



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Cellules B CD5+: contribution à l'étude de leurs caractéristiques chez des bovins infectés par le BLV (Bovine leukemia virus)

Matheise, Jean-Philippe

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Cellules B CD5⁺ : contribution à l'étude de leurs caractéristiques chez des bovins infectés par le BLV (*Bovine Leukemia Virus*).

MATHEISE JEAN-PHILIPPE

Résumé

La leucose est la maladie néoplasique la plus fréquente de l'espèce bovine et affecte la lignée lymphoïde. Son agent étiologique est un rétrovirus nommé BLV (*Bovine Leukemia Virus*). La lymphocytose de cellules B consécutive à l'infection par ce virus semble corrélée à une perturbation du phénotype des lymphocytes circulants. La majorité de ceux-ci sont en effet caractérisés par l'expression en membrane de marqueurs B (IgM), mais aussi T (CD5) (Depelchin et al., 1989).

Ce type de bouleversement phénotypique, constaté sur une faible proportion de cellules B normales, a également été détecté au niveau de souches de souris immunodéficientes et, chez l'homme, dans des cas de leucémie chronique lymphocytaire à cellules B (Hayakawa et Hardy, 1988) ou d'arthrite rhumatoïde.

C'est dans le cadre de l'étude de certaines caractéristiques des BCD5 bovines que s'est inscrit ce travail. Notre démarche nous a conduits tout d'abord à nous intéresser au phénotype des cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose. A la lumière des résultats obtenus, il est apparu que si l'expression des IgM et du CD5 sur une majorité de cellules est bien effective, d'autres Ag membranaires (Ag de classe II, chaînes légères, CD11b et CD11c) sont également concernés par cette perturbation phénotypique. De plus, quelques "indices d'activation" (récepteurs à l'IL-2 ou à fragments Fc, densité des IgM et des Ag de classe II,...) ont été détectés soit ponctuellement, soit sur des cellules circulantes de l'ensemble des animaux leucosiques étudiés.

Suite à ces résultats, il était logique de s'attarder plus particulièrement à la physiologie des BCD5. Dans cet ordre d'idée, l'étude du cycle cellulaire a montré qu'une proportion non négligeable de ces cellules se trouve en phase G2/M (étapes indissociables en regard de la technique utilisée). L'analyse en cytométrie de flux a révélé que si les cellules constitutives de cette phase sont plus granuleuses et ont un noyau plus grand que les cellules en G0/G1, ce pool cellulaire concerne en majorité les cellules B. Ces études suggèrent donc l'état activé de certaines cellules leucosiques. Ceci a par ailleurs été confirmé *in vitro* par la forte prolifération de ces cellules en réponse à une source d'IL-2. Les tests ont été poursuivis afin de déterminer si cette lymphokine ne permettait pas aux BCD5 de poursuivre leur maturation jusqu'à la production d'anticorps. Bien que préliminaires, les résultats, nous permettent de penser que l'IL-2 n'agit pas outre mesure en faveur d'une sécrétion d'Ig en culture.

En conclusion, ce travail a pu mettre l'accent sur l'état d'"activation" propre à certaines cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose. Ces révélations apparaissent donc comme des indications importantes dans le contexte général du problème de l'origine des BCD5, mais également au niveau de l'éclaircissement des processus physiologiques impliqués dans le développement de la leucose bovine.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur : Prof. A. DEPELCHIN

A l'issue de cette année, qu'il me soit permis de remercier le Professeur A. DEPELCHIN pour avoir accepté de promouvoir ce mémoire.

Toute ma reconnaissance va au Docteur J.J. LETESSON pour son aide précieuse, sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Toute ma gratitude va à Monsieur C. DIDEMBOURG pour sa compétence technique, sa bonne humeur et son inlassable dévouement

Mes remerciements s'adressent également à M. Delcommenne pour les conseils qu'il m'a prodigués en tout domaine ainsi que pour son sens de l'humour.

Je m'en voudrais d'oublier A. Mager, P. Hubert et M. Lambot pour leur sympathie et pour l'accueil qu'il m'ont réservé.

Un merci tout particulier est également destiné à Mesdames M. MULUMBA-ALBERT et M.A. DIDEMBOURG-POOS pour leur gentillesse et leurs encouragements.

Je remercie aussi les Professeur R. GREIMERS pour les renseignements qu'il m'a procurés sur le cycle cellulaire.

Enfin, que toute personne ayant, à sa manière, participé à la réalisation de ce travail trouve ici l'expression de mon entière reconnaissance.

LISTE DES ABREVIATIONS USUELLES

a.a.	: acide aminé
ABTS	: 2,2-Azino-Di-3-Ethyl-Benzothiazolin-sulfonate
Acm	: Anticorps monoclonal
Ag	: Antigène
BCLL	: Leucémie Lymphocytaire Chronique à Cellules B
BLV	: Bovine Leukemia Virus
BoLA	: Bovine Leucocytes Antigen
BrdU	: Bromodéoxyuridine
BrMRBC	: érythrocytes de souris traités à la broméline
BTC	: Lignées de cellules T productrices d'interleukine 2
CD	: Cluster of differentiation
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Con A	: Concavaline A
DNA	: acide désoxyribonucléique
DPM	: Désintégrations par minute
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DO	: Densité Optique
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
FACS	: Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	: Sérum de veau foetal
FITC	: Isothiocyanate de fluorescéine
gp 30	: glycoprotéine de 30 KDalton
gp 51	: glycoprotéine de 51 KDalton
HTLV	: Human T cell Leukemia Virus
Ig	: Immunoglobuline
IL-1	: Interleukine 1
IL-2	: Interleukine 2
IL-4	: Interleukine 4
IL-5	: Interleukine 5
IL-6	: Interleukine 6
I.P.	: Iodure de Propidium
LPS	: Lipopolysaccharides bactériens
LTR	: Long Terminal Repeat
MLA144	: Lignée lymphoïde T de Gibbon
p18	: protéine de 18 KDalton
p24	: protéine de 24 KDalton
p34	: protéine de 34 KDalton
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PHA	: Phytohémagglutinines
RFc	: Récepteur à fragment Fc des Immunoglobulines
RIL-2	: Récepteur à l'IL-2
RNA	: Acide ribonucléique
SAM	: Sheep Anti-Mouse
TAA	: Tumor-associated Antigen

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.

AVANT-PROPOS.....	1
1. LEUCOSE BOVINE.	
1.1. Terminologie.....	2
1.2. Virus de la leucémie bovine.....	2
1.2.1. Génome viral.....	2
a).Produits du gène GAG : Protéines structurales internes.....	3
b).Produits de transcription du gène POL : Transcriptase inverse et endonucléase.....	3
c).Produits de ENV (qui overlappe en partie POL) : Glycoprotéines d'enveloppe.....	4
d).Produits de pXBL : Protéines de régulation.....	4
e).BLV comme modèle d'étude des HTLV.....	5
1.2.2. Réplication.....	5
1.3. Transmission du BLV.....	5
1.3.1. Espèces cibles.....	5
1.3.2. Modes de transmission.....	6
1.4. Différents aspects de la maladie.....	6
1.5. Cellules cibles de BLV et interactions hôtes virus.....	8
1.5.1. Animaux infectés.....	8
1.5.2. Animaux en lymphocytose persistante.....	8
1.5.3. Animaux en phase tumorale.....	9
1.6. Modes d'action du BLV.....	9
2. LYMPHOCYTES B CLASSIQUES.....	10
2.1. L'ontogenèse.....	11
2.2. Marqueurs membranaires.....	12
2.3. Les immunoglobulines.....	13
2.3.1. Structure des immunoglobulines.....	14
2.3.2. Organisation des gènes d'Ig. et diversité.....	14
2.3.3. Classes d'Immunoglobulines.....	15
2.3.4. Variation de classes d'Immunoglobulines.....	16
2.4. Activation, prolifération et différenciation.....	16

2.4.1. Rôle des récepteurs immunoglobuliniques dans l'activation des cellules B.....	17
2.4.2. Rôle des lymphocytes T dans l'activation des cellules B.....	17
a).Présentation de l'Ag.....	17
b).Coopérations cellulaires.....	18
3. LES CELLULES BCD5.....	21
3.1. Biochimie du CD5.....	21
3.2. Fonctions du CD5 sur la cellule T.....	21
3.3. Cellules BCD5.....	22
3.3.1. Historique.....	22
3.3.2. Origine.....	22
a).Lignée distincte BCD5.....	23
b).Cellules B classiques activées.....	23
3.3.3. Contrôle génétique.....	24
3.3.4. Tumorigenèse.....	25
a).Cellules pré malignes.....	25
b).Cellules malignes et transformation de lignées cellulaires.....	25
3.3.5. Caractéristiques phénotypiques.....	26
a).Morphologie et expression de marqueurs de surface.....	26
b).Cycle cellulaire.....	26
c).Expression d'isotypes d'immunoglobulines.....	27
3.3.6. Caractéristiques physiologiques.....	27
a).Sécrétion d'auto-anticorps.....	27
b).Réponse aux antigènes de laboratoire.....	28
But du travail.....	29

II. MATERIEL ET METHODES

1. ANIMAUX.....	30
2. OBTENTION DES CELLULES.....	30
2.1. Prélèvements sanguins.....	30
2.2 Isolement des cellules.....	30
2.3 Conservation des cellules.....	31

3. MARQUAGE EN IMMUNOFLUORESCENCE.....	32
3.1. Détection d'antigènes membranaires.....	32
3.1.1. Anticorps monoclonaux utilisés.....	32
3.1.2. Marquage des antigènes en immunofluorescence.....	32
a).Méthode indirecte.....	32
b).Méthode directe.....	33
3.1.3. Observation des cellules.....	33
3.2 Détection des acides nucléiques.....	34
3.2.1.Estimation des fractions G0/G1, S et G2/M par marquage à l'iodure de propidium et analyse mathématique.....	34
a). Préparation des cellules au marquage.....	34
b). Analyse des résultats.....	35
3.2.2. Estimation des fractions G0/G1, S et G2/M par double marquage I.P./anti-BrdU.....	36
3.3.Détection des Récepteurs à fragments Fc des Immunoglobulines.....	37
4. MISE EN CULTURE.....	39
4.1. Composition du milieu de culture.....	39
4.2. Distribution des cellules en boîtes de culture.....	40
4.3. Culture.....	40
5. DEPLETION DES CELLULES T.....	40
6.STIMULATION DES CELLULES.....	41
6.1. Modes de stimulations.....	42
6.2. Mesure de prolifération cellulaire.....	42
6.2.1 Incorporation de thymidine tritiée.....	42
6.2.2.Récolte au "Cell-Havester"	43
6.2.3. Mesure de la radioactivité β par scintillation liquide.	43
7.MISE EN EVIDENCE DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS.....	43
7.1. Mise en culture.....	44
7.2. Le test ELISA.....	44

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. PHENOTYPES GLOBAUX DES ANIMAUX LEUCOSIQUES.....	46
1.1. Détection d'antigènes spécifiques des cellules B.....	47
1.2. Détection de marqueurs non spécifiques des cellules B.....	48
1.3. Détection d'antigènes très peu présents sur les cellules B.	50
1.4. Evolution de certains paramètres en fonction de la lymphocytose.....	54
1.5. Enseignements générés par l'étude phénotypique des cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose.....	55
2. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE.....	57
2.1. Mise au point.....	58
2.2. Application de la technique aux cellules circulantes d'animaux leucosiques.....	59
2.3. Identification des cellules en phase G2/M.....	61
2.3.1. Granulosité.....	62
2.3.2. Phénotypes membranaires.....	64
a). Détection des cellules B exprimant des IgM	64
b). Détection des cellules T.....	65
2.4. Estimation de la phase de synthèse.....	66
2.5. Estimation des cellules en mitose par coloration histochimique.	68
2.6. Enseignements générés par l'étude du cycle cellulaire.....	69
3. TESTS DE PROLIFERATION APPLIQUES AUX CELLULES CIRCULANTES D'ANIMAUX EN FORTE LYMPHOCYTOSE.....	71
3.1. Test de prolifération réalisé sur une population totale.....	72
3.1.1. Modalités de la mise en culture.....	72
3.1.2. Modes de stimulation.....	73
3.1.3. Résultats et discussions.....	74
3.2. Tests de prolifération appliqué à une population déplétée en cellules T.....	75
3.2.1. Déplétion des cellules T.....	75
3.2.2. Mise en culture et modes de stimulation.....	76
3.2.3. Résultats et discussions.....	76

4. PRODUCTION D'ANTICORPS <i>IN VITRO</i> PAR DES CELLULES D'ANIMAUX EN FORTE LYMPHOCYTOSE.....	78
4.1. Modalités de la mise en culture.....	79
4.2. Test de détection.....	80
4.3. Résultats et discussions.....	80
4.4. Enseignements générés par l'étude de la production d'anticorps <i>in vitro</i>	82

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSIONS.....	84
2. PERSPECTIVES.....	87

V. BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS.

La leucose bovine est la maladie néoplasique la plus fréquente chez le bovin et affecte la lignée lymphoïde. Son agent étiologique est un rétrovirus exogène : "le virus de la leucose bovine" (*Bovine Leukemia Virus: BLV*). La maladie est dispersée uniformément dans différentes régions géographiques du monde. L'Europe semble néanmoins être le berceau de la forme enzootique (affectant les adultes).

Les pertes économiques engendrées par le BLV sont également importantes, notamment au niveau de la production laitière. De plus, le seul recours actuel en cas d'infection consistant en l'abattage des bêtes atteintes, il en résulte un dommage énorme pour les propriétaires.

Il existe actuellement beaucoup de données moléculaires, sérologiques et hématologiques concernant la maladie, mais très peu au niveau physiopathologique. Une meilleure connaissance du mécanisme d'infection permettra d'élaborer de bonnes méthodes diagnostiques et de mieux contrôler la maladie.

D'autre part, vu les similarités entre le BLV et les virus T-lymphotropes humains, HTLV-I et II (vecteurs de leucémies humaines), l'étude de ce virus semble être un modèle d'étude appréciable pour toutes les affections rétrovirales.

1. LEUCOSE BOVINE.

Les premières descriptions de forme de leucose chez les bovidés se rencontrent dans des journaux d'origine germanique de la fin du XIX^e siècle (Leisering, 1871). Très vite, on se rendit compte que la leucose bovine constituait une entité clinique définie et que l'Europe était le berceau de la forme enzootique. D'autres descriptions indiquent que la maladie est dispersée uniformément dans les différentes régions géographiques (Portetelle, 1990).

LEUCOSE BOVINE ENZOOTIQUE (lymphosarcome multicentrique)	LEUCOSE BOVINE SPORADIQUE
<p>Noeuds lymphoïdes :</p> <ul style="list-style-type: none"> iliaques (65 à 83%) intrathoraciques (62 à 74%) mésentériques (66%) superficiels (41 à 62%) <p>Rate (10 à 50%)</p> <p>Thymus (parfois)</p> <p>Amygdales pharyngiennes (12%)</p> <p>Moëlle osseuse (40%)</p> <p>Foie (30 à 40%)</p> <p>Coeur (50 à 90%)</p> <p>Poumons (10 à 15 %)</p> <p>Utérus (12 à 15%)</p> <p>Reins (50%)</p>	<p>Lymphosarcome de veau :</p> <ul style="list-style-type: none"> Noeuds lymphoïdes (généralisés) Moëlle osseuse Rate (70 à 90%) Reins et foie (fréquemment) <p>Lymphosarcome thymique :</p> <ul style="list-style-type: none"> Thymus et cou (presque toujours) Noeuds lymphoïdes Moëlle osseuse Coeur Rein Rate <p>Lymphosarcome cutané :</p> <ul style="list-style-type: none"> Cou, dos et cuisse (en surface) Noeuds lymphoïdes Infiltration des viscères.

TABLEAU I : Lieux privilégiés de développement de tumeurs pour la leucose bovine (en % de cas) (d'après Olson et Miller, 1987).

INTRODUCTION

1.1. Terminologie

La leucose bovine englobe à la fois une pathologie maligne néoplasique de cellules lymphoïdes (lymphosarcome) et une lymphocytose persistante. Cette maladie peut être scindée en leucose bovine enzootique (associée au BLV) et leucose bovine sporadique (non associée au BLV).

Les développements tumoraux en résultant concernent un ensemble de lieux (**Tableau I**), mais aussi différentes lignées lymphoïdes : cellules B pour la forme enzootique et T pour la forme sporadique. Il ne sera plus question par la suite de cette dernière, étant donné son indépendance probable vis-à-vis du BLV.

La lymphocytose persistante résulte d'une augmentation des lymphocytes B du sang périphérique et concerne 30% des animaux infectés.

Le terme de leucémie ne s'applique que lors d'envahissement du sang par des cellules tumorales (Olson et Miller, 1987).

1.2. Virus de la leucémie bovine.

L'agent étiologique de la maladie est un rétrovirus de la famille des oncovirinae: le BLV. La première méthode reproductible de détection a été décrite en 1969. Des cellules de vaches infectées, stimulées à la PHA (phytohémagglutinines), étaient en effet capables de produire des particules virus-like (semblables morphologiquement à des particules de type C représentant le virus de la leucémie chez d'autres espèces). Mais ce n'est qu'en 1972 que leur activité biologique a été démontrée (Miller et Olson, 1987).

1.2.1. Génome viral.

Par analogie avec les autres rétrovirus connus et grâce aux techniques de l'ingénierie génétique, la structure génomique du BLV a été établie. Structuellement et fonctionnellement, il est apparenté au virus T-lymphotropes, HTLV-I et HTLV-II, vecteurs des leucémies virales humaines (Burny et al., 1987).

La principale caractéristique des rétrovirus est de posséder un génome constitué de RNA. Ce n'est que lors de l'infection d'une cellule que

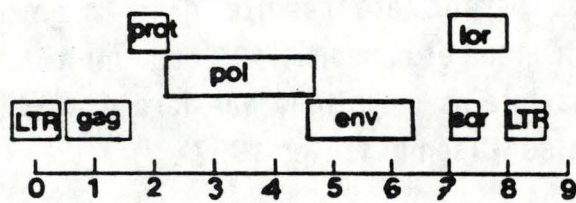


Figure 1 : Structure génomique du BLV (d'après Burny et al., 1987).

INTRODUCTION

le virion pourra transformer son patrimoine génétique en DNA (grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse) et s'intégrer au DNA hôte.

La structure génétique peut être résumée en une séquence : RU5-GAG-(PROT)-POL-ENV-pXBL-RU3 (**Figure 1**), R représentant une séquence de nucléotides répétée aux extrémités 5' et 3'. Les gènes GAG, POL et ENV codent respectivement pour des protéines structurales, une polymérase et des glycoprotéines d'enveloppe. pXBL est un gène qui pourrait intervenir dans la production d'une protéine transactivante (Ghysdael et al., 1987).

a). Produits du gène GAG : Protéines structurales internes.

Il existe 4 protéines structurales que l'on dénomme p suivi de leur poids moléculaire (en Kilodaltons) :

- p24 est une protéine neutre, constitutive de la capside.
- p15 est la phosphoprotéine majeure du virion. Deux populations semblent exister, l'une est liée à la bicouche lipidique de la membrane virale, l'autre au RNA viral.
- p12 est associée au RNA viral.

La fonction et la nature exacte de p10 n'ont pas encore été démontrées.

Le gène GAG encode en fait un précurseur protéinique de 45 KDa contenant les déterminants antigéniques de p24, p15 et p12.

Il est protéolytiquement clivé pour générer chacune de ces protéines (Ghysdael et al., 1987).

b). Produits de transcription du gène POL : Transcriptase inverse et endonucléase.

Approximativement 500 paires de bases en aval du codon terminal de GAG, s'étend une ORF (Open Reading Frame) qui encode pour une séquence de 852 a.a. : le gène POL. Un domaine de 55 a.a. du côté 5' serait responsable de la production de la transcriptase inverse tandis que l'autre partie coderait pour une endonucléase.

A l'heure actuelle, les mécanismes de transcription et de traduction du gène POL ne sont pas clairement connus.

c). Produits de ENV (qui overlappe en partie POL) : Glycoprotéines d'enveloppe.

L'enveloppe du virion possède 2 types de glycoprotéines de respectivement 51 KDa (gp51) et 30 KDa (gp30). Ces protéines proviennent d'un précurseur glycosylé de 72 KDa (gp72). Son homologue non glycosylé de 47 KDa n'est pas clivé par la suite, ceci indiquant l'importance de la glycosylation dans la reconnaissance des enzymes de clivage.

La principale fonction de gp30 (protéine transmembranaire) est probablement d'ancrer le complexe glycoprotéinique dans la membrane du virus, mais aussi des cellules infectées (Burny et al., 1987). La gp51 (protéine d'enveloppe externe) est responsable de propriétés biologiques du virus. Les anticorps monoclonaux ont permis de découvrir 8 épitopes (A à H) de gp51 parmi lesquels seuls F, G et H sont impliqués dans les mécanismes d'infection du virus et la formation de syncytia par les cellules productrices de BLV (Ghysdael et al., 1987).

d). Produits de pXBL : Protéines de régulation.

Deux ORF situés entre ENV et LTR (Long terminal Repeat) codent pour des protéines complètement différentes des autres. Il s'agit d'une LOR (Long Open Reading Frame) et une SOR (Short Open Reading Frame) dont les produits sont des protéines de respectivement 34 et 18 KDa.

La p34 agirait comme transactivateur de la région promoter-enhancer des LTR virales, mais aussi de certains gènes cellulaires. p18 joue un rôle régulateur post-transcriptionnel et est impliqué dans le phénomène d'épissage des mRNA viraux et peut-être dans le transfert de RNA du noyau vers le cytoplasme (Portetelle, 1990).

Cette situation présente une grande homologie avec les virus HTLV-I et HTLV-II et pourrait amener des éclaircissements dans le processus de leucémogénèse.

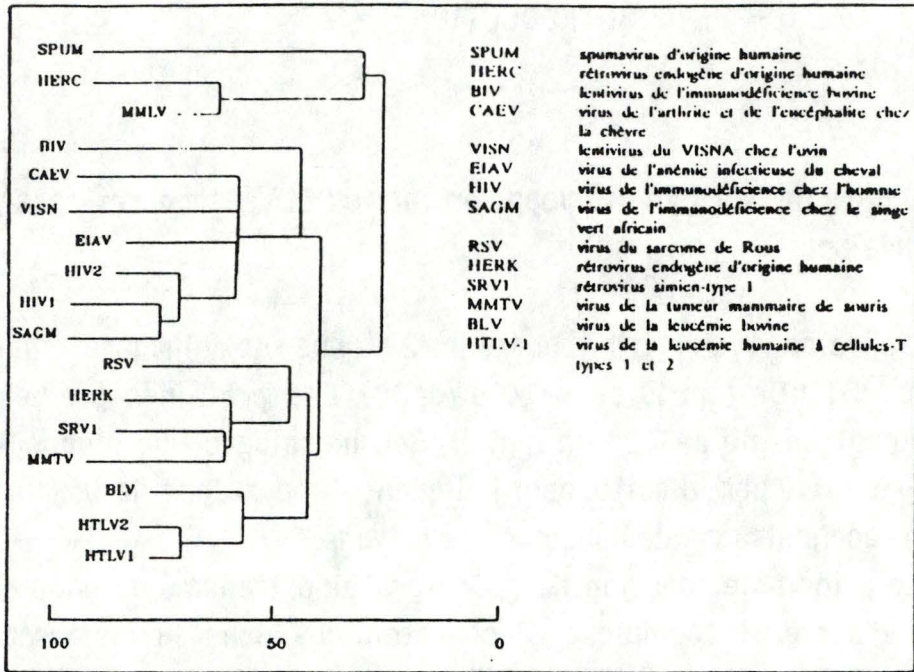


Figure 2 : Phylogénèse des rétrovirus des vertébrés, établie d'après les divergences des séquences nucléotidiques de la transcriptase inverse (d'après Portetelle, 1990).

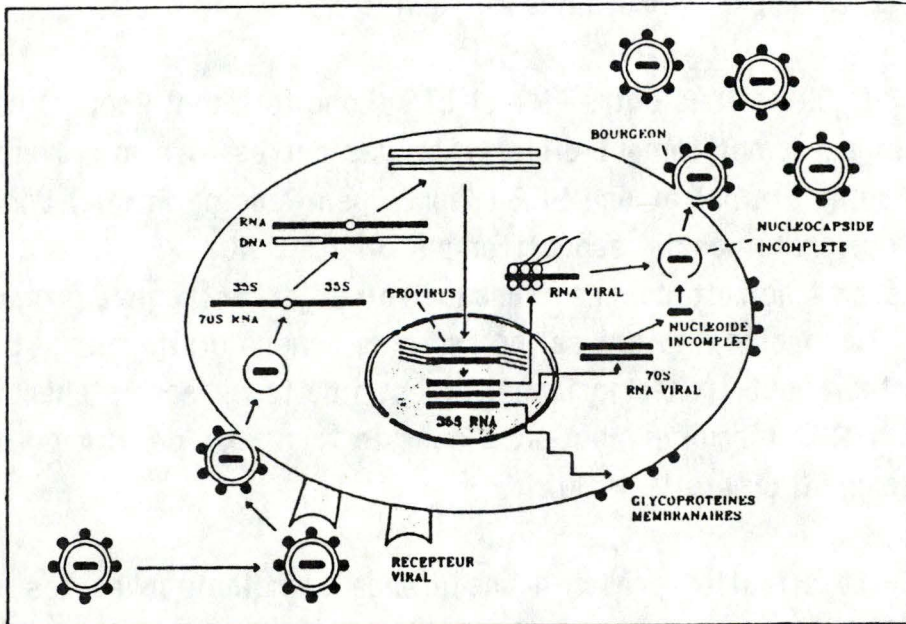


Figure 3 : Cycle de répliation d'un rétrovirus (d'après Portetelle, 1990).

INTRODUCTION

e). BLV comme modèle d'étude des HTLV.

Les maladies induites par le BLV et les HTLV-I et HTLV-II, bien qu'impliquant des cellules-cibles différentes (lymphocytes B pour BLV et lymphocytes T pour HTLV) comportent des similarités épidémiologiques, pathologiques et biochimiques. De plus, autant au niveau de la structure du génome (5'-GAG-PROT-POL-ENV-pXBL-3') que des séquences nucléotidiques, il existe une grande ressemblance entre ces virus. Ceci pourrait soutenir l'hypothèse d'une nouvelle classe de virus (à transformation aigue ou non aigue) (**Figure 2**) (Ghysdael et al., 1987).

1.2.2. Réplication.

Le cycle de réplication du BLV est très similaire aux autres rétrovirus. Il débute par l'adsorption du virus sur son récepteur cellulaire. Après fusion avec la membrane et déshabillage du virus, la transcription inverse conduit à une copie du DNA double brin complémentaire du RNA viral. Ce DNA est intégré au DNA-hôte et est alors appelé provirus.

Après activation, le DNA proviral est transcrit par des RNA polymérases. Ce RNA devient soit génomique, soit messenger en vue de la formation des protéines virales. Les nouveaux virions quittent la cellule en bourgeonnant à la surface cellulaire (Portetelle, 1990) (**Figure 3**).

1.3. Transmission du BLV.

1.3.1. Espèces cibles.

Des cas d'infections naturelles sont présentées par des bovins et des moutons. La maladie peut-être transmise expérimentalement chez la chèvre, le lapin, le singe Rhésus et le chimpanzé (Burny et al., 1987).

Les moutons semblent hautement réceptifs au BLV. Lors d'infections expérimentales, tous les sujets présentent des anticorps anti-BLV 2-3 mois p.i. (post-inoculation). Après 10-13 mois, une lymphocytose persistante est détectée dans 50% des cas. Un lymphosarcome apparaît pour 40% des bêtes 1 à 6 ans p.i.. Tout comme chez le bovin, un désordre des

INTRODUCTION

cellules B a été démontré. Le modèle ovin pourra donc servir comme base d'étude des propriétés biologiques des rétrovirus (Djilali et Parodi, 1989).

Jusqu'à présent, il n'a jamais été prouvé que le BLV est transmissible à l'homme.

