

Exploration de la réponse inflammatoire des souris Wild Type- C57BL/6 et des souris déficientes pour le gène BAFF-1

Introduction

La lignée de souris C57BL / 6 souvent appelée "Black 6", est une souche consanguine commune des souris de laboratoire. C'est la souche de souris la plus utilisée et la plus vendue, en raison de la disponibilité des souches congéniques, sur la facilité de reproduction. **La souris KO** est aussi une souris de laboratoire dont un ou plusieurs gènes ont été inactivés. Dans le cas de notre TP, il s'agit du gène BAFF -/- (B-Cell Activating Factor). BAFF est une cytokine de la superfamille du TNF- α .

L'objectif du TP consisté à tester in vivo des souris WT (Wild Type – C57BL/6) et sur des souris déficientes pour le gène BAFF-1, l'effet de l'administration du LPS sur la répartition des cellules sanguines et le taux de cytokines.



Souris Wild type C57BL/6.



Souris KO

Matériels et Méthodes

□ Modèle animal

Pour la réalisation des travaux pratiques, les souris ont été séparé en 3 lots différents. Le premier lot contient les souris de 1 à 6, le deuxième lot contient des souris de 7 à 12 qui ont reçu du LPS la veille de l'expérience par voie intranasale et le 3^{ème} lot contient les souris de 13 à 18 qui sont déficientes pour le gène BAFF-1(BAFF-/-). Ensuite nous avons 18 échantillons pour le LBA, 18 échantillons pour les poumons et 2 échantillons pour le blanc.

Avant de réaliser le lavage broncho-alvéolaire (LBA), il est administré aux souris par voie intramusculaire du LPS.

Calcul détaillé pour préparer la dose de LPS

➤ Données du protocole de TP

-Stock LPS : 10mg /ml

-Dose à administrer : 250 µg /kg

-Nombre de souris : X (+1 souris de marge) = 19 souris → 3 groupes de souris

-Administration de 40 µl pour 1 souris de 30g

Cherchons la dose pour une souris pesant 30g

Si 250 µg → 1kg =1000g

X 30g →

$X = 30 \mu\text{g} \times 250 \mu\text{g} / 1000\text{g}$

$X = 7,5 \mu\text{g}$

Volume de LPS pour une souris :

10mg → 1000 µl

$Y = (1000 \mu\text{l} \times 30 \text{ g}) / 10\text{mg} = 0,75 \mu\text{l}$

0,0075 → mg Y ?

Volume de Nacl à prélever pour une souris :

$V = 40 \mu\text{l} - 0,75 \mu\text{l} = 39,25 \mu\text{l}$

Donc pour une souris il faudra **prélever 0,75 µl de LPS dilué dans 39, 25 µl de Nacl**. Pour les **18 souris +1 souris de marge** utilisées au cours de nos manipulations au TP, il faudra alors **prélever 0,75 x 18 = 13,5 µl de LPS dilué dans 39,25 x 18 = 706,5 µl de Nacl**. **L'objectif de l'injection du LPS est de mobiliser le système immunitaire des souris en créant une inflammation étant donné que le LPS est une endotoxine des bactéries à Gram négatif.**

LBA

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est un outil diagnostique peu invasif qui permet de caractériser la santé des alvéoles. Ce dernier peut abriter des cellules immunes et inflammatoires, des cytokines, des enzymes, ou encore des agents infectieux et environnementaux. Dans la compréhension de l'immunité de la barrière alvéolaire, **le LBA est un outil intéressant. C'est ce qui explique l'intérêt du LBA dans la réalisation de ce TP.**

Dans un premier temps, nous avons à eu à prélever le surnageant du prélèvement et récupérer le culot monté dans une cellule de Malassez pour le comptage des cellules au microscope. Le point du comptage se fait selon la formule suivante :

Nombre de cellules /ml = Moyenne des cellules comptées x10 x 1000 x Facteur de dilution (Fd)

Lot 1 : 1-6 : d =1/2 Lots 2 et 3 : d=1/10

Le point du comptage des cellules totales au niveau du LBA :

N° souris	Nombre total de cellules (Nb cellules/ml)
1	42500
2	182500
3	35000
4	35000
5	40000
6	35000
7	A éliminer
8	41000
9	19000
10	22000
11	26000
12	26000
13	60000
14	128000
15	83666
16	110000
17	76500
18	45666

On constate que le nombre de cellules par ml varie en fonction du type d'échantillons. Les échantillons du lot 2 WT LPS (Souris 8 à 12) ont un nombre moins important de cellules /ml comparativement aux échantillons du lot BAFF-/- (Souris 13-18).

Dosage de protéines – méthode Bradford

Il s'agit de trouver la concentration en protéines d'une solution inconnue (ici un sérum animal) par la méthode de Bradford. Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation de bleu brillant de Coomassie G250(BBC). Ainsi plus il y a de protéine dans la solution, plus la coloration bleue est intense, c'est à dire que l'absorption à 595 nm est élevée.

