

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN
INSTITUT LUDWIG POUR LA RECHERCHE SUR LE CANCER
Unité de Bruxelles

**UN RETROVIRUS ENDOGENE DEFECTIF CODE
UN ANTIGENE RECONNU PAR DES
LYMPHOCYTES T CYTOLYTIQUES SUR UNE
LEUCEMIE MURINE SPONTANEE**

Figures des résultats : 2-1 à 2-10

Vinciane de Brouhoven de Bergeyck

Promoteur: Pr. T. Boon
Co-Promoteur: Pr. C. Remacle

**Dissertation présentée à la
Faculté des Sciences de l'Université catholique de Louvain
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences**

1994

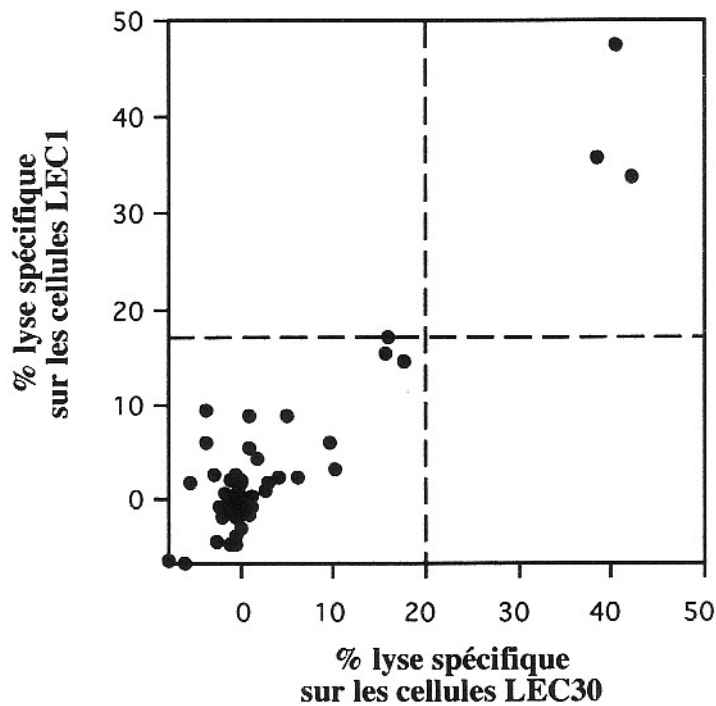


Figure II.1: Obtention de clones de lymphocytes T cytolytiques reconnaissant un antigène présent sur les cellules LEC.

48 microcultures ont été initiées avec 27 péritonéocytes, 10^3 cellules LEC1 irradiées (5.000 rads), 10^6 splénocytes syngéniques irradiés (3.000 rads) et 50% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires. Le volume de chaque microculture était de 200 μ l. Après 8 jours d'incubation à 37°C, 50 μ l de chaque microculture ont été transférés dans des micropuits contenant soit 2.000 cellules LEC1, soit 2.000 cellules LEC30 marquées au chrome-51. La lyse a été mesurée après 5h30 d'incubation. Chaque point représente l'activité lytique d'une microculture.

Les microcultures exerçant une activité lytique égale supérieure au relargage spontané + 5 déviations standard (indiqué par des lignes hachurées) ont été considérées comme positives. Le relargage spontané est le relargage moyen observé pour 48 micropuits contenant uniquement les cellules cibles.