1.3.2. Modes de transmission.

Plusieurs expériences témoignent de la possibilité de transmission de la maladie par un mode vertical (prénatal), mais seulement à condition que la mère ait développé une lymphocytose permanente (Straub, 1987).

Dans la majorité des cas, la transmission semble être post-natale. Divers cas d'infections par contact, par le colostrum (Straub, 1987) mais aussi par l'intermédiaire d'insectes (Manet et al., 1987) ont été décrits.

Mais, le principal vecteur de la maladie semble être la cellule infectée. Une quantité importante de cellules peut être véhiculée par le sang, le plasma, des aiguilles réutilisées par des vétérinaires peu scrupuleux et même des gants provenant d'examen gynécologiques (Burny et al., 1987).

1.4. Différents aspects de la maladie.

La leucose bovine enzootique est une pathologie chronique car elle évolue au cours de plusieurs années.

Elle se caractérise principalement par:

-l'absence de virémie : le provirus n'est réactivé qu'*in vitro* lorsque les cellules sont stimulées, en absence de facteurs plasmatiques inhibiteurs (Cornil et Lévy, 1989), grâce à une production de lymphokines par les lymphocytes T, des composants du sérum de veau foetal ou des mitogènes (Portetelle, 1990).

-une longue période de latence pendant laquelle le seul signe d'infection est la présence d'anticorps dirigés contre les protéines virales gp51 et p24. Malgré leur titre élevé, leur pouvoir neutralisant *in vitro* ne

INTRODUCTION

peut enrayer l'infection. Moins de 20% des cellules semblent contenir le provirus intégré (Portetelle,1990). De plus, une multiplicité de sites d'intégration a été montrée (Kettmann et al.,1987).

-une phase de lymphocytose persistante qui n'apparaît que dans 10 à 30% des cas. Elle se caractérise par l'accroissement du nombre de lymphocytes circulants. **Pour être reconnu en lymphocytose, un animal doit posséder un nombre de lymphocytes qui dépasse de 3 déviations standards la valeur reconnue comme normale pour un animal de cet âge et maintenir cette quantité plus de 3 mois.** Les lymphocytes peuvent ainsi représenter plus de 90% de leucocytes. 20 à 30% de ceux-ci contiennent le provirus intégré à divers sites. La population infectée semble donc être polyclonale (Portetelle,1990). La présence des provirus paraît corrélée à la présence en surface des cellules, de marqueurs B (chaînes μ et légères) et T (CD5) (Depelchin et al.,1989).

-une phase tumorale atteignant 0,1 à 20% des bovins infectés. Elle n'est pas nécessairement précédée par une lymphocytose. Les cellules tumorales sont caractérisées par un antigène spécifique "tumeur-associé" (antigène TAA). Ce marqueur est également exprimé sur des cellules circulantes du sang d'animal leucosique, bien avant le stade tumoral. L'antigène TAA, par ailleurs absent de composants classiques du BLV, permettrait donc de détecter un développement tumoral potentiel (Onuma,1987).

Les cellules tumorales issues des lymphocytes B possèdent toujours au moins une copie du provirus, complète ou délétée (mais jamais du côté 3'), et intégrée au même endroit pour toutes les cellules de la tumeur. Elles présentent de nombreuses anomalies chromosomiques. L'intégration du provirus n'est pas préférentielle pour un locus défini et son expression n'est pas nécessaire au maintien des signes cliniques de la maladie (Kettmann,1986) et à l'état transformé des cellules (Van den broeke et al.,1988).

La pathogénie du BLV est donc associée à une perturbation considérable du système immunitaire de l'hôte. Ce désordre est également caractérisé par une diminution de production d'immunoglobulines M (IgM) dans le sang, la rate et les noeuds lymphoïdes, mais aussi une réactivité biologique plus faible de ceux-ci (bien qu'ils conservent leur structure naturelle) et une réduction de lymphocytes T du sang périphérique. Cette

INTRODUCTION

observation pourrait être mise en relation avec la défécation de lymphocytes T helper au niveau du SIDA (Ungar-Waron et Trainin, 1987).

1.5. Cellules cibles de BLV et interactions hôtes virus.

1.5.1. Animaux infectés.

S'il est certain qu'il n'existe pas de virémie, l'identité des cellules impliquées dans la réplication du BLV *in vivo* n'est pas claire. Il est établi que le BLV persiste dans des cellules B et que la proportion de ces cellules augmente appréciablement avant toute élévation du nombre total de lymphocytes circulants. De plus, la surface de certaines de ces cellules comporte des altérations au niveau de la composition de leurs sucres, témoignant de l'arrêt de ces cellules à un stade précoce de maturation.

Le génome du virus paraît transcriptionnellement réprimé, à la fois dans les cellules transformées et non transformées *in vivo*. Le mécanisme de ce processus n'est pas encore compris actuellement, mais certaines protéines plasmatiques (Platelet Derived Factor et Platelet Blocking Factor) agissant de manière antagoniste pourraient participer à cette régulation (Burny et al., 1987).

1.5.2. Animaux en lymphocytose persistante.

La prolifération polyclonale des lymphocytes B est une réponse à une stimulation constante du virus. Mais, il semble que la progression subclinique de la maladie soit sous contrôle du système BoLA (Bovine Leucocytes Antigen) qui sélectionnerait la résistance individuelle à la prolifération cellulaire (Burny et al., 1987). Ce système analogue, aux Human Leucocytes Antigen et H-2 murin, est représenté par une région particulière du génome (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), dont les produits (Antigènes de classes I et II) sont responsables des spécificités antigéniques individuelles (Stone et al., 1981).

Néanmoins, ce système paraît échapper à toute régulation à certains moments. Les cellules infectées par le virus (1/3 à 1/4) sont apparemment au repos, à l'inverse des cellules sans BLV, très réactives à

INTRODUCTION

tout stimulus *in vivo*. L'analyse en cytométrie de flux a révélé sur ces cellules une augmentation des IgM, mais aussi l'expression d'un marqueur de cellules T (CD5), seulement présent tôt au cours de l'ontogenèse des lymphocytes B normaux. Il reste à savoir si le BLV comporte un tropisme particulier pour ces cellules et permet leur prolifération ou si la pénétration du virus engendre l'acquisition de nouveaux marqueurs (Depelchin et al., 1989).

1.5.3. Animaux en phase tumorale.

La plupart des cellules tumorales contiennent le provirus. La présence de celui-ci semble donc indispensable au développement de la tumeur. Comme nous l'avons vu précédemment, le provirus est parfois délété, mais est toujours capable d'encoder une protéine transactivante p34. Il est possible que les cellules non délétées en cette séquence soient sélectionnées comme clone de la tumeur (Burny et al., 1987).

Au niveau phénotypique, la cytométrie de flux nous incite à penser que les cellules tumorales correspondent à des pré-B bloquées à un stade encore indéfini (Letesson et al., 1990).

1.6. Modes d'action du BLV

Les modes de transformation de cellules par les virus HTLV et BLV semblent liés, mais restent toujours obscurs. Au delà des doutes, le gène viral responsable de l'expression d'une protéine transactivante joue un rôle-clé dans l'interaction hôte-virus. Pour certains chercheurs, le virus est nécessaire, mais pas suffisant. Il reste à connaître la nature et le nombre de circonstances impliqués dans ce processus (Burny et al., 1987).

Etant donné que le virus est indispensable aux étapes initiales du processus, mais ne l'est apparemment pas plus tard, l'expression transitoire de gènes viraux pourrait mener à l'expression permanente de gènes cellulaires critiques. Cet état latent du virus qui n'est pas dû à une altération de structure est sous l'influence d'un facteur plasmatique, peut être apparenté à l'interleukine 4 (IL-4) (Cornil et Lévy, 1989).

L'expression de gènes viraux dépend de l'action de la p34, mais aussi du patrimoine génétique et de l'état de différenciation de la cellule (Rosen et al., 1985).

INTRODUCTION

D'après Portetelle (1990), la p34 ne peut agir directement sur les séquences LTR virales. Elle perturberait en fait l'activité d'oncoprotéines dont le rôle essentiel est de relayer les stimuli extérieurs jusqu'à la machinerie transcriptionnelle et modifierait finalement le programme génétique de la cellule. Ceci permettrait l'expression transitoire d'antigènes viraux à certains stades de développement cellulaire et expliquerait la stimulation quasi permanente du système immunitaire. Suivant sa rencontre ou non avec une série d'oncoprotéines, la p34 transactiverait certains gènes cellulaires et dirigerait l'animal vers tel ou tel effet de la maladie (affection asymptomatique, lymphocytose persistante ou tumeur)

Il en est ainsi pour le système HTLV, analogue au BLV. La dérégulation de l'oncogène c-myc pourrait contribuer à l'obtention d'un phénotype transformé (peut-être les cellules BCD5⁺, Ig M⁺, Ag de classe II⁺).

D'autre part, le degré de phosphorylation de la p34 semble jouer un rôle important dans la transformation cellulaire. La déphosphorylation, due à une action immunitaire intense, lui conférerait ses propriétés transformantes.

Jusqu'à présent il n'a pas encore été possible de trouver un modèle susceptible d'expliquer les mécanismes de transformation cellulaire liés à l'infection au BLV. Il est certain qu'il existe un équilibre entre les interactions intra et intercellulaires où interviennent de temps à autres les antigènes viraux (gp51, gp30, p34,...), des lymphokines, des inhibiteurs plasmatiques ou cellulaires, des oncoprotéines intracellulaires, des cellules porteuses de marqueurs pré-B ou de l'antigène TAA (Portetelle, 1990).

Ces interactions semblent aussi varier suivant la susceptibilité individuelle.

Un des phénomènes capitaux accompagnant l'infection d'un animal par le BLV est la perturbation de certaines caractéristiques phénotypiques de la population de lymphocytes B. Il nous semble donc opportun d'étudier plus profondément ces acteurs de la réponse immunitaire spécifique.

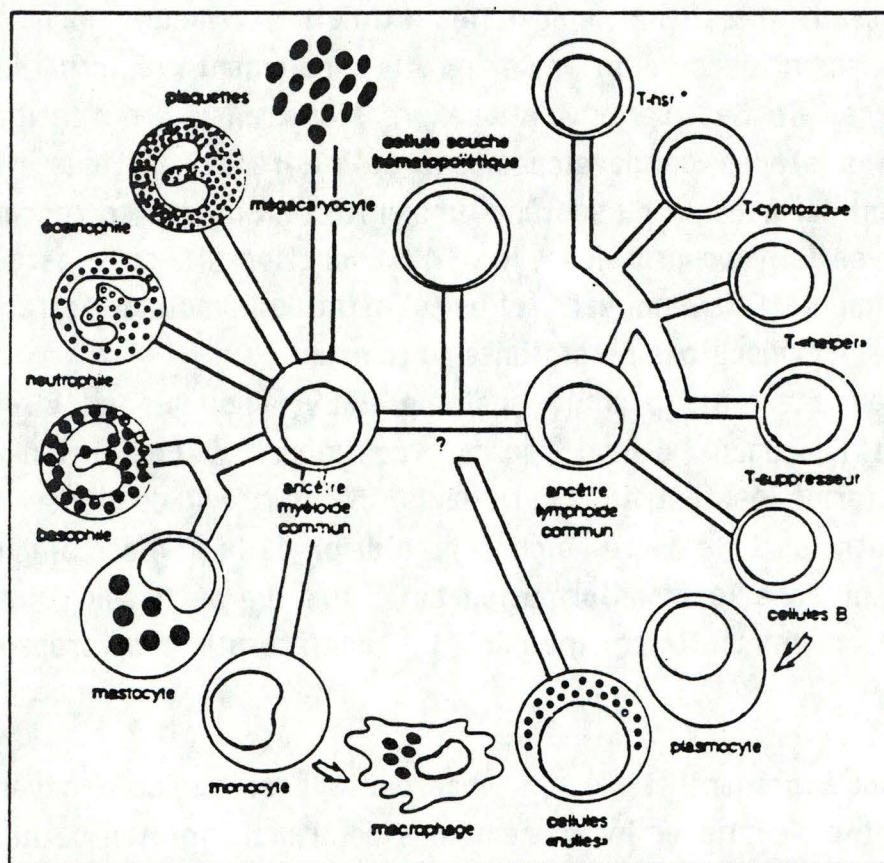


Figure 4 : Lignées cellulaires formées à partir des cellules-souches pluripotentes (d'après Roitt et al., 1985).

2. LYMPHOCYTES B CLASSIQUES.

Les cellules spécialisées dans la production d'anticorps sont nommées lymphocytes B pour rappeler leur origine: la moëlle osseuse (Bone marrow) chez les mammifères et la bourse de Fabricius chez les oiseaux.. Elles se localisent préférentiellement dans les zones définies de formations lymphoïdes secondaires. Ces cellules sont petites (5 à 8 μm) et ne sont pas distinguables des lymphocytes T au niveau morphologique. La distinction fondamentale peut néanmoins se faire sur base de marqueurs membranaires acquis lors de l'ontogenèse.

2.1. L'ontogenèse.

Au niveau médullaire, des cellules-souches pluripotentes sont à l'origine de deux lignées constitutives du système immunitaire qui donneront naissance aux phagocytes et aux lymphocytes (**Figure 4**).

Les précurseurs lymphoïdes vont alors subir une maturation leur conférant leur spécificité (Roitt et al., 1985).

S'il a été prouvé depuis un certain temps le rôle de la bourse de Fabricius dans la maturation des cellules-précurseurs chez les oiseaux (Glick et al., 1956), le mécanisme semble plus compliqué chez les mammifères. En effet, il n'existe pas un organe unique spécialisé dans la constitution des lymphocytes B, puisque la moëlle osseuse, le foie et la rate (chez l'embryon pour ces deux derniers) semblent y tenir une place importante. En fait, cette apparente complexité reflète leur activité spécifique à certaines étapes de développement (Gathings et al., 1977).

Ainsi, le foie foetal, site initial de production de lymphocytes B, est relayé par la moëlle osseuse chez l'adulte (Rosse, 1981). A ce niveau, les principaux stades de différenciation se font de manière centripète. A la périphérie, on observe de grandes cellules lymphoblastiques à division rapide: ce sont les progéniteurs. A partir de ces cellules, se produit un réarrangement génique conduisant à la synthèse de chaînes lourdes (μ) intracytoplasmiques. Ces petits lymphocytes qui constituent le premier signe de différenciation sont appelés cellules pré-B. Le stade suivant est celui des cellules B jeunes ou immatures. Cette étape correspond à l'acquisition d'immunoglobulines membranaires de type IgM.

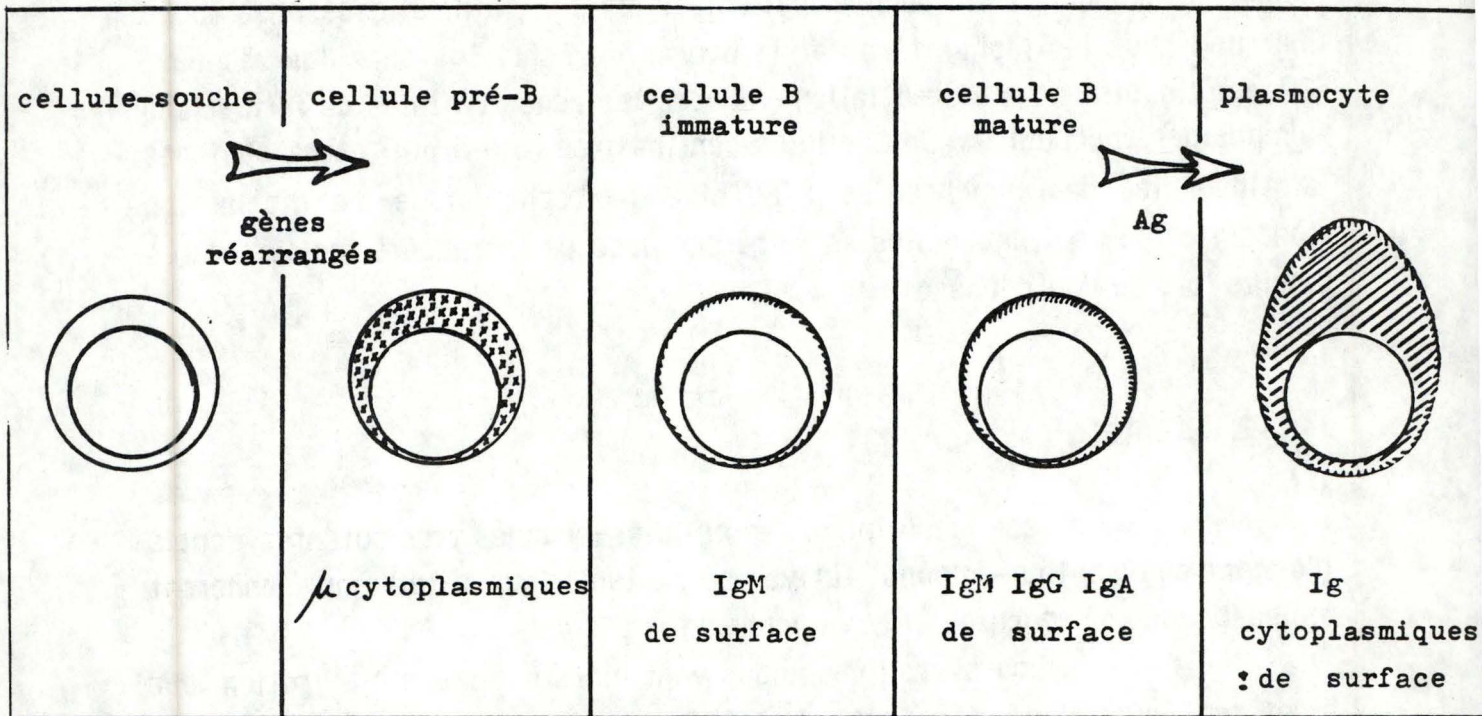


Figure 5: Principaux stades de la maturation des lymphocytes B.

INTRODUCTION

Ces cellules complètent leur maturation sur place ou migrent vers la rate ou d'autres sites. Les transformations diverses qui conduiront aux cellules B matures se traduisent par une plus grande densité d'IgM, mais aussi par la présence d'autres marqueurs tels que les IgD membranaires, les récepteurs à fragment Fc des Ig, des récepteurs de la molécule C3b du complément et des Ag de classe II (Roitt et al., 1985).

Le développement ultime (plasmocyte) dépendra d'une rencontre éventuelle avec un antigène spécifique et la stimulation en résultant (**Figure 5**). La diversification des cellules B se manifeste aussi par un switch ("passage") de la partie constante de la chaîne lourde, des IgM au cours de la réponse immunitaire (vers les IgG et IgE), suivant leur lieu d'action (IgA) ou la spécificité du stimulus. Ce processus sera détaillé plus tard (cfr.2.3.4.). Malgré cette grande diversité, un lymphocyte ne secrète qu'un seul type d'Ig (Roitt et al., 1985).

On retrouve normalement les plasmocytes dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils représentent physiologiquement moins de 0,1% des lymphocytes B. Certaines cellules matures ne développent pas le matériel d'Ig. Ces "cellules folliculaires" colonisent les centres germinatifs et constitueraient un pool de cellules mémoires.

L'ontogenèse permet donc aux lymphocytes d'acquérir leur spécificité en terme d'anticorps, mais aussi de marqueurs membranaires. Ceux-ci peuvent être le signe de fonctions très spécialisées et même de lignées cellulaires séparées.

2.2. Marqueurs membranaires.

Le développement de la production d'anticorps monoclonaux a rendu possible une meilleure détermination des antigènes de surface. Ceux-ci ont été regroupés chez l'homme en Cluster de différenciation (CD) (**Tableau II**). L'analyse biochimique a montré une forte analogie entre les marqueurs CD humains et Ly murins (Huang et al., 1987). Cela a permis de découvrir que la structure générale et l'expression de certains gènes ont été conservées au cours de l'évolution (IgM membranaires, récepteurs de cellules T à l'antigène, CD5,...).

Dans la majorité des cas, la fonction des molécules répertoriées est toujours obscure. On dispose néanmoins de diverses informations à leur

Antigen	Formerly	Mol. wt (kDa)	Distribution	Comments
CD1a	CD1	49	thymocytes (Langerhans' cells)	
CD1b	CD1	45	thymocytes	
CD1c	CD1	43	thymocytes	
CD2		50	T cells	
CD3		20,26	T cells	
CD4		60	T subset	
CD5		67	T cells	
CD6		120	T cells	
CD7		40	T cells	Fc γ R
CD8		32	T subset	
CD9		24	monocytes, pre-B, platelets	
CD10		100	pre-B, ^a CALL	
CD11a	CDw18	180 (95)	leucocytes	
CD11b	CD11	160 (95)	monocytes, granulocytes	
CD11c		150 (95)	monocytes (granulocytes)	
CDw12			monocytes, granulocytes, platelets	
CD13	CDw13	150	granulocytes, monocytes	
CD14	CDw14		monocytes (granulocytes) ^b FDRC	
CD15	CDw15	-	granulocytes (monocytes)	X hapten
CD16		50-60	granulocytes	FcR γ
CD17		-	granulocytes, monocytes, platelets	lactosyl-ceramide
CD18		95	leucocytes	LFA-B
CD19		95	B cells	
CD20		35	B cells, FDRC	
CD21		140	B cells, FDRC	C3dR
CD22		135	B cells	
CD23		45	B subset, FDRC	
CD24		45, 55, 65	B cells, granulocytes	
CD25		55	activated T cells	IL-2R
CDw26		130	activated T cells	
CD27		120->55	T cells, plasma cell	
CD28		44	T subset	p44 (9.3)
CDw29		135	T subset	4B4
CD30			activated T cells, activated B cells	Ki-1
CD31		130-140	monocytes, granulocytes, platelets (T cells) (bone marrow)	?gpIIa
CDw32		40	monocytes, granulocytes, platelets, B cells	?FcR γ
CD33		67	myelogenous leukaemia	
CD34		115	myeloid and lymphoblastic leukaemia	
CD35		220	granulocytes, monocytes, FDRC	CR1
CD36		85	monocytes, platelets	gpIV
CD37		40-45	B cells	
CD38		45	restricted multiple lineages	
CD39		80	B cells, macrophages, vessels	
CDw40		50	B cells, carcinomas, ^c IRC	gpIIb/IIIa
CDw41			platelets	gpIb
CDw42			platelets	
CD43		95	T cells, granulocytes, red cells, brain	
CD44		65-85	T cells, pre-B, brain, granulocytes	T200, LCA
CD45		220, 205, 190, 180	leucocytes	restricted T200 2H4 etc
CD45R		220, 205	B cells, T subset, granulocytes, monocytes	

^aCALL = common type acute lymphoblastic leukaemia.

^bFDRC = follicular dendritic reticulum cells.

^cIRC = interdigitating reticulum cells.

Weak reactions shown in parentheses. Molecular weights in kDa, all reduced except CD27 125 non-reduced -> 55 reduced.

Note that the nomenclature CD1a,b,c, CD11a,b,c, CD18, CD27-45R is provisional. It has been recommended by the workshop nomenclature committee but still has to be approved by IUIS-WHO.

Tableau II : Liste des principaux marqueurs de surface répertoriés (d'après Shaw, 1987).

INTRODUCTION

sujet. Ainsi, CD21 a une faible affinité pour le composant C3d du complément et est le récepteur de l'Epstein-Barr Virus (EBV). De même, CD23 pourrait agir comme récepteur de la portion Fc des IgE (Teder et al., 1984).

Pour certaines de ces molécules, nous possédons des données particulièrement précises. Un groupe important de molécules présentes sur les cellules B est constitué par les molécules de classe II du CMH. Chez l'homme et la souris, ces hétérodimères sont formés chacun d'une chaîne α et d'une chaîne β . Ils jouent un rôle déterminant dans la liaison des fragments d'antigène exogènes processés, en permettant la fixation des récepteurs des lymphocytes sur l'antigène et en améliorant le processus de présentation de l'antigène. Leur expression sur les cellules humaines est déjà constatée au stade pré-B tandis que leur apparition sur les cellules murines ne se réalise pas avant la maturité des lymphocytes B. De plus, l'augmentation de ces molécules est drastique (Roitt et al., 1985). Dans ces cas, la densité reflète donc l'état de maturité du lymphocyte B, son implication dans la réponse immune ainsi que sa sensibilité vis-à-vis des lymphokines (Mond et al., 1986).

La molécule Ly1 ou CD5, marqueur ubiquiste des lymphocytes T, a été découverte sur des cellules B murines et humaines. Les cellules BCD5 sont peu présentes dans des conditions normales. Chez la souris, on en détecte dans les rates néonatales et dans les cavités péritonéales foetales et adultes. Par contre, on en trouve en quantité beaucoup plus importante chez des individus (souris et homme) souffrant de maladies auto-immunes ou infectés par un rétrovirus. Certaines caractéristiques suggèrent une grande spécificité de ces cellules, donnant lieu de croire qu'il pourrait s'agir d'une lignée B indépendante. Ce point précis sera développé plus tard (cfr. 3.) (Hardy et Hayakawa, 1986).

Les Ig sont parmi les constituants majeurs de la membrane des lymphocytes B. Ces récepteurs immunoglobuliniques sont les piliers de la réponse spécifique à l'antigène. Seule la présence d'une chaîne supplémentaire d'acides aminés hydrophobes à l'extrémité des anticorps (assurant leur ancrage membranaire) les différencie des Ig sécrétées.

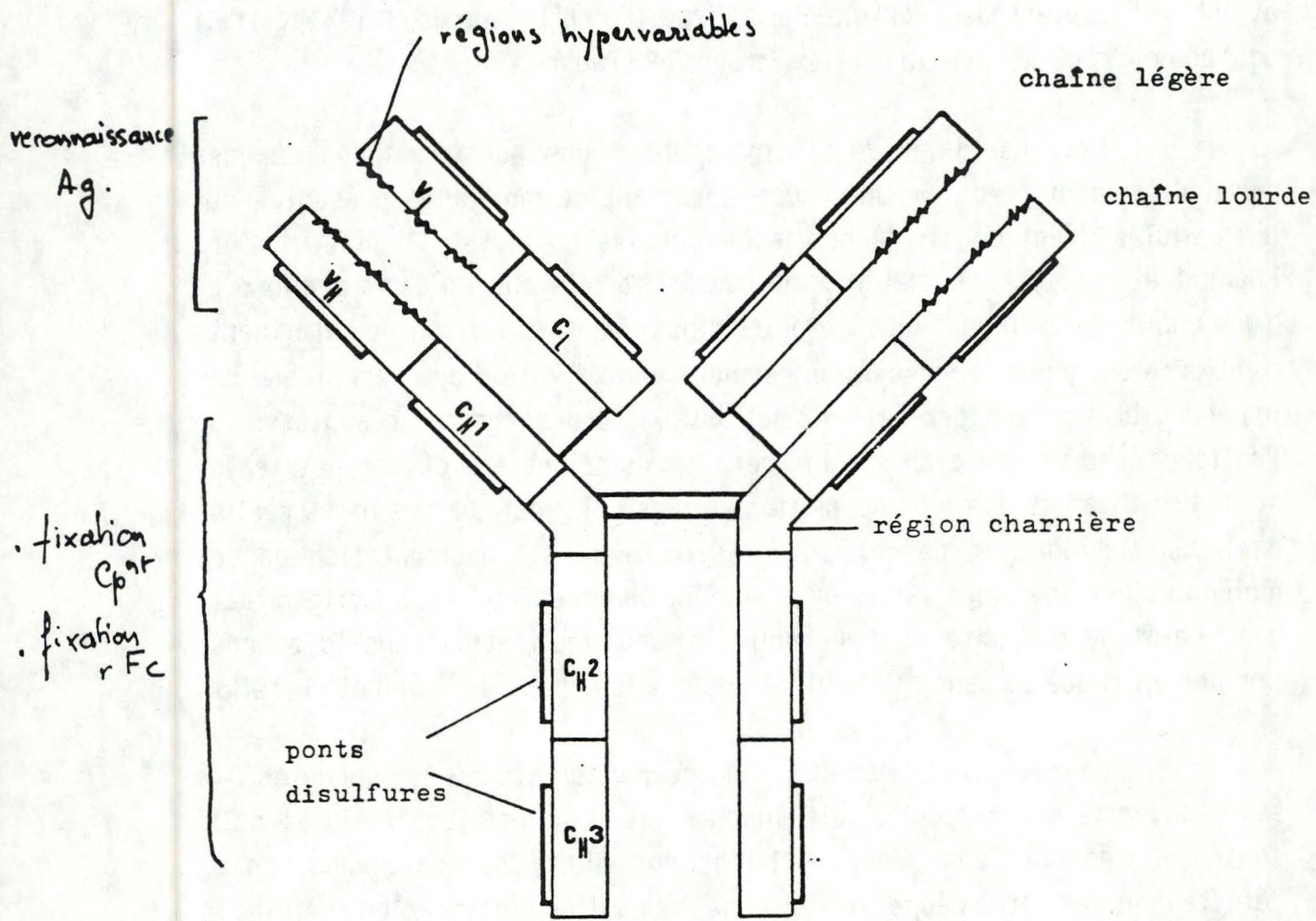


Figure 6 : Structure d'une IgG.

