Rev. Fr. Histotechnol., 1999, **12**, n° 1, p. 81 à 89

MISE EN EVIDENCE DES ARN MESSAGERS DE L'INTERLEUKINE 2 PAR HYBRIDATION *IN SITU* : APPLICATION DANS UN TEST DE SENSIBILISATION CUTANEE CHEZ LA SOURIS

C. GRAULIÈRE, S. MOLON-NOBLOT et C. BOUSSIQUET-LEROUX

Laboratoires MSD-Chibret, Route de Marsat, Riom, 63963 Clermont-Ferrand Cedex 9

INTRODUCTION

Il est établi que les allergènes responsables d'une hypersensibilité retardée induisent une activation sélective des lymphocytes de type Th1. L'interleukine 2 (IL-2) étant une cytokine sécrétée spécifiquement par les lymphocytes Th1, il nous a paru intéressant d'étudier la production de cette cytokine dans le cadre d'un test de sensibilisation cutanée chez la souris : le "Local Lymph Node Assay (LLNA) (1)".

Nous avons utilisé la technique d'hybridation *in situ* (HIS) (2, 3) pour mettre en évidence les ARN messagers de l'IL-2 dans les ganglions de drainage des sites d'application.

MATERIEL ET METHODES

Protocole expérimental et prélèvements

*Les souris de souche Crl : CD-1(ICR) BR, âgées d'environ 8 semaines ont été réparties en 6 groupes de traitement comprenant chacun 4 femelles contrôles et 4 femelles traitées.

*Elles ont reçu soit 25 µl de véhicule (acétone-huile d'olive 4/1), soit 25 µl de dichromate de potassium à 0,5 % dans le véhicule par application cutanée sur la face dorsale de chaque oreille, une fois par jour, pendant 3 jours consécutifs.

* Les animaux ont été sacrifiés de façon séquentielle 1h, 3h, 6h, 9h, 24h et 48h après la dernière application topique.

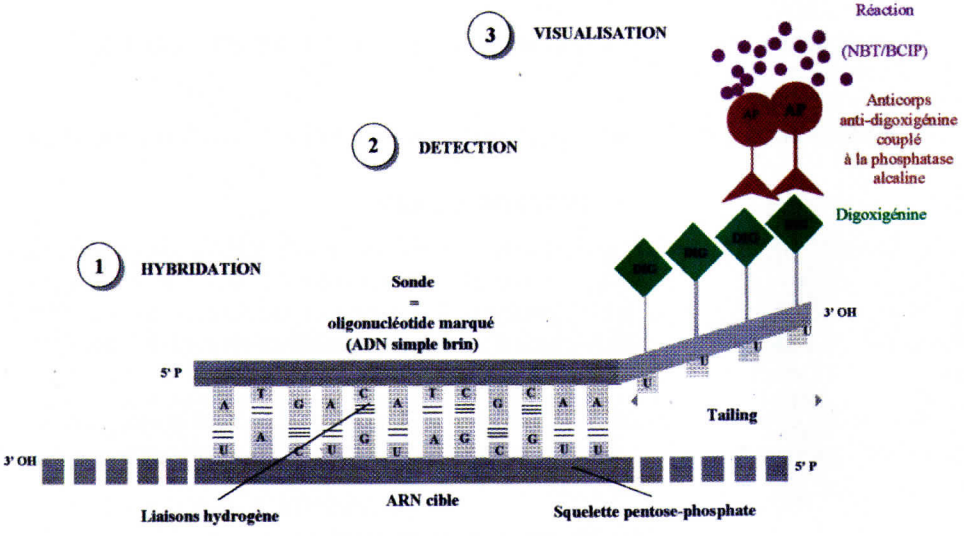
* Les ganglions auriculaires ont été prélevés à l'autopsie et immergés dans une solution fixatrice de formol tamponné à 10 % (solution commerciale) pendant 24 heures.

* Après inclusion classique des ganglions en paraffine, des coupes de 5 µ ont été recueillies sur des lames traitées au 3-aminopropyl triéthoxysilane (Fluka) à 2 % dans l'acétone.

* Pour limiter l'action des RNases, tout le matériel servant à la réalisation des coupes a été décontaminé avec une solution de RNase Away (Prolabo) et de l'eau stérile a été utilisée dans le bain-marie.

* La conservation des préparations a été obtenue en immergeant les lames dans le xylène (3 x 5 mn) et l'éthanol 100 (3 x 5 mn), puis après séchage à l'air, en les stockant dans un endroit sec, dans des boîtes contenant du silicagel.