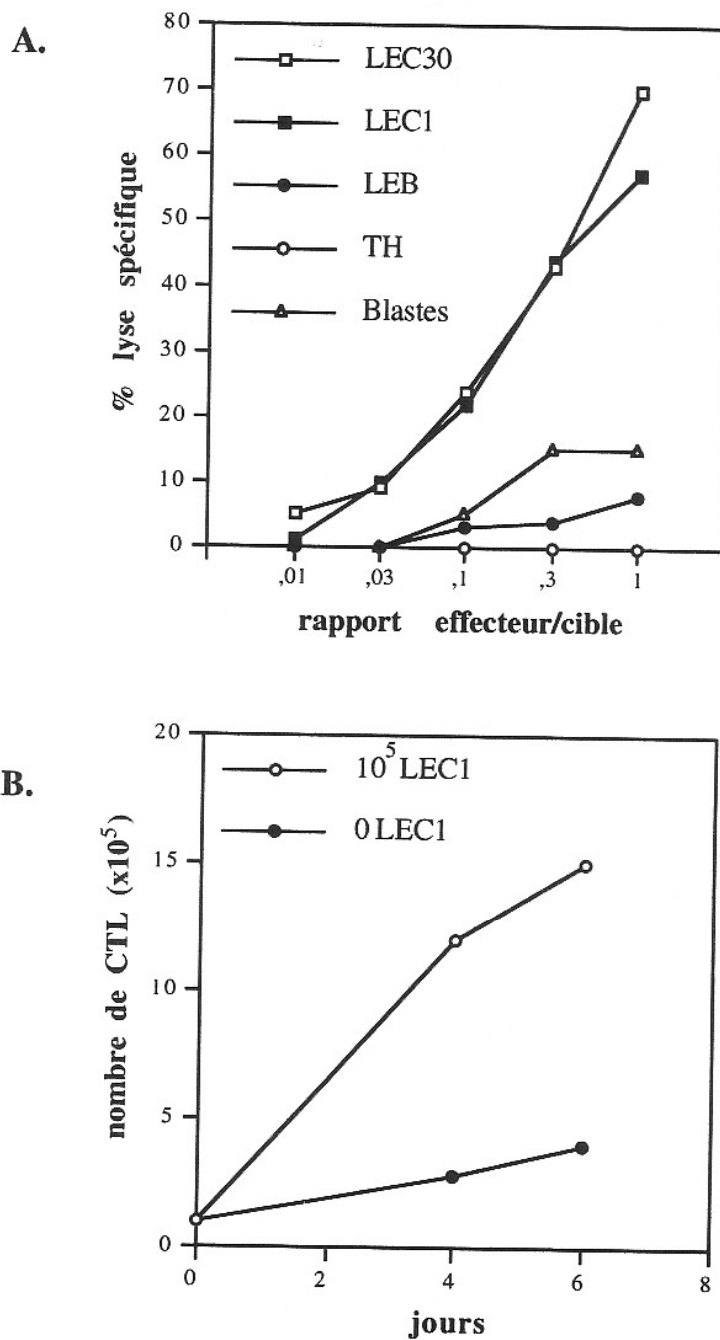


Figure II.2: Caractérisation des CTL-LEC1:5.

A. Les CTL-LEC1:5 lysent spécifiquement les cellules LEC. La radioactivité relarguée par les différentes cellules marquées au chrome-51 a été mesurée après une incubation de 6 heures à 37°C.

B. Les CTL-LEC1:5 dépendent de la présence de leur antigène pour proliférer. 10⁵ CTL ont été inoculés dans du milieu contenant 50% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires avec 5x10⁶ splénocytes syngéniques irradiés et soit 10⁵ cellule LEC1 irradiées, soit pas de cellule LEC1. Après 4 jours d'incubation à 37°C, les lymphocytes ont été comptés et dilués deux fois avec du milieu contenant 50% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires. Un second comptage a été effectué deux jours plus tard.

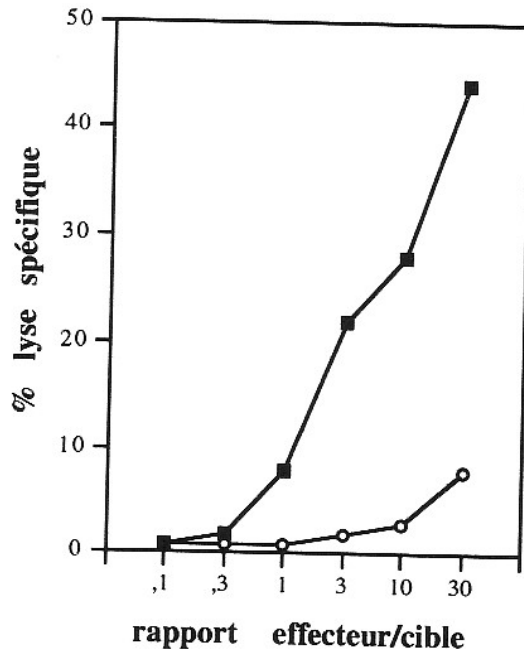


Figure II.3: Activité lytique des CTL-LEC1:5 sur les cellules LEC.aza^R et les fibroblastes DAP. La lyse a été mesurée après un test de relargage de chrome-51 de 4 heures pour les cellules LEC.aza^R (■) et de 6 heures pour les fibroblastes DAP (○).

