui entrent en contact avec l'échantillon d'ARN doivent d'abord être traités au pyrocarbonate diéthylique (DEPC) pour inactiver les RNases contaminantes, puis autoclave selon les procédures standard. Il faut porter des gants pour éviter la contamination des échantillons par des nucléases provenant de la peau. Il faut utiliser des embouts de pipettes filtrantes.

5. Jeter le surnageant.
6. Remettre la pastille dans du trizol de 1 ml et verser la suspension dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
7. Garder le tube à température ambiante pendant 5 minutes.
8. Ajouter 200 µl de chloroforme ; utiliser une hotte chimique et de nouveaux gants.

9. Mélanger vigoureusement le tube pendant 15 secondes.
10. Garder 2 à 3 minutes sur le banc.
11. Centrifuger pendant 15 minutes à 4 °C à une vitesse maximale de 12 000 g.
12. Pipetter la phase aqueuse supérieure claire (environ 500-600 µl) dans un nouveau tube, garder le premier tube.
13. Ajouter 500 µl d'isopropanol dans le nouveau tube, mélanger et conserver à température ambiante pendant 10 minutes.
14. Centrifuger pendant 10 minutes à +4 °C, 12 000 g maximum.
15. Transférer le surnageant dans un autre tube Eppendorf et laver la pastille en ajoutant 1 ml d'éthanol (75 % dans 0,1 % d'eau traitée DEPC) sur la pastille. Mélanger.
16. Centrifuger pendant 5 minutes à +4 °C, 7 500 g.
17. Transférer le surnageant dans un autre tube d'Eppendorf et sécher le granulé sous vide pendant 5 à 10 minutes.
18. Resuspendre la pastille dans 50 µl d'eau traitée DEPC
19. Placer le tube dans un bloc chauffant (55 °C – 60 °C) pendant 5 à 10 minutes.
20. Quantifier l'ARN à l'aide d'un spectrophotomètre (260 nm). Vider le spectrophotomètre avec de l'eau. Relever l'échantillon d'ARN à 260 nm et 280 nm. Calculer la pureté de l'échantillon en divisant la lecture 260 par la lecture 280. Un rapport A260/280 d'au moins 1,8 est requis. Multiplier la lecture 260 par 37 pour obtenir la concentration de l'ARN en µg/ml.
21. La préparation d'ARN est entreposée congelée à – 20 °C ou de préférence à – 70 °C.

2.VI - Synthèse de l'ADNc

La transcriptase inverse MMLV est utilisée dans la réaction d'ADNc du premier brin pour générer l'ADNc à partir de l'ARNm. Avant la synthèse de l'ADNc de premier rang, l'ARNm en suspension dans l'eau libre d'RNase est chauffé pour éliminer toute structure secondaire qui pourrait entraver la réaction.

1. Utiliser 200 ng à 1 µg d'ARN pour la réaction du premier brin. Préparer la réaction suivante dans un tube de microcentrifuge de 200 µl

ARNm X µl

Eau libre de RNase X µl

Amorces Oligo dT (100 µM) 0,5 µl Volume total 32,6 µl

2. Chauffer l'ARNm à 65 °C pendant 5 minutes et refroidir immédiatement sur la glace. Démarrer la réaction à l'ADNc du premier brin (ci-dessous) dans les 2 minutes suivant la mise sur la glace.
3. Pendant l'incubation, préparer la solution mère à l'aide du tableau ci-dessous.

dNTP (25 mM) 0,4µl
Tampon 5X 10µl
DTT 0,1 M 5µl
RNASin 1µl
RT-MMLV 1µl
Volume total 17,4µl

Mélanger la solution par inversion, puis faire tourner le tube à 1000 x g pendant 5 secondes.

4. Transférer 17,4 µl de la solution mère dans le tube à réaction du premier brin.
5. Incuber pendant 70 minutes à 37 °C.
6. Arrêter la réaction en incubation pendant 15 minutes à 70 °C. Puis stocker le tube à 4 °C. Alternativement, la réaction entière peut être effectuée en utilisant un thermocycleur. Utilisez le programme suivant :
1 cycle de : 65 °C pendant 5 minutes / Pause / 1 cycle de : 37 °C pendant 70 minutes, 70 °C pendant 15 minutes, maintien à 4 °C.

2.VII - PCR Amplification

L'ADNc du premier brin est utilisé comme modèle pour l'amplification par PCR afin de générer un fragment d'ADN spécifique à la cytokine. Les ARNm IFN γ seront les ARNm cibles pendant l'atelier (Fig. 1, Fig. 2).

Il peut être une bonne idée de quantifier un mRNA de gène domestique ainsi que l'ARNm cible. Ceci corrigera pour des quantités inégales d'ARNm dans l'ARN total. Les bons gènes d'entretien sont β -actine, APRT, HPRT ou glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Note : β -actine et G6PD sont haute expression, HPRT et APRT sont basse expression.

Normaliser avec un gène d'entretien qui est similaire à l'expression du gène d'intérêt.