Principe de la réaction d'hybridation



Réalisation pratique de l'hybridation

Afin de détruire l'activité des RNases, toute la verrerie a été placée dans une étuve (2 heures à 200 °C) et toutes les surfaces de travail, les pipettes, le matériel plastique ont été décontaminés avec la solution de RNase away.

Toutes les solutions préparées ont été autoclavées 30 mn à 120° C.

1. Prétraitement

Pour optimiser les conditions d'accessibilité de la sonde, les coupes sont réhydratées et déprotéinisées :

- NaCl 0.9 % : 5 mn

- Tris-HCl-$CaCl_2$ (tris 20 mM ; $CaCl_2$ 2 mM) : 3 mn à température ambiante.
- Tris-HCl-$CaCl_2$: 3 mn à 37°C.
- Tris-HCl-$CaCl_2$/protéinase K à 4 µg/ml (Boehringer # 161 519) : 15 mn à 37°C.
- Tris-HCl-$CaCl_2$: 5 mn à température ambiante.
- Tampon phosphate Sörensen 0.1 M : 5 mn à température ambiante.
- NaCl 0.9 % : 5 mn à température ambiante.
- Ethanol 75°, 95°, 100° : 2 mn à température ambiante.
- Séchage à l'air.

2. Hybridation

Composition du milieu d'hybridation

Concentration stock	Concentration finale	Pour 1 ml de milieu d'hybridation
Sonde (2 pmoles/µl)**	50 pmoles/ml	25 µl
Standard saline citrate (SSC 20 X) (Sigma)	SSC 4 X	200 µl
Formamide 100 % déionisé (Sigma)	50 %	500 µl
Sulfate de Dextran 50 % (Sigma)	10 %	200 µl
Solution de Denhardt 50 X (Sigma)	1 X	20 µl
ARN t (10 mg/ml) (Sigma)	100 µg/ml	10 µl
ADN de sperme de saumon (10 mg/ml) (Bioprobe)	100 µg/ml	10 µl
Eau stérile		35 µl

***sonde oligonucléotidique commerciale de 30 bases (Biognostik) marquée en 3' avec le kit : Dig Oligonucleotide Tailing Kit (Boehringer # 1.417.231) selon les instructions du fabricant.*

La solution d'hybridation est déposée sur les coupes (0,03 ml/mm^2 de lamelle) qui sont ensuite recouvertes d'une lamelle de verre et hybridées à 38°C en chambre humide pendant une nuit.

3. Lavages post-hybridation

Les coupes sont lavées dans des solutions salines de stringence croissante de manière à éliminer les appariements non spécifiques.

- Retirer les lamelles en SSC 5X
- Laver en SSC 2X : 1 heure à température ambiante
- Laver en SSC 2X : 1 heure à 40°C
- Laver en SSC 1X : 1 heure à température ambiante

4. Détection/visualisation des hybrides

- Après rinçage dans le tampon A, les coupes sont incubées dans le même tampon additionné de 2 % de sérum de chèvre et de 0,3 % de triton X 100 pendant 30 mn à température ambiante, puis avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline au 1/100 dans le milieu précédent, 1 h à température ambiante. (Anti-Dig-AP, Fab fragments Boehringer # 1.093.274)
- Après rinçage dans le tampon A : 3 x 10 mn, puis le tampon B : 2 x 2 mn, les coupes sont incubées avec une solution de NBT-BCIP au 1/50 (Boehringer # 1681.451) dans le tampon B, 2 h à température ambiante et à l'obscurité.
- La réaction est arrêtée par rinçage dans le tampon C. Les lames sont contre-colorées au vert de méthyle, 15 s puis montées au glycergel.

Tampon A = Tris-NaCl (100 mM -150 mM), pH : 7,5

Tampon B = Tris-NaCl-MgCl2 (100 mM-100 mM-50 mM), pH : 9,5

Tampon C = Tris-EDTA (10 mM-1 mM), pH : 8,0

RESULTATS

Résultats relatifs aux contrôles de validation de la méthode

Un contrôle préalable du marquage de la sonde a été effectué sur membrane de nylon selon les instructions du fabricant (Boehringer). Les contrôles de validation suivants ont été réalisés avec succès :

Contrôles négatifs

- Evaluer le bruit de fond engendré par la sonde :
  - Réaction sur tissu pancréatique n'exprimant pas l'ARNm recherché
- Evaluer la réactivité parasite du tissu :

- Réaction avec la sonde hétérologue commerciale : même GC %, séquence différente (Biognostik)
- Réaction avec la sonde sens commerciale : séquence complémentaire (Biognostik)

• Evaluer le bruit de fond engendré par le système de détection :

- Réaction en omettant la sonde
- Réaction en omettant l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline.