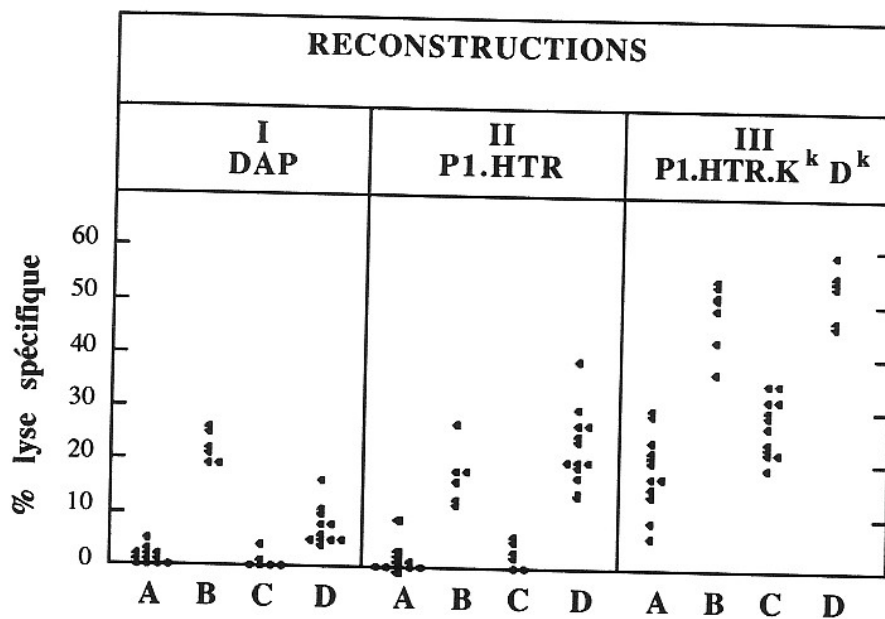


Figure II.4: Stimulation des CTL-LEC1:5 dans différentes conditions. 1.500 (reconstructions I et II) ou 2.000 (reconstruction III) CTL-LEC1:5, 10^6 splénocytes syngéniques irradiés, de l'IL-2r et du HAT ont été ajoutés dans des micropuits contenant:

- A: du milieu
- B: 2×10^3 cellules LEC.aza^R
- C: 6×10^4 cellules testées
- D: 2×10^3 cellules LEC.aza^R et 6×10^4 cellules testées

Après 6 jours, l'activité lytique de chaque microculture a été mesurée sur 2.000 (reconstruction I) ou 3.000 (reconstruction II et III) cellules LEC.aza^R marquées au chrome-51. Chaque point représente l'activité lytique d'une microculture après 4 heures d'incubation.