INTRODUCTION

2.3. Les immunoglobulines.

2.3.1. Structure des immunoglobulines.

La structure de base des anticorps compte quatre chaînes protéiques : deux chaînes lourdes (H) de 55000 Daltons et deux chaînes légères (L) de 25000 Daltons. On ne rencontre, chez la plupart de vertébrés, que deux types de chaînes L : Kappa (K) et Lambda (λ). Par contre, les chaînes H peuvent être $\mu, \gamma, \alpha, \epsilon$ et δ caractérisant leur classe (IgM, IgG, IgA, IgE et IgD) et leur fonction. Pour une même molécule d'anticorps, les deux chaînes H et les deux chaînes L sont de même type. De plus, l'analyse biochimique a montré que chacune d'entre elles comporte une région variable d'un anticorps à l'autre (V_L et V_H), ainsi qu'une région constante (C_L et C_H). C'est par la région variable que se fait la reconnaissance d'une partie de l'antigène : le déterminant antigénique (**Figure 6**).

La nature compte une infinité de tels déterminants. La quantité d'anticorps que doit produire un organisme pour répondre à cette diversité est également importante. Cependant, tous ne peuvent être totalement programmés dans l'ADN chromosomique. Il n'existe pas de gène qui code pour chaque anticorps. On explique en fait la variété de leur spécificité par un remaniement génétique au sein des gènes codant pour les parties variables et constantes des Ig (Roitt et al., 1985).

2.3.2. Organisation des gènes d'Ig. et diversité.

Chaque chaîne constituant l'anticorps est synthétisée d'une seule pièce (un seul mRNA est porteur de l'information pour la région V et la région C). Les gènes qui codent pour les régions V et C sont contigus sur le chromosome au moment où ils sont transcrits en mRNA. Avant cette transformation, les gènes V et C ont été choisis et transloqués l'un à côté de l'autre. La nature du gène V transloqué et du gène C mis en contact avec lui définissent à ce moment la spécificité et la classe d'anticorps produits par le lymphocyte.

Il existe 3 familles de gènes V et C: une pour les chaînes légères λ , une pour κ et une qui regroupe les gènes des différentes classes de chaînes lourdes. Sur le chromosome codant pour la chaîne λ (**Figure 7**), se trouve un

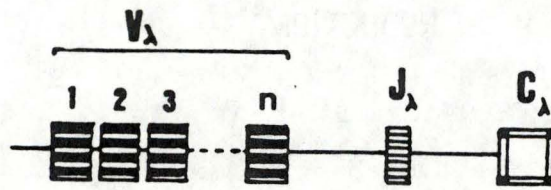


Figure 7 : Région génique codant pour la chaîne légère λ .

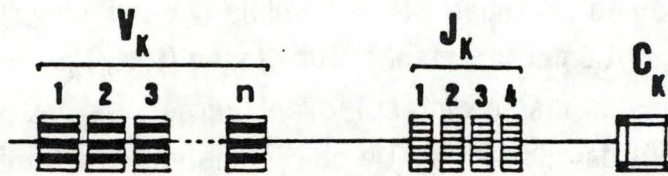


Figure 8 : Région génique codant pour la chaîne légère κ .

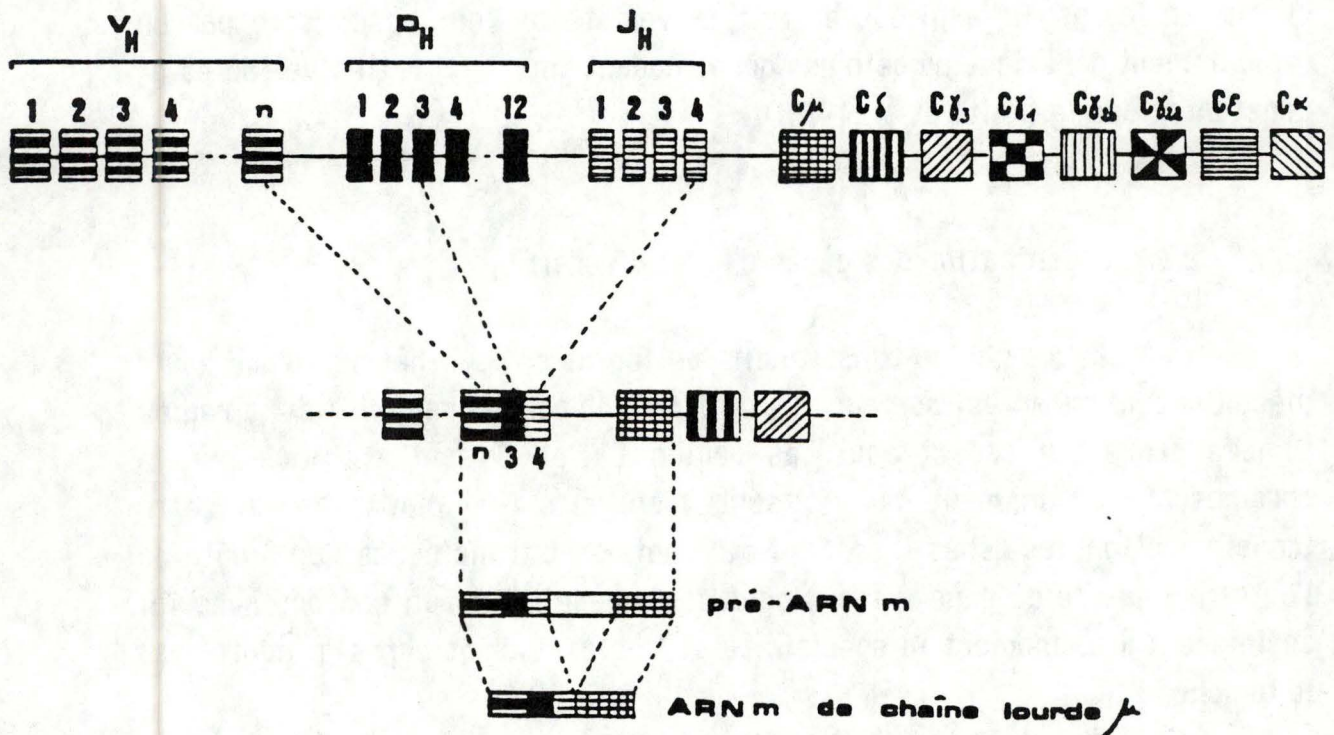


Figure 9 : Région génique codant pour la chaîne lourde μ .

INTRODUCTION

pool de gène V. Un seul sera transcrit après avoir été transloqué auprès d'un gène de fonction unique (J), lui même amené en amont d'un seul segment C codant pour la région constante λ . C'est ce mécanisme de recombinaison d'un segment variable et d'une pièce de jonction qui est la base de la diversité des anticorps. Les segments codant pour les chaînes κ subissent le même sort, mais les combinaisons possibles sont beaucoup plus nombreuses du fait de la plus grande hétérogénéité des gènes V et J (**Figure 8**). Les possibilités de diversification sont encore plus vastes au niveau des chaînes lourdes. L'ADN codant pour la partie variable est formé de l'association de trois types de segments génétiques (V-D-J) choisis parmi une centaine de gènes V_H et quatre pièces J_H en amont de la série de gènes codant pour la région constante. Entre les groupes de V_H et J_H , l'ADN compte une douzaine de petits segments, les pièces de diversités D_H (**Figure 9**).

De plus, il existe une diversité additionnelle qui engendre une variabilité de recombinaison entre les gènes V et J. Le 95^{ème} résidu de la chaîne légère κ est codé par le dernier codon du segment V tandis que le 96^{ème} l'est habituellement par le premier triplet de J. Cependant, le 96^{ème} résidu est parfois codé par un triplet composite formé du second ou du troisième nucléotide de J, les autres provenant de l'intron situé en 3' du segment V.

Des mutations somatiques apparaissant au cours de la vie peuvent encore modifier les régions V et H. Enfin, l'association des chaînes lourdes et légères se faisant au hasard, il en résulte une diversité supplémentaire des Ig formés (Roitt et al, 1985).

Il est donc clair que l'organisme est armé pour combattre un nombre infini d'antigènes exogènes.

2.3.3. Classes d'Immunoglobulines.

On distingue chez les mammifères 5 classes d'immunoglobulines : IgG, IgM, IgD, IgA et IgE sur base de leur poids moléculaire, leur charge et leur composition en acides aminés (a.a.) et en sucres. A ces différences inter-classes s'ajoute une hétérogénéité à l'intérieur-même de certaines classes.

La classe et la sous-classe sont déterminées par le type de chaîne lourde, à savoir α , β , γ , δ , μ , ϵ (classes) et γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 et α_2 (sous

Classe d'Ig	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Chaîne lourde	γ	μ	α	δ	ϵ
Sous-classes	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	—	$\alpha 1, \alpha 2$	—	—
% Ig sériques	70-75	10	15-20	<1	traces
Compartiment	intra et extra vasculaire	intravasculaire	sécrétions séro-muqueuses	en membrane des lymphos circulants	en membrane des basophiles et mastocytes
Structure	monomérique	pentamérique	monomérique (homme) et dimérique (autres mammifères)	monomérique	monomérique
Fonctions biologiques	Ac de réponse secondaire essentiellement anti-toxines bactériennes	Ac précoces dirigés contre les agents infectieux	Protection au niveau des muqueuses (note)	Pas clairement connu	Rôle dans les maladies d'hypersensibilité

NOTE : Les IgA sécrétoires sont protégées de la protéolyse grâce à sa combinaison avec une autre protéine, la pièce sécrétoire.

Tableau III : Caractéristiques principales des 5 classes d'immunoglobulines (d'après Roitt et al., 1985).

INTRODUCTION

classes)(Roitt et al.,1985). Des informations plus précises sont fournies au tableau III.

Malgré la diversité et le rôle spécifique de chaque immunoglobuline, leur fonction primordiale reste de lier l'antigène.

2.3.4 Variation de classes d'immunoglobulines.

Au cours d'une réponse antigénique, il peut exister un changement dans la classe d'anticorps produits. Ce phénomène est appelé "class switch". Il en résulte donc un changement important au niveau de la région constante des chaînes lourdes ou fragment Fc. Etant donné le rôle joué par ce segment lors la fixation des anticorps aux basophiles et au système du complément, il s'ensuit une perturbation de ces fonctions. Mais, quelque soit la classe des anticorps produits, la cellule a eu un progéniteur exprimant des IgM.

Au niveau moléculaire, la réassociation d'une même région variable de la chaîne lourde (V_H) avec une région constante différente de C_μ (codant pour l'IgM) résulte en fait d'une délétion plus ou moins étendue du DNA.

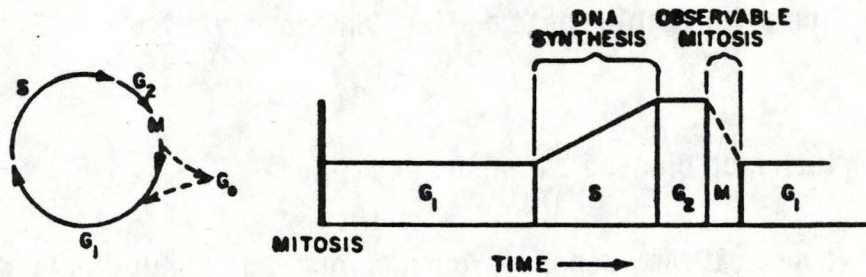
Ce "class switch" est sous le contrôle d'une série de lymphokines produites par les lymphocytes T. C'est la régulation isotypique grâce aux cellules T (Roitt et al.,1985).

Ce processus n'est pas seulement réservé aux cellules B productrices d'Ig (plasmocytes). Un lymphocyte B est perpétuellement soumis à une série de contrôles impliquant de multiples interactions cellulaires et/ou de nombreuses substances activatrices ou inhibitrices.

2.4. Activation, prolifération et différenciation.

L'activation d'une cellule B est inhérente au contact antigénique. Cette information peut être soit médiée par les lymphocytes T(Ag T-dépendants) soit liée à la fixation de l'Ag sur les Ig membranaires (Ag T-indépendants).

Tout ce processus permet à la cellule au repos d'entrer dans un cycle cellulaire normal. Une cellule activée pénètre en phase G1 qui la prépare à une nouvelle synthèse de DNA.Vient ensuite la phase S (de synthèse)



G₁ - NUCLEUS CONTAINS DIPLOID DNA

S - PERIOD OF DNA REPLICATION

G₂ - NUCLEUS CONTAINS TETRAPLOID DNA

M - PERIOD OF MITOSIS

G₀ - RESTING STATE. HAS POTENTIAL FOR DIVISION

GENERATION TIME - TIME FROM ONE MITOSIS TO THE NEXT

Figure 10 : Différents stades du cycle cellulaire(d'après Wintrobe et al.,1974).

INTRODUCTION

où le matériel chromosomique est dupliqué. Elle est suivie de la phase G2, utile à la préparation de la mitose. La cellule peut ensuite retourner au repos (en phase G0) ou recommencer un nouveau cycle (G1). La durée du cycle est très variable (surtout en G1) suivant le type de cellule et l'espèce étudiée. Elle peut en effet varier de 8 heures (cellules épithéliales) à 100 jours (cellules à division très lente)(Wintrobe et al.,1976)(Figure 10).

2.4.1. Rôle des récepteurs immunoglobuliniques dans l'activation des cellules B.

La réponse spécifique des cellules B à un Ag réside uniquement dans la fonction des récepteurs immunoglobuliniques. La sélection des clones en vue de leur croissance et de leur différenciation est réalisée grâce à l'appariement Ag-Récepteurs immunoglobuliniques de surface (Figure 11). Il a été démontré que ces Ig sont de type IgM chez les lymphocytes B immatures de la moëlle osseuse tandis que que les cellules B matures coexpriment à la fois des IgM et des IgD (de même spécificité antigénique)(Salsano et al.,1974). Il semble que seules les IgD interviennent dans le mécanisme d'activation. Notons aussi que des anti-Ig de surface ont une action analogue aux Ag.

Les récepteurs immunoglobuliniques agiraient soit activement (grâce au cycle du phosphatidyl inositol), soit passivement (via l'internalisation de l'Ag)(Maino et al.,1975).

2.4.2. Rôle des lymphocytes T dans l'activation des cellules B.

a). Présentation de l'Ag.

Le point de départ de ce processus est la reconnaissance de l'Ag par les récepteurs spécifiques des lymphocytes T. Celle-ci requiert des conditions précises. L'Ag doit en effet être inséré dans la membrane d'une cellule autologue (Cellule Présentatrice de l'Ag) en association avec une molécule de classe II. Cela nécessite donc le "processing" de l'Ag, c'est-à-dire son internalisation, son clivage protéique et enfin sa réexpression en

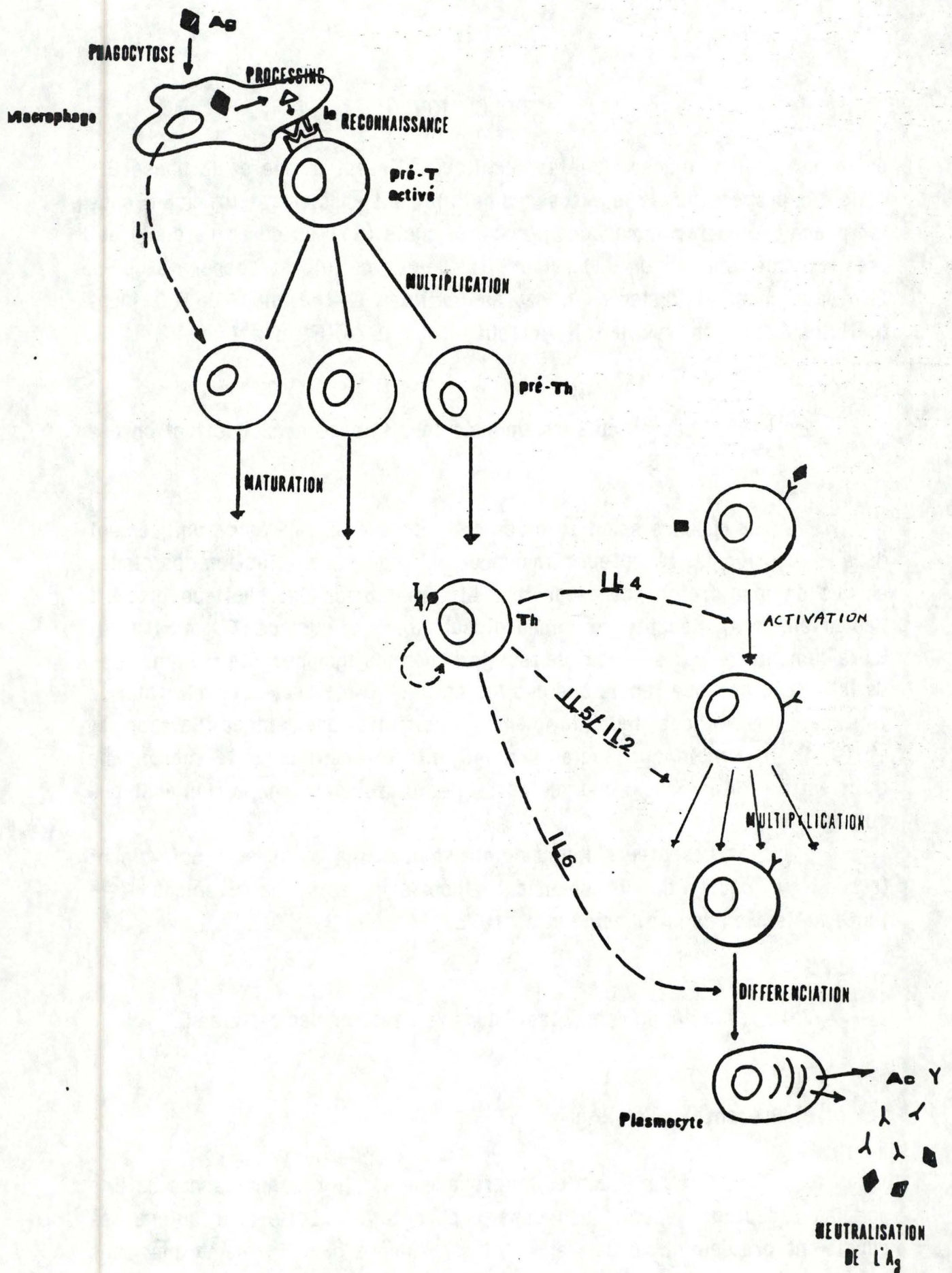


Figure 11 : Schéma général des processus d'activation, de prolifération et de différenciation des lymphocytes B.

INTRODUCTION

surface. De plus, d'autres facteurs aident à la stabilisation du complexe lymphocyte T-Ag-Classe II (CD3, LFA1, ICAM-1,...).

b). Coopérations cellulaires.

Il est bien établi que des interactions cellulaires entre les lymphocytes B et T existent en vue de l'élaboration de la réponse humorale spécifique (**Figure 11**). Les lymphocytes T helper y jouent un rôle central. La fixation de ces cellules au complexe Ag-Classe II déclenche la libération d'Interleukine 1 (IL-1) par les CPAg. L'IL-1 stimule la différenciation des lymphocytes T helper. Ceux-ci mettent alors en place des récepteurs à IL-2 et produisent cette lymphokine. L'IL-2 permet de soutenir la croissance des lymphocytes T sensibilisés et de produire plusieurs interleukines agissant à 3 niveaux sur les lymphocytes B:

- Activation des cellules au repos par l'IL-4.
- Croissance des cellules activées grâce à l'IL-5.
- Différenciation finale avec sécrétion importante d'Ig par l'intermédiaire de plusieurs lymphokines.

1). Activation à l'IL-4.

L'IL-4 a été identifiée dans un surnageant de culture à la fois de lignées de cellules T murines (EL4) et d'hybridome de lignées humaines. Sa principale activité est l'induction de synthèse de DNA chez les cellules B au repos, mais son rôle ne s'arrête pas là (**Tableau IV**)(Paul et Ohara, 1987).

Les récepteurs à l'IL-4 sont largement distribués sur les cellules de la lignée hématopoïétique comme les lymphocytes B et T et les macrophages. Les principales caractéristiques de ces récepteurs sont indiquées dans le tableau V.

2). Contrôle de la croissance.

Toute stimulation permet à la cellule B au repos d'entrer en phase G1 et de proliférer sous le contrôle d'une variété de médiateurs générés par les lymphocytes T (lymphokines) et les monocytes (monokines). Certains de ces facteurs agissent en phase de transition G1/S et d'autres en

	IL-4		IL-5		IL-6	
	Mouse	Human	Mouse	Human	Mouse	Human
1. Apparent MW	20K	20K	25-30K		22-29K	21K
2. Number of amino acids						
Total	140	153	133	134	211	212
Mature protein	120		113	(112)	187	184
3. N-glycosylation sites	3	2	3	2	0	2
4. Sequence homology	GM-CSF		IL-3		G-CSF	
5. Genomic structure	4 exons		4 exons		5 exons	
6. Chromosome location	Ch11	Ch5	Ch11	Ch5	Ch5	Ch7
7. Functions induced	Induction of IgG ₁ and IgE and suppression of IgG ₃ and IgG _{2c} in LPS blasts (BCDF _γ or BCDF _ε) Induction of class II MHC Induction of proliferation of anti-μ-stimulated B cells (BCGFI) Induction of T cell growth (TCGF2) Induction of mast cell growth (MCGF2) (connective tissue type) Induction of FcεRII (CD23) on B cells Induction of growth of early lymphoid precursors		Induction of proliferation of activated B cells (BCGFII) Induction of proliferation of BCL1 (BCGFII) Induction of Ig secretion in primed B cells and BCL1 (TRF) Induction of IgA in LPS blasts (BCDF _α) Induction of maturation of eosinophils (EDF) Induction of IL-2 receptor on T and B cells Induction of cytotoxic T cells in the presence of IL-2 (KHF)		Induction of Ig production in B lymphoblastoid cells and activated B cells (BSF-2/BCDF) Anti-IL-6 inhibits PWM-Ig production at late stage Hybridoma/plasmacytoma growth factor (HPGF) Autocrine growth factor for human multiple myelomas Induction of cytotoxic T cells with IL-2 (CDF) Induction of IL-2 production in T cells (TAF) Costimulatory activity for T cell growth Multi-CSF activity Induction of acute-phase proteins in liver cells (HSF) Induction of macrophage differentiation Induction of neural cell differentiation	
8. Producers	T cells (Th2), mast cells		T cells (Th2)		T cells, monocytes, B cells, fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes, astrocytoma, glioblastoma, osteosarcoma, bladder carcinoma, cardiac myxoma, myelomas	

Tableau IV : Structure moléculaire et activité biologique de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 (d'après Kishimoto et Hirano, 1989).

INTRODUCTION

G2. De plus, les cellules sont capables de produire leurs propres substances régulatrices.

-Facteurs agissant sur l'étape de transition G1/S.

Il a été proposé que des cellules B activées répondent à des monokines (facteurs α) en fin de phase G1 et ensuite à des lymphokines provenant de cellules T (facteurs β). La nature moléculaire du facteur α n'est pas connue, mais certaines molécules appartenant au système du complément (comme C3b et C3d) semblent agir de manière analogue. L'IL-1 est également capable de déclencher la croissance à ce stade (Gordon et al., 1986).

-Facteurs agissant sur la phase G2.

Bien que les cellules B murines et humaines comportent beaucoup de récepteurs à l'IL-2 et prolifèrent en réponse à celle-ci (Karasuyama et al., 1988), le rôle de l'IL-5 est prépondérant dans la croissance des cellules B. Malgré ses multiples activités (**Tableau IV**) et sa proximité moléculaire par rapport à l'IL-4, l'IL-5 fonctionne de manière totalement différente (Kinashi et al., 1986).

Les récepteurs à IL-5 sont exprimés sur des cellules B normales et leucémiques (BCLL1). Il existe des récepteurs à haute et basse affinités (**Tableau V**).

D'autres cytokines peuvent également déclencher une croissance des lymphocytes. Ainsi, l'interféron γ potentialise la prolifération des cellules B humaines activées par des anti-Ig M et de l'IL-4 (Defrance et al., 1986).

3). Contrôle de la production d'Ig.

L'étape ultime de la maturation des cellules B consiste en la production d'anticorps spécifiques.

-Rôle de l'IL-6

La lymphokine impliquée dans le développement final des lymphocytes B est appelée IL-6 (Kishimoto et Hirano, 1988).

	IL-4	IL-5	IL-6
Number	10^2-10^3	10^2-10^3	10^2-10^3
Affinity	$10^{-10}-10^{-11}$ M (homogeneous)	$\sim 10^{-8}$ M (low affinity) $\sim 10^{-11}$ M (high affinity)	$\sim 10^{-8}$ M (low affinity; $\sim 10^{-11}$ M (high affinity;
Apparent MW	-60 kd	-50 kd	-80 kd
Number of amino acids, total	N.D.	N.D.	468
Mature protein			(449)
Intracytoplasmic			-82
Homology			Immunoglobulin superfamily
Distribution	Resting B and T cells, monocytes, mast cells, B and T lymphomas	B leukemia cell line BCL1, normal B cells	Activated B cells, resting T cells, myelomas, hepatocytes, myeloid leukemia cells, pheochromocytoma (PC12)

Tableau V : Principales caractéristiques des récepteurs à l'IL-4, IL-5 et IL-6(d'après Kishimoto et Hirano, 1989).

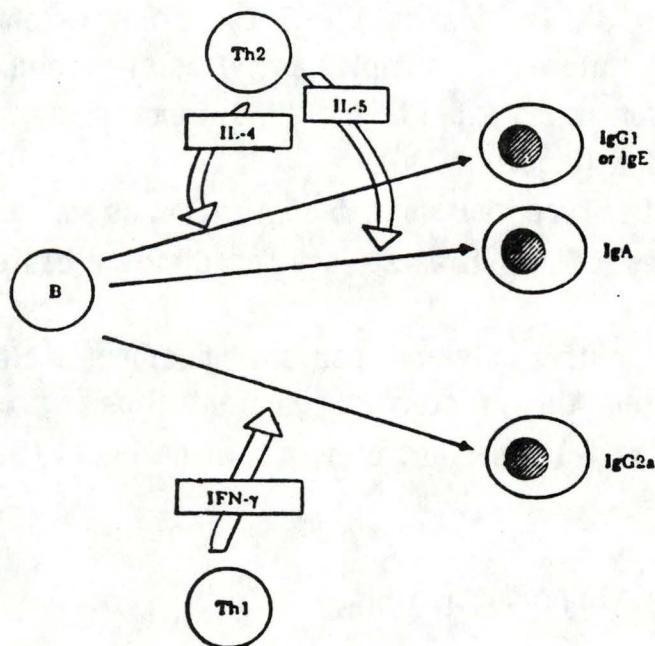


Figure 12 : Régulation isotypique par les lymphocytes T.
(d'après Kishimoto et Hirano, 1989).

INTRODUCTION

Multifonctionnelle comme les autres interleukines citées précédemment (**Tableau IV**), elle est produite par différents types de cellules, lymphoïdes ou non, soit constitutivement (monocytes), soit en réponse à un stimulus (lymphocytes T sous dépendance monocyttaire). On pense que l'IL-6 dérivée de monocytes agit sur les lymphocytes T et que celle provenant de cellules T active les lymphocytes B en vue d'une sécrétion d'Ig (Garman et al., 1987).