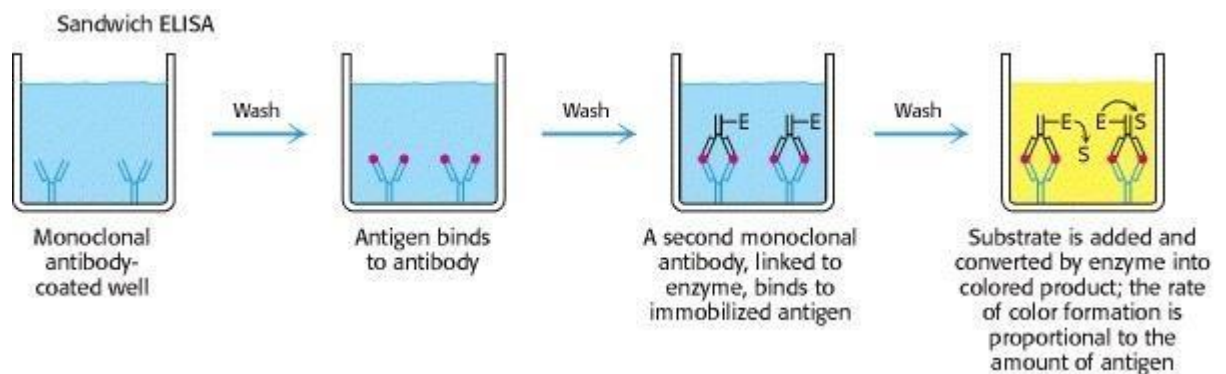
La correspondance entre la valeur de la D.O. à 595 nm et la concentration en protéines de la solution est donnée grâce à l'établissement d'une gamme d'étalonnage. Cela consiste à faire

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou

réagir le réactif de coloration avec des solutions de protéines de concentrations connues et croissantes.

ELISA

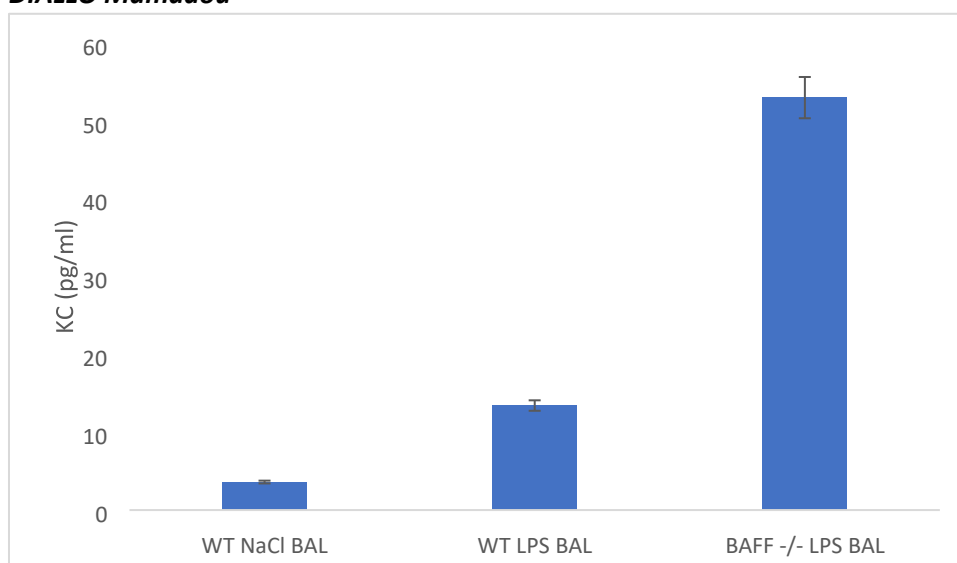
L'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique de dosage **immunologique** qui permet de quantifier les concentrations de diverses molécules présentes notamment dans les liquides biologiques. Elle est très utilisée notamment pour le dosage des cytokines, des facteurs de croissances, et de certaines hormones. Le liquide biologique utilisé ici est le prélèvement issu du lavage broncho-alvéolaire (LBA).



Lors de l'ELISA en sandwich, le puits est dans un premier temps recouvert d'un anticorps monoclonal, après lavage l'antigène se lie à l'anticorps. Ensuite après un deuxième lavage, un second anticorps monoclonal lié à l'enzyme se lie à l'antigène immobilisé. Enfin après un troisième lavage, le substrat est ajouté et transformé par l'enzyme en produit coloré ; la vitesse de formation de la couleur est proportionnelle à la quantité d'antigène.