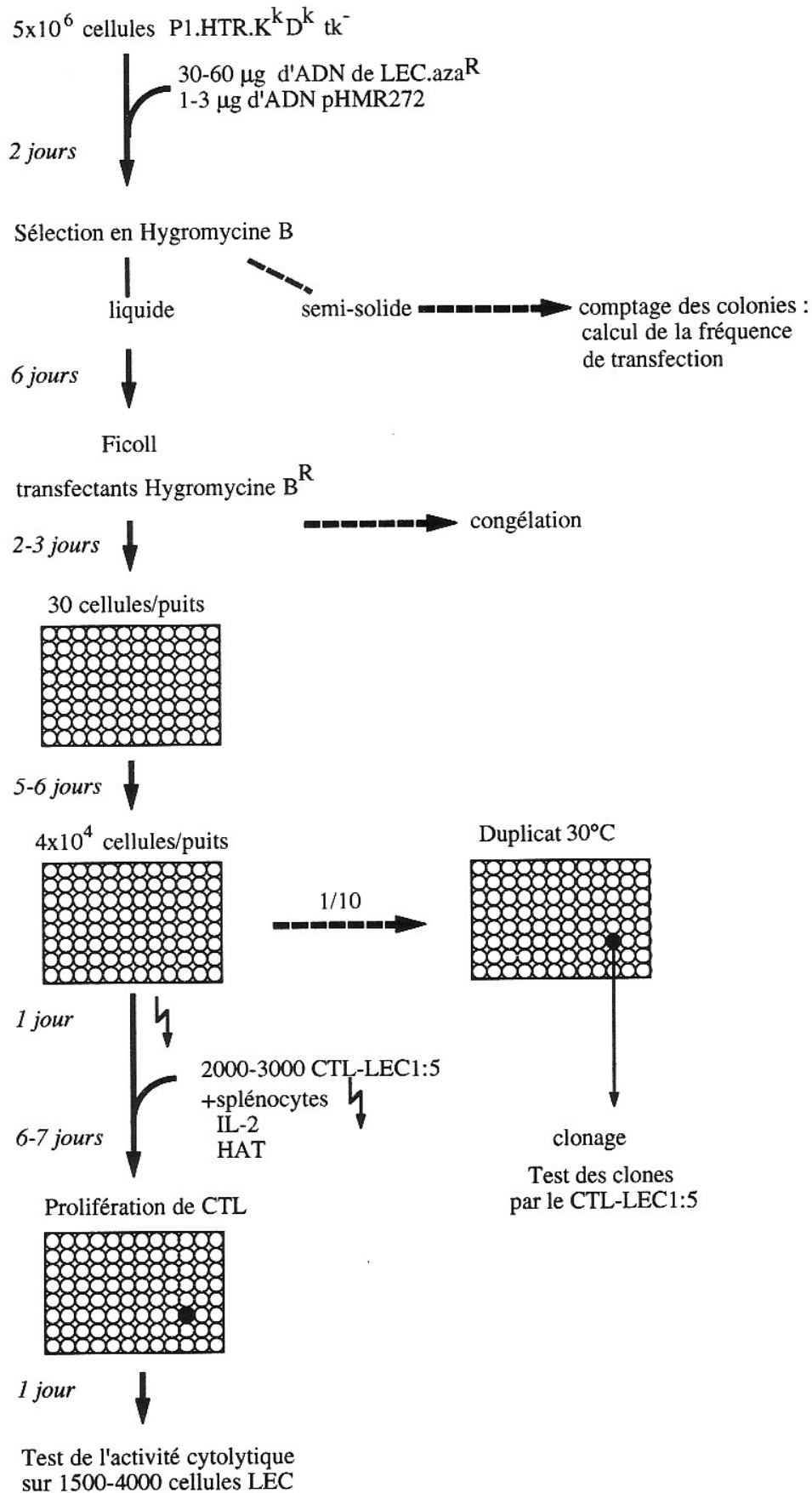


Figure II.5: Stratégie de transfection et d'analyse des transfectants.

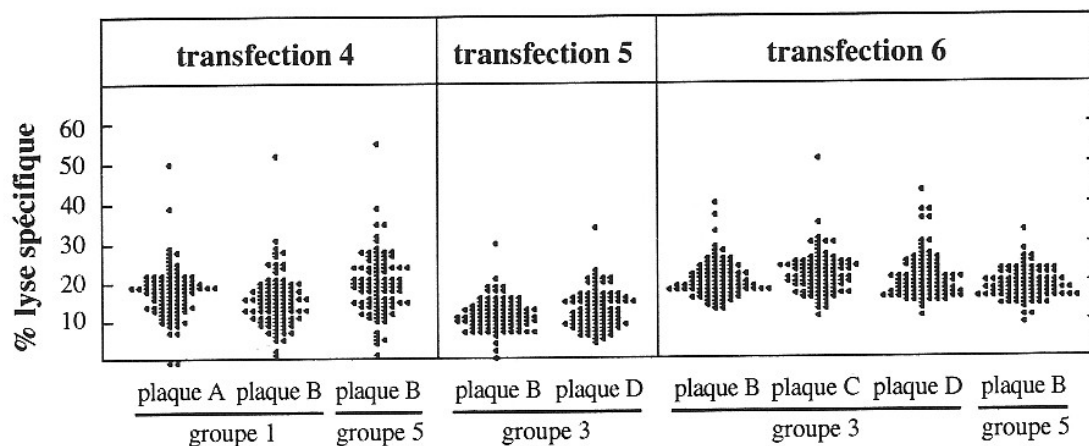


Figure II.6: Résultat des tests de stimulation effectués après cotransfection de l'ADN génomique des cellules LEC.aza^R et de l'ADN du cosmide pHMR272 dans les cellules P1.HTR.K^{kDk}.