Comme il peut y avoir une certaine variabilité dans la qualité de l'extraction d'ARN de jour en jour, essayez d'extraire tous les échantillons à analyser dans le même cycle, si possible.

Au cours de l'atelier, nous utiliserons l'ARNm G3PDH comme gène de maintenance (Fig. 3).

1. Étiqueter un tube comme IFN γ , un deuxième tube comme contrôle positif, un troisième tube comme contrôle négatif et un quatrième tube comme G3PDH.

2. Ajouter les réactifs indiqués ci-dessous aux tubes appropriés.

IFN γ

Eau distillée stérile 39,6 μ l
Tampon PCR 10X (sans MgCl₂) 5 μ l
MgCl₂ (50 mM) 1,5 μ l
dNTP (25 mM) 0,4 μ l
Amorces 1 et 2 (7,5 μ M chacune) 2 μ l
Taq ADN polymérase (5 unités/ μ l) 0,5 μ l
Réaction du premier brin 1 μ l
Volume total 50 μ l

contrôle positif

Eau distillée stérile 39,6 μ l
Tampon PCR 10X (sans MgCl₂) 5 μ l
MgCl₂ (50 mM) 1,5 μ l
dNTP (25 mM) 0,4 μ l
Amorces 1 et 2 (7,5 μ M chacune) 2 μ l
Taq ADN polymérase (5 unités/ μ l) 0,5 μ l
témoin positif d'ADNd. 1 μ l
Volume total 50 μ l

Contrôle négatif

Eau distillée stérile 40.6 μ l
Tampon PCR 10X (sans MgCl₂) 5 μ l
MgCl₂ (50 mM) 1,5 μ l
dNTP (25 mM) 0,4 μ l
Amorces 1 et 2 (7,5 μ M chacune) 2 μ l
Taq ADN polymérase (5 unités/ μ l) 0,5 μ l
Volume total 50 μ l.

G3PDH

Eau distillée stérile 40.6 μ l
Tampon PCR 10X (sans MgCl₂) 5 μ l
MgCl₂ (50 mM) 2 μ l
dNTP (25 mM) 0,1 μ l
Amorces 1 et 2 (10 μ M chacune) 2 μ l
Taq ADN polymérase (5 unités/ μ l) 0,5 μ l
Réaction du premier brin 5 μ l
Volume total 50 μ l

3. Mélanger délicatement avec une micropipette et faire tourner les tubes à 1000 x g pendant 5 secondes. Superposez chaque réaction avec 50 μ l d'huile minérale seulement si l'ajout d'huile minérale est une exigence pour votre cycleur thermique.

4. Placer le tube dans un thermocycleur et exécuter immédiatement le programme suivant :

IFN γ

1 cycle de : 94 °C pendant 4 minutes
30 cycles de : 94 °C pendant 45 secondes

55 °C pendant 45 secondes

72 °C pendant 45 secondes

1 cycle de : 72 °C pendant 10 minutes maintenir à 4 °C

G3PDH

1 cycle de : 30 cycles de : 94 °C pendant 2 minutes

94 °C pendant 30 secondes

61 °C pendant 45 secondes

72 °C pendant 45 secondes

1 cycle de : 72 °C pendant 10 minutes , Maintenir à 4 °C

VIII - Électrophorèse en gel d'agarose d'un fragment d'ADN amplifié par PCR

L'électrophorèse en gel d'agarose des aliquotes des produits PCR avec une quantité connue d'un fragment PCR standard fournit une estimation visuelle des quantités relatives des fragments d'IFN γ ou de G3PDH en fonction de leur intensité de bande dans un gel teinté de bromure d'éthidium.

Il est important que les tubes contenant des produits PCR ne soient pas ouverts dans la pièce où le PCR est installé.