Les récepteurs à IL-6 sont dispersés sur des cellules lymphoïdes ou non (**Tableau V**). Comme pour l'IL-5, il existe des récepteurs à haute et basse affinités.

-Régulation isotypique.

Les déterminants isotypiques (caractérisant chaque classe d'Ig) intéressent principalement des séquences en a.a. des régions constantes des chaînes lourdes. Par l'intermédiaire de facteurs solubles, différentes souches de cellules T peuvent induire une série de classes préférentielles d'Ig (**Figure 12**). Ainsi, l'IL-4 agit sur des cellules stimulées par des LPS (lipopolysaccharides bactériens) en faveur d'un switch vers les IgE et de la sous-classe IgG₁ (Snapper et al., 1988). Dans les mêmes conditions, l'IL-5 influence positivement la production d'IgA. Ces deux lymphokines seraient produites par une souche de cellules T appelées Th2.

D'autre part, l'interféron γ induit la sécrétion d'IgG2a par des cellules spléniques de souris stimulées par des LPS. Ces cellules productrices sont nommées Th1 (Coffman et al., 1988).

Un animal en lymphocytose connaît une perturbation de tous ces processus physiologiques concernant les lymphocytes B. Ainsi, le bovin infecté possède des cellules B avec des marqueurs de surface inhabituels, à savoir une grande quantité d'IgM et un marqueur ubiquiste des T : le CD5 (aussi appelé Leu 1 ou Ly 1).

Dans la partie suivante, nous détaillerons l'état actuel des connaissances sur les lymphocytes BCD5 humains et murins.

3. LES CELLULES BCD5.

La molécule CD5 est exprimée sur la majorité des cellules T périphériques chez l'homme tandis qu'il n'existe que peu de cellules B (pour la plupart dans la rate et les noeuds lymphoïdes foetaux) qui la portent. Il en est de même chez le bovin (Depelchin et al., 1989).

3.1. Biochimie du CD5.

L'analogue murin de cette molécule (Ly1) est beaucoup mieux connu. Le CD5 est synthétisé avec une région leader de 23 a.a. La protéine mature de 67000 Daltons consiste en une région aminoterminal de 347 a.a., un domaine transmembranaire de 30 résidus et une région carboxyterminale de 94 a.a. (où se trouvent les plus grandes ressemblances entre Ly1 murin et CD5 humain). Il a été proposé que ces marqueurs fassent partie de la superfamille immunoglobulinique (Huang et al., 1987).

3.2. Fonctions du CD5 sur la cellule T.

Des expériences chez l'homme et la souris ont suggéré un rôle régulateur du CD5 dans la prolifération des cellules T, mais aussi dans la production de médiateurs. Des anticorps anti-CD5 peuvent augmenter la prolifération de cellules stimulées par des mitogènes (PHA ou Con A) ou par la rencontre avec des Ag (anti-CD3, par exemple). Ils augmentent aussi la production d'IL-2 par ces cellules, de même que l'expression de récepteurs à IL-2 (Nishimura et al., 1988). Par ailleurs, le même phénomène est constaté dans l'espèce bovine (Letesson et al., 1990). L'anti-CD5 n'agit donc pas directement. En présence de PHA, il semble même mimer l'action de l'IL-1. Le CD5 pourrait donc fonctionner comme récepteur à IL-1.

D'autres hypothèses sont néanmoins permises, comme l'expression de néo-épitopes de CD5 (servant de site de liaison à l'IL-1) ou une modification d'affinité en faveur de l'IL-1 (Lögberg et al., 1985).

Hollander (1982) suggère également une inhibition de cellules suppressives par l'anti-CD5.

INTRODUCTION

Une dernière hypothèse sur ce mécanisme d'activation provient de l'étude moléculaire du CD5. En effet, la forte homologie entre les régions carboxyterminales humaines et murines indique une importance fonctionnelle de cette partie de la molécule. Plusieurs sites de phosphorylation possibles (tyrosine, sérine et thréonine) y sont trouvés. Or, on connaît le rôle central de ces résidus au niveau des récepteurs de divers facteurs de croissance et de produits d'oncogènes. Il est possible que le ligand du CD5 (encore inconnu actuellement) cause une phosphorylation de cette région (Huang et al., 1987).

Pour en savoir plus au sujet du CD5 et des cellules le portant dans certaines conditions (infection par le BLV), il est nécessaire d'étudier le cadre d'expression de cette molécule.

3.3. Cellules BCD5.

3.3.1. Historique.

Le CD5 a tout d'abord été détecté sur les lymphocytes B humains dans des cas de leucémies chroniques à cellules B (BCLL) (1978) avant que son homologue murin ne soit décrit chez de vieilles souris normales (de souche BALB/C) ainsi que sur plusieurs tumeurs B.

Des analyses en cytométrie de flux ont ensuite prouvé la présence du CD5 sur une petite population de cellules B à la fois chez des souris NZB (souffrant de maladie auto-immune) et chez certaines souches normales (Hayakawa et al., 1983).

L'analyse multiparamétrique a également montré que ces cellules étaient des constituants normaux de certains compartiments lymphoïdes (Caligaris-Cappio et al., 1982). Le CD5 est le seul Ag de différenciation des cellules T qui a été trouvé sur des cellules B (Hayakawa et Hardy, 1988).

INTRODUCTION

3.3.2. Origine.

Actuellement, deux hypothèses sont émises quant à l'origine des BCD5 :

- soit des cellules, présentes en faible quantité à l'état normal, sont sélectionnées par un agent quelconque et prolifèrent suite à cette stimulation. Il s'agirait dans ce cas d'une lignée distincte des lymphocytes B classiques.

- soit des cellules B normales acquièrent le marqueur suite à une stimulation.

a). Lignée distincte BCD5.

Cette hypothèse provient de la différence constatée entre progéniteurs B normaux et BCD5 tant au niveau de la localisation dans les organes que de l'état de différenciation.

Ainsi, chez l'homme, ces cellules apparaissent très tôt dans l'ontogenèse et ont une prédominance relative parmi les cellules B précoces (comparée à leur rareté chez l'adulte). Les BCD5 constituent une fraction importante des noeuds lymphoïdes après 17 semaines de gestation, mais aussi de la rate foetale (Hardy et Hayakawa, 1986).

Au niveau murin, des études plus poussées ont remarqué que les cellules spléniques et péritonéales sont à 30% Ly1⁺ chez la jeune souris. Par ailleurs, le péritoine garde ces cellules jusqu'à l'âge adulte. De plus, ces cellules sont capables de recoloniser un péritoine d'un receveur nouveau-né (allotype-congénique). Par contre, la moëlle osseuse reste insensible à ce transfert (Förster et Rajewsky, 1987).

Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'une lignée distincte générée tôt au cours de l'ontogenèse, localisée en périphérie et se maintenant indépendamment de la moëlle osseuse.

b). Cellules B classiques activées.

Un autre courant de chercheurs suggèrent l'acquisition de ce marqueur suite à un processus d'activation. Il existe en effet divers indices montrant l'état activé des BCD5 : leur augmentation de taille, la

INTRODUCTION

fréquence plus élevée de cellules en phase S du cycle cellulaire (Werner-Favre et al., 1989), l'expression plus importante d'IgM et moindre d'IgD, la présence de certains Ag d'activation (B5, Récepteurs à l'IL-2, CD23) (Freedman et al. 1, 1989) et leur prolifération, ainsi que la sécrétion d'anticorps déclenchées par l'IL5 (Wetzel, 1989).

De plus, certaines substances sont capables d'induire le CD5 (TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate) ou d'augmenter son occurrence (PMA: Phorbol Méristate acétate). Les autres stimuli testés (EBV, anti-Ig, IL-4, IL-1b et B Cell Growth Factor) se sont montrés incapables de réaliser cela.

D'autre part, l'IL-4 inhibe spécifiquement l'expression du CD5 sur des cellules B normales ou BCLL stimulées au TPA et à la PHA, alors qu'elle est sans effet sur d'autres Ag d'activation. (Freedman et al. 2, 1989). Il semble donc que le TPA ou le PMA soient nécessaires à l'acquisition de récepteurs à l'IL-4 (DeFrance et al., 1989).

La question de l'origine des populations est donc loin d'être résolue. S'il existe plusieurs signes d'activation au niveau de ces cellules, il est certain qu'elles correspondent aussi à un pool de cellules présentes tôt dans l'ontogenèse. Ces deux hypothèses, bien qu'opposées au départ, pourraient apporter chacune leur contribution à l'éclaircissement du problème des BCD5.

3.3.3. Contrôle génétique.

Grâce à l'utilisation de souches murines, il a été possible d'établir des corrélations entre des particularités génétiques et l'expression de Ly1. Certaines souches témoignent déjà de l'influence génétique sur le taux de Ly1 B dans le péritoine adulte. Le fait que les souris BALB/C ont un taux relativement élevé de Ly1 B, comparées à d'autres comme les SJA, semble lié à l'expression codominante de plusieurs gènes (encore inconnus) (Hayakawa et al., 1986).

Chez la souris "motheaten" portant l'allèle récessif *me^v* sur le chromosome 6, toutes les cellules B sont Ly1⁺ (Sidman et al., 1986). Au contraire, les souris Xid (qui souffrent d'une immunodéficiance liée au chromosome X) ont un nombre faible de Ly1 (Scher et al., 1976).

INTRODUCTION

La mutation "nude" (souris athymiques) ne paraît pas agir directement sur le nombre de Ly1 B, ce qui implique leur indépendance de génération par rapport au thymus (Hayakawa et al., 1986).

Il est toujours difficile de savoir si ces caractéristiques sont inhérentes à une souche. Il est néanmoins clair que la prolifération des Ly1 B est fortement régulée par certains gènes.

Le stade ultime de cette prolifération anormale conduit souvent à un développement tumoral contrôlé par d'autres facteurs génétiques.

3.3.4. Tumorigenèse.

a). Cellules pré-malignes.

En plus de leur capacité proliférative découverte chez les NZB et certaines vieilles souris BALB/C, les Ly1 B sont relativement bien radiorésistantes, comparées aux cellules normales. Ces signes constituent l'image potentielle d'un lymphome pré-malin (Hayakawa et Hardy, 1988).

Chez l'homme, les patients atteints d'arthrite rhumatoïde comportent un taux élevé de BCD5. Or, ils sont connus pour avoir une propension plus importante à développer des tumeurs (Plater-Zyberk et al., 1985).

De toute manière, le stade pré-malin n'est qu'une étape du processus de prolifération.

b). Cellules malignes et transformation de lignées cellulaires.

Des investigations réalisées sur plusieurs lignées tumorales suggèrent une capacité proliférative des Ly 1 B. Ces cellules sont constitutives de beaucoup de tumeurs murines. Un grand nombre de lymphomes l'exprime *in vivo* soit spontanément, soit par induction virale (Hardy et Hayakawa, 1986).

Des lignées de cellules bovines établies à partir de tumeur ou de sang d'animaux en phase tumorale de leucose présentent toutes ces marqueurs (Letesson et al., 1990).

INTRODUCTION

Les Ly 1B montrent aussi des caractéristiques uniques en culture. Tandis que la plupart des cellules B d'organes lymphoïdes périphériques ne survivent pas en culture à court terme, les Ly 1B. ont une existence prolongée à long terme. Braun (1983) a montré que les cellules B IgM⁺ survivant à long terme expriment toutes à bas niveau Ly1, des chaînes λ (très rares chez la souris) et montrent aussi une hyperexpression et une amplification de l'oncogène c-myc.

Au niveau murin, la majorité des cellules transformées par des rétrovirus expriment Ly1. Celles-ci ont un phénotype précurseur B/myéloïde (Hayakawa et Hardy, 1988). Par ailleurs, on retrouve ce phénomène au niveau des lignées tumorales bovines (Letesson et al. 2,1990). Certaines de ces cellules se différencient même en macrophages. Il pourrait donc exister un processus commun de différenciation B/myéloïde. La grande occurrence de Ly1B pourrait refléter soit une transformation rétroviral soit une haute fréquence de génération Ly1B parmi le pool de cellules B (Hayakawa et Hardy, 1988).

3.3.5. Caractéristiques phénotypiques.

L'expression du CD5 est souvent corrélée à la présence d'autres marqueurs et à certaines caractéristiques propres à ces cellules.

a). Morphologie et expression de marqueurs de surface.

Bien qu'exprimant les principaux marqueurs de lymphocytes B, les Ly1B de NZB et BALB/C sont relativement plus grandes et plus granuleuses que les cellules normales, mais moins cependant que les cellules myéloïdes (Hayakawa et Hardy, 1988). Les études chez l'homme et la souris prouvent l'expression sur ces cellules de CD11b et CD11c. Ces molécules, récepteurs du C3bi, sont responsables au niveau des monocytes des processus d'adhésion. Il reste à déterminer le rôle exact de ces antigènes dans le contexte des BCD5 (De la Hera et al., 1988).

Enfin, l'expression du CD5 est dix fois moins importante sur les lymphocytes B que sur les lymphocytes T.

INTRODUCTION

b). Cycle cellulaire.

Chez la souris, les BCD5 ne sont pas restreintes à un stade particulier du cycle. Bien qu'elles soient capables de régénération, la plupart de ces cellules ne sont pas en phase active (Hayakawa et Hardy, 1988). Ceci est confirmé par les travaux de Förster et Rajewsky (1987), mais en contradiction avec ceux de Rabinovitch (cités par Förster et Rajewsky, 1987). Ce dernier prétend en effet que les Ly1B sont activées, mais arrêtées en phase S.

c). Expression d'isotypes d'immunoglobulines.

La plupart des Ly1 B expriment une grande quantité d'IgM membranaires, mais peu d'IgD. Par ailleurs, le CD5 apparaîtrait avant les IgM au cours de l'ontogenèse (Hayakawa et Hardy, 1988). On ne possède pas de preuve d'un éventuel "switch" vers IgG plus tard ou de l'existence d'une régulation isotypique préférentielle. La découverte d'une présence importante de chaînes λ membranaires suggère une régulation génique unique. Cependant, ces cellules continuent à synthétiser des chaînes κ internes et connaissent des nouveaux réarrangements de la région génique J μ des chaînes lourdes. Dans ce cas, les chaînes κ présentent des a.a. inhabituels rendant leur fixation avec une chaîne lourde impossible. La coexpression des deux chaînes légères est toujours incomprise en vertu de la théorie d'exclusion allélique.

Des études contradictoires parlent aussi de Ly1 B comportant des μ sans chaînes légères et des remplacement de gènes de parties variables de chaînes lourdes (Hardy et al., 1986). Une telle expérience a été également rapportée dans le cas de certaines lignées établies bovines (Letesson et al., 1990).

3.3.6. Caractéristiques physiologiques.

a). Sécrétion d'auto-anticorps.

Chez certaines souches murines, la présence du CD5 semble corrélée à la production spontanée d'IgM et principalement d'auto-anticorps.

INTRODUCTION

Ainsi, les cellules spléniques NZB sécrètent un taux élevé d'anticorps anti-DNA simple brin, anti-Ag de surface de thymocytes et anti-érythrocytes de souris traités à la broméline (BrMRBC) (Hayakawa et al., 1984).

Les Ly1 B de souris BALB/C possèdent aussi ce genre de capacité. Les cellules anti-BrMRBC peuvent être détectées dans la rate, mais leur stimulation antigénique par les érythrocytes n'augmente pas leur fréquence. Bien que les LPS augmentent la sécrétion de ces auto-anticorps, les effets stimulateurs dus à la flore intestinale sont peu probables car un animal "germ-free" possède spontanément des cellules productrices d'anti-BrMRBC. On ne sait pas encore si les Ly 1 B sont responsables d'une variété d'autres auto-anticorps chez la souris normale. (Cunningham, 1974).

Chez l'homme, les BCD5 ne sécrètent pas spontanément des auto-anticorps, mais une stimulation avec des staphylocoques dorés induit des auto-anticorps appelés facteurs rhumatoïdes (IgM anti-IgG). Ceci est vraisemblablement lié à la présence importante de BCD5 chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Hardy et al., 1987).

Un population BCD5 infectée par l'EBV produit aussi une série d'auto-anticorps : IgM et IgG anti-DNA, IgM anti-IgG, IgM anti-thyroglobine. Ces anticorps semblent polyréactifs (Casali et al., 1987). Comme ceux-ci sont détectés facilement lors d'une réponse immunitaire classique (Dziarski, 1982), il est possible que les BCD5 soient une première ligne de défense contre une attaque extérieure.

b). Réponse aux antigènes de laboratoire.

La contribution des Ly1 B à la réponse humorale vis-à-vis de la plupart des antigènes est faible par rapport à leur propension à sécréter des auto-anticorps (Hayakawa et al., 1984). Cela suggère que ces cellules possèdent un répertoire restreint d'IgG et risque de poser certains problèmes de réactivité à toute attaque exogène (Hayakawa et Hardy, 1988).

But du travail.

Le processus lymphoblastique et l'identification des cellules BCD5 permettent d'établir un parallélisme entre la leucose bovine et la leucémie lymphocytaire chronique chez l'homme. Chez la souris, il existe actuellement deux hypothèses quant à l'origine des BCD5, à savoir une lignée distincte ou une population ayant acquis ce marqueur suite à une activation.

Notre but sera d'apporter une contribution à l'éclaircissement de l'origine de ces cellules au niveau bovin au travers de l'étude de certaines de leurs caractéristiques. Dans cette optique, nous aborderons plus particulièrement le phénotype des cellules BCD5, leur état d'activation (par l'entremise du cycle cellulaire) et leurs capacités de prolifération et de synthèse *in vitro*. Cette approche permettra peut-être d'émettre des hypothèses au niveau du mode d'action du BLV et de son implication dans la perturbation du système lymphocytaire B chez le bovin.

MATERIEL
ET
METHODES

Numéros des bovidés	Date de naissance	Groupe d'âge	Titre anti-BLY en ELISA	Nombre de lymphocytes/ μ l	Nombre de lymphocytes/ μ l admis physiologiquement (Note)	Nombre de lymphocytes/ μ l excédent
71	01/07/86	4-5 ans	14580	6591	6500	Normal
132	03/83	>6 ans	14580	10124	5500	4624
77	18/07/86	4-5 ans	43740	16305	6500	9805
163	08/84	>6ans	43740	20689	5500	15189
76	18/07/86	4-5 ans	43740	23709	6500	17209

Tableau VI : Liste des animaux leucosiques étudiés. Les données relatives à ces individus nous ont été fournies par l'Institut National de Recherche Vétérinaire.

Note : Les quantités de lymphocytes considérées comme normales pour un animal d'un âge précis sont répertoriées dans plusieurs tables de références. Les valeurs indiquées dans ce tableau s'inspirent de la clé européenne (Straub, 1987).

MATERIEL ET METHODES

1. ANIMAUX.

Les cellules qui font l'objet de notre étude sont isolées à partir de sang bovin. Les animaux non infectés proviennent d'exploitations agricoles privées de la région tandis que les animaux leucosiques ont été mis à notre disposition par le Professeur Mammerickx de l'Institut National de Recherches Vétérinaires. Leurs principales caractéristiques sont indiquées au tableau VI.

2. OBTENTION DES CELLULES.

2.1. Prélèvements sanguins.

Le sang est prélevé stérilement au niveau de la veine jugulaire de l'animal et immédiatement mélangé à 10% de PBS-EDTA (2) (Phosphate Buffer Saline-Ethylène diamine tétracétate). L'EDTA est agent anti-coagulant qui agit en chélateur des ions calcium, éléments essentiels au processus de coagulation.

2.2 Isolement des cellules.

Le sang est réparti dans des tubes stériles de 50 ml (Nunc) que l'on soumet à une centrifugation de 1500 g pendant 15 minutes. Au terme de cette étape, le plasma est séparé du culot par une couche de cellules mononucléées : le buffy-coat (**figure 13**). Ce dernier est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur et dilué au minimum deux fois dans du tampon PBS (1).

Les étapes suivantes se présentent comme suit :

- Déposer 20 ml de la suspension cellulaire sur 15 ml de ficoll-Urograf-fine(3) et centrifuger dans ce gradient de densité à 1000 g pendant 25 minutes. Ce stade a pour but de séparer les cellules mononucléées des globules rouges prélevés en même temps lors de la récolte du buffy-coat (Spooner et al, 1978).
- Récolter les cellules à l'interface et diluer en PBS.
- Centrifuger 10 minutes à 200 g.

(1) **PBS** (Phosphate buffer saline)

KCl(ucb)	200 mg/l d'eau distillée
KH ₂ PO ₄ (Merck)	200
NaCl (Merck)	8000
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (ucb)	1440
pH = 7,4	

(2) **PBS-EDTA.**

Na₂EDTA (sel bisodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique)
1,5% en PBS
pH = 7-7,2

(3) **Ficoll-Urograffine.**

Ficoll	7,65 gr
Eau distillée	100 ml
Urograffine	18 gr

Ajuster à pH 7,4
à densité 1,007 au réfractomètre

(4) **NH₄Cl** (ucb)

0,75 g pour 100 ml d'eau distillée

pH = 7,4

(5) **Bromure d'éthidium-acridine orange** (100X concentré)

-50 mg d'éthidium bromide

-15 mg d'acridine orange

-Dissoudre dans 1 ml d'éthanol 95% et 49 ml d'eau distillée.

-Répartir en aliquots de 1 ml et stocker à -20°C.

Une solution 1X concentrée est préparée en diluant un aliquot 100X en PBS.

Elle peut être stockée un mois à 4°C.

(4) **NH₄Cl** (ucb)

0,75 g pour 100 ml d'eau distillée

pH = 7,4

(5) **Bromure d'éthidium-acridine orange** (100X concentré)

-50 mg d'éthidium bromide

-15 mg d'acridine orange

-Dissoudre dans 1 ml d'éthanol 95% et 49 ml d'eau distillée.

-Répartir en aliquots de 1 ml et stocker à -20°C.

Une solution 1X concentrée est préparée en diluant un aliquot 100X en PBS.

Elle peut être stockée un mois à 4°C.

MATERIEL ET METHODES

- Resuspendre le culot cellulaire dans du NH_4Cl 0,14M (4). Ce traitement est lytique pour les globules rouges persistants, mais ne se pratique qu'au cas où il subsisterait trop de globules rouges après le stade "ficoll".
- Centrifuger 10 minutes à 200 g.
- Eliminer le surnageant et laver deux fois les cellules en PBS au moyen de centrifugations de 10 minutes à 110 g. Cette réduction de vitesse limite la sédimentation des thrombocytes et permet ainsi leur élimination.

2.3 Conservation des cellules

Les cellules sont conservées sous azote liquide. Dans ce but, elles sont resuspendues à 10 ou 20 $10^6/\text{ml}$ à 4°C dans du FCS (Fetal Calf Serum : sérum de veau foetal) + 10% de DMSO (Diméthylsulfoxyde,ucb), agent cryoprotecteur mais toxique pour les cellules à température ambiante.

Cette suspension cellulaire est répartie en aliquots de 1 ml dans des cryotubes (Nunc). Après avoir été placés dans une boîte en frigolite, ceux-ci sont placés à -70°C. La frigolite assure une diminution progressive de la température. Après 24 heures, les cryotubes sont transférés dans l'azote liquide à -196°C. Lors de leur utilisation, les cellules sont rapidement décongelées au bain-marie à 37°C., puis immédiatement lavées trois fois en PBS afin d'éliminer le DMSO. La viabilité est estimée au microscope à fluorescence après coloration au bromure d'éthidium bromide-acridine orange (5). Les cellules mortes sont colorées en rouge tandis que les cellules vivantes apparaissent en vert.

Acm.	Origine	Cible	Cellules concernées	Isotype	Dilution finale	Références
1H4	surnageant	chaînes μ	Lymphocytes B	IgG ₁	1/2	Letesson et al. (1985).
3B8	surnageant	ch.légères	Lymphocytes B	IgG ₁	1/2	Letesson et al., (1985).
1C8	surnageant	IgG ₁	Lymphocytes B	IgG ₁	1/2	Letesson et al., (1985).
8C11	surnageant	CD5	Lymphocytes T classiques et B leucosiques	IgG _{2a}	1/2	Depelchin et al., (1989).
ILA42	ascite	CD2	Lymphocytes T	IgG _{2a}	1/1000	Dr.Naessens, ILRAD, Nairobi, Kenya.
ILA57	ascite	CD6	Lymphocytes T	IgG _{2a}	1/1000	Dr.Naessens, ILRAD, Nairobi, Kenya.
2G1	surnageant	CD11c	Monocytes, PMN, LT activés et néoplasiques, NK et peu de LT et LB classiques (Note)	IgG ₁	1/5	Delcommenne et al. (manuscrit en préparation).
ILA15	ascite	CD11b	Monocytes, PMN, grands lymphocytes granuleux (Note)	IgG _{2a}	1/200	Dr.Naessens, ILRAD, Nairobi, Kenya.
7C7	surnageant	Ag de classe II	LB,LT activés, macrophages, cellules endothéliales et de Langhens (Roitt et al.,1985)	IgG _{2a}	1/2	Letesson et al. (1983).
11B2	surnageant	Ag de classe I	cellules nucléées	IgG _{2a}	1/2	Letesson et al. (1986).
Anti-Tac	sérum polyclonal	Récepteurs à IL-2	LB et T activées	IgG	1/100	Dr.Dobbelaere (FRG)

Note : 1.) Abréviations :

- LT et B : lymphocytes T et B
- PMN : Polymorphonucléaires
- NK : Natural killers

2.) Sources :

- Rigal et al., 1988.
- Chadburn et al., 1990.

Tableau VII : Caractéristiques principales des anticorps monoclonaux utilisés dans ce travail.

MATERIEL ET METHODES

3. MARQUAGE EN IMMUNOFLOUORESCENCE.

Le marquage en immunofluorescence et l'analyse en cytométrie de flux permettent de rendre compte du phénotype membranaire et donc de l'identité des cellules concernées, mais aussi d'apprécier quantitativement leur contenu en acides nucléiques.

3.1. Détection d'antigènes membranaires.**3.1.1. Anticorps monoclonaux utilisés.**

Les différents anticorps utilisés pour le marquage membranaire sont repris dans le tableau VII, de même que certaines caractéristiques s'y rapportant. La technique de production d'anticorps monoclonaux est réalisée suivant deux voies principales. Ils peuvent être récoltés dans un surnageant de cellules hybrides spécifiques ou provenir de liquides d'ascites après implantation de la tumeur *in vivo*.

3.1.2. Marquage des antigènes en immunofluorescence.

La détection d'Ag se réalise soit de manière indirecte (anticorps fluorescent dirigé contre les anticorps spécifique de la cible), soit de manière directe (anticorps spécifique couplé directement au composé fluorescent).

a). Méthode indirecte.

Les cellules sont resuspendues à 30.10^6 /ml en PBS-NaN₃ 0,1% à 4°C. Cette température permet d'éviter le phénomène de capping c'est-à-dire le rassemblement d'antigènes à un pôle de la cellule.

Le marquage est réalisé en micropuits à fond cône (Laboratoire Bioplast Medical). A 50 µl de suspension cellulaire, sont ajoutés 50 µl de monoclonal en solution PBS-NaN₃.

MATERIEL ET METHODES

Par la suite :

- Incuber 30 minutes à 4°C.
- Après avoir complété les puits avec du PBS-NaN₃, centrifuger à 200 g pendant 5 minutes.
- Les puits ayant été vidés, resuspendre le culot dans 50 µl de SAM-FITC (Sheep anti-Mouse : anticorps de mouton anti-immunoglobulines de souris couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine, Amersham) dilué 1/50 dans du PBS-NaN₃ + 10% de sérum bovin normal.
- Incuber 30 minutes à 4°C.
- Après un nouveau lavage en PBS-NaN₃, centrifuger à 200 g pendant 5 minutes.
- Resuspendre le culot dans 50 µl de PBS-NaN₃. On peut y ajouter éventuellement 50 µl de formol 2% en PBS, ce qui permet la fixation et la conservation des cellules à 4°C. en vue d'une observation ultérieure.