Les transfectants résistants à l'hygromycine B ont été déposés dans des plaques à 96 puits à raison de 30 cellules par puits. Après environ une semaine, de 2.000 à 3.000 CTL-LEC1:5, 10⁶ splénocytes syngéniques irradiés, de l'IL-2r et du HAT ont été ajoutés dans chaque puits. Après quelques jours, les plaques ont été examinées au microscope. Une prolifération de lymphocytes a été observée dans plusieurs microcultures. L'activité lytique de toutes les microcultures des plaques contenant des puits positifs a été mesurée sur 1.500-4.000 cellules LEC marquées au chrome-51. Chaque point représente l'activité lytique d'une microculture après 4 heures d'incubation.

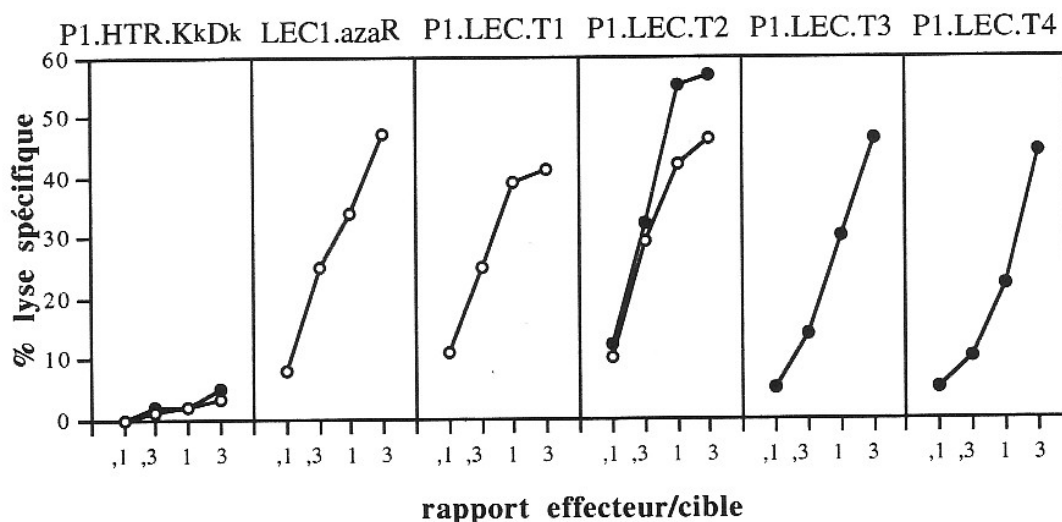


Figure II.7: Lyse des transfectants exprimant l'antigène LEC-A (P1.LEC.T1 à T4) et des cellules-contrôles (P1.HTR.K^{kDk} cl.6 et LEC.aza^R) par les CTL-LEC1:5 mesurée lors d'un test de relargage de chrome-51 de 4 heures. Les cellules ont été cultivées (●) ou non (○) en présence de 25% de surnageant de cultures lymphocytaires mixtes secondaires pendant 3 à 5 jours.

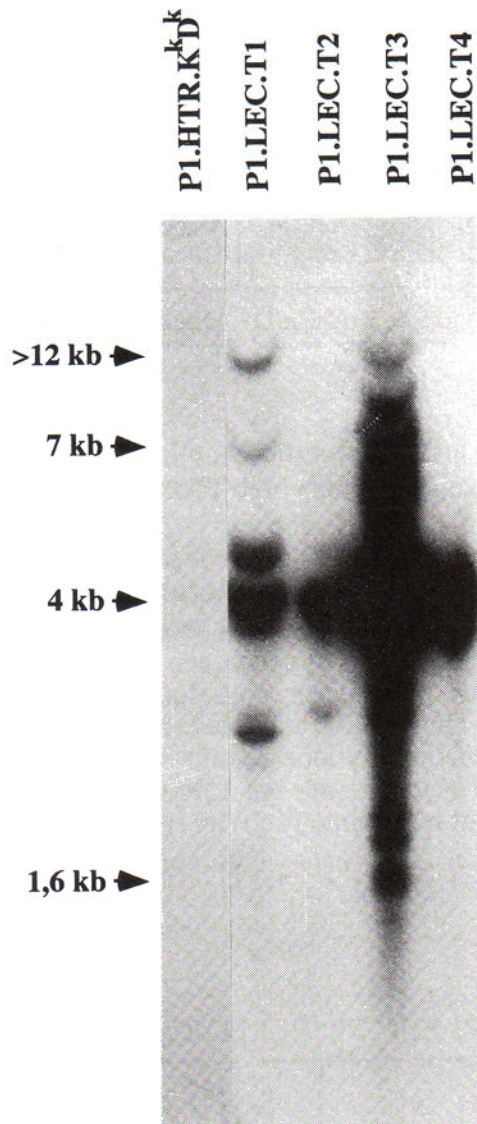


Figure II.8: Analyse par Southern blot de l'ADN des cellules P1.HTR.K^{kD} et des transfectants génomiques exprimant l'antigène LEC-A.