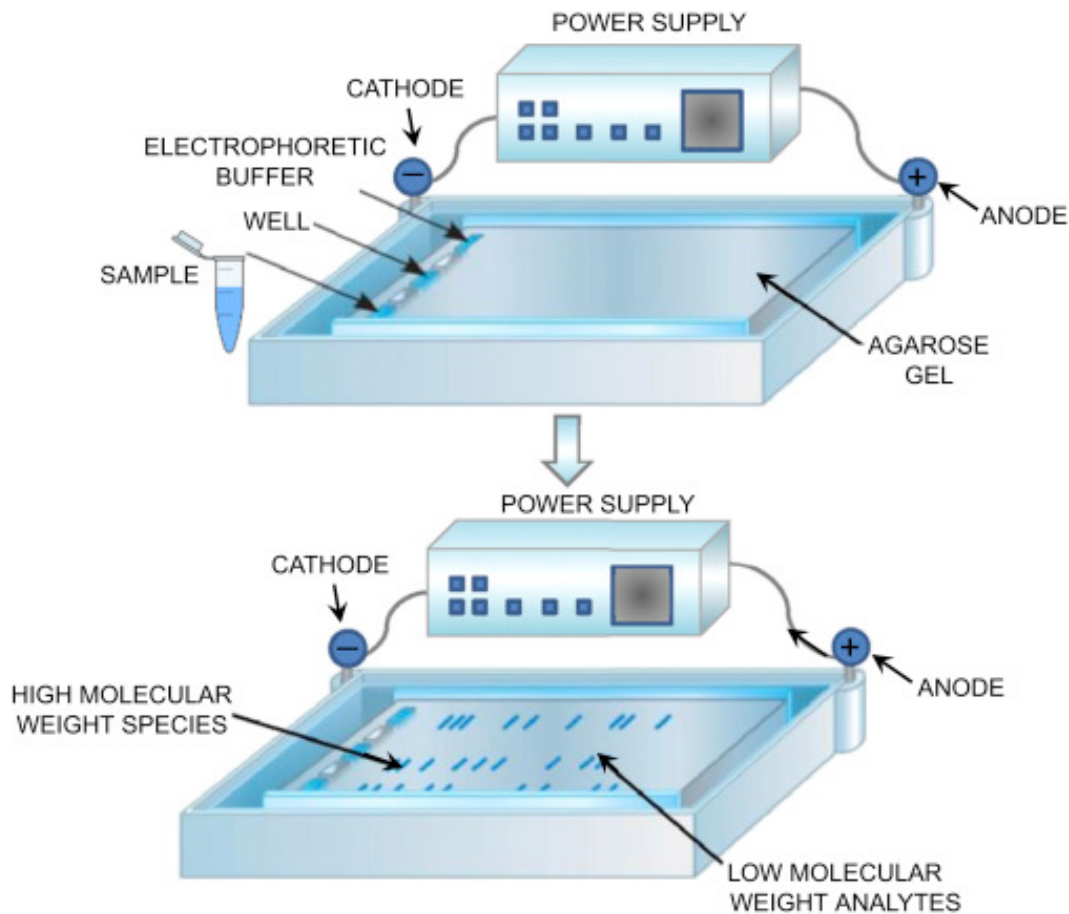


Figure 5 : système d'électrophorèse sur Agarose [Drabik ., *et al* 2016]

1. Avant utilisation, préparer un gel d'agarose à 1,2 % dans 1X TBE contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium avec des puits suffisants pour accueillir 15 µl d'échantillons.
2. Ajouter 2 µl du colorant de chargement 6X à 10 µl de chaque réaction d'amplification.
3. Charger chaque échantillon et 5 µl de Smart Ladder dans des puits séparés du gel d'agarose et de l'électrophorèse à 100 V pendant 1 heure.
4. Prendre une photo avec un film qui produit une image positive (Polaroid Type 66).
5. Procéder à l'analyse des données

Genomic Sequence:

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)