Contrôles positifs

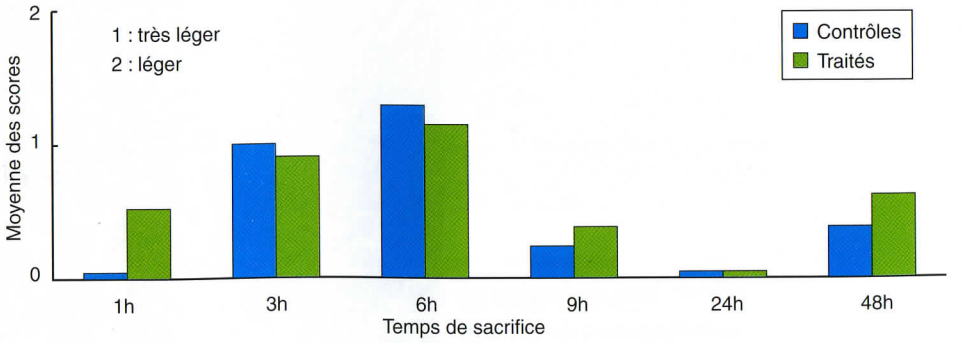
• Vérifier la localisation attendue du signal :

- Réaction sur un tissu exprimant fortement l'ARNm recherché (lymphome ovarien : figure 1)
- - Réaction sur un culot de centrifugation de cellules spléniques stimulées par l'acide trinitrobenzène sulfonique (figure 2).

Résultats relatifs au test de sensibilisation cutanée

Le signal positif s'est manifesté par la présence d'un précipité violet-noir dans le cytoplasme des lymphocytes sécréteurs d'IL-2. Les ARNm de l'IL-2 ont été détectés essentiellement dans le paracortex ganglionnaire, les cellules positives étant peu nombreuses et régulièrement distribuées au sein de cette zone (figure 3). Les lames ont été évaluées de façon semi-quantitative. Le score maximum attribué a été de 2 (léger) sur une échelle de 0 à 4.

Les résultats exprimés en moyenne des 8 valeurs obtenues par groupe de traitement sont présentés dans le tableau ci-dessous :



Il n'a pas été trouvé de différence notable entre les groupes contrôles et traités aux divers temps de sacrifice des animaux. Ce travail expérimental a été réalisé sur plusieurs jours, mettant en évidence de légères variations dans le comptage des cellules positives pour l'IL-2.

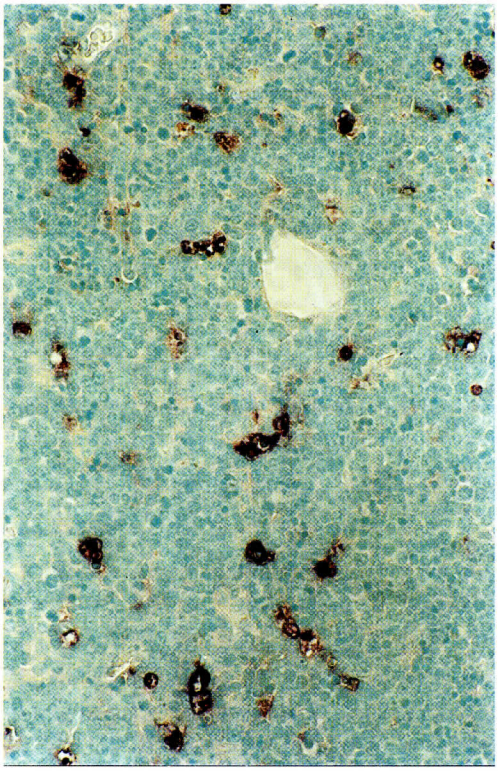


Figure 1 : cellules tumorales de lymphome ovarien de souris

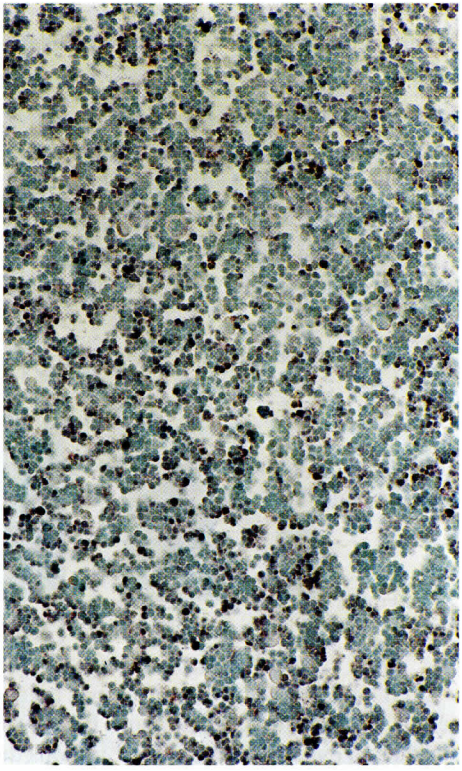


Figure 2 : culot de centrifugation de cellules spléniques de souris stimulées par l'acide trinitrobenzène sulfonique