L'ADN génomique extrait des différentes cellules a été digéré par HindIII. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose 0,6% et ont été transférés sur une feuille de nitrocellulose. Le fragment EcoRI-BglII du cosmide pHMR272 (Annexe II) contenant le gène de résistance à l'hygromycine B a été utilisé comme sonde pour hybrider le filtre de nitrocellulose.

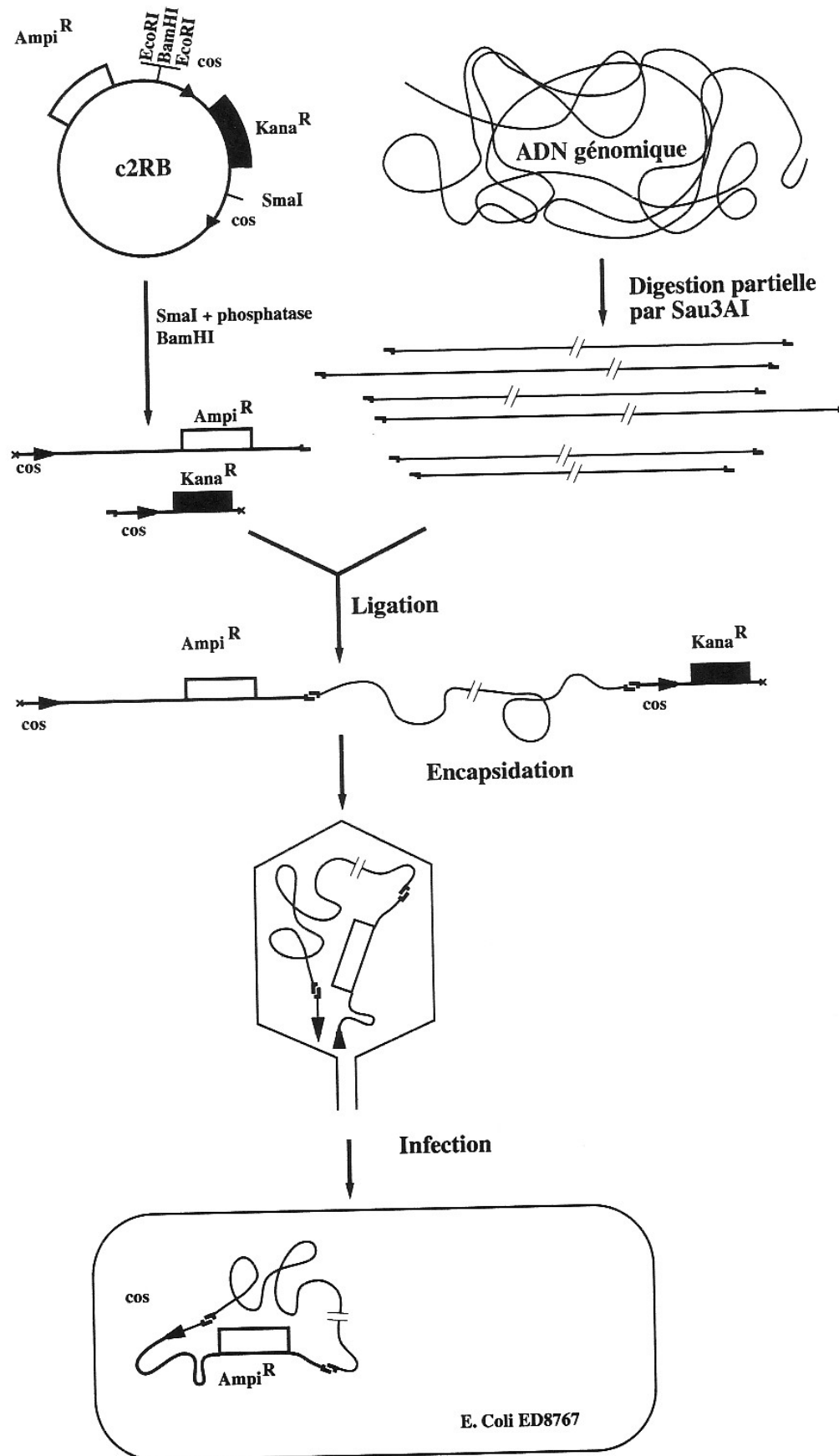


Figure II.9: Construction d'une bibliothèque de cosmides dans le vecteur c2RB.