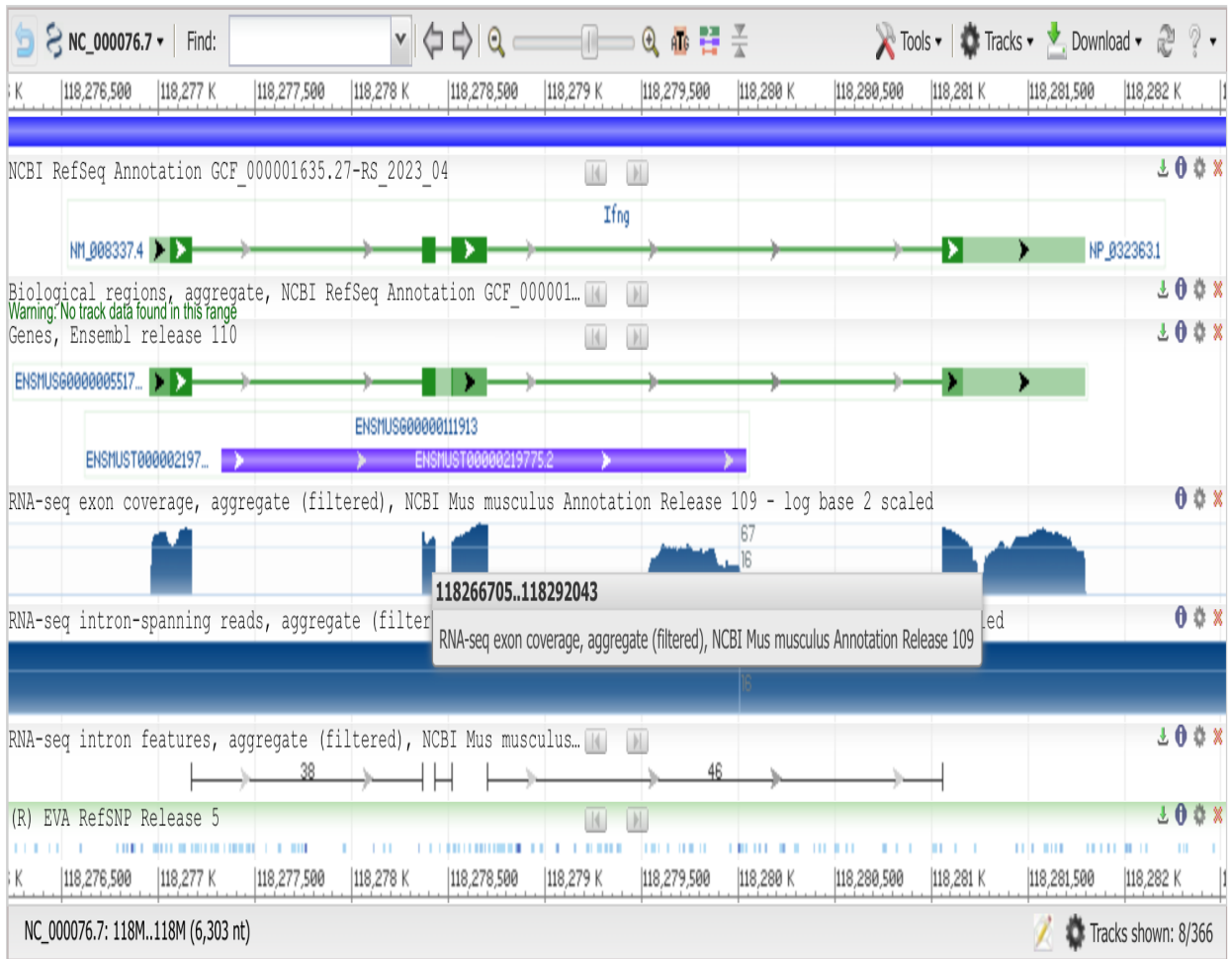


Figure 6 : Séquence d’ARNm de l’interféron g de la souris . (NCBI)

S1

Mouse MNATHCILALQLFLMAVS-GCYC
Human .KY.SY...F..CIVLG.L....

1 10 50

Mouse HGTVIESLES LNNYFNAGHS DV-EEKSLFLD IWRNWQKGD MKILQSQIIS
Human QDPYVKEA.N .KK...SSGI ..ADNGT...G .LK..KEES. R..M....V.

100

Mouse FYLRLFVCLK DNQAISNNIS VIESHLITTF FSNSKAKKDA FMSIAKFEVN
Human ..FK..KNF. .D.S.QKSVE T.KEDMNVK. .NSN.K.R.D .EKLTNYS.T

110

Mouse NPQVQRQAFN ELIRVVHQLL PESSLRKRKR SRC
Human DLN...K.IH ...Q.MAE.S .AAKTG.... .QM LFRGRRASQ

Figure 7 : Comparaison entre les séquences d'interféron γ souris et humaine (NCBI)

TP N°3

Mesure de la concentration de cytokine (ELISA)

TP N°3 : Mesure de la concentration de cytokine (ELISA)

Durée : 1 séance

Le but de cet atelier pratique est de déterminer les niveaux de cytokine par la technique ELISA et finaliser le TP n 2.

L'objectif de cette session de laboratoire d'une séance est de démontrer la puissance et les limites de cet approche, qui peuvent être appliquées à la fois dans la recherche fondamentale et clinique.