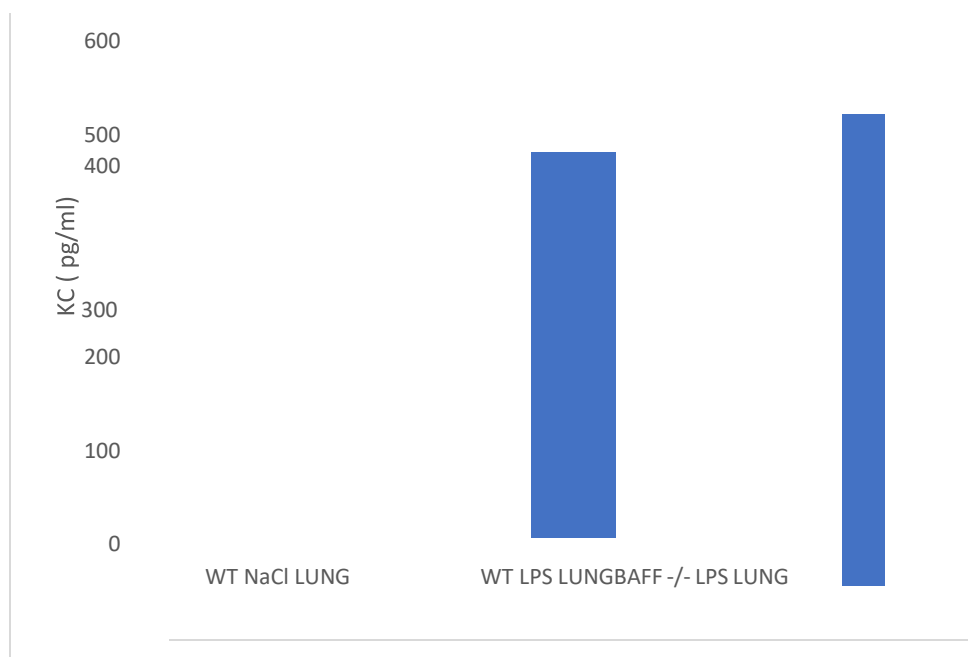
Analyse des résultats

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou

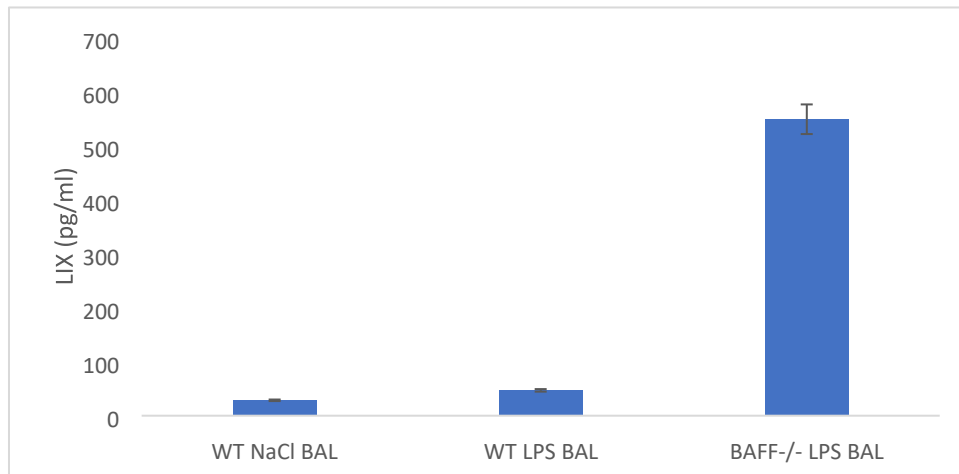


En ce qui concerne le gène KC, on observe au niveau des échantillons BAL, que ceux des BAFF-/- LPS produisent une quantité plus importante de KC comparativement aux deux autres lots.

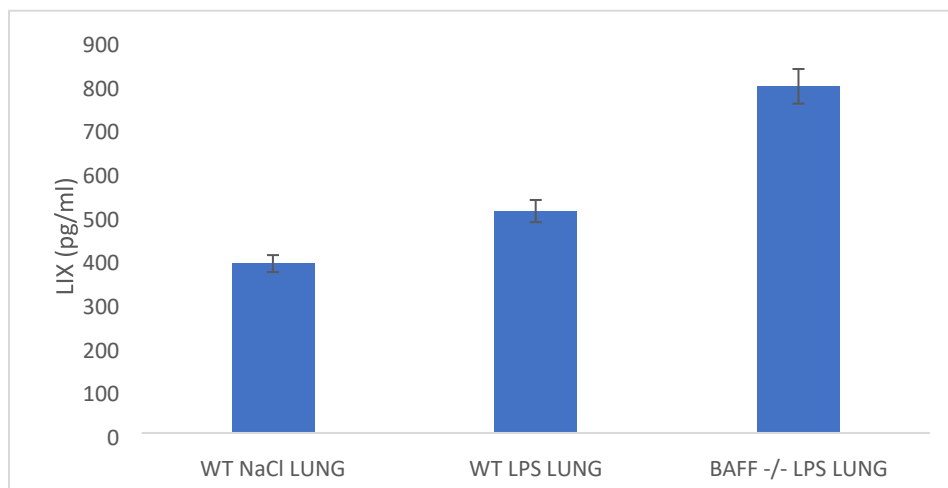
On peut en déduire que le LPS induit la production du gène KC, de plus l'absence de BAFF (cytokine pro inflammatoire) amplifie cette production.



On observe qu'au niveau des échantillons de poumons (LUNG), WT LPS et BAFF-/- LPS produisent une quantité de KC plus ou moins importante. On en déduit que le kératinocyte chemoattractant (KC) est une chimiokine produite par les chondrocytes et est sensible au stress inflammatoire. C'est la raison pour laquelle, elle est présente en quantité importante chez les échantillons de poumons ayant eu une inflammation (WT LPS et BAFF-/- LPS)

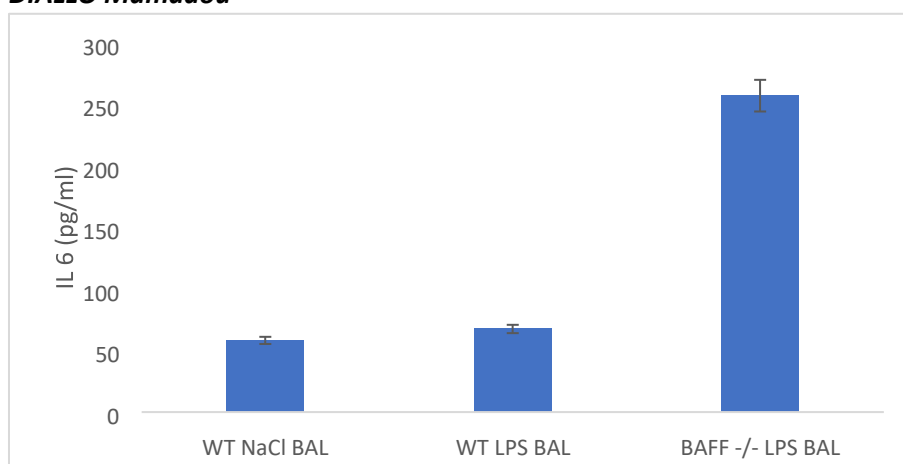


On observe que les échantillons BAFF -/- LPS pour le BAL présentent une quantité importante du gène LIX. Il faut souligner que le gène LIX est une chimiokine activatrice de neutrophiles (populations de globules blancs intervenant lors d'une réaction immunitaire ; Inflammation par exemple). En absence de BAFF (B- cell activating factor: cytokine qui joue un rôle dans le développement de lymphocyte B), la production du gène *lix* est amplifiée suite à la réponse inflammatoire.