L'avantage de cette méthode consiste en l'amplification du signal par l'anticorps secondaire (SAM). Néanmoins, le risque de réaction croisée avec celui-ci subsiste. C'est pour limiter cette adsorption non spécifique qu'est utilisé le sérum bovin normal.

b). Méthode directe.

Les conditions d'expériences sont analogues à celles utilisées en méthode indirecte. Cependant, après l'ajout du monoclonal couplé, le temps d'incubation se limite à 10 minutes. Le SAM-FITC n'étant plus nécessaire, cette technique présente une grande rapidité de mise en oeuvre et permet de diminuer les interférences.

3.1.3. Observation des cellules.

Après marquage, les cellules peuvent être observées au microscope à fluorescence ou au FACStar (Fluorescence Activated Cell Sorter, Beckton-Dickinson). Ce cytomètre de flux permet l'analyse d'un nombre de cellules (1000-10.000 contre 100-200 pour le microscope à fluorescence) et donc une meilleure étude statistique. De plus, chaque cellule

(6) Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

40 10^6 cellules sont resuspendues dans 1 ml d'une solution à 50% NaCl 7gr/l et 50% sérum bovin normal. Elles sont étalées sur une lame préalablement dégraissée.

Pour la suite des opérations :

- Laisser évaporer le liquide à 37°C.
- Couvrir les lames de May-Grunwald pur pendant 3 à 5 minutes.
- Traiter les lames avec du May-Grunwald 50% en eau distillée pendant 1 minute.
- Tremper ensuite les lames pendant 15 minutes dans du Giemsa dilué à raison d'une goutte/ml d'eau distillée.
- Laver à l'eau distillée 30 secondes.
- Décolorer à l'acide borique 1% en eau distillée pendant 4-5 minutes.
- Monter les lames et observer en microscopie optique

MATERIEL ET METHODES

peut-être analysée suivant quatre paramètres (la taille, la granulométrie et 2 types de fluorescence).

3.2 Détection des acides nucléiques.

Le marquage des acides nucléiques est également réalisé en immunofluorescence. Comme nous l'avons évoqué précédemment le cycle cellulaire se définit par l'ensemble des processus responsables de la prolifération des cellules. Il est constitué de 5 phases : G0, G1, S, G2 et M (mitose). Les cellules capables de se multiplier ont un contenu en DNA variable selon le stade du cycle. Les phases G0 et G1 sont caractérisées par un DNA $2n$ tandis que G2 et M sont représentés par un contenu nucléique $4n$. La phase S constitue l'étape intermédiaire entre $2n$ et $4n$.

Sur base d'une simple coloration stoechiométrique du DNA, il n'est donc possible que distinguer trois phases: G0/G1, S et G2/M. Les cellules en mitose sont visibles en microscopie optique par coloration au May-Grunwald-Giemsa (6). L'estimation de la fraction de cellules en phase S est cependant difficile car les cellules au début et en fin de S sont comptabilisées respectivement en G1 et G2. Des procédés mathématiques assez lourds existent pour extraire les trois phases. Néanmoins, l'utilisation de molécules comme la bromodéoxyuridine (BrdU) a simplifié considérablement cette approche (Greimers, 1990).

3.2.1. Estimation des fractions G0/G1, S et G2/M par marquage à l'iodure de propidium et analyse mathématique.

a). Préparation des cellules au marquage.

L'estimation quantitative du DNA cellulaire a été permise grâce à l'utilisation de l'iodure de propidium (I.P.) (Calbiochem) qui s'associe aux bases nucléotidiques .

Les cellules, après avoir été lavées deux fois en PBS, sont resuspendues dans $100 \mu\text{l}$ de PBS- NaN_3 0,1% à 4°C .

Les étapes suivantes se présentent comme suit:

-Ajouter à la suspension 2 ml d'éthanol froid (Merck) à 70% en eau distillée et cela goutte à goutte tout en agitant au vortex (4°C). Ce stade est le plus

(7) Modèle polynômial global.

$$Y(x) = \frac{A_1}{\sqrt{2\pi} \sigma_1} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - \mu_1}{\sigma_1} \right)^2 \right] + \frac{A_2}{\sqrt{2\pi} \sigma_2} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - \mu_2}{\sigma_2} \right)^2 \right] + P(x)$$

où x = Intensité de fluorescence

A = nombre de cellules

σ = déviation standard

μ = moyenne du pic

Les indices 1 et 2 représentent les pics concernés (respectivement G0/G1 et G2/M) et $P(x)$, le polynôme du second degré délimitant la phase S.

(8) Polynôme du second degré.

$$P(x) = \sum_{j=1}^N (a + bx + cx^2) \times \frac{1}{\sigma_j} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - \mu_j}{\sigma_j} \right)^2 \right]$$

où a, b et c sont les paramètres du polynôme à ajuster aux points expérimentaux.

La phase S est divisée en N compartiments, chacun représenté par un modèle gaussien. (d'après Dean, 1985).

MATERIEL ET METHODES

critique du procédé car la formation d'agrégats est réversible. C'est la raison pour laquelle la fixation doit être lente, très agitée et se dérouler à froid.

- Incuber 30 minutes à 0°C.
- Ajouter 2 ml de HCl (Merck) 4N goutte à goutte au vortex (température ambiante) pour dénaturer le RNA.
- Incuber 30 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 5 minutes à 500 g et resuspendre le culot dans 10 ml de Na₂B₄O₇ (Merck) 0,1N pH8,5 pour neutraliser l'acide.
- Incuber 15 minutes température ambiante.
- Centrifuger 5 minutes 500 g.
- Resuspendre le culot dans 100 µl de PBS Tween 0,5%.
- Ajouter 200 µl d'I.P. à 10 µgr/ml dans du PBS Tween 0,5%.

La fluorescence résultante est détectée au FACS entre 560 et 600 nm.

b). Analyse des résultats.

L'histogramme global est généralement constitué de 2 pics séparés par un plateau. Le pic le plus élevé correspond aux cellules 2n et le second aux cellules 4n. Le plateau donne une idée des cellules en phase de synthèse. Cette fonction tripartite est représentée par un modèle polynômial (7), la phase S étant estimée par un polynôme du second degré (8) et les pics selon une loi normale (Dean, 1985). La fonction générale est ajustée aux points expérimentaux par une procédure itérative de recherche du minimum de la somme des carrés des écarts résiduels (entre les points expérimentaux et la courbe).

Cette technique permet la détection d'une quantité 2n ou 4n en DNA. Néanmoins, une cellule binucléée contiendrait également un DNA 4n, malgré qu'elle soit au repos. Il est donc nécessaire de confirmer les résultats prédits par l'analyse cellulaire. La méthode utilisée consiste en une coloration des noyaux seuls.

Principe de la méthode (Vindelov, 1983):

- Après lavage, resuspendre 10⁶ cellules dans 200 µl de tampon citrate (9).
- Ajouter à la suspension cellulaire 1800 µl d'une solution trypsinée (10) et mélanger délicatement.

(9) Tampon citrate.

Sucrose (BDH)	85,5 gr
Trisodium citrate.2H ₂ O (Merck)	11,76 gr
Eau distillée	800 ml

A cette solution sont ajoutés 50 ml de DMSO. Elle est ensuite complétée jusqu'à 1000 ml par de l'eau distillée et le pH est ajusté à 7,6.

(10) Solution trypsinée.

Trypsine (Gibco)	15 mgr
Solution stock	500 ml
pH = 7,6	

(11) Inhibiteur de trypsine (Sigma)	250 mgr
Ribonucléase A (Sigma)	50 mgr
Solution stock	500 ml
pH = 7,6	

(12) Iodure de propidium (Calbiochem)	208 mgr
Spermine tétrahydrochloride (Sigma)	580 mgr
Solution stock	500 ml
pH = 7,6	

Solution stock.

Trisodium citrate.2H ₂ O (Merck)	2000 mgr
Nodinet P40 (NP40,Shell)	2000 µl (0,1% V/V)
Sperminetétrahydrochloride (Sigma)	1044 mgr
Tris(-hydroxyméthyl)-aminométhane	121 mgr
Eau distillée	2000 ml
pH = 7,6	

MATERIEL ET METHODES

- Incuber à température ambiante pendant 10 minutes (durant lesquelles on agite 5-6 fois la préparation).
- Ajouter 1500 μ l d'une solution comprenant un inhibiteur de trypsine et de la ribonucléase A (11).
- Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
- Ajouter 1500 μ l d'une solution glacée contenant de l'I.P. et de la spermine(12) (qui stabilise les noyaux).

La solution est mélangée et passée sur un filtre nylon de 30 μ m. Les échantillons sont gardés dans la glace jusqu'à lecture au FACS.

NOTE -La trypsine clive les protéines cytoplasmiques et modifie les protéines chromosomiques en vue d'un marquage plus efficace.

-L'inhibiteur de trypsine est nécessaire car les noyaux trypsinisés sont instables en présence d'I.P. et d'une concentration de spermine compatible avec la lyse des membranes.

Quoiqu'informatisés ces processus d'analyse restent lourds et pas totalement représentatifs. Cette difficulté peut-être contournée par l'utilisation d'un "marqueur de synthèse": la BrDu.

3.2.2. Estimation des fractions G0/G1, S et G2/M par double marquage I.P./anti-BrdU.

La Brdu, analogue de la thymidine, est incorporée spécifiquement par le DNA cellulaire. Elle est le reflet d'une synthèse et donc de la phase S (si l'incubation en présence de BrdU n'est pas trop longue). Un marquage cellulaire à l'anti-BrdU (reconnu par un anticorps secondaire fluorescent) permet d'apprécier la quantité de Brdu incorporée. Le test est réalisé en combinaison avec un marquage à l'I.P., de manière à séparer G0/G1 de G2/M.

NOTE: Une dénaturation partielle du DNA au HCl est nécessaire avant toute détection car l'anti-BrdU ne se lie qu'aux chaînes monocaténares de DNA.

La séquence des différentes étapes se présentent de cette manière (Greimers,1990) :

- Après lavage, resuspendre les cellules à 4 10^6 /ml(10^7 maximum) dans du RPMI 1640 (cfr.4.1.).

MATERIEL ET METHODES

- Ajouter la BrdU au milieu de culture pour arriver à une concentration finale de 10 μ M
- Incuber pendant un temps adéquat dans un incubateur CO₂ à 37°C.
- Laver les cellules deux fois en PBS.
- Resuspendre le culot dans 100 μ l de PBS.
- Réaliser un traitement à l'éthanol et au HCl, analogue à celui utilisé précédemment pour le marquage à l'I.P.
- Après neutralisation au Na₂B₄O₇, les cellules sont lavées en PBS Tween 0,5% et aliquotées dans des micropuits à fonds coniques à 1,5 10⁶ cellules/ml).
- Centrifuger 5 minutes à 500 g.
- Resuspendre le culot dans 20 μ l de PBS Tween 0,5%.
- Ajouter le monoclonal anti-BrdU à une concentration finale de 1/10.
- Incuber 30 minutes à température ambiante.
- Laver en PBS Tween 0,5% et centrifuger 5 minutes à 500 g.
- Resuspendre le culot dans 50 μ l de SAM-FITC (1/50 en PBS Tween) auquel on a préalablement ajouté 10% de sérum bovin normal.
- Laver en PBS Tween 0,5%.
- Centrifuger 5 minutes à 500 g.
- Resuspendre le culot dans 100 μ l de PBS Tween 0,5%.
- Ajouter 200 μ l d'IP à 10 μ gr/ml dans du PBS Tween 0,5%.

La lecture se réalise au FACS entre 560 et 600 nm (pour l'IP) et 515 et 545 nm (pour FITC).

3.3. Détection des Récepteurs à fragments Fc des Immunoglobulines.

Comme nous ne disposons pas d'anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs à fragments Fc (RFc) des Ig, nous avons eu recours à une technique particulière de détection. Le principe de celle-ci consiste à coupler chimiquement des Ig d'isotypes déterminés à des globules rouges de mouton et de les mettre ensuite en présence d'une suspension cellulaire. En cas de présence de RFc sur certaines cellules, celles-ci vont aller se lier aux Ig d'isotype correspondant et former de véritables rosettes avec les globules rouges. La lecture se réalise en microscopie à fluorescence grâce à l'utilisation de composés *ad hoc* (solution d'éthidium bromide-acridine orange).

MATERIEL ET METHODES

Les différentes étapes de ce test sont les suivantes (Fey et al., 1976) :

- Laver une suspension de globules rouges (G.R.) bovins 4X en PBS.
- Resuspendre les G.R. à 10% en PBS.
- Ajouter le même volume de trypsine (Gibco) (0,2 mg/ml en PBS).
- Incuber 60 minutes à 37°C en agitant de temps en temps.
- Laver 3X les cellules en PBS et resuspendre à 10% en PBS.
- Ajouter un volume égal de glutaraldéhyde (Fluka chemika) à 3% en PBS.
- Incuber 20 heures à température ambiante sous agitation constante.
- Laver 5X en PBS.
- Resuspendre à 10% en PBS.
- Ajouter un volume identique de formaldéhyde (Fluka chemika) 3% en PBS.
- Laver 5X en PBS (les G.R. peuvent être stockés à 4°C dans du PBS-NaN₃ 0,1% en vue d'un couplage ultérieur).
- Mettre en présence un volume égal de G.R. (4% en PBS) et d'Ig de lapin à 80-400 µg/ml en tampon acétate 0,15 M pH 5.
- Incuber 2 heures à température ambiante tout en mélangeant continuellement dans un rotateur.
- Laver 3X en PBS.

Le couplage chimique étant terminé, les G.R. peuvent être stockés en PBS-NaN₃ 0,1%, BSA (Bovine Serum Albumine) 0,5% à 4°C. Dans ce cas, un lavage est nécessaire avant emploi.

La deuxième partie de la procédure se déroule comme suit :

- Répartir dans des micropuits à fonds coniques (Laboratoire Bioplast Médical) les cellules concernées (30 10⁶/ml en PBS-NaN₃) à raison de 100 µl/puits.
- Ajouter le même volume de la suspension de G.R. couplés (2% en PBS-NaN₃ 0,1%).
- Incuber une nuit à 4°C.
- Enlever 150 µl/puits.
- Ajouter 100 µl/puits d'une solution d'éthidium bromide -acridine orange (5).

La détection se réalise au microscope à fluorescence et le comptage s'effectue à plusieurs reprises sur des échantillons d'au moins 100 cellules. Nous considérons la présence effective d'une rosette lorsqu'au moins 3 G.R. sont fixés sur un lymphocyte.

MATERIEL ET METHODES

4. MISE EN CULTURE.

Après lavage, les cellules sont comptées sur lame de Thoma (ivel) et suspendues à la concentration souhaitée dans du milieu RPMI 1640 (Gibco).

4.1. Composition du milieu de culture.

Le milieu RPMI 1640, fourni sous forme de poudre, est reconstitué avec de l'eau bidistillée ultrapure. Une série de composants y est ajouté :

- HEPES (N-2 hydroxyéthylpiperazine-N-2-éthanesulfonique) 25 mM (Gibco)
- NaHCO₃ (Merck) 0,85g/l
- Pyruvate de sodium (Gibco) 1 mM
- Glutamine (Gibco) 2 mM
- Pénicilline 100 U/ml
- Streptomycine 100 mg/ml
- 10% de fetal calf serum (Gibco) décomplémenté par chauffage à 56°C durant 30 minutes.

Le mélange est mis à pH 7,4 et passé sur filtre de 0,22 µm pour le stériliser. Au moment de son utilisation, on y ajoute du 2-mercaptoethanol (Gibco) à 5 10⁻⁵ M final qui protège les cellules de l'action des radicaux libres, ainsi que de l'indométhacine (Sigma) à 1,5 µg/ml (inhibiteur de la PGE₂, prostaglandine E₂, qui perturbe, quant à elle, la prolifération des cellules T). Ce milieu est dit "complet".

MATERIEL ET METHODES

4.2. Distribution des cellules en boîtes de culture.

Les cellules en milieu de culture sont distribuées dans des microplaques à 96 puits à fonds plats (Nunc) à raison de 100 μ l/puits. Seuls les 60 puits internes sont utilisés pour des raisons d'évaporation au niveau des bords. Pour pallier cet inconvénient, le pourtour des boîtes est rempli avec du PBS stérile. L'utilisation des puits internes est organisée de façon à pouvoir :

- réaliser des réplicats
- comparer différents modes de stimulation dans les mêmes conditions
- étudier le comportement des cellules au cours du temps

4.3. Culture

Les boîtes de culture, non hermétiques, permettent les échanges gazeux. Elles sont placées dans une étuve à 37°C, 5% de CO₂ et une atmosphère saturée en humidité (pour limiter l'évaporation).

5. DEPLETION DES CELLULES T.

En vue de l'étude particulière des lymphocytes B, il a été nécessaire de dépler la préparation cellulaire en lymphocytes T. En interagissant avec les cellules B, les cellules T pourraient en effet introduire des paramètres supplémentaires, difficiles à estimer. La cytotoxicité appliquée sur les lymphocytes T est induite par la voie classique du complément, elle-même initiée par la formation de complexes Ag-Ac spécifiques (Roitt et al., 1985 et Hirsh et al., 1982). Les monoclonaux utilisés (nommés ILA42 et ILA57) ont une spécificité envers des marqueurs T, respectivement CD2 et CD6. Une fois fixés, ces anticorps de par leur isotype particulier (IgG_{2a}) sont susceptibles de réagir avec le système du complément.

La séquence des différentes étapes de la cytotoxicité médiée par complément se présente comme suit :

MATERIEL ET METHODES

- Après lavage, resuspendre les cellules à $20 \cdot 10^6$ /ml dans des tubes stériles de 10 ml, à raison de 0,5ml/tube.
- Ajouter 0,5ml/tube d'un mélange de 2 monoclonaux(ILA42 et ILA57) dilués chacun à 1/500 en PBS.
- Incuber 30 minutes à 4°C.
- Laver deux fois en PBS.
- Centrifuger 5 minutes à 200 g.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 1ml (par tube) d'une solution de complément (sérum de lapin,Séra-Lab) à 10% dans du RPMI minimum (sans FCS).
- Incuber 1 heure à 37°C au bain-marie.
- Laver deux fois en PBS.

Deux types de contrôle sont ensuite mis en oeuvre :

- contrôle de viabilité par coloration à l'acridine orange-éthidium bromide.
- contrôle de déplétion par marquage spécifique des lymphocytes B en immunofluorescence (méthode directe).

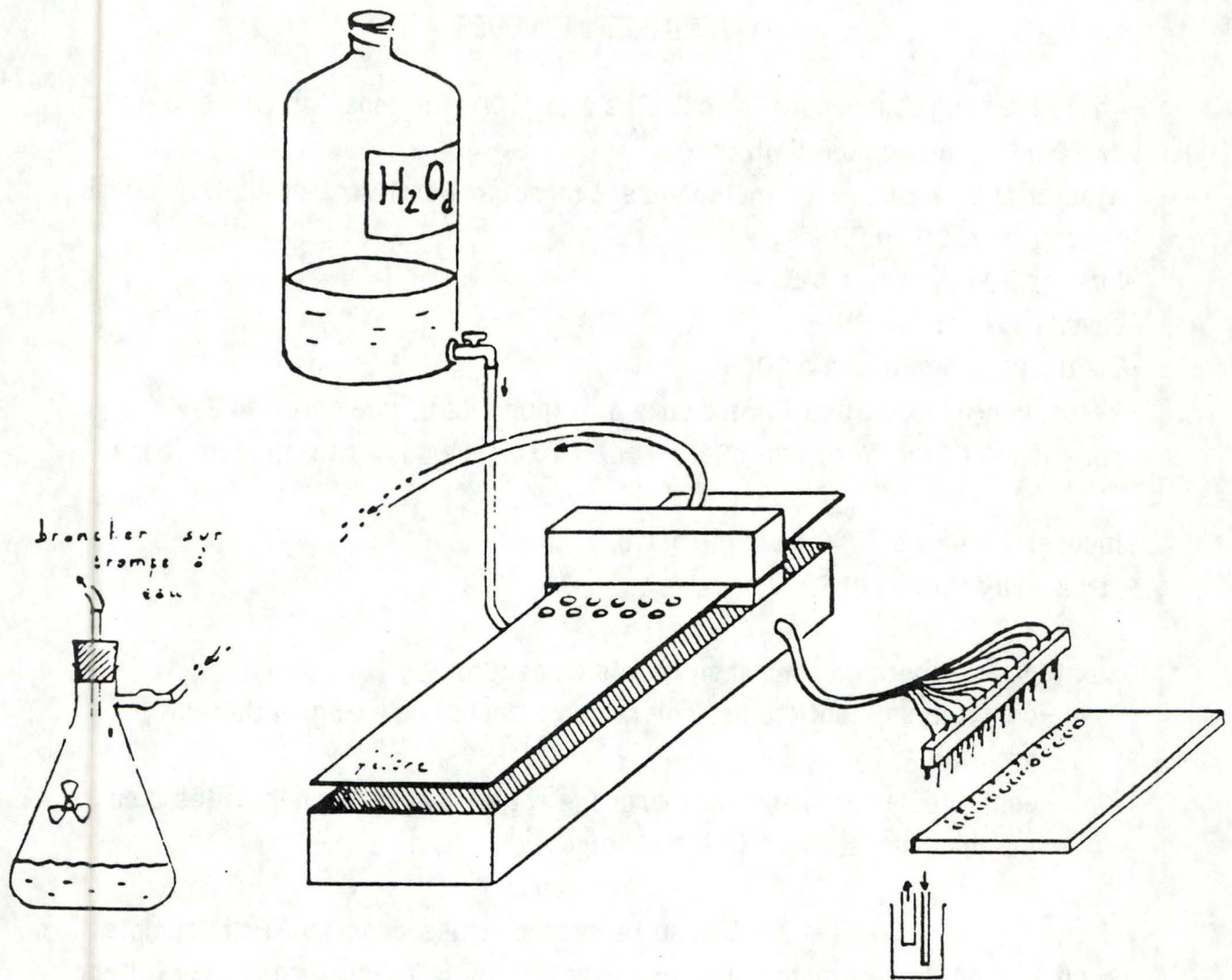
Les cellules sont ensuite resuspendues dans du RPMI "complet". Le but ultime de ces manipulations étant la mise en culture, chaque étape doit donc se dérouler **dans des conditions stériles**.

6. STIMULATION DES CELLULES.

Afin de mieux cerner l'état physiologique des cellules leucosiques, nous les avons soumises à plusieurs stimuli de spécificités différentes. Le test a été réalisé sur une population totale (lymphocytes T/B et monocytes résiduels) et sur une population déplétée en cellules T.

Les cellules en RPMI complet (concentration minimale de $2 \cdot 10^6$ /ml) ont été distribuées à raison de 100 μ l/micropuits. Un même volume de substance stimulante y est ajouté.

(13) (Méthyl-3H)Thymidine (Amersham) : 2,0 curies/mM



- Commander l'arrivée et l'aspiration d'eau simultanées (rester une vingtaine de secondes par rang).
- Essorer (aspiration seule).
- Laisser sécher le filtre.
- Détacher les petits disques du filtre. Chacun d'eux ayant retenu le contenu d'un puits de la boîte de culture.
- Déposer ces disques dans des fioles individuelles avec 2 ml de scintillant.

Figure 14 : Utilisation du "Cell-Harvester".

MATERIEL ET METHODES

6.1. Modes de stimulations.

-PHA (Phytohémagglutinines, Sigma) : Cette lectine, isolée de *Phaseolus vulgaris* est un mitogène des lymphocytes T et entraîne leur transformation lymphoblastique (Ling et al, 1975).

-1H4 : Cet anticorps monoclonal à spécificité anti-chaîne μ est produit sous forme d'ascite et purifié sur colonne de protéine A-Sépharose (Affiland).

-3B8 : C'est un anticorps monoclonal dirigé contre les chaînes légères. La préparation est la même que pour 1H4

-Surnageant d'IL-2 :

L'IL-2 utilisé pour les différents tests de stimulation provient du surnageant de cellules de la lignée MLA-144.

La lignée lymphoïde T de gibbon MLA-144 provient de l'ATCC. (American Type Culture Collection) et est reconnue comme produisant de l'IL-2. De plus, les cellules de cette lignée expriment des récepteurs d'IL-2 en membrane (Smith, 1988). La production se déroule de la manière suivante :

Les cellules sont mise en culture en "roller bottle" dans du RPMI 1640 + FCS 10%. Après 48 heures d'incubation à 37 °C, le surnageant est récupéré par centrifugation.

6.2. Mesure de prolifération cellulaire.

6.2.1 Incorporation de thymidine tritiée.

Après avoir mis en culture les différentes populations de cellules stimulées, il est nécessaire de mesurer l'impact du mode de stimulation sur la prolifération cellulaire. A cette fin, de la thymidine tritiée (**13**) est ajoutée à la culture à raison de 0,8 μ curies/puits. Les cellules actives incorporent ces précurseurs radioactifs lors de leur synthèse de DNA. Après récolte, la mesure de radioactivité sera indicatrice de l'importance du taux de prolifération cellulaire.

MATERIEL ET METHODES

6.2.2. Récolte au "Cell-Havester".(Titertek Cell-Havester 550) (figure 14).

Le principe de cet appareil est de faire éclater les cellules au moyen d'eau distillée et de récolter leur contenu par aspiration sur un filtre en fibre de verre (Titertek). La récolte se fait 18 heures après l'ajout de thymidine tritiée. La radioactivité précipite sur le filtre qui est mis à sécher, placé dans une fiole et ensuite mis à compter après addition de 2 ml de scintillant (Instafluor II, Packard) par fiole.

6.2.3. Mesure de la radioactivité β par scintillation liquide.

Le principe du comptage à scintillation liquide est basé sur la mesure de la lumière émise par des photons provenant d'atome excités directement ou indirectement par les rayonnements β , c'est-à-dire par les électrons.

Chaque isotope β émet des électrons dont les énergies cinétiques différent et se distribuent pour donner un spectre d'émission d'électrons caractéristiques de l'isotope utilisé.

Le tritium est l'isotope radioactif de l'hydrogène. Une fois la substitution réalisée, du fait du faible pouvoir pénétrant de la radiation β , la détection et la quantification de cet isotope est impossible. Il faut donc combiner l'échantillon radioactif avec "un cocktail à scintillation". Ce dernier contient habituellement un solvant, un émulsifiant et un scintillant.

Le but de l'utilisation d'un tel cocktail est de convertir l'énergie cinétique des électrons émis par l'isotope β en énergie lumineuse détectable par le compteur.

7. MISE EN EVIDENCE DE LA PRODUCTION D'ANTICORPS.

La détection d'anticorps nous donne un indice sur l'état physiologique de la cellule. En effet, le développement ultime d'un lymphocyte B consiste en la production d'immunoglobulines.

MATERIEL ET METHODES

Les échantillons testés proviennent soit de surnageants de cellules en culture.

7.1. Mise en culture.

Les cellules sont resuspendues dans du RPMI minimum (sans FCS) et disposées dans des macropuits (Nunc) à raison de 1ml/puits. Nous y ajoutons 1ml d'une solution qui potentialiserait la sécrétion d'Ig.(choisie en fonction du test de prolifération). Cette solution est diluée en RPMI minimum.

Les boîtes sont mises dans une étuve CO₂ à 37 °C. La disposition des puits (en triplicate) nous permet de réaliser des prélèvements après 3, 5 et 7 jours. Les surnageants sont ensuite dosés par une méthode immunoenzymatique..

7.2. Le test ELISA.

La méthode retenue est le test ELISA ("Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay"). Ce test immunochimique permet la détection d'anticorps fixés sur un antigène par une réaction enzymatique donnant lieu à une coloration mesurable. Il nous a permis une détection des anticorps sans spécificité antigénique dans un surnageant de culture. De plus, l'utilisation d'anticorps monoclonaux à spécificité isotypique particulière nous a donné l'occasion de mieux caractériser les Ig détectées.