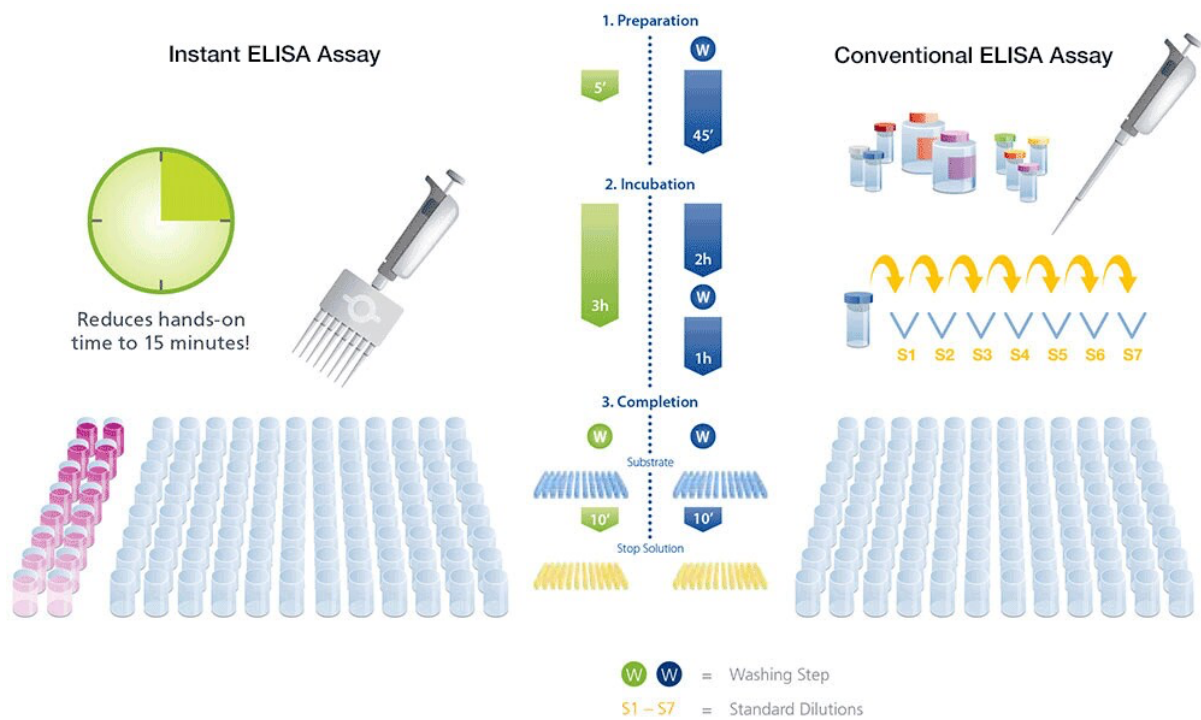


Figure 8 : Principe test d'ELISA [Thermofisher.com]

1. Quantification de l'INF γ par Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

1. Après la culture de nuit, centrifuger la suspension des cellules T pendant 5 minutes à 1200 rpm à 4° C.

2. Transférer le surnageant dans des tubes stériles de 15 ml. Les tubes sont stockés à 4° C jusqu'à l'étape de quantification.

2. Préparation des micro plaques : (suite)

3. Diluer l'anticorps de capture à la concentration de travail dans le PBS sans protéine porteuse. Enduire immédiatement une microplaque de 96 puits de 100 µl par puits de l'anticorps de capture dilué. Sceller la plaque et incuber pendant la nuit à température ambiante.

4. Aspirer chaque puits et laver avec le tampon de lavage, en répétant le processus deux fois pour un total de trois lavages. Laver en remplissant chaque puits avec du tampon de lavage (400 µL) à l'aide d'une bouteille d'eau, d'une pipette multicanaux, d'un distributeur collecteur ou d'un autolaveur.

5. L'élimination complète du liquide à chaque étape est essentielle pour un bon rendement. Après le dernier lavage, retirer tout tampon de lavage restant en l'aspirant ou en inversant la plaque et en la frottant contre des serviettes en papier propres.

6. Bloquer les plaques en ajoutant 300 µl de tampon de bloc à chaque puits. Incuber à température ambiante pendant au moins 1 heure.

7. Répéter l'aspiration/le lavage comme à l'étape 4. Les plaques sont maintenant prêtes pour l'ajout d'échantillons.

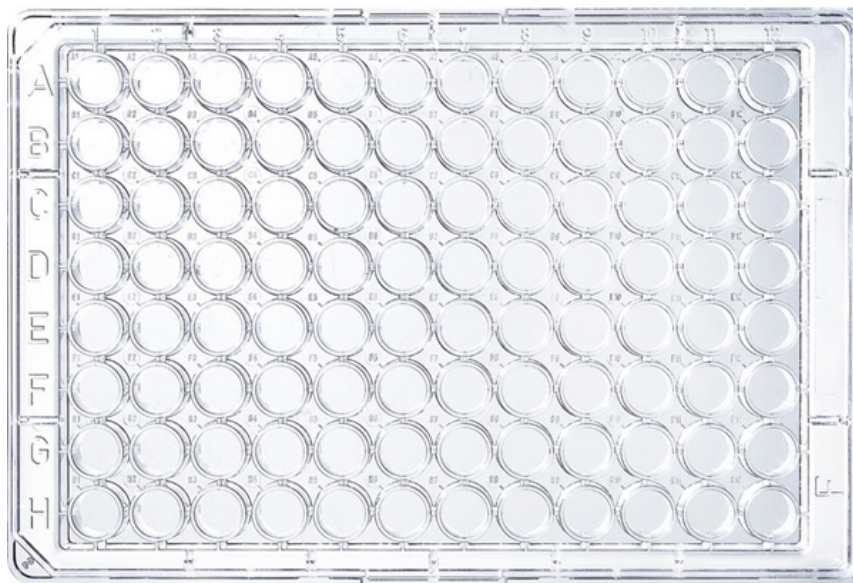


Figure 9 : microplaques pour ELISA

Procédure d'expérience :

8. Ajouter 100 µl d'échantillon ou d'étalons dans le diluant réactif, ou un diluant approprié, par puits. Couvrir d'une bande adhésive et incuber 2 heures à température ambiante.
9. Répéter l'aspiration/le lavage comme à l'étape 4 de la préparation de la plaque.
10. Ajouter 100 µl de l'anticorps de détection, dilué dans le diluant réactif, à chaque puits. Couvrir d'une nouvelle bande adhésive et incuber 2 heures à température ambiante.
11. Répéter l'aspiration/le lavage comme à l'étape 2 de la préparation de la plaque.
12. Ajouter 100 µl de la dilution de travail de Streptavidin-HRP à chaque puits. Couvrir la plaque et incuber pendant 20 minutes à température ambiante. Évitez de placer la plaque en lumière directe.
13. Répéter l'aspiration/le lavage comme à l'étape 4.
14. Ajouter 100 µl de solution de substrat à chaque puits.
15. Incuber pendant 20 minutes à température ambiante. Éviter de placer la plaque à la lumière directe.
16. Ajouter 50 µl de solution d'arrêt à chaque puits. Tapoter doucement la plaque pour assurer un mélange complet.