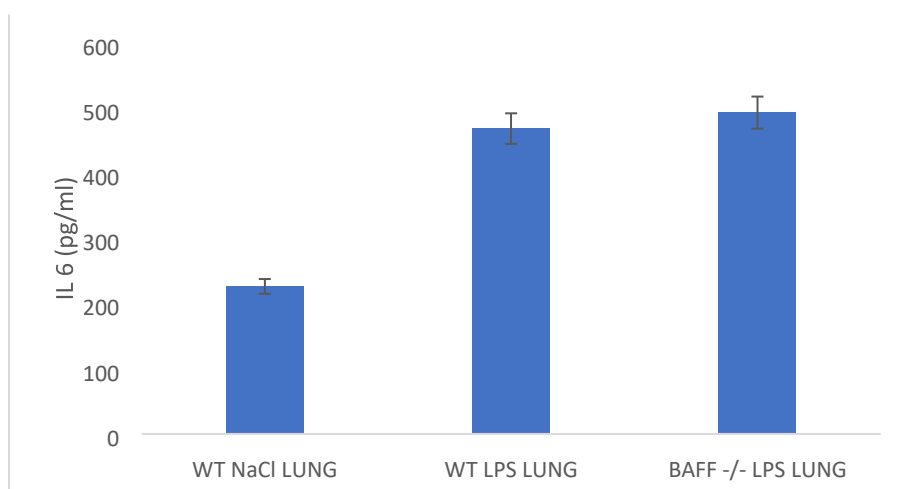


On observe que pour les échantillons de poumons (LUNG), le gène LIX est représenté chez les trois lots de souris en quantité plus ou moins importante. On en déduit que le gène *Lix* possède de récepteurs dans les poumons et sa production s'intensifie suite à une réponse inflammatoire due au LPS.

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou



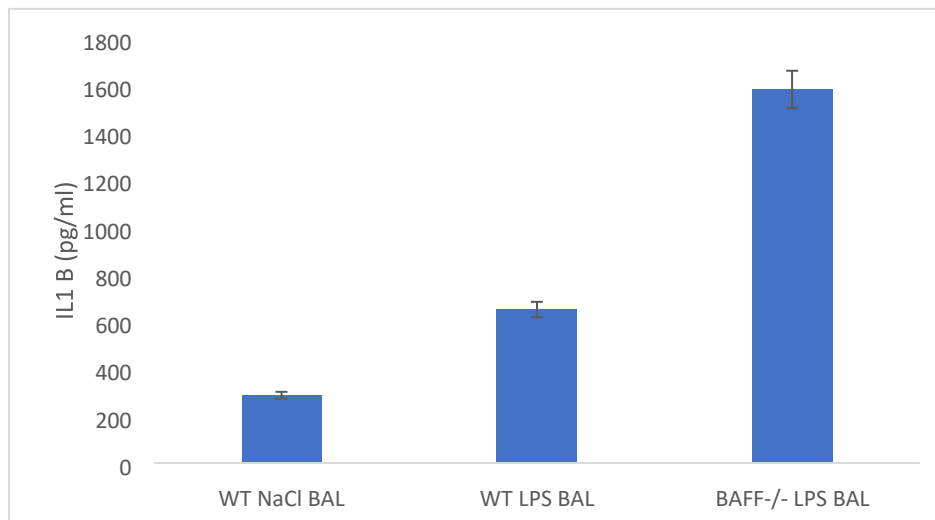
On observe qu'au niveau des échantillons de BAL, seules les BAFF-/- LPS ont produit une quantité très importante d'IL6, on en déduit que le gène BAFF-/-LPS possède le récepteur à IL-6 qui est responsable de cette production importante suite à une réponse inflammatoire due au LPS.



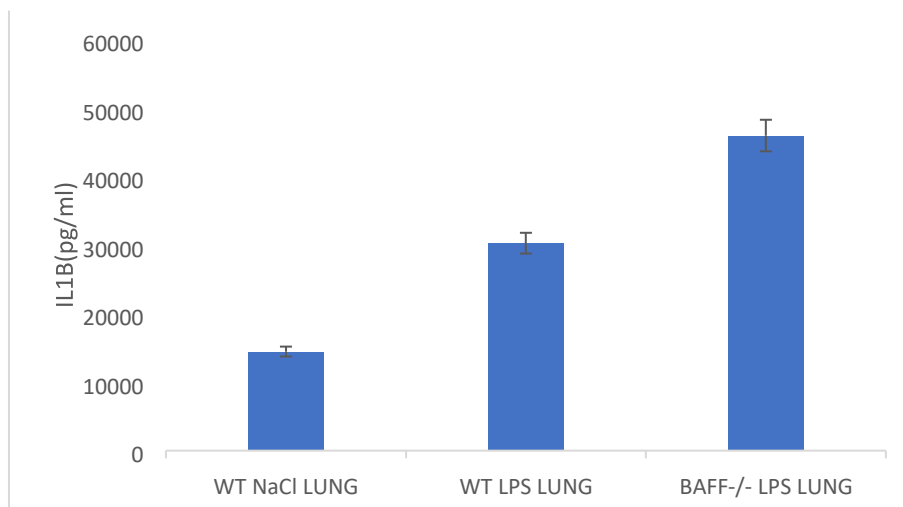
On observe qu'au niveau des échantillons de poumons (LUNG), les WT LPS et BAFF-/- LPS ont une production élevée d'IL6. Cela s'explique par le fait que dans ses échantillons l'IL6 a été produite en réponse à une inflammation en phase aigüe : c'est une cytokine proinflammatoire. Elle est produite par certains agents du système immunitaire pour la défense de l'organisme.