Principe du test :

- Déposer au fond de chaque puits"ELISA" (Nunc) 50 µl d'une solution de RAB (Rabbit anti-Bovine: solution d'Ig de lapin anti-Ig bovines).à 10 µgr/ml en PBS.
- Laisser une nuit à 4 °C.
- Enlever l'excès et laver plusieurs fois en PBS.
- Remplir les puits avec 200µl de PBS-0,02% gélatine (ucb) pour saturer les sites de fixation du plastique restés libres.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Ajouter à chaque puits 50 µl d'anticorps monoclonal soit 1H4, soit 1C8 (reconnaissant respectivement les IgM et les IgG₁).

(14) Composition du "révélateur".

ABTS (Boehringer)	4,2 mgr
Tampon citrate	5,6 ml
H ₂ O ₂ 30%	10 µl

Tampon citrate :

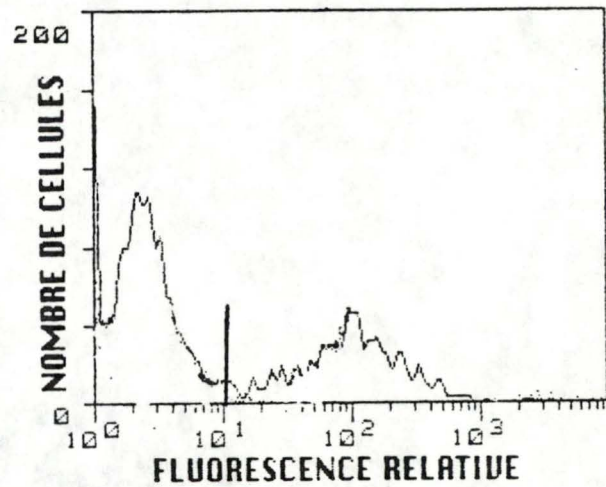
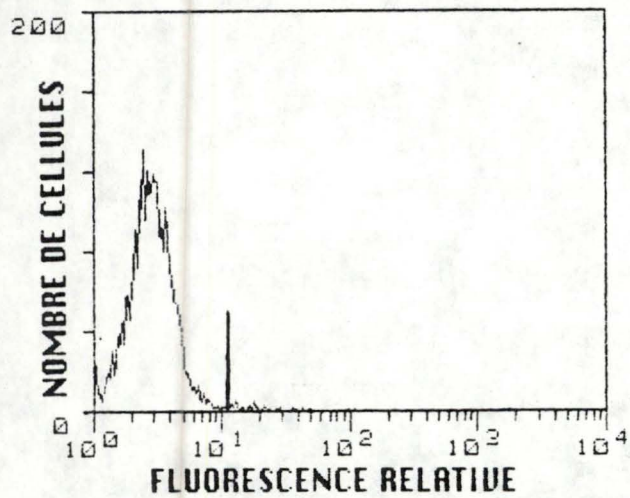
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (Merck)	2050 mgr
Acide citrique (ucb)	890 mgr
Eau distillée	100 ml

pH = 5,6.

MATERIEL ET METHODES

- Enlever l'excès et laver plusieurs fois en PBS.
- Disposer 50 μ l/puits d'une solution SAM-peroxydase à 1/500 en PBS + 10% de sérum bovin normal.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Enlever l'excès et laver plusieurs fois en PBS.
- Révéler la réaction en ajoutant 100 μ l/puits d'une solution **(14)** contenant du H₂O₂ et le chromogène (ABTS : 2,2-Azino-Di-3-Ethyl-Benzothiazolin-sulfonate)
- Lire l'absorbance après 15 minutes à 405 nm au lecteur ELISA.

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS



Graph 1 : Schémas résultant d'un marquage classique en immunofluorescence après analyse en cytométrie de flux. La courbe exprime le nombre de cellules détectées en fonction de leur intensité de fluorescence relative (dont l'échelle est divisée en valeurs discrètes nommées numéros de canaux).

- a). Marquage-témoin (sans incorporation du monoclonal).
- b). Marquage typique des Ag de classe II chez un animal normal.

1. PHENOTYPES GLOBAUX DES ANIMAUX LEUCOSIQUES.

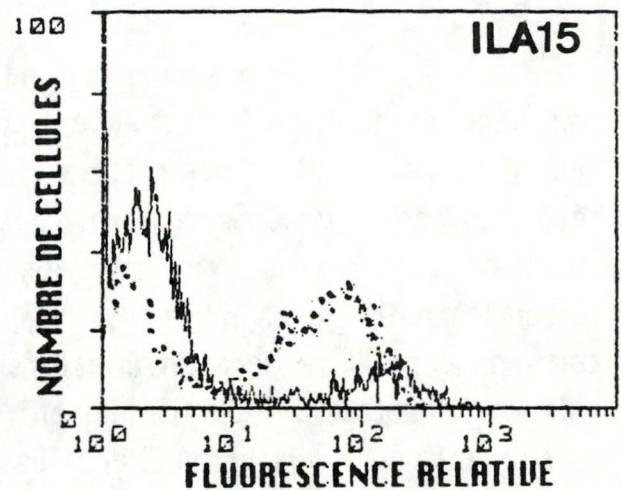
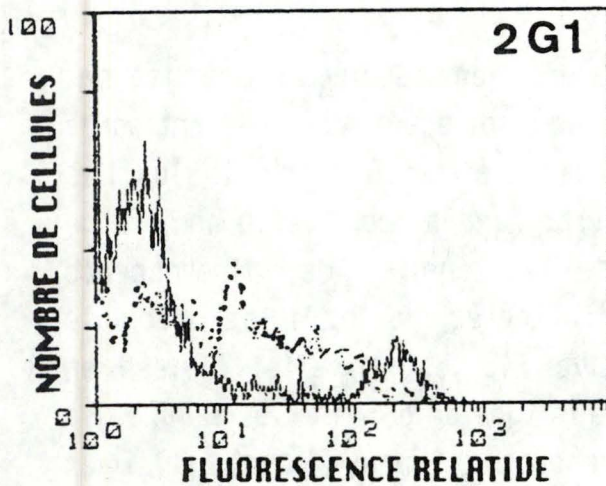
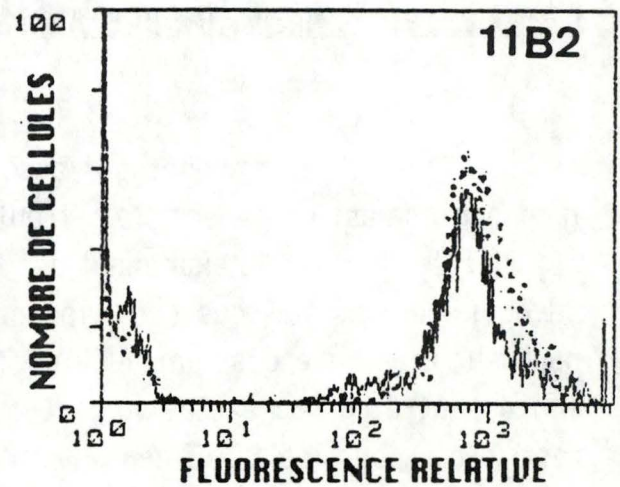
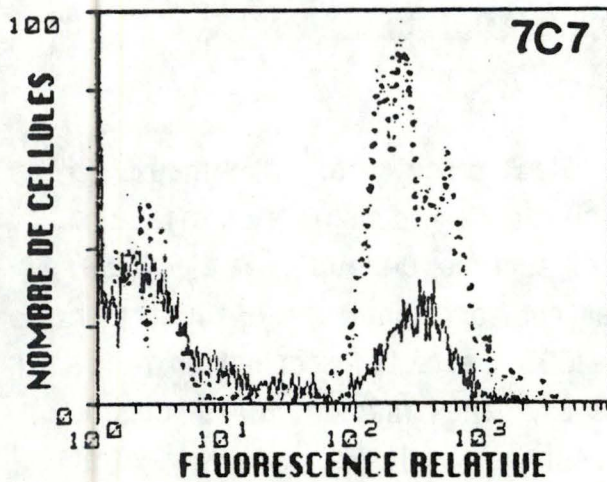
Le phénotype des cellules circulantes d'animaux en lymphocytose est en général fortement perturbé. On y dénombre en effet une majorité des cellules B exprimant des IgM en surface. Depelchin et al. (1989) ont également montré que ces lymphocytes comportaient pour la plupart un marqueur classique des lymphocytes T, le CD5. Cette transformation ne se limite peut-être pas exclusivement à ces antigènes membranaires, comme c'est le cas pour les BCD5 dans d'autres espèces (De la Hera et al., 1988 et Freedman et al. 1, 1989).

De plus, la détection d'antigènes marqueurs de cellules activées pourrait être aussi en mesure de nous renseigner sur l'origine des BCD5. C'est dans cette optique que nous avons étudié l'expression de différents antigènes membranaires sur des cellules provenant d'animaux en forte lymphocytose (n°76, 77 et 163). Celle-ci a été comparée à la répartition des mêmes antigènes sur des cellules sanguines normales.

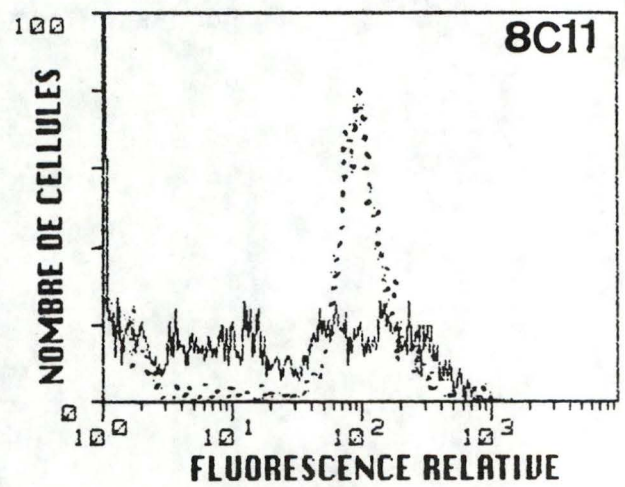
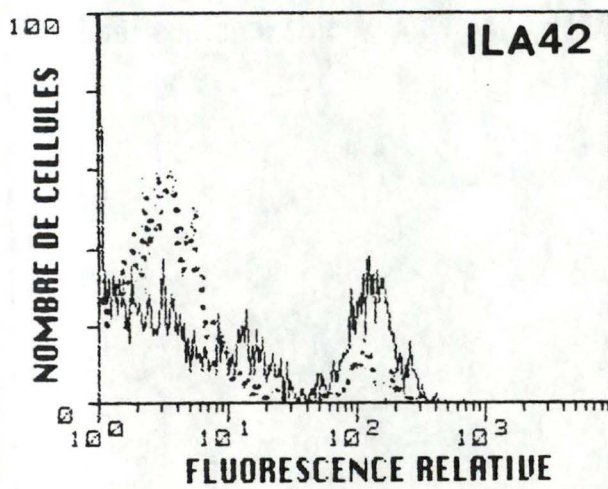
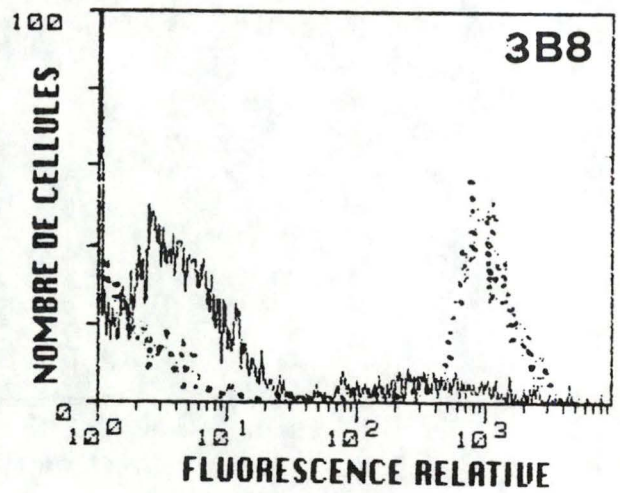
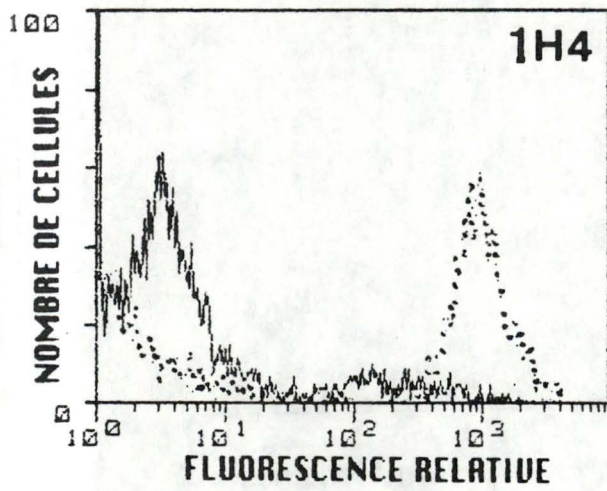
La détection des marqueurs membranaires se réalise par marquage en immunofluorescence (méthode indirecte) via des anticorps spécifiques et l'analyse des résultats fait appel à la cytométrie de flux. Ces résultats sont exposés sous forme de courbe rendant compte du nombre de cellules considérées en fonction de l'intensité de fluorescence (proportionnelle au nombre d'antigènes détectés par cellule). L'échelle correspondant à ce paramètre est relative. Elle est en effet divisée en valeurs discrètes (256 ou 104 suivant que le type de gain utilisé à l'analyse soit linéaire ou logarithmique) appelées numéros de canaux (**Graphe 1**). Deux statistiques particulières de la distribution cellulaire ont été envisagées :

-le pourcentage de cellules marquées (établi suivant la disposition de cellules-témoins n'ayant pas été mise en présence du monoclonal).

-la moyenne des intensités de fluorescence, représentant le numéro de canal au-dessus et au-dessous duquel 50% des observations sont reprises. Les comparaisons de moyenne ne tiendront compte que de variations prononcées (1,5X à 2-3X la valeur de base) vu la variabilité inhérente à tout marquage en immunofluorescence. Afin de mieux visualiser les modifications perçues sur les cellules leucosiques et avant de les détailler, nous présentons pour chaque marquage le profil de distribution cellulaire d'un



Graphe 2 : Marquages en immunofluorescence indirecte réalisés sur les cellules circulantes d'un animal normal (lignes pleines) et d'un animal en forte lymphocytose représentatif (pointillés). Les anticorps monoclonaux testés sont : le 1H4 (anti-IgM), le 3B8 (anti-chaînes légères), l'ILA42 (anti-CD2), le 8C11 (anti-CD5), le 7C7 (anti-Ag de classe II), le 11B2 (anti-Ag de classe I), le 2G1 (anti-CD11c) et l'ILA15 (anti-CD11b).



Animaux	Anti-IgM		Anti-chaînes légères	
	%	Moy.	%	Moy.
Normal	18	268	20	430
163	77	1022	79	1040
76	76	835	78	870
77	64	731	67	952

Tableau VIII: Comparaisons des pourcentages des cellules marquées par les anticorps anti-chaînes μ et anti-chaînes légères.

RESULTATS

animal normal et d'un animal en lymphocytose représentatif (163) (**Graphe2**).

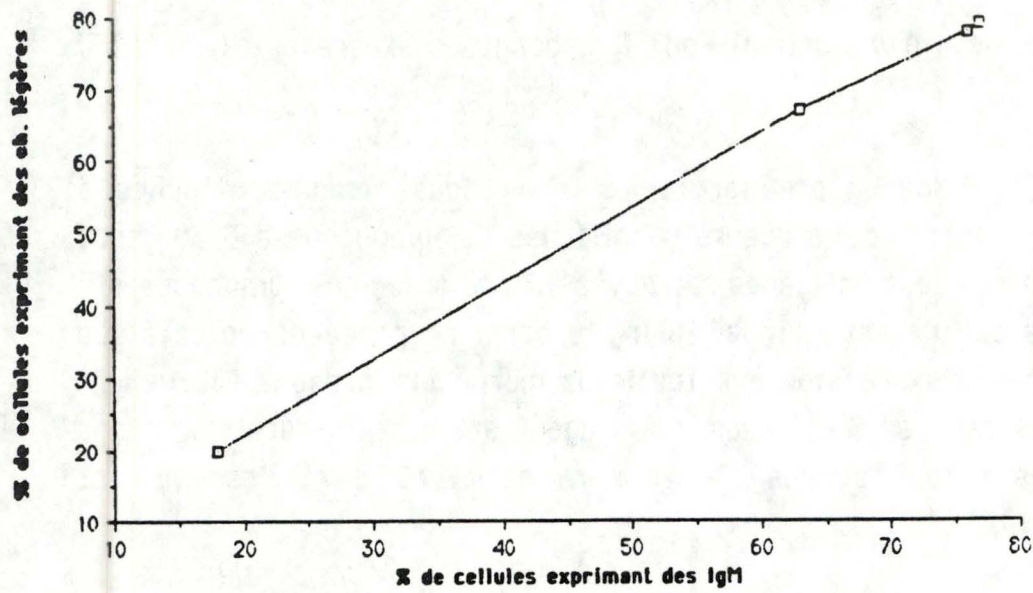
Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à confirmer l'expression de marqueurs spécifiques de lymphocytes B au repos pour ensuite aborder des antigènes retrouvés à la fois sur des lymphocytes B et sur d'autres cellules sanguines. Enfin, la dernière phase de notre étude s'est intéressée à l'expression éventuelle de marqueurs presque totalement absents sur des cellules B au repos, mais ayant été parfois décrits sur des BCD5 humaines et/ou murines (De la Hera et al., 1988 et Freedman et al., 1989).

1.1. Détection d'antigènes spécifiques des cellules B.

Le marquage en immunofluorescence est réalisé sur une préparation de cellules mononucléées contenant en majorité des lymphocytes B et des lymphocytes T, mais aussi des monocytes résiduels. Les deux anticorps spécifiques des cellules B que nous avons utilisés étaient dirigés contre les IgM et les chaînes légères. L'expression de ces deux marqueurs est bien sûr corrélée et il serait logique de retrouver une proportion de cellules portant des chaînes légères au moins aussi élevée que celles exprimant des IgM.

Les résultats obtenus sont détaillés dans le tableau VIII. Chez l'animal normal, la quantité de cellules IgM⁺ (18%) et de chaînes légères (20%) sont en accord avec les valeurs généralement trouvées dans la littérature (Wintrobe et al., 1974); les 2% de différence pouvant être générés par des lymphocytes B tapissés d'Ig d'autres isotypes.

Le marquage de cellules d'animaux leucosiques indique une augmentation drastique des cellules IgM⁺. Au moins 67% de la population (minimum pour l'animal 77) répond à ce critère, ce qui est en accord avec Depelchin et al., 1989. Les moyennes d'intensité de fluorescence sont aussi fortement amplifiées chez les animaux leucosiques (5 fois plus que l'animal-témoin). Ceci nous incite donc à penser que ces individus présentent une accumulation d'IgM membranaires. Par ailleurs, les moyennes varient parallèlement aux pourcentages d'IgM⁺.



Graph 3 : Evolution du pourcentage de cellules exprimant des chaînes légères en fonction de la proportion des cellules portant des IgM en membrane.

Animaux	Anti-Ag de classe II		Anti-Ag de classe I		Rosettes (Rfc)
	%	Moy.	%	Moy.	%
Normal	45	316	95	835	18
163	80	327	95	898	36
76	77	622	98	740	31
77	65	330	97	798	33

Tableau IX : Comparaisons des pourcentages des cellules marquées par les anticorps anti-molécules de classe II et anti-molécules de classe I.

RESULTATS

Comme nous pouvions le prévoir, la proportion de cellules IgM⁺ paraît corrélée à la quantité de cellules porteuses de chaînes légères (**Graph 3**). De plus, étant donné que ces valeurs sont fort proches pour chaque animal, nous pouvons en déduire que la majorité des Ig de surface sont constituées de chaînes μ . Les moyennes des intensités de fluorescence révèlent également une plus grande densité d'Ig en membrane.

Ces résultats confirment que les animaux en forte lymphocytose comportent plus de 65% de cellules B exprimant pour la plupart des IgM de surface à forte densité. Les récepteurs immunoglobuliniques constituant une source possible d'activation, ces cellules pourraient donc présenter une réactivité plus importante vis-à-vis de certains antigènes. Il reste à savoir si la spécificité antigénique n'indique pas une restriction de réponse à un ou plusieurs de ces antigènes. De toute manière, la densité d'IgM ne prouve aucunement l'implication de ces cellules dans un quelconque processus d'activation.

D'autres marqueurs ne se trouvant pas exclusivement sur les lymphocytes B peuvent également être concernés par ces modifications phénotypiques (apparemment consécutives à l'infection par le BLV) et ainsi fournir de nouvelles informations quant à l'état physiologique de ces cellules. C'est dans ce sens que nous avons étudié la répartition de certains d'entre-eux.

1.2. Détection de marqueurs non spécifiques des cellules B.

Le rôle des antigènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) est primordial pour la réaction immunologique T-dépendante. Il nous paraît donc utile de vérifier l'occurrence des ces molécules sur une population cellulaire d'animaux en forte lymphocytose (**Tableau IX**).

Les antigènes de classe II sont généralement exprimés sur toutes les cellules présentatrices de l'antigène (monocytes, cellules endothéliales, lymphocytes T activés,...et cellules B) (Roitt et al., 1985). Un animal normal comporte 45% de cellules circulantes portant ces antigènes.

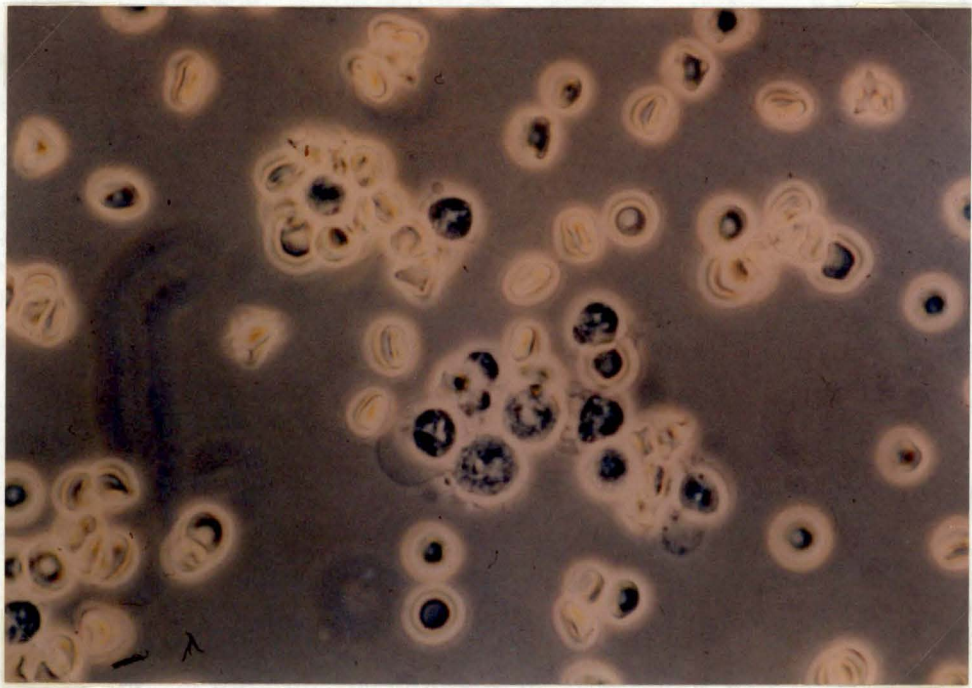
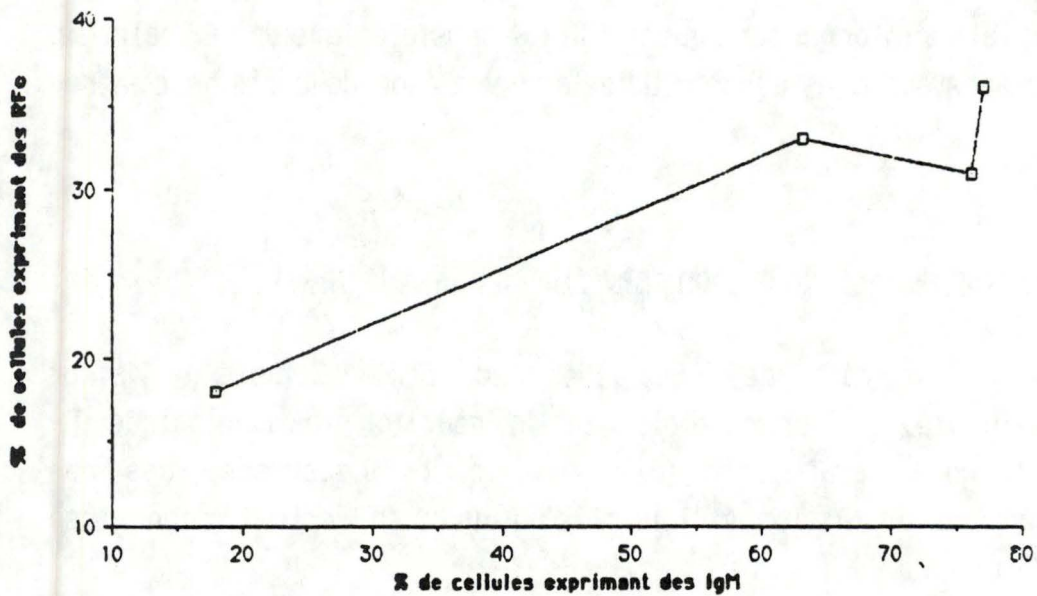


PHOTO : Formation de rosettes consécutives à la détection de récepteurs Fc. et observées en microscopie optique



Graphe 4 : Evolution du pourcentage de cellules exprimant des récepteurs Fc en fonction de la proportion de cellules portant des IgM en membrane.

RESULTATS

Par contre, cette valeur s'élève au-delà de 65% chez des animaux en lymphocytose. Vu l'importance du pool de lymphocytes B chez ces individus, ce résultat semble logique.

De plus, si deux des trois animaux infectés (77 et 163) ne montrent pas de différence de moyenne d'intensité de fluorescence par rapport à l'animal normal, il n'en va pas de même pour le n°76 (double de la valeur de base). Ce phénomène paraît particulièrement intéressant car l'activation d'une cellule se manifeste souvent par une densité plus forte d'antigènes de classe II (pour autant qu'elle en exprime dès le départ). Certes, ce résultat n'est apparemment pas généralisé (bien que vérifié en d'autres circonstances sur l'animal 76) et pourrait être la conséquence de réaction ponctuelle et individuelle à un autre agent que le BLV. Mais, une confirmation de cette éventualité contribuerait à éclairer le problème de l'origine des BCD5.

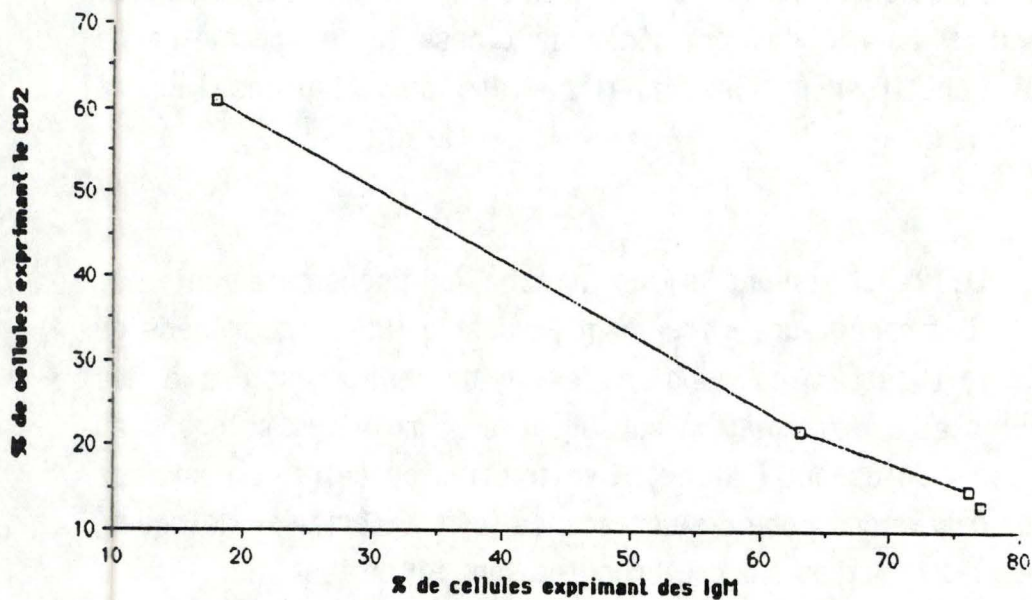
Les molécules de classe I sont habituellement présentes sur toutes les cellules nucléées et sont impliquées notamment dans les processus de reconnaissance des antigènes par des cellules T cytotoxiques. Les pourcentages de cellules marquées (allant de 95 à 98%) par un anticorps spécifique ne signalent pas de grandes modifications entre un animal normal et des animaux leucosiques. Il en est de même en ce qui concerne les moyennes et donc la densité des antigènes de classe I. Ce paramètre ne semble donc pas constituer un lieu privilégié des perturbations liées à l'installation de la leucose.