17. Déterminer immédiatement la densité optique de chaque puits à l'aide d'un lecteur de microplaques réglé sur 450 nm. Si la correction de longueur d'onde est disponible, régler sur 540 nm ou 570 nm. Si la correction de longueur d'onde n'est pas disponible, soustraire les lectures à 540 nm ou 570 nm des lectures à 450 nm. Cette soustraction corrigera les imperfections optiques de la plaque. Les lectures effectuées directement à 450 nm sans correction peuvent être plus élevées et moins précises.

TP N°4

Détection de la production
de cytokines
intracellulaires par
cytométrie en flux

TP N°4 : Détection de la production de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux

Le but de cette étude pratique est de déterminer les niveaux de cytokines par la méthode de cytométrie en flux intracellulaire. Cette méthode peut être utilisée dans la recherche fondamentale et clinique pour des modèles humains et animaux.

Le principe de cette technique est de quantifier les cellules productrices de cytokines en détectant les cytokines par coloration d'anticorps et analyse de cytométrie en flux.

Le terme "cytométrie de flux" dérive de la mesure (mètre) des cellules uniques (cyto) au fur et à mesure qu'elles passent devant une série de détecteurs. Le concept fondamental est que les cellules s'écoulent une à la fois à travers une région d'interrogation où de multiples propriétés biophysiques de chaque cellule peuvent être mesurées à des taux de plus de 1000 cellules par seconde. Ces propriétés biophysiques sont ensuite corrélées avec les propriétés biologiques et biochimiques d'intérêt. Le haut débit des cellules permet aux cellules rares, qui peuvent avoir des différences inhérentes ou inductibles, d'être facilement détectées et identifiées à partir du reste de la population cellulaire.

La cytométrie en flux implique l'utilisation d'un faisceau de lumière laser projeté à travers un flux liquide qui contient des cellules, qui, lorsqu'elles sont frappées par la lumière focalisée, émettent des signaux qui sont captés par des détecteurs. Ces signaux sont ensuite convertis pour le stockage informatique et l'analyse des données, et peuvent fournir des informations sur diverses propriétés cellulaires.

Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

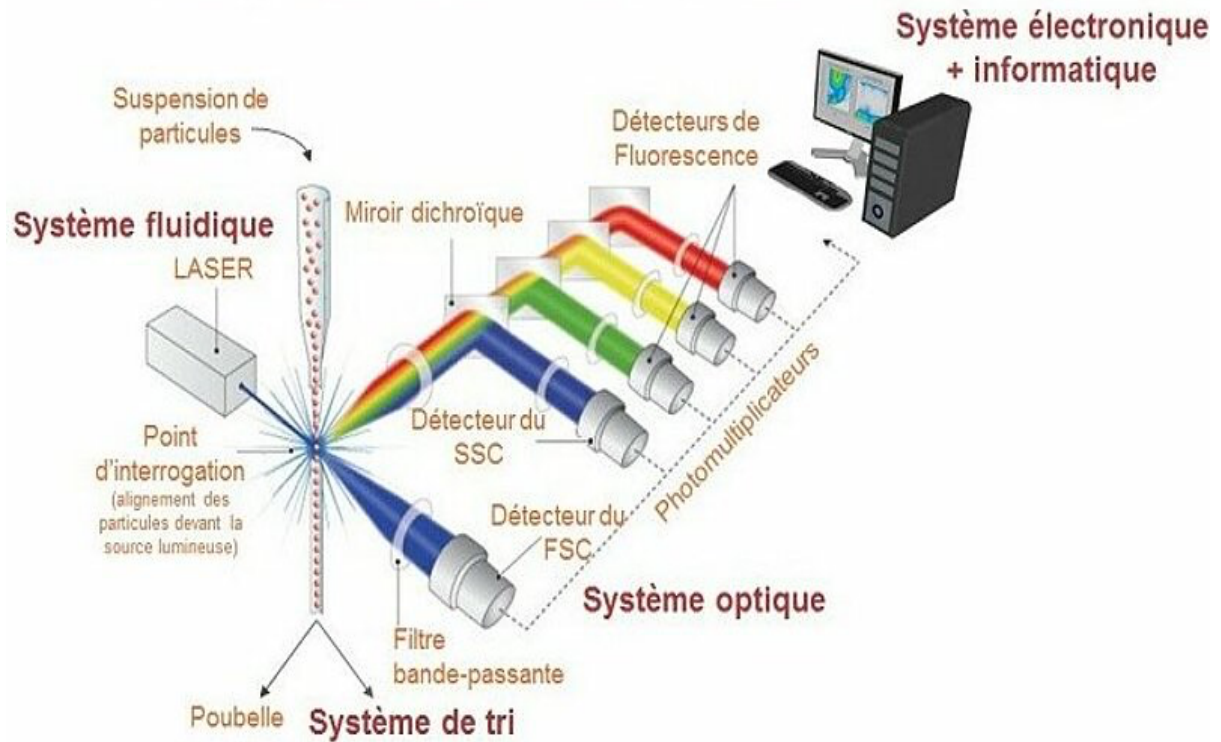


Figure 10 : principe de cytométrie en flux (Source : <https://www.univ-reims.fr/urcacyt>)