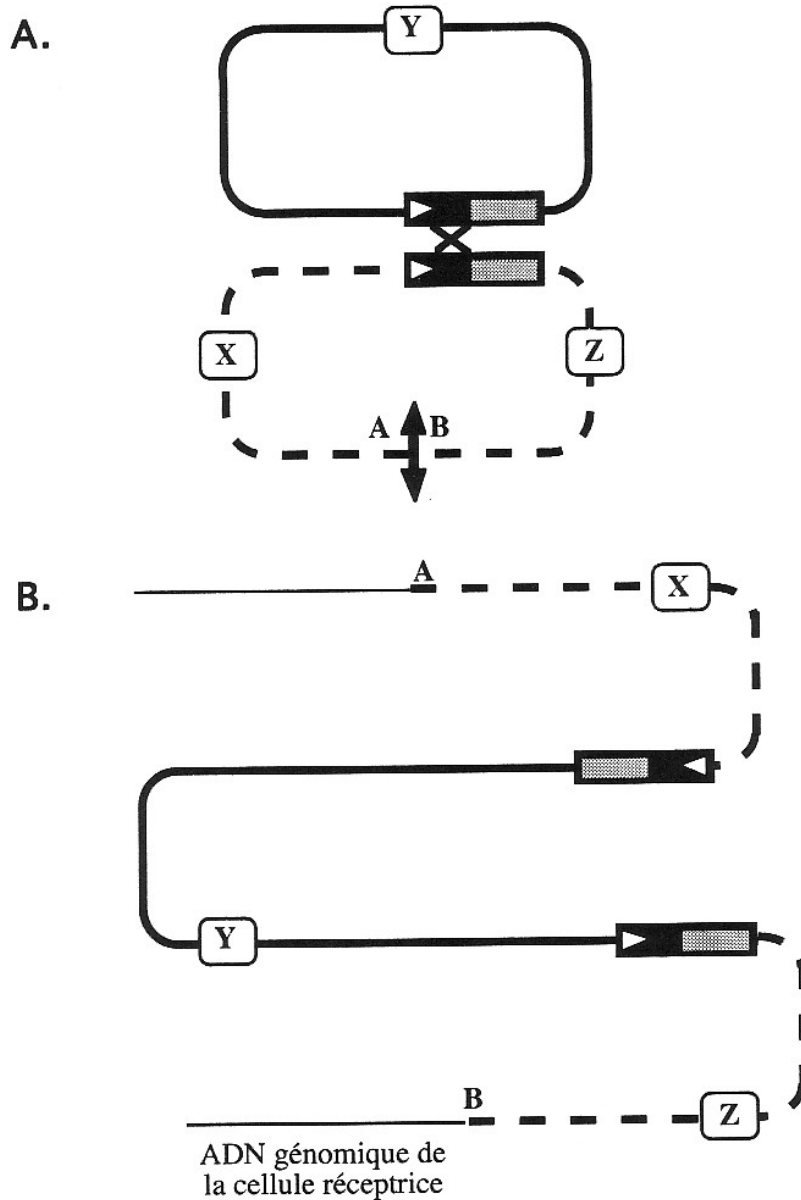


Figure II.10: Récupération d'un gène par encapsidation directe.

A. Représentation de la formation d'un concatémère à partir de deux cosmides portant les gènes X, Y et Z. Une recombinaison homologue entre ces cosmides génère une structure circulaire (non représentée) qui est ensuite linéarisée. La recombinaison se fait au niveau du vecteur (schématisée par une croix) et la linéarisation se fait entre les séquences A et B de l'insert d'un cosmide (représentée par une double flèche). Ce concatémère s'intègre dans l'ADN génomique d'un transfectant.

B. L'encapsidation directe de l'ADN génomique du transfectant permet de récupérer la séquence Y. Ce procédé ne permet pas de récupérer les séquences X et Z.

Les triangles blancs représentent les sites cos des vecteurs cosmidiques (rectangles noirs), les rectangles gris symbolisent le gène de résistance à un antibiotique.