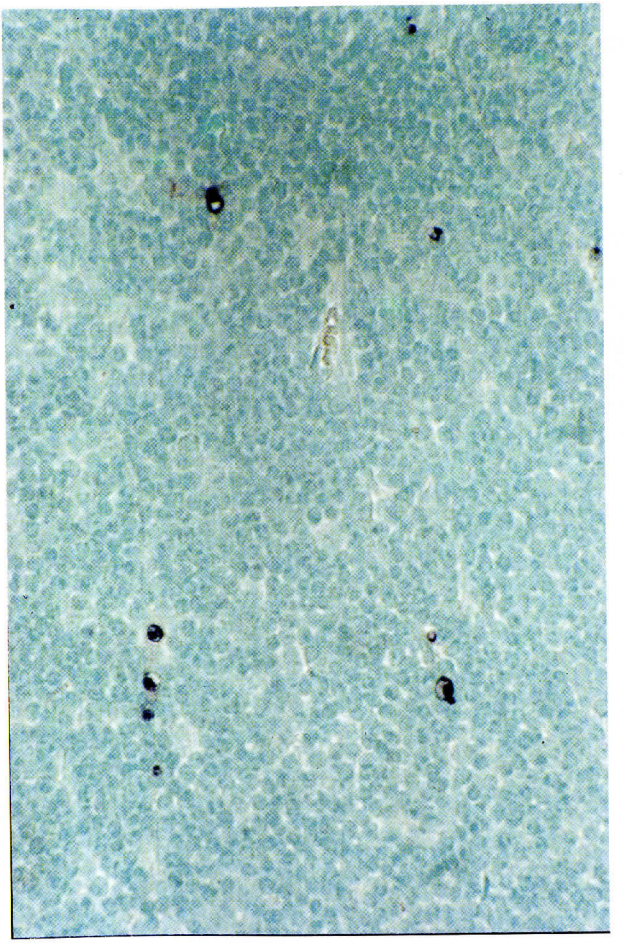


Figure 3 : lymphocytes paracorticaux de ganglion auriculaire (dichromate de potassium testé dans le LLNA)

Par ailleurs, le signal obtenu s'est avéré stable, après réexamen de lames hybridées ayant été stockées durant une période de 3 ans.

CONCLUSION

Nous avons pu mettre en évidence, par hybridation *in situ*, les ARN messagers de l'IL-2 dans les ganglions auriculaires chez la souris.

Le LLNA est un test de sensibilisation cutanée développé chez la souris pour évaluer le pouvoir allergisant éventuel des molécules. Ce test est basé sur la mesure, après incorporation de thymidine tritiée, de la prolifération cellulaire induite par les produits sensibilisants au niveau des ganglions de drainage des sites d'application (1). Le pouvoir sensibilisant cutané du dichromate de potassium n'a pas pu être établi dans le LLNA sur la base du nombre de cellules productrices d'IL-2 mises en évidence par ISH.

Ce résultat est en accord avec les observations de Vandebriel *et al.* qui, dans un travail comparable, ont recherché la production éventuelle d'IL-2 et d'interféron gamma après sensibilisation au dinitrochlorobenzène, en utilisant des méthodes immunohistochimiques semi-quantitatives sur coupes tissulaires cryostatées. Les auteurs ont toutefois observé une élévation significative de ces cytokines au niveau du site d'application, offrant des perspectives intéressantes (4).

BIBLIOGRAPHIE

1. KIMBER I. & WEISENBERGER C. : A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. Arch. Toxicol., 1989, 63, pp 274-282.
2. FOURNIER J-G. : Histohybridation in "Histologie moléculaire. Application des techniques de la biologie moléculaire à l'histologie". Ed. Technique & Documentation, Lavoisier, 1994, pp 55-166.
3. LEVY E.R. & HERRINGTON C.S. : Non-isotopic detection of RNA *in situ* in "Non-isotopic methods in molecular biology. A practical approach". Ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1995, pp 85-106.
4. VANDEBRIEL R.J., MEREDITH C., SCOTT M.P., GLEICHMANN E., BLOKSMA N., VAN'T ERVE E.H.M., DESCOTES J. & VAN LOVEREN H. : Early indicators of immunotoxicity : development of molecular biological test batteries. Hum. & Exp. Toxicol., 1996, 15, Supl. 1, S2-S9.

Remerciements :

A.L.Gérardin pour la réalisation du schéma : Principe de la réaction d'hybridation.