Réactifs, solution jetable nécessaires pour le TP 4

Anticorps :

anti-CD4-PE (clone H129.19) anti-CD3-FITC (145-2C11)

anti-IFN- γ -APC (clone XMG1.2) anti-IL-4-APC (clone 11B11)

anti-FcR II/III (clone 24G2)

Réactifs :

Sérum de veau fœtal Formaldéhyde 4 % . PBS 1 X

Sel de calcium ionomycine (sigma ref. I-0634, 1mg) Brefeldin A, 5mg)

Phorbol 12 Myristate 13 acétate (PMA, Sigma ref P-8139; 1mg) Saponine (Sigma ref S-7900)

Paraphormaldéhyde (PFA) 4 %

Solution de lavage et d'incubation : PBS 1X-3% FCS-0,1% NaN₃ (Azide). Solution de fixation : PFA 2% final

Tampon de perméabilisation : Permwash 1X (BD-Pharmingen) ou 1X PBS-3% FCS-0,5% Saponine

Articles jetables :

Béchers en papier absorbant

Tubes centrifuges « falcon » 15 ml Facs Tubes

96 plaques de micropuits

Flacons de culture Tissu 75 cm³ Gants taille L, M, S Pointes micropipette 200-1000 l Pointes micropipette 20-200 l Pipettes stériles 10 ml

Pipettes stériles 5 ml Glace

Équipements :

Outils de dissection

Incubateur de culture cellulaire CO₂ Culture cellulaire Hood

Cytomètre de flux

Malassez cytomètre Micropipettes 1000 l Micropipettes 200 l

Microscope Micropipette 20 l

Pipette multicanal 200 l Vortex

Centrifugeuse réfrigérée pour tubes de 15 ml

Protocole d'expérience :

1. Traitement des splénocytes de souris

- Les souris sont tuées par une exposition au CO₂ pendant au moins 5 minutes
- Disséquer l'animal pour prendre la rate
- Dilacérer la rate dans un RPMI stérile complété par du PS et transférer les cellules dans un tube de 15 ml.
- Après 5 minutes, la suspension cellulaire est décantée dans un nouveau tube de 15 ml.
- Centrifuger 5 min à 300 g et laver deux fois avec RPMI
- Remettre la pastille dans 10 ml de milieu cutané RPMI complet (500 ml RPMI avec glutamate complété avec 50 ml de sérum de veau fœtal, 5 ml streptomycine/pénicilline solution antibiotique, 5 ml Hepes 1M et 1 ml 2 mercaptoethanol).
- Compter les cellules sur un hémocytomètre.

2. Stimulation cellulaire

- **Remarque :** *Les temps de coupe indiqués dans ce protocole sont optimisés pour les temps de culture IL-10 et IFN pour une coloration optimale d'autres cytokines devront être déterminés empiriquement par l'investigateur en fonction du type de cellule utilisé et du processus de stimulation.*

- Diluer les cellules à $2,5 \times 10^6$ cellules/ml dans deux flacons de culture séparés.
- Ajouter 50 ng/ml de PMA + 500 g/ml d'ionomycine + 10 g/ml de brefeldine A dans un flacon.
- Incuber les fioles à 37 °C, 5 % de CO₂ pendant 3 à 4 heures.
- Récupérer les cellules après stimulation et laver 1X avec PBS , TRAVAILLER SUR GLACE.

- **Remarque :** La brefeldine A est un métabolite fongique qui perturbe la structure et la fonction de l'appareil de Golgi. Par conséquent, la sécrétion de protéines est inhibée et les protéines nouvellement synthétisées s'accumulent à l'intérieur des cellules. Ince il est toxique, Brefeldin A ne devrait pas être ajouté trop longtemps.

3. Marquage des marqueurs de surface

- Distribuer 1 x 10⁶ cellules/puits dans une plaque de 96 puits et les granuler par centrifugation 5 minutes à 1200 rpm.
- Incuber 30 min avec 50 l de 2.4G2 (anti-FcR II/III dilué à 1/100)
- Laver les cellules en ajoutant 200 l 1 X PBS contenant 3 % FCS (PBS-3 % FCS).
- Granulés par centrifugation 5 minutes à 1200 rpm.
- Incuber pendant 30 minutes à 4°C avec un marqueur anti-surface phycoerythrine (PE) ou un anticorps marqué FITC :
anti-CD4-PE : 1/400
anti-CD3-FITC : 1/800 dilué dans PBS-3%FCS.
- Laver 2 fois avec PBS-3%FCS.