Le test suivant s'est attaché au dénombrement des cellules porteuses des récepteurs à fragment Fc des Ig (RFc). Le procédé de détection utilisé fait cette fois appel à des Ig de lapin couplées à des érythrocytes bovins et à la formation subséquente de rosettes colorées ou non par un composé fluorescent (**Photo**). L'estimation de cellules positives s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence (cfr. Matériel et Méthodes, II.3.3.). Notons que les Ig fixées aux érythrocytes sont ici de type IgG.

Les résultats repris au tableau IX indiquent une augmentation notable des cellules exprimant des RFc_γ chez les animaux en lymphocytose. Nous passons en effet de 18 (normal) à 36% (163). Ces valeurs ne présentent apparemment pas de relation linéaire étroite avec les pourcentages de cellules IgM⁺ (**Grphe 4**). L'augmentation du nombre de

Animaux	Anti-CD2		Anti-CD5	
	%	Moy.	%	Moy.
Normal	61	106	57	140
163	13	127	91	147
76	15	123	91	128
77	22	117	85	152

Tableau X : Comparaisons des pourcentages des cellules marquées par les anticorps anti-CD2 et anti-CD5.



Graph 5 : Evolution du pourcentage de cellules exprimant le CD2 en fonction de la proportion de cellules portant des IgM en membrane.

RESULTATS

cellules exprimant des Rfc semble donc une autre conséquence de la lymphocytose.

En cas de liaison d'un complexe Ag-Ac, ces Rfc sont des sites potentiellement activateurs des cellules qui les portent. Mais, il serait hâtif de voir en cette caractéristique un indice d'activation car les Rfc, présents donc tôt au cours de l'ontogénèse, pourraient tout autant favoriser l'hypothèse d'une lignée séparée pour les BCD5.

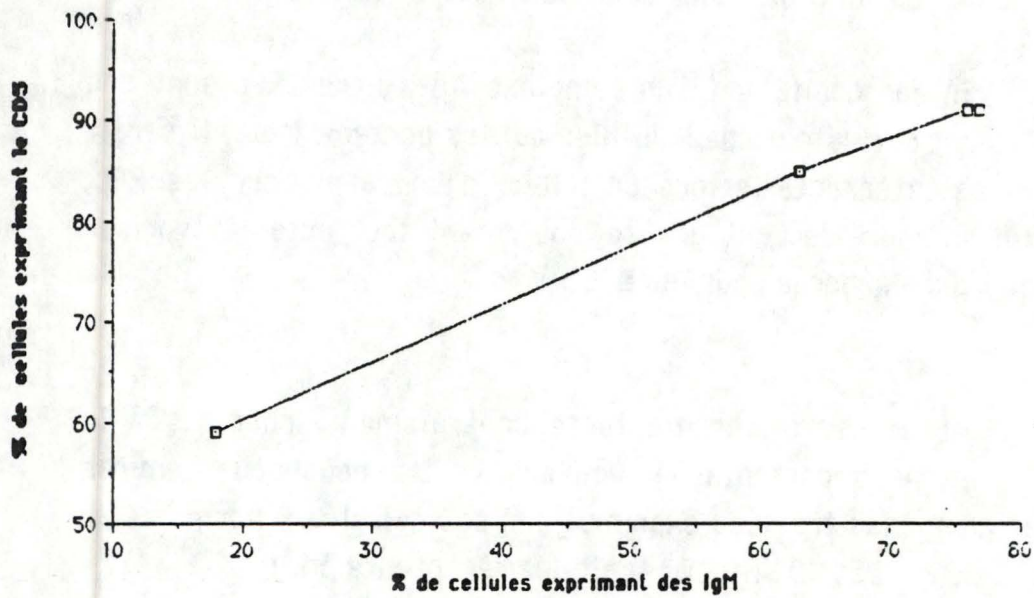
Après ces différents tests généralement inhérents à la présence plus ou moins importante de lymphocytes B, nous nous sommes intéressés à des antigènes très peu exprimés par des cellules B normales au repos. Il s'agit de CD2, CD5, CD11b, CD11c et des récepteurs à l'IL-2.

1.3. Détection d'antigènes très peu présents sur les cellules B.

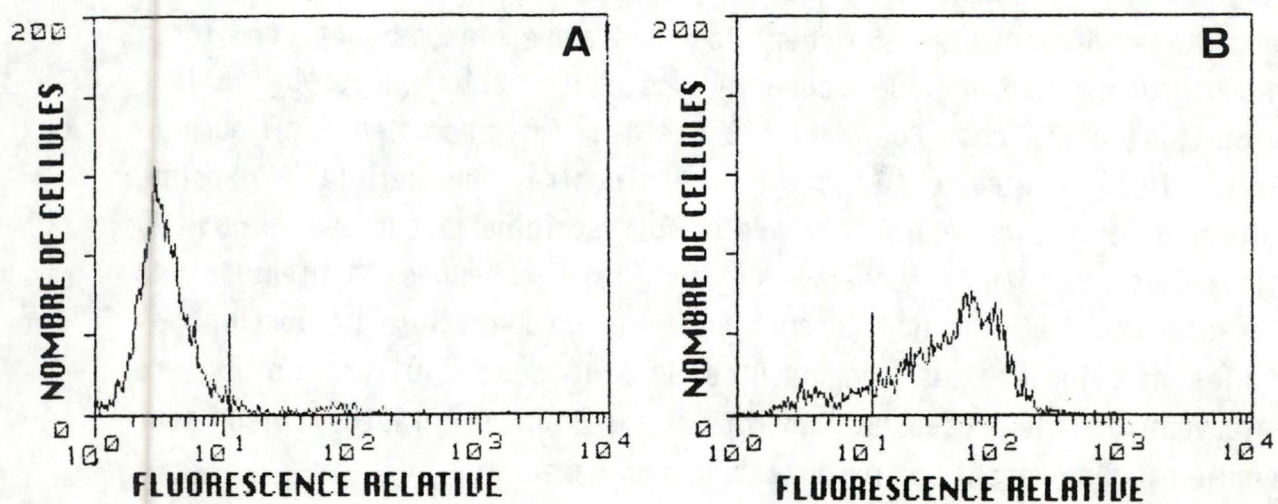
Le premier type de marquage réalisé a fait appel à un anticorps détectant le CD2, marqueur ubiquiste des cellules T. Ce test a pour but principal de vérifier la diminution de la quantité de ces cellules parallèlement à l'élévation des cellules IgM⁺. Les résultats sont détaillés dans le tableau X.

Un animal normal possède plus de 60% de cellules T. Vu le pourcentage de cellules B chez les individus leucosiques en forte lymphocytose, il est logique d'observer une chute de lymphocytes T à leur niveau (jusque 13% chez l'animal 163). Les deux faits semblent d'ailleurs en relation linéaire étroite (**Graphe 5**). Par contre, une cellule T exprime toujours autant de molécules CD2 qu'elle soit d'origine leucosique ou non (Vu les faibles variations observées pour les moyennes d'intensité de fluorescence). Bien que ne représentant plus qu'une faible proportion des cellules circulantes, les lymphocytes T sont donc toujours en mesure d'intervenir dans le processus immunitaire des animaux infectés, raison pour laquelle elles ne seront pas perdues de vue par la suite.

La principale caractéristique des cellules B d'animaux infectés résidant dans l'expression du CD5 (marqueur des lymphocytes T), nous avons également vérifié l'existence de cet antigène sur les cellules leucosiques (**Tableau X**).



Graph 6 : Evolution du pourcentage de cellules exprimant le CD5 en fonction de la proportion de cellules portant des IgM.



Graph 7 : Marquage en immunofluorescence indirecte des cellules BTC par l'anticorps monoclonal dirigés contre les récepteurs à l'IL-2.

a).Témoin SLN (pas d'adjonction du monoclonal)

b).Marquage des cellules BTC par l'anticorps anti-récepteurs à l'IL-2.

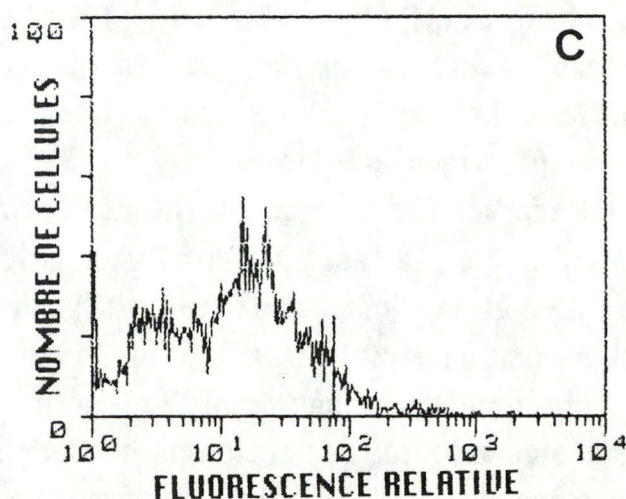
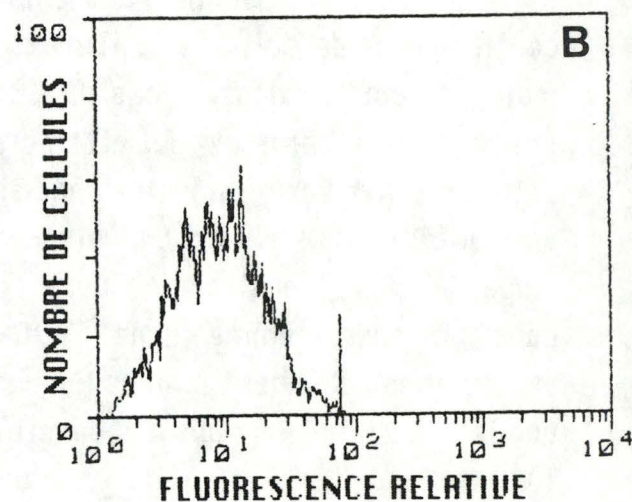
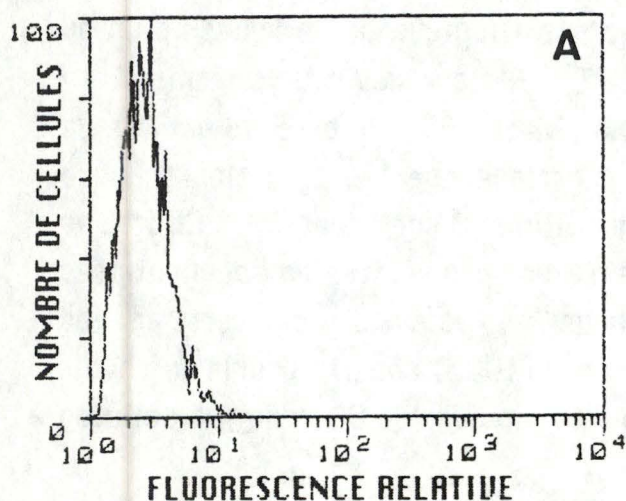
RESULTATS

Comme l'a précisé la détection du CD2, l'animal normal contient 61% de cellules T. Il n'est donc pas illogique de retrouver plus ou moins ce chiffre dans le cas du CD5 (57%). Par contre, pour un animal en lymphocytose, celui-ci peut atteindre 91% (76 et 163). De plus, le nombre de cellules CD5⁺ varie dans les mêmes proportions que les IgM⁺ pour chaque animal étudié (**Graph 6**). La plupart des cellules B sont donc IgM⁺ CD5⁺. Les moyennes des intensités de fluorescence n'étant pas véritablement modifiées dans un sens comme dans l'autre, nous ne pouvons pas vérifier les conclusions qu'avaient émises Hayakawa et al.(1988) chez la souris (à savoir que les BCD5 murines ont une densité 10 fois moindre de CD5 que les cellules T).

Les récepteurs à l'IL-2 (RIL-2) sont habituellement exprimés sur les lymphocytes T primés par un antigène ou des lymphocytes B classiques, mais en phase d'activation. Néanmoins, Freedman et al.(1,1989) ont décrit la présence de ces récepteurs sur certaines BCD5 humaines, suggérant ainsi une origine "activée" de ces cellules. Nous avons donc entrepris un marquage spécifique de RIL-2.

Afin de vérifier la capacité de cet anticorps à se lier à l'antigène visé, l'anti-RIL-2 a été testé sur une lignée de cellules T bovines (BTC) productrices d'IL-2 et exprimant des RIL-2. Vu l'origine des anticorps anti-RIL-2 (production par un lapin) et le type de marquage (indirect), le témoin négatif consiste à mettre un sérum de lapin normal en présence des cellules BTC et ensuite de rajouter des anticorps secondaires (Donkey anti-Rabbit : solution d'Ig d'âne anti-Ig de lapin). Cette épreuve a révélé que l'anti-RIL-2 reconnaît à plus de 80% les cellules BTC (**Graph 7**).

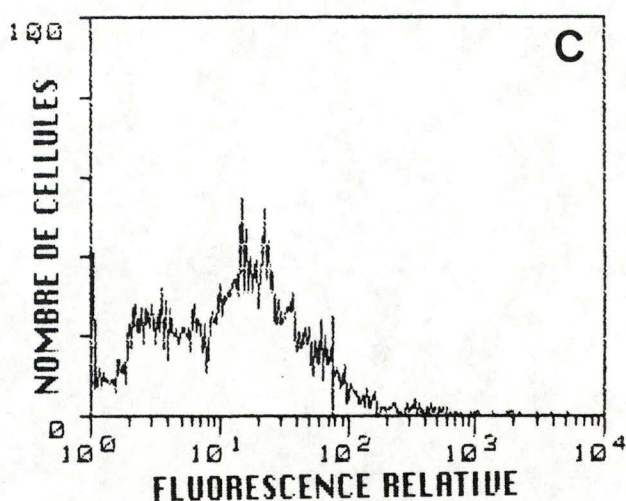
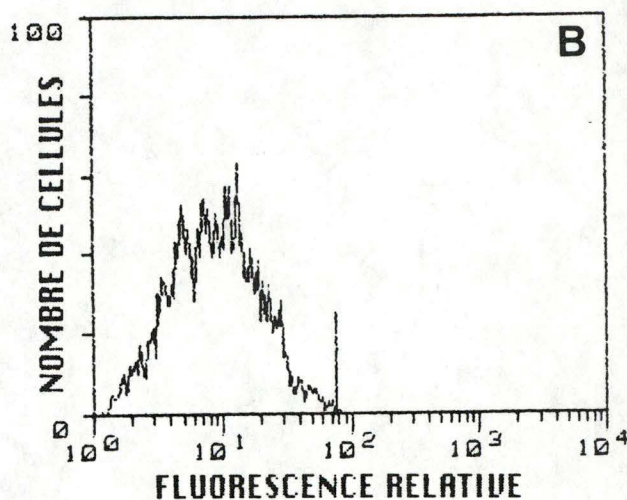
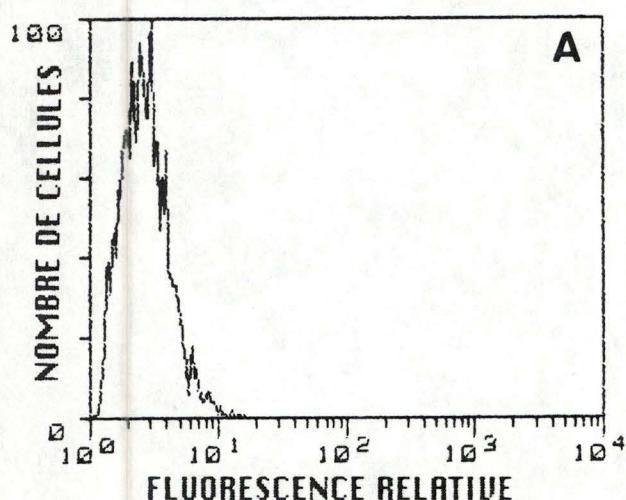
Ce test a ensuite été reproduit sur des cellules mononucléées d'un bovin normal. Il montre en fait un glissement du monopic vers des intensités de fluorescence très importantes et cela, même pour le témoin négatif. Ce phénomène peut néanmoins facilement s'expliquer par la présence de RFc sur ces cellules (au contraire des BTC). Les RFc bovins ont en effet une grande affinité pour les Ig de lapin. Ce sont par ailleurs des Ig de lapin qui sont utilisés pour l'estimation des cellules porteuses de RFc (cfr. Mat. et Méth., 3.3.). Ces résultats confirment donc la détection des RFc à la fois sur des cellules bovines normales et leucosiques. De plus, la fixation des anticorps de lapin et leur détection sont d'autant plus accentuées que le



Graph 8 : Marquage en immunofluorescence de cellules circulantes leucosiques (animal 132) par l'anticorps monoclonal anti-récepteurs à l'IL-2.

- a). Témoin PBS (adjonction de PBS en lieu et place du monoclonal)
- b). Témoin SLN (adjonction de sérum de lapin normal en lieu et place du monoclonal).
- c). Marquage de cellules leucosiques (animal 132) par l'anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs à l'IL-2.

NOTE : Le glissement du pic observé dans le cas du témoin SLN a été constaté pour tous les animaux étudiés (y compris l'individu normal).



Graph 8 : Marquage en immunofluorescence de cellules circulantes leucosiques (animal 132) par l'anticorps monoclonal anti-récepteurs à l'IL-2.

- a). Témoin PBS (adjonction de PBS en lieu et place du monoclonal)
- b). Témoin SLN (adjonction de sérum de lapin normal en lieu et place du monoclonal).
- c). Marquage de cellules leucosiques (animal 132) par l'anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs à l'IL-2.

NOTE : Le glissement du pic observé dans le cas du témoin SLN a été constaté pour tous les animaux étudiés (y compris l'individu normal).

RESULTATS

nombre de cellules exprimant ces récepteurs est élevé (cas des animaux leucosiques).

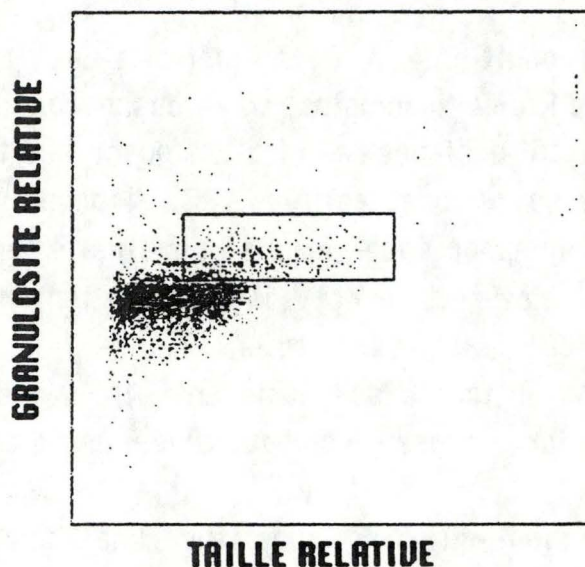
Dans ces conditions, il est difficile de tirer des conclusions sur l'expression de RIL-2. Néanmoins, en se basant sur un témoin négatif très décalé et en émettant quelques restrictions quant à ce test, nous pouvons croire en la présence de quelques cellules (7%) disposant de RIL-2 chez un animal en forte lymphocytose étudié ponctuellement (132) (**Graphes 8**). Si ce résultat s'avérait exact, il nous orienterait vers l'hypothèse de cellules BCD5 activées. Mais, seules des études complémentaires utilisant des anticorps de souris anti-RIL-2 (pas encore disponibles actuellement) seraient en mesure de nous renseigner à ce sujet.

Si l'expression du CD5 constitue une des grandes caractéristiques des lymphocytes B infectés par le BLV, nous ne pouvons pas exclure la présence d'autres Ag (tout aussi inhabituels) sur ces cellules

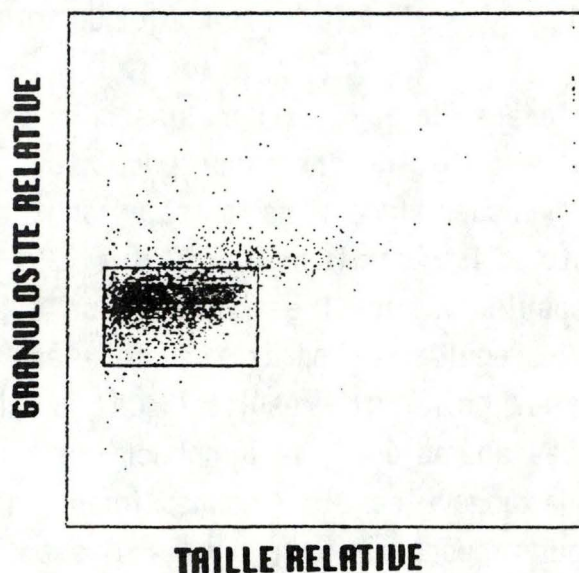
C'est une des raisons nous incitant à vérifier l'occurrence de molécules comme les intégrines. Celle-ci, largement distribuées sur les PMN (Polymorphonucléaires) et les monocytes, interviennent dans les processus d'adhésion cellulaire. Trois types particuliers d'intégrines existent au niveau des leucocytes : CD11a, CD11b et CD11c. Si CD11a est exprimé sur tous les leucocytes, on n'observe que peu de cellules B comportant CD11b et CD11c. Cependant, De la Hera et al. (1988) ont montré la présence de ces deux antigènes sur des BCD5 humaines. Il était donc intéressant de voir s'il n'en allait pas de même dans le cas de BCD5 issues de la leucose. Quant au CD11a, vu sa présence sur tous les leucocytes, il ne fera pas l'objet de notre étude.

L'un des intérêts majeurs de l'analyse en cytométrie de flux réside dans la possibilité de déterminer une population cellulaire particulière en vue de son examen spécifique. Dans le cas présent, ce procédé nous a permis de rendre compte de la répartition de CD11b et CD11c sur une population enrichie en lymphocytes. Celle-ci est déterminée à partir des caractéristiques de taille et de granulosité propres à ces cellules.

La suspension cellulaire résultant de la préparation utilisée ("Ficoll") est composée en majorité de lymphocytes B et T, mais aussi d'une faible proportion de monocytes. Etant donné l'importance de leur taille et de leur granulosité par rapport aux lymphocytes, il est possible de délimiter une "fenêtre" comprenant ces monocytes (**Graphes 9**) sur un graphe taille/granulosité.



Graphe 9 : Délimitation d'une "fenêtre" comportant une majorité de monocytes à partir des caractéristiques de taille et de granulosity propres à ces cellules.



Graphe 10 : Délimitation d'une "fenêtre" comportant une majorité de lymphocytes à partir des caractéristiques de taille et de granulosity propres à ces cellules.

RESULTATS

Néanmoins, il existe souvent des "parasites" au sein de cette population. Il s'agit souvent de grands lymphocytes granuleux ou d'autres cellules (voir cycle cellulaire) présentant une taille et/ou une granulosité élevée. De plus, l'établissement de cette "fenêtre" est très subjective. Ceci explique pourquoi nous nous limiterons à l'étude de la population totale et d'une "fenêtre" comprenant une majorité de lymphocytes (en nombre beaucoup plus élevé que les monocytes) au sein de laquelle "la contamination" est moins importante (**Grphe 10**).

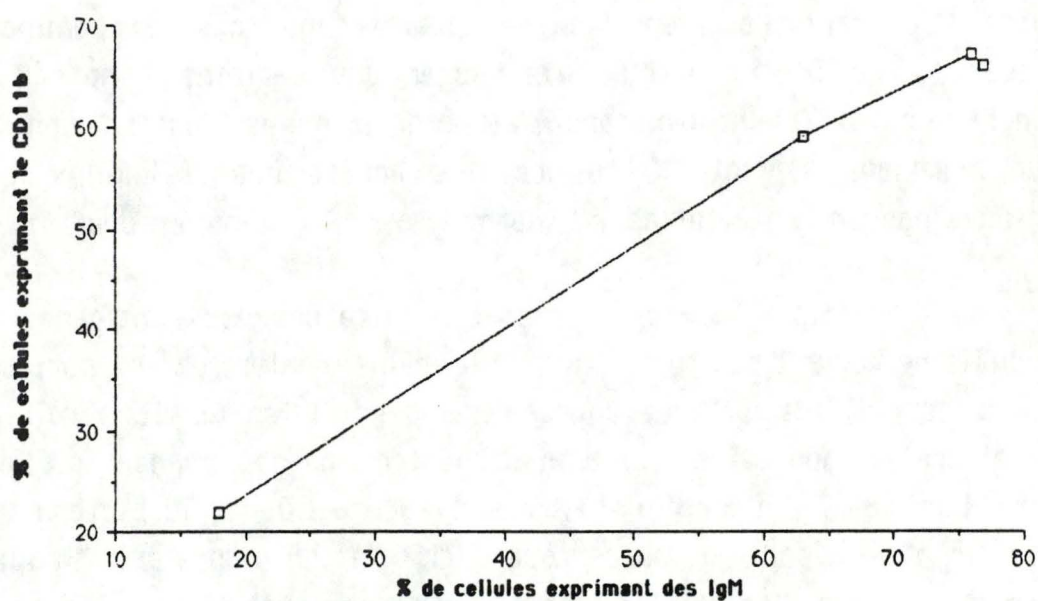
Passons tous d'abord en revue la répartition des deux intégrines visées au niveau de la suspension cellulaire globale (**Tableau XI**). Si le pourcentage de cellules normales détectées par des anticorps anti-CD11b et anti-CD11c est de 22%, la proportion de spécimens positifs augmente fortement pour les cellules leucosiques (nous passons de 44 à 59 % pour CD11c et de 59 à 67 % pour CD11b). De tels résultats indiquent que les monocytes (constituant au grand maximum 15% de la préparation) ne sont plus les seuls à exprimer ces marqueurs.

Afin de vérifier ceci, nous avons recours à l'examen d'une "fenêtre" englobant une majorité de lymphocytes (**Tableau XI**). Chez un animal normal, 11% des cellules ont été détectées par l'anti-CD11c. Bien que faible, ce chiffre indique qu'il pourrait exister soit quelques lymphocytes exprimant CD11c soit une légère contamination de la "fenêtre" par des monocytes. Cependant, l'augmentation des pourcentages chez les animaux leucosiques (38 à 50 %) permet d'envisager que certains lymphocytes contiennent bien CD11C en membrane. L'étude de la même "fenêtre" dans le cas d'un marquage à l'anti-CD11b accentue encore ces réflexions. Les pourcentages passent en effet de 7% (normal) à 64% (maximum pour 76 et 163).

Malgré l'analogie constatée entre ces deux antigènes, il semble qu'ils ne varient pas tout à fait de la même manière par rapport aux proportions de cellules IgM⁺. Le pourcentage de cellules CD11c paraît en effet atteindre son apogée pour un animal ayant moins de lymphocytes IgM⁺ (64% pour l'animal 77) (**Grphe 11**). Au niveau de CD11b, le plateau est apparemment atteint pour un pourcentage d'IgM⁺ un peu plus élevé (**Grphe 12**). Bien que sources d'indications intéressantes, ces évolutions par rapport aux pourcentages d'IgM⁺ doivent être prises avec précautions et vérifiées sur un grand plus grand nombre d'animaux leucosiques.

Animaux	Anti-CD11c				Anti-CD11b			
	Population totale		"Fenêtre"		Population totale		"Fenêtre"	
	%	Moy.	%	Moy.	%	Moy.	%	Moy.
Normal	22	177	11	158	22	67	7	45
163	44	71	38	50	66	79	64	70
76	52	108	42	76	67	82	64	71
77	59	134	50	96	59	113	53	84

Tableau XI : Comparaisons des pourcentages des cellules marquées par les anticorps anti-CD11c et anti-CD11b.