IL1B BAL

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou



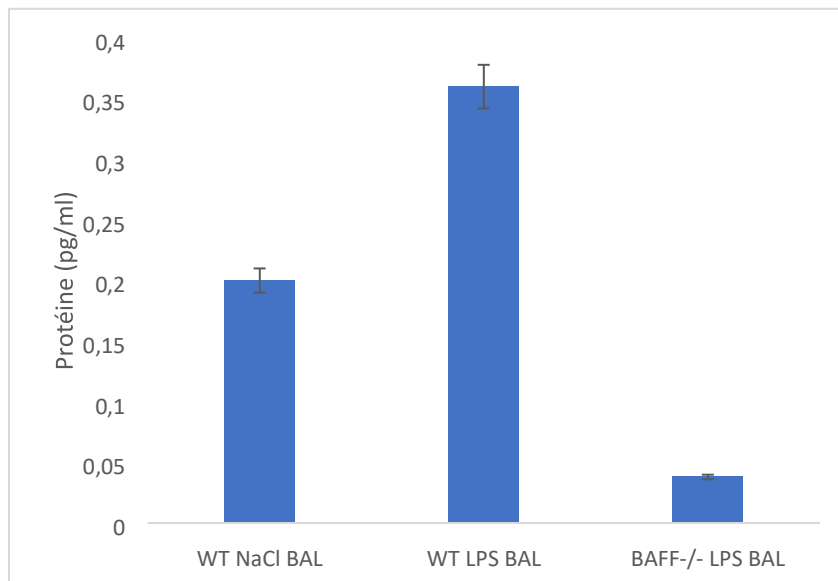
On observe qu'au niveau des échantillons BAL, les BAFF ^{-/-} LPS produisent en quantité très importante l'interleukine 1B (IL1B). on en déduit qu'en absence du gène BAFF suite à une réponse inflammatoire IL-1B s'intensifie.



On observe qu'au niveau des échantillons de poumons (LUNG), les WT LPS et BAFF ^{-/-} LPS produisent en quantité plus ou moins importante d'IL1B. L'IL-1B est une cytokine, un médiateur important de la réponse immunitaire et inflammatoire. Elle est produite par certaines cellules de l'immunité notamment les monocytes et les macrophages. Elle a pour fonctions de favoriser le recrutement des leucocytes sur le site de la lésion ou de l'infection, d'amplifier la réponse des lymphocytes T et B, de favoriser les fonctions des neutrophiles.

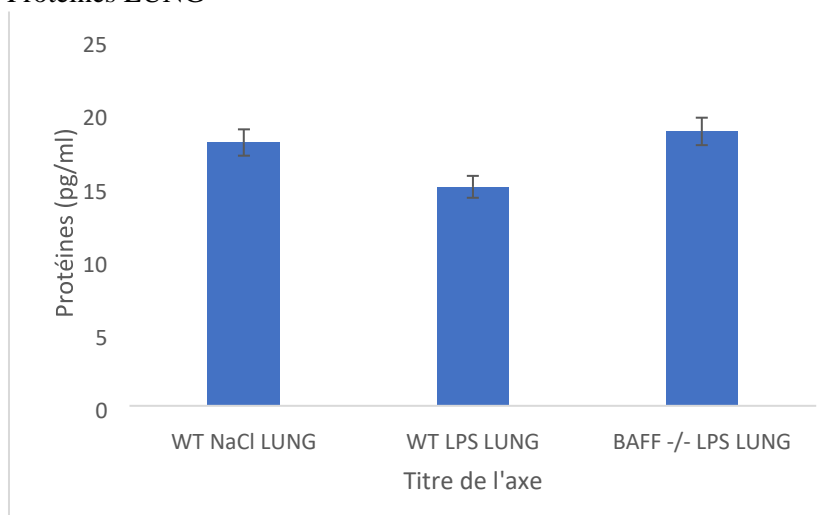
Protéines BAL

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou



On observe que pour les échantillons BAL, les WT LPS produisent assez de protéines par rapport au témoin WT NaCl et au BAFF -/- LPS. Ce qui montre que la réponse inflammatoire due au LPS induit la production de protéine en quantité suffisante. Aussi l'absence du gène BAFF inhibe la production de protéines malgré la présence d'une réponse inflammatoire due au LPS.

Protéines LUNG



On observe que pour les échantillons de poumons (LUNG), les 3 lots de souris une production plus ou moins importante de protéines alors ces protéines sont présentes dans les poumons

De l'ensemble de tous les histogrammes on retient que les chimiokines (KC, IL-1B, IL-6, Lix) sont impliqués dans ce phénomène d'inflammation.