4. Fixation

- Fixer les cellules marquées sur la surface avec 60 l de paraformaldéhyde (PFA) 2% final (diluer PFA%) pendant 1 heure à température ambiante en protégeant les cellules de l'exposition à la lumière.
- Centrifuger la plaque et laver une fois avec 200 l de Becton Dickinson PBS-3%FCS-0, 5% de saponine ou Permwash 1X
- Centrifuger 5 min à 1200rpm.

5. Coloration des cytokines intracytoplasmiques

- Incuber les cellules 30 min à 4°C avec
- 50 l anti-IFN -APC : 1/50

- ou anti- IL-4 APC : 1/50

Anticorps marqués par l'allophycocyanine (APC) dilués dans Permash 1X ou 1X PBS-3%FCS-0,5%Saponin. ***Protéger les cellules contre l'exposition à la lumière.***

- Laver deux fois dans Permash 1X ou 1X PBS-3%FCS-0,5%Saponine.
- Laver une fois dans PBS 1X-3%FCS.
- Resuspend les cellules dans 300 l PBS 1X-3%FCS pour effectuer une analyse de cytométrie en flux.

REFERENCES

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A et al. (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: New players and new insights. *J Clin Immunol.*;23:147–161.

Camper SA. (1987) Research applications of transgenic mice. *Bio- techniques* 5: 638.

Caramalho I, Nunes-Cabaço H, Foxhall R, Sousa AE. (2015) Regulatory T-cell development in the thy- mus. *Front Immunol.*;6:395.

Cell Affinity Chromatography: Principles and Methods, Pharmacia Booklet (1984) Pharmacia Ltd., Midsummer Blvd., Milton Keynes, MK9 3HP, England).

Channing-Rodgers RP. (1994) Clinical laboratory methods for detection of antigens and antibodies. In Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). *Basic and Clinical Immunology, 8th ed.* E Norwalk, CT: Appleton & Lange.

Fu H, Ward EJ, Marelli-Berg FM. (2016). Mechanisms of T cell organotropism. *Cell Mol Life Sci.*;73:3009–3033.

Ghetie, V., Mota, G., and Sjoquist, J, I. (1978) Separation of cells by affinity chromatography on SPA-Sepharose 6MB. *J. Immunol. Methods* 21,133-141.

Gibson G. (2004). *A Primer Of Genome Science, 2nd Ed.* Sunderland, MA: Sinauer. p. 308.

GODINOT, C., H. MOREAU, M. PAULHIAC-PISON & F. TEJEDOR (2010). *Biologie-Géologie Ire année BCPST-véto.* Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Harlow E, Lane D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hayao, A., Rossio, J. L., Ruscetti, F. W., Matsushima, K., and Oppenheim, J. J. (1986) Establishment of a human B cell line that proliferates in response to B cell growth factor. *J. Immunol. Methods* 90,111-123.

Heesters BA, Myers, RC, Carroll MC. (2014). Follicular dendritic cells: Dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol*;14:495–504.

- Hellstrom, U., Dillner, M. L., Hammarstrom, S., and Perlmann, P. (1976) The interaction of nonmitogenic and mitogenic lectins with T-lymphocytes: association of cellular receptor sites. *Scf272dJ. Immunol.* 5,45-55.
- Hudson L, Hay FC. (1989) *Practical Immunology, 3rd ed.* Oxford, UK: Blackwell.
- Hudson, L. and Hay, F. C. (1980) *Practical Immunology* (Blackwell Scientific Publications), pp. 212,213.
- Johnstone A, Thorpe R. (1987) *Immunochemistry in Practice.* Oxford, UK: Blackwell.
- Köhler G, Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495.
- Koller BH, Smithies O. (1992) Altering genes in animals by gene targeting. *Annu Rev Immunol* 10: 705.
- Liuzzi AR, McLaren J, Price DA, Eberl M. (2015). Early innate responses to pathogens: Pattern recognition by unconventional human T cells. *Curr Opin Immunol.*;36:31–37.
- Mac Lennan IC. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol.*;12:117–139.
- Mayforth RD. (1993) *Designing Antibodies.* San Diego, CA: Academic Press.
- Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K.I., *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications.* Springer. 2001.
- Mishell BB, Shiigi SM. (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology.* New York: Freeman.
- Morice WG. The immunophenotypic attributes of NK cells and NK lineage lymphoproliferative disorders. *Amer J Clin Path.* 2007;127:881–886.
- Muñoz MA, MBiro M, Weninger WT. (2014).Cell migration in intact lymph nodes in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 30:17–24.
- O'Garra A, Vieira P.(2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.*;10:801–805.

PCR quantitative. Techniques en Immunologie. Société Française d'Immunologie. Sonia Berrih-Aknin, ed. 2000.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. (2010) FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.*;10:490–500.

Tanoue T, Atarashi K, Honda K. (2016) Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.*;16:295–309.

Thompson KM. (1988) Human monoclonal antibodies. *Immunol Today* 9: 113.

Weir DM. (1986) *Handbook of Experimental Immunology, Vol. 12, 4th Ed.* Oxford, UK: Blackwell.

Winter G, Griffith AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12: 433.

