

Mise en évidence de lymphocytes de souris par immunofluorescence

Principe: le traitement des cellules eucaryotes par des ligands bi- ou multi-fonctionnels reconnaissant des antigènes ou des récepteurs protéiques trans-membranaires entraîne, du fait de la fluidité de la membrane cytoplasmique, un changement spectaculaire dans la distribution de ces protéines.

Le but de la manipulation est de marquer par immunofluorescence indirecte des récepteurs membranaires des lymphocytes B de souris. Les récepteurs membranaires sont ici les immunoglobulines trans-membranaires, caractéristiques des lymphocytes B, reconnues et pontées par des anticorps de chèvre anti-Ig de souris, l'ensemble étant révélé par des anticorps de lapin anti-Ig de chèvre conjugués à un fluorochrome (FITC, iso-thio-cyanate de fluorescéine).

On observe d'abord des micro-agrégations locales rapides des récepteurs liés qui donnent des images d'amas de surface, (les patches). Ce processus (appelé patching) est indépendant de l'énergie cellulaire et insensible à la température (il se produit à 4°C). Puis les patches coalescent ensuite lentement pour former un chapeau, un cap, à un pôle de la cellule. Ce deuxième processus, le capping, est provoqué par les composants du cytosquelette de la cellule et, en conséquence, il est dépendant de l'ATP et de la température (inhibition par des températures proches de 0°C). Le cap est ensuite soit internalisé, soit rejeté dans le milieu extérieur.

1. Matériel et réactifs

Par binôme :

- Souris (*Mus musculus*) de souche consanguine
- Matériel pour dissection
- Pipettes semi-automatiques
- Pipettes graduées de 5 et 10 mL avec propipette
- Tubes à centrifuger coniques de 15 mL
- Tubes de Kahn ou microtubes (type Eppendorf)
- Boîtes de Pétri
- Cellules de Malassez
- Bac à glace
- Pipettes Pasteur
- Papier aluminium et boîte hermétique
- Milieu de culture RPMI
- Sérum de chèvre anti-immunoglobuline de souris (sérum polyvalent anti-IgG, IgA et IgM)
- Sérum normal de chèvre
- Sérum de lapin anti-IgG de chèvre conjugué au FITC
- Tampon pour lyse des globules rouges
- Milieu de montage pour immunofluorescence
- Tampon phosphate de Dulbecco (PBS)

Par groupe de 4 :

- Bain thermostaté à 37°C
- Solution de bleu trypan pour test de viabilité
- Vortex

Par laboratoire :

- Centrifugeuse de table réfrigérée
- Microscopes à épifluorescence

2. Mode opératoire

Préparer une suspension cellulaire à partir de la rate de souris dans du tampon phosphate de Dulbecco (PBS).

Laver la suspension 1 fois par centrifugation (250g, 10 minutes, 4°C). Éliminer soigneusement le surnageant après la centrifugation puis dissocier le culot par agitation avant de rajouter le tampon de lavage (tampon pour lyse de globules rouge). Resuspendre le culot cellulaire dans 5 mL de PBS.

Numérer les lymphocytes viables et réaliser une suspension à 10^7 cellules viables/mL dans du milieu RPMI.

Distribuer 1 mL de cette suspension dans 5 tubes à centrifuger (voir tableau). Centrifuger (250g, 10 min, 4°C) pour obtenir des culots cellulaires et éliminer soigneusement les surnageants. Dissocier les culots par agitation.

Poursuivre selon le tableau suivant :

Tubes n°	100µL d'antisérum ajouté	Incubation	
		T°C	Temps (minutes)
1	Anti-Ig de souris	4°C	30
2	Sérum normal de chèvre	37°C	30
3	Anti-Ig de souris	37°C	5
4	Anti-Ig de souris	37°C	15
5	Anti-Ig de souris	37°C	30

Vous disposez de bac de glace pour l'incubation à 4°C et de bain thermostaté à 37°C.

En fin d'incubation, pour tous les tubes, ajouter 10 mL de milieu RPMI et les placer en attente dans la glace.

A la fin de toutes les incubations, centrifuger tous les tubes et effectuer un lavage supplémentaire en milieu RPMI (250g, 10 minutes, 4°C). Éliminer soigneusement les liquides de lavage.

Ajouter sur tous les culots cellulaires dissociés 100µL de sérum de lapin anti-IgG de chèvre conjugué au FITC.

Incuber 30 minutes à 4°C.

Laver les cellules 2 fois par centrifugation (250G, 10 minutes, 4°C) en milieu RPMI.

Resuspendre les culots cellulaires dans une goutte de milieu de montage pour immunofluorescence (Fluorep).

Placer une goutte de chaque suspension, sur une lame microscopique identifiée et recouvrir d'une lamelle. Les lames peuvent être conservées dans du papier d'aluminium (pour être observées plus tard et être stockées dans une boîte étanche à 4°C).

Observer au microscope à épifluorescence.

3. Résultats et compte-rendu

Schématiser le principe de la mise en évidence des récepteurs membranaires des lymphocytes B murins.

Indiquer le rôle du tube 2 et ce que vous attendez dans les autres tubes en justifiant.

Pour les tubes 3 à 5, sur 50 cellules fluorescentes, déterminer le pourcentage de cellules donnant les phénomènes de patching, de capping et éventuellement d'endocytose.

Les hématimètres

Ce sont d'épaisses lames de verre, creusées de rigoles qui délimitent des plates-formes :

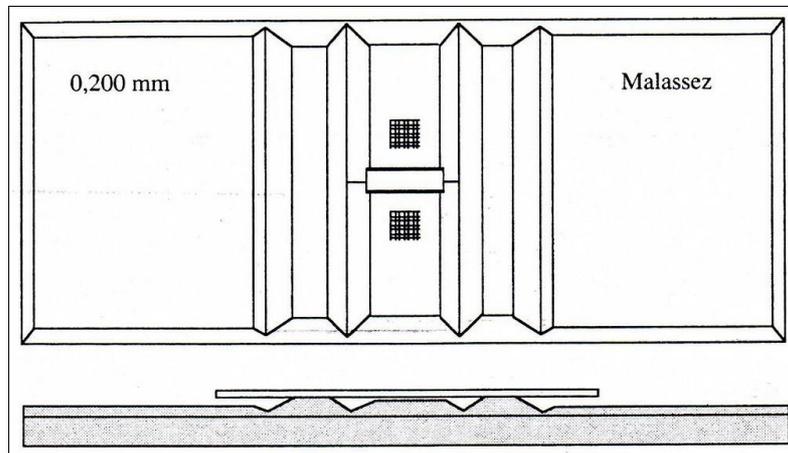
- deux plates-formes latérales élevées qui supporteront une lamelle épaisse et plane;
- une plate-forme centrale légèrement abaissée, sur laquelle sont gravés un ou deux quadrillages.

Les deux hématimètres les plus utilisés en hématologie sont :

- l'hématimètre de MALASSEZ ;
- l'hématimètre de THOMA.

Leurs quadrillages sont différents :

- le quadrillage de Malassez est constitué d'un grand rectangle;
- le quadrillage de Thoma est constitué d'un grand carré.



Le quadrillage de l'hématimètre de Malassez