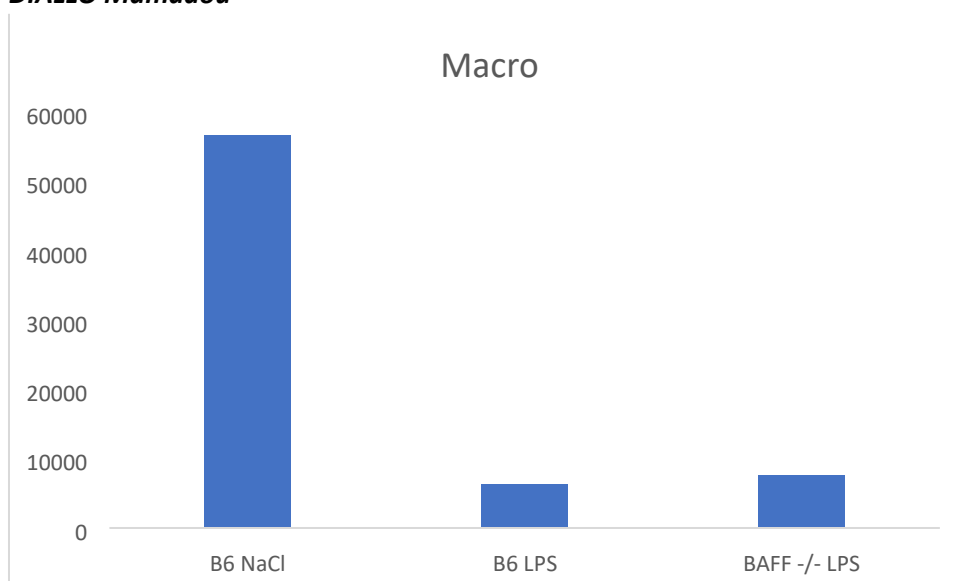
OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou

Observation des lames de cytopspin

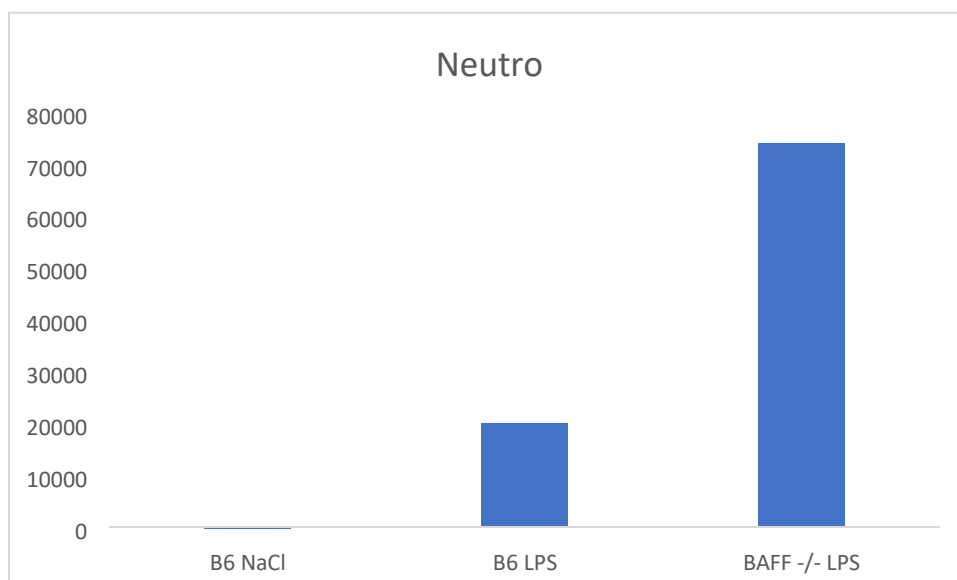
		Counted cells				
		Macro	Neutro	Lympho	Eosino	Numer counted cells
B6 NaCl	1	92	00	08	00	100
	2	85	00	15	00	100
	3	97	00	03	00	100
	4	90	00	10	00	100
	5	94	01	05	00	100
	6	93	00	07	00	100
B6LPS	7	A éliminer				
	8	26	70	04	00	100
	9	30	70	00	00	100
	10	24	76	00	00	100
	11	14	78	08	00	100
	12	25	75	00	00	100
BAFF -/- LPS	13	05	95	00	00	100
	14	10	90	07	00	100
	15	17	83	00	00	100
	16	07	85	08	00	100
	17	04	89	07	00	100
	18	08	84	08	00	100

Nombre de macrophage = (Nombre de macrophages comptés x Nombre de cellules totales) / Nombre de cellules comptées

	Macro	Neutro	Lympho
B6 NaCl	56733	61	4933
B6 LPS	6342	19832	536
BAFF -/- LPS	7557	73895	4198



On observe que les macrophages sont en majorité présents dans les échantillons témoins B6 NaCl et très peu présents au niveau des deux autres lots de souris. Il faut souligner que les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes indispensables à la réponse immunitaire.



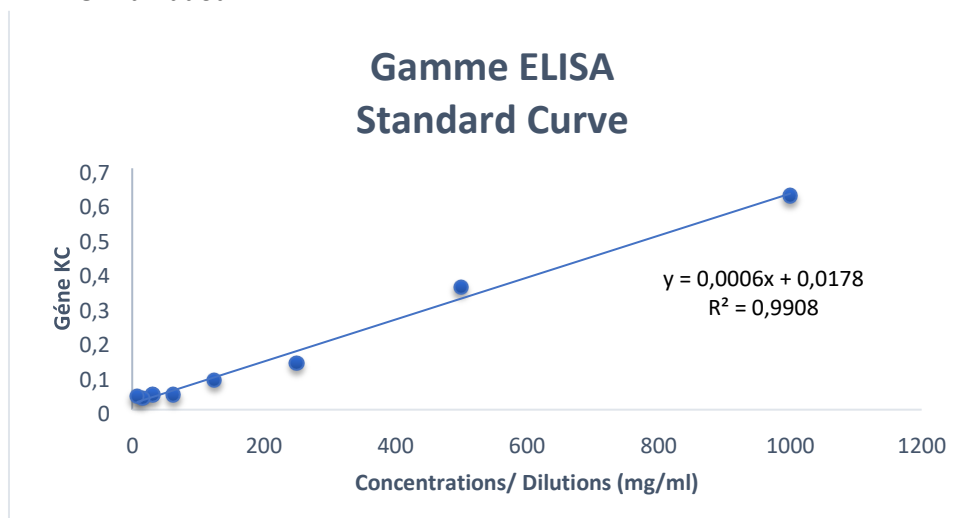
On n'observe pratiquement pas de polynucléaires neutrophiles au niveau des échantillons témoins B6 NaCl et une présence plus ou moins importante chez les deux autres lots de souris. Ainsi les échantillons BAFF -/- LPS présentent une population nombreuse de polynucléaires neutrophiles ce qui explique la présence d'inflammation ou infection.

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou
Conclusion

Lors de ce TP il a été montré que le gène étudié BAFF-1 entraîne une augmentation significative de différentes cytokines dosées, de plus nous avons observé une augmentation du nombre de neutrophile ce qui suggère qu'il est impliqué dans le phénomène de pro inflammation aiguë. A partir de différentes observations on peut en déduire que le gène étudié est efficace.

ANNEXES

Gène KC	0,651 0,589	0,386 0,324	0,166 0,104	0,117 0,055	0,075 0,013	0,074 0,012	0,065 0,003	0,069 0,007
Moyenne	0,62	0,355	0,135	0,086	0,044	0,043	0,034	0,038
Concentration	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125



KC BAL

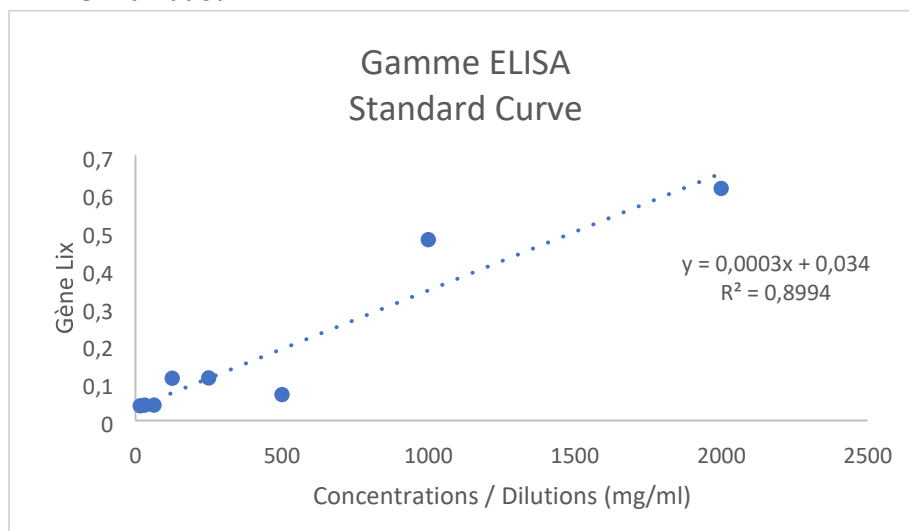
Point de gamme KC	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0006x + 0,0178$	3,6	13,43	53

KC LUNG

Point de gamme KC	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0006x + 0,0178$	12,825	365,922	503,866

Gène LIX	0,652 0,574	0,652 0,304	0,107 0,03	0,151 0,074	0,15 0,073	0,08 0,002	0,079 0,002	0,078 6,50 ^E -04
Moyenne	0,613	0,478	0,0685	0,1125	0,1115	0,041	0,0405	0,039325
Concentration	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou



LIX BAL

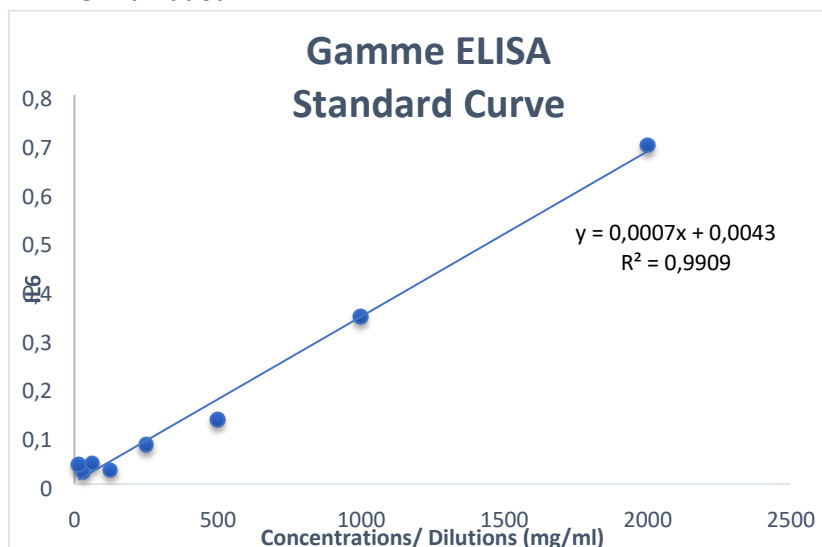
Point de gamme LIX	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0003x + 0,034$	388	508,33	794

LIX LUNG

Point de gamme LIX	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0003x + 0,034$	287,83	650,33	1582,83

IL6	0,731 0,66	0,379 0,308	0,168 0,097	0,117 0,045	0,064 0,007	0,078 0,007	0,075 0,004
Moyenne	0,6955	0,3435	0,1325	0,081	0,0285	0,0425	0,0395
Concentration	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou



IL6 BAL

Point de gamme IL 6	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0007x + 0,0043$	58,291	67,571	257,285

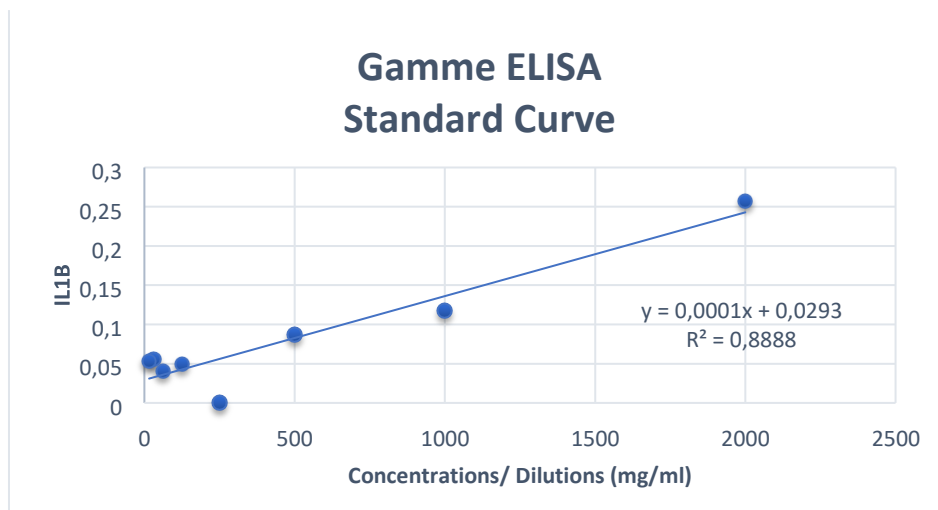
IL6 LUNG

Point de gamme IL 6	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0007x + 0,0043$	226,714	469,334	493,334

IL1B	0,309	0,169	0,139	0,052	0,101	0,092	0,107	0,105
	0,205	0,066	0,035	0,052	0,002	0,011	0,004	0,001

OGUI Foumilayo
DIA Mohamed
HAMMI Sarah
DIALLO Mamadou

Moyenne	0,257	0,1175	0,087	0	0,0495	0,0405	0,0555	0,053
Concentration	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125



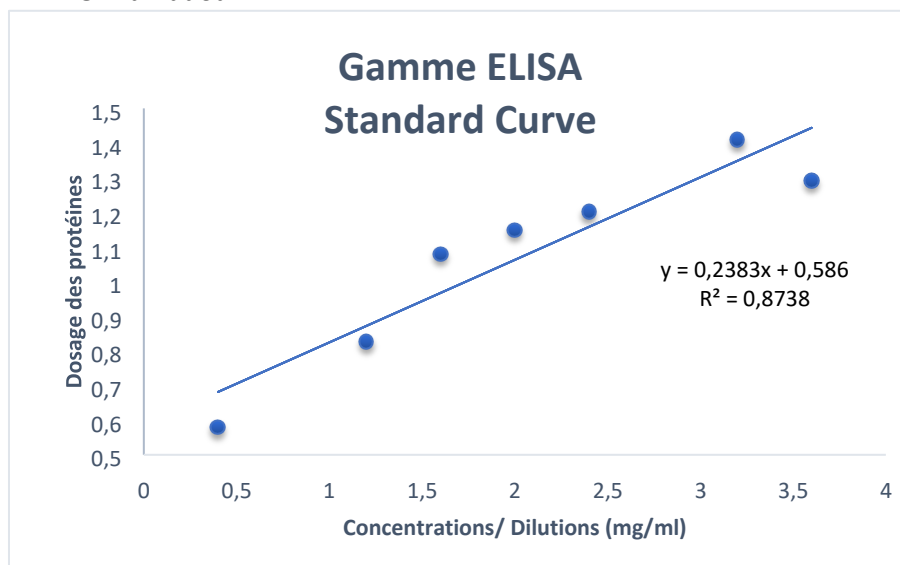
IL1B BAL

Point de gamme IL1B	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0001x + 0,0293$	287,83	650,33	1582,83

IL1B LUNG

Point de gamme IL1B	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,0001x + 0,0293$	14469,5	30294,5	46015

Protéine	1,433 1,148	1,551 1,266	1,345 1,059	1,291 1,006	1,222 0,936	0,969 0,683	0,722 0,436
Moyenne	1,2905	1,4085	1,202	1,1485	1,079	0,826	0,579
Concentration	3,6	3,2	2,4	2	1,6	1,2	0,4



Protéines BAL

Point de gamme Protéine	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,2383x + 0,586$	0,20	0,36	0,038

Protéines LUNG

Point de gamme protéine	Droite d'équation	WT NaCl	WT LPS	BAFF -/- LPS
Données de la courbe	$y = 0,2383x + 0,586$	18,031	14,996	18,790

Références bibliographiques

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol. (2013) 13:159–75. doi: 10.1038/nri3399