Graph 11 : Evolution du pourcentage de cellules exprimant le CD11c en fonction de la proportion de cellules portant des IgM.

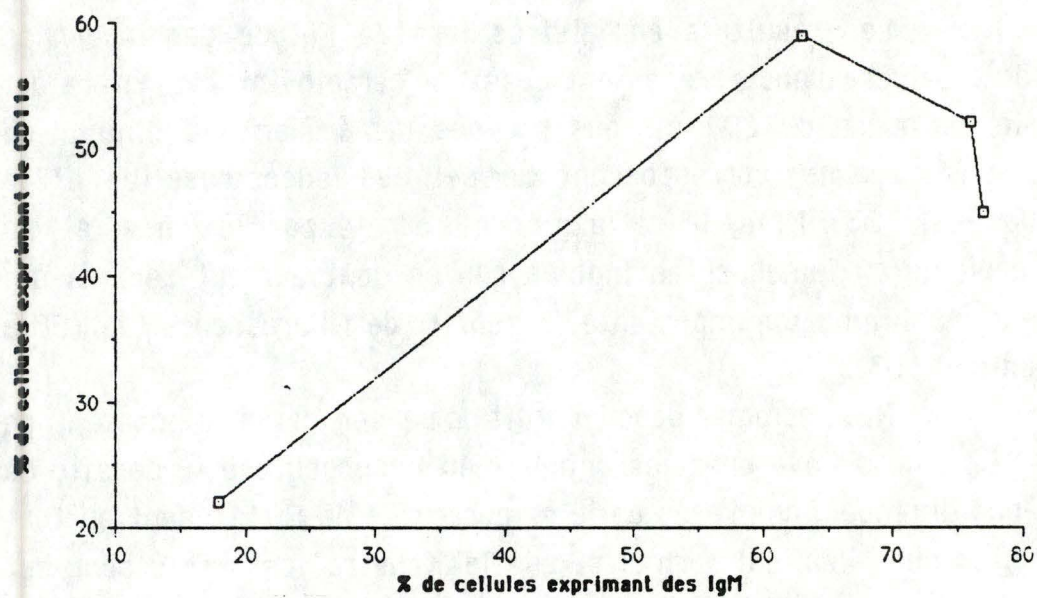
RESULTATS

Les résultats enregistrés lors de l'étude des moyennes d'intensités de fluorescence présentent aussi un certain intérêt. En ce qui concerne le marquage du CD11c, nous pouvons remarquer une diminution importante des moyennes correspondant aux cellules leucosiques (de 177 à 71 pour l'animal 163). Mais, la réflexion ne s'arrête pas là. En effet, la "fenêtre" enrichie en lymphocytes indique que ce sont surtout ceux-ci qui enregistrent une diminution importante d'intensité de fluorescence (de 158 à 50 pour l'animal 163).

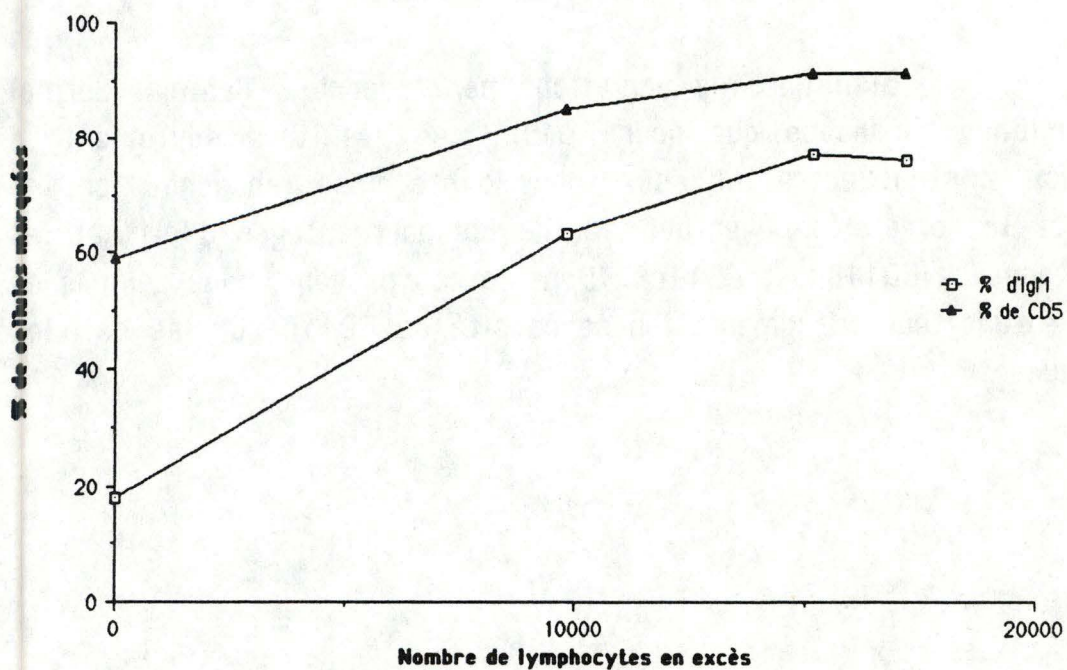
Nous sommes donc en droit de penser que si le pourcentage de cellules CD11c⁺ s'élève chez les animaux en lymphocytose, la densité de ces antigènes diminue. Comme les cellules porteuses de CD11c sont surtout des monocytes chez l'animal normal et que la "fenêtre" délimitée pour cet animal contient apparemment encore quelques-une de ces cellules, nous pouvons croire que l'expression des molécules de CD11c est plus faible pour les animaux leucosiques. Dans le cas où "la fenêtre" contiendrait chez l'animal normal des lymphocytes à densité très élevée de CD11c, cette conclusion n'en serait pas plus modifiée.

Par contre, les moyennes d'intensité consécutives au marquage globale de CD11b ne signale pas ce phénomène. Mieux, elles semblent augmenter légèrement pour deux animaux leucosiques (163 et 76) et plus fortement encore pour l'animal 77 (113 contre 67 à l'animal témoin). Ces résultats se répercutent comme pour le CD11c (mais dans une moindre mesure) sur les cellules constitutives de notre "fenêtre".

Bien que les variations par rapport à l'animal normal soient moins prononcées que pour CD11c, ces résultats soulignent la différence existant entre les deux types d'intégrines (ébauchée lors de l'étude de la corrélation éventuelle entre les pourcentages d'IgM⁺ et les pourcentages de CD11b⁺ et CD11c⁺). Dans le cas présent, nous serions en présence d'une légère augmentation de densité de CD11b sur les cellules leucosiques.



Graph 12 : Evolution du pourcentage de cellules exprimant le CD11b en fonction de la proportion de cellules portant des IgM.



Graph 13 : Evolution des pourcentages de cellules exprimant respectivement des IgM et des molécules CD5 en fonction du degré de lymphocytose de l'animal considéré.

RESULTATS

1.4. Evolution de certains paramètres en fonction de la lymphocytose.

Les animaux en forte lymphocytose dont nous disposions présentent tout de même entre-eux quelques variations quant au degré de lymphocytose. Il nous semble donc opportun de regarder s'il n'existe pas de relation étroite entre celui-ci et l'expression des antigènes les plus significatifs de la perturbation du système immunitaire engendrée par le BLV.

Les marqueurs les plus extraordinaires des cellules circulantes des animaux infectés sont certainement les IgM membranaires et les molécules CD5. Le graphe 13 présente les pourcentages de cellules marquées respectivement par des anti-IgM et des anti-CD5 par rapport au degré de lymphocytose. La quantité de lymphocytes considérée comme normale par la clé européenne (Straub, 1987) étant modulée par l'âge du bovin, nous avons décidé d'exprimer cette lymphocytose suivant le nombre de lymphocytes excédant la valeur physiologique pour un animal de cet âge.

Les résultats indiquent une relation étroite entre le pourcentage de cellules IgM⁺ et la lymphocytose. Néanmoins, il semble qu'en très forte lymphocytose, la proportion de ces cellules stagne. Le même genre de réflexion s'applique à l'expression du CD5. Ce test pourrait être confirmé avec plus d'animaux leucosiques, mais il reprend déjà en partie ce qu'ont décrit Depelchin et al. en 1989.

Ce type d'analyse peut également s'adresser aux pourcentages de cellules exprimant d'autres marqueurs. Mais, étant donné la relation linéaire (jusqu'au plateau) entre les IgM⁺ et la lymphocytose, tout autre graphe ne serait qu'une répétition des schémas exposant les pourcentages de cellules marquées par rapport aux IgM⁺.

1.5. Enseignements générés par l'étude phénotypique des cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose.

Le but principal de cette étude consistait initialement à vérifier la présence de certains marqueurs (IgM et CD5) sur des cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose, mais aussi d'apprécier si la perturbation phénotypique ne s'étendait pas à d'autres antigènes (découverts ou non sur des BCD5 murines ou humaines).

RESULTATS

Les premiers tests réalisés confirment en effet la présence d'une quantité importante de cellules B exprimant pour la plupart des IgM et le CD5. A ce niveau, nous sommes déjà en mesure d'établir un parallèle entre les phénotypes des BCD5 bovines, murines et humaines. Néanmoins, il semble que, contrairement à ce qu'ont décrit Hayakawa et Hardy (1988) chez la souris, la densité du CD5 en surface des lymphocytes B bovins soit la même que sur les cellules T.

Mais, la comparaison entre les trois espèces ne s'arrête pas là. Nous avons en effet mis en évidence la présence de deux classes d'intégrines (CD11b et CD11c) sur une proportion importante de cellules circulantes leucosiques (comme De la Hera et al. l'ont décrit chez la souris et chez l'homme en 1988). Ces molécules, généralement impliquées dans les processus d'adhésion cellulaire, sont certainement susceptibles de participer à des phénomènes d'interactions cellulaires très pointus (installation de la phase tu morale par exemple). Il est cependant trop tôt pour élaborer de tels plans dans la mesure où nous ne connaissons pas l'influence que pourraient avoir les intégrines dans le contexte de cellules BCD5.

Au-delà des analogies phénotypiques, notre attention s'est portée sur l'expression plus ou moins importante de Ag membranaires considérés comme "marqueurs d'activation" sur les cellules leucosiques. Ce terme doit par ailleurs souvent être relativisé. Il en est ainsi pour l'augmentation drastique de la densité des IgM chez les individus infectés par le BLV. S'il est vrai qu'une cellule activée exprime plus d'IgM, cette caractéristique ne prouve en rien que les BCD5 ne proviennent pas d'une lignée cellulaire distincte ayant à l'origine une densité plus grande d'IgM. Plus qu'un phénomène d'activation, la densité des Ig de surface indique une capacité plus forte à réagir face aux Ag spécifiques des ces anticorps. Le même type de réflexion est également d'application en ce qui concerne le nombre élevé de cellules leucosiques portant des RfC et des molécules CD11c (ces dernières ayant été découvertes par Chadburn et al. en 1990 sur des cellules T activées).

Enfin, d'autres indices d'activation, découverts ponctuellement (RIL-2 et densité des Ag de classe II) chez des individus infectés sont également en mesure de nous aiguiller vers l'hypothèse d'"activation", mais seulement à condition de vérifier leur occurrence à plus grande échelle.

RESULTATS

L'établissement des phénotypes membranaires de divers animaux en forte lymphocytose a donc confirmé l'état perturbé de leurs cellules B sanguines, décrit par ailleurs dans la littérature (Depelchin et al., 1989). De plus, certains signes reflétant une possible activation ont été détectés sur un nombre conséquent de cellules leucosiques.

Mais, d'une part, il reste à prouver que ces Ag n'ont pas été acquis lors de l'ontogénèse par des cellules constituant une lignée séparée. Dans cette optique, une étude approfondie de cellules bovines foetales s'impose.

D'autre part, il serait intéressant de savoir si ces perturbations phénotypiques ne sont pas associées à des modifications physiologiques des cellules, celle-ci pouvant se traduire par une quantité de phénomènes (réactivité plus importante, prolifération, sécrétion...). C'est dans ce but qu'ont été entrepris les volet suivants de notre travail.

2. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE.

Afin de mieux cerner l'état physiologique des cellules B circulantes, il nous paraît utile de faire appel dans un premier temps à l'étude de leur cycle cellulaire.

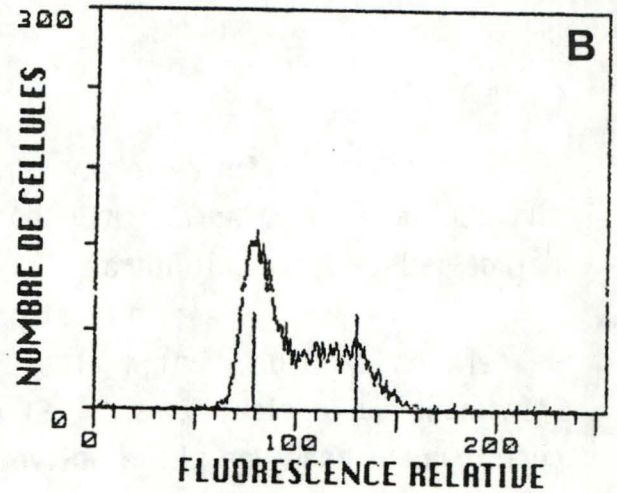
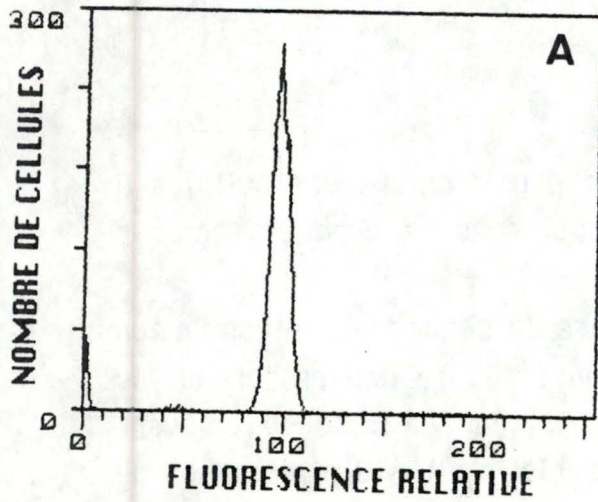
Il n'est en effet pas illusoire de penser qu'une population de cellules dans un certain état d'activation présente une proportion de spécimens qui cyclent *in situ*. Si c'est le cas, ces cellules se trouvent certainement dans une phase active de leur cycle, c'est-à-dire en phase de préparation à la synthèse (G1), en phase de synthèse proprement dite (S), en phase pré-mitotique (G2) ou en mitose (M). Ces différentes phases étant caractérisées par un contenu cellulaire en DNA différent ($2n$ pour G1, 2 à $4n$ pour S et $4n$ pour G2 et la mitose), nous nous sommes donc attachés à étudier la quantité de DNA interne.

La technique utilisée (Greimers, 1990) permet la détection du DNA en immunofluorescence. Ce procédé requiert néanmoins un traitement préalable des cellules. Celles-ci sont en effet perméabilisées par de l'éthanol afin de permettre l'entrée d'un composé fluorescent (iodure de propidium) et sa fixation entre les bases des acides nucléiques. Afin d'éviter une liaison de cette substance avec le RNA et donc une détection impromptue de celui-ci en immunofluorescence, une solution de HCl (dénaturante pour le RNA) est utilisée. L'analyse de ce marquage fait appel à la cytométrie de flux.

2.1. Mise au point.

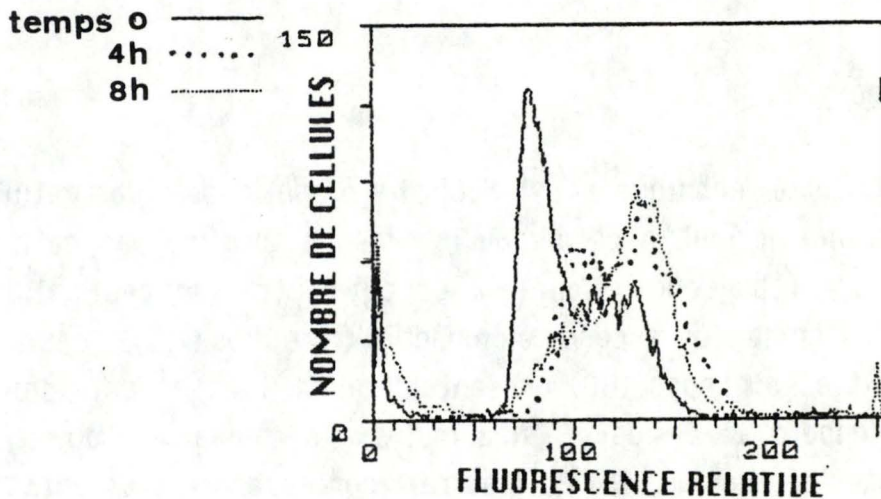
Cette technique a tout d'abord été appliquée à des cellules provenant d'un animal normal. A ce niveau la presque totalité des cellules sanguines se trouvent au repos. L'analyse en cytométrie de ces cellules révèle une distribution de fluorescence en monopic (**Graph 14a**). Comme la majorité des cellules au repos (G_0) présentent un DNA $2n$, il est logique d'attribuer le monopic à celles-ci. Néanmoins, la phase G1 du cycle (également caractérisée par un DNA $2n$) pourrait correspondre tout autant à cette répartition.

Si nous considérons maintenant la répartition de cellules actives ayant subi le même traitement (cellules de la lignée MLA-144), le



Graph 14 : Marquage en immunofluorescence du DNA par l'iodure de propidium. La courbe représente le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence relative.

- a). Cellules provenant de l'animal normal
- b). Cellules de la lignée MLA-144.



Graph 15 : Marquage du DNA de cellules de la lignées MLA-144 mises en présence de colchicine soit 4 heures, soit 8 heures.

RESULTATS

schéma est un peu différent (**Graphe 14b**). Certes, un pic important est toujours bien individualisé, mais nous pouvons remarquer la présence d'un autre pic cellulaire situé au niveau d'un canal de fluorescence correspondant au double du premier pic. Cela laisse présager qu'une proportion importante de cellules comportent un DNA $4n$. De plus, certaines cellules semblent émettre une fluorescence intermédiaire, signe de la phase de synthèse ou d'une aneuploïdie (phénomène peu probable pour une lignée établie).

Par ailleurs, afin de vérifier l'origine du second pic, nous avons mis en oeuvre un test permettant de bloquer ces cellules en phase M. Celles-ci ont en effet été incubées en présence de colchicine (à $0,01 \mu\text{gr/ml}$), puissant bloqueur des cellules en mitose. Après traitement à l'éthanol et à l'acide chlorhydrique et marquage à l'iodure de propidium, les résultats obtenus ont été comparés au test précédent (**Graphe 15**). Après 4 heures d'incubation, plus de la moitié des cellules sont déjà arrivées au niveau du second pic, bien que l'on remarque un glissement du premier. Des cellules traitées 8 heures avec de la colchicine font en majorité partie intégrante du second pic. Vu l'accumulation de cellules à ce niveau, les phases G2 et M (indistinguables à la lumière de cette quantification de DNA) semblent donc représentées par le second pic.

Bien que cette méthode permet d'individualiser la proportion de cellules comportant $2n$ et $4n$ chromosomes, elle ne peut faire la distinction entre G0 et G1 ni entre G2 et M. Etant donné que ce procédé de marquage du DNA nous indique si les cellules se multiplient *in situ* et nous donne donc des renseignements sur leur état d'activation, nous aborderons l'étude des animaux leucosiques à l'aide de cette technique. Néanmoins, il existe certaines méthodes de coloration de DNA et de RNA par des composés fluorescents (Darzynkiewicz et al., 1976 et 1977) permettant d'envisager chaque phase du cycle séparément.

Un dernier doute reste permis en ce qui concerne la phase S. En effet, cette étape se situant entre G0/G1 et G2/M, certaines cellules en phase de synthèse sont comptabilisées soit en G0/G1 soit en G2/M. Un modèle polynomial (cfr. Matériels et méthodes, 3.2.1.b) résoud en partie le problème. Bien que fort stéréotypé, il tient compte de l'éventualité d'avoir des cellules en synthèse reprises dans l'un des deux pics.

2.2. Application de la technique aux cellules circulantes d'animaux leucosiques.

Nous nous sommes penchés sur la répartition cellulaire de quatre animaux leucosiques que nous avons comparée à la distribution de cellules provenant d'un animal normal (**Graphes 16**). Très peu de cellules sanguines normales cyclent *in situ*. Il est donc logique de constater qu'une infime quantité de cellules se trouvent en phase G2/M (<1%). S'il paraît en exister 2% en synthèse, il ne faut pas perdre de vue que notre modèle polynômial tient compte de la possibilité que des cellules en synthèse soient comptabilisées en phase G0/G1 au préalable (mais non de leur présence effective).

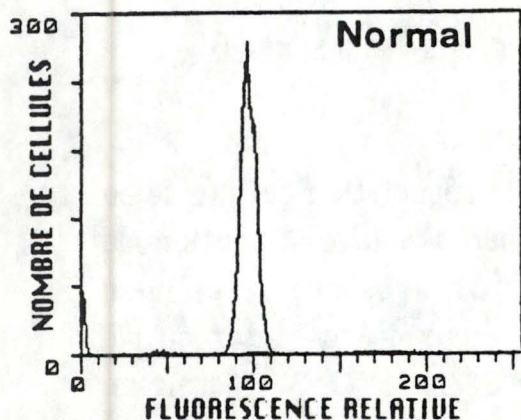
En examinant la distribution de l'animal 71, nous remarquons une légère augmentation du nombre de cellules tant en phase S (4%) qu'en G2/M (2%). Cet animal infecté au BLV, bien que n'étant pas en lymphocytose, présente donc une légère perturbation physiologique de certaines de ces cellules.

Par contre, l'étude d'animaux en forte lymphocytose (76, 77 et 163) montre des variations beaucoup plus drastiques : allant de 5% (pour G2/M) et 7% (pour S) jusqu'à des maximum de 10% pour chacune des deux phases.

La lymphocytose paraît donc bien corrélée à des modifications physiologiques de cellules sanguines.

Malgré ces résultats encourageants, plusieurs problèmes inhérents à ce test restent à régler. Tout d'abord, la méthode de préparation des cellules en vue du marquage à l'iodure de propidium (I.P.) comporte une étape délicate (le traitement à l'éthanol) où la formation d'agrégats n'est pas à exclure. Lors de leur détection en cytométrie de flux, ces formations cellulaires engendreraient une image représentant des pics d'intensité de fluorescence plus élevée que la normale. Par exemple, si deux cellules étaient collées, elles émettraient une fluorescence double.

Dans cette optique, il est possible que les cellules G2/M constituent un artefact. Ceci semble néanmoins peu probable. En effet, il est difficile d'expliquer pourquoi les cellules normales ne forment pas d'agrégats. De plus, l'étude biparamétrique (fluorescence due à l'I.P. en



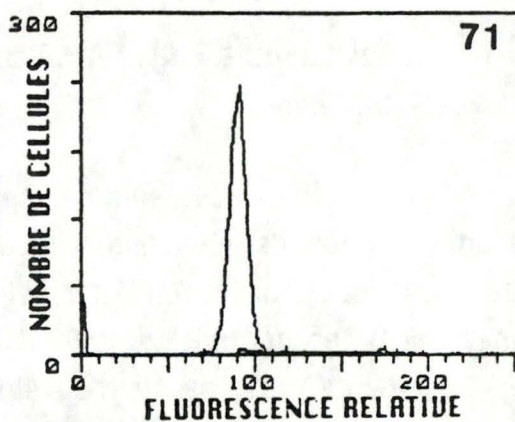
62M/61 Ratio: 1.92

61 Phase Statistics

Mean : 97.1
CV : 4.1 %

Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	2772	98
S	51	2
G2M	11	0
Total:	2834	100



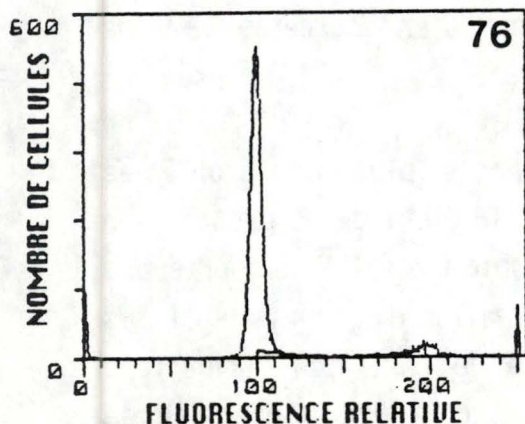
62M/61 Ratio: 1.91

61 Phase Statistics

Mean : 90.5
CV : 5.3 %

Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	2693	94
S	128	4
G2M	48	2
Total:	2869	100



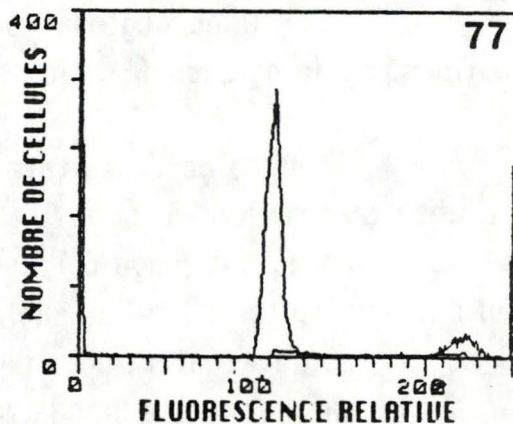
62M/61 Ratio: 1.98

61 Phase Statistics

Mean : 99.7
CV : 3.1 %

Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	3987	86
S	443	10
G2M	233	5
Total:	4663	100



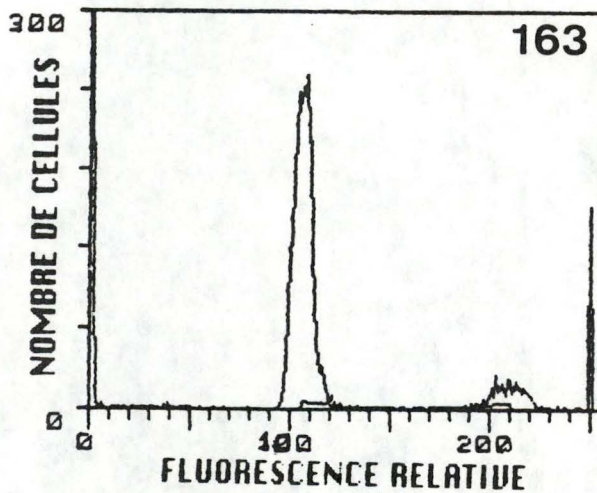
62M/61 Ratio: 1.99

61 Phase Statistics

Mean : 111.9
CV : 3.7 %

Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1	2964	82
S	264	7
G2M	377	10
Total:	3605	100



G2M/G1 Ratio: 1.98

G1 Phase Statistics

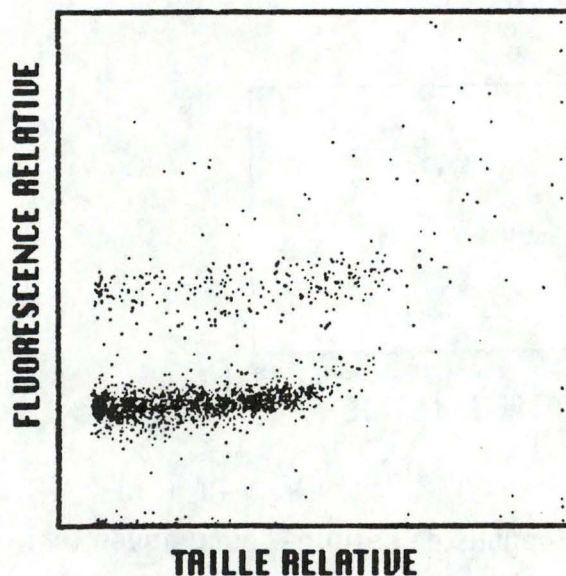
Mean : 106.2

CV : 4.1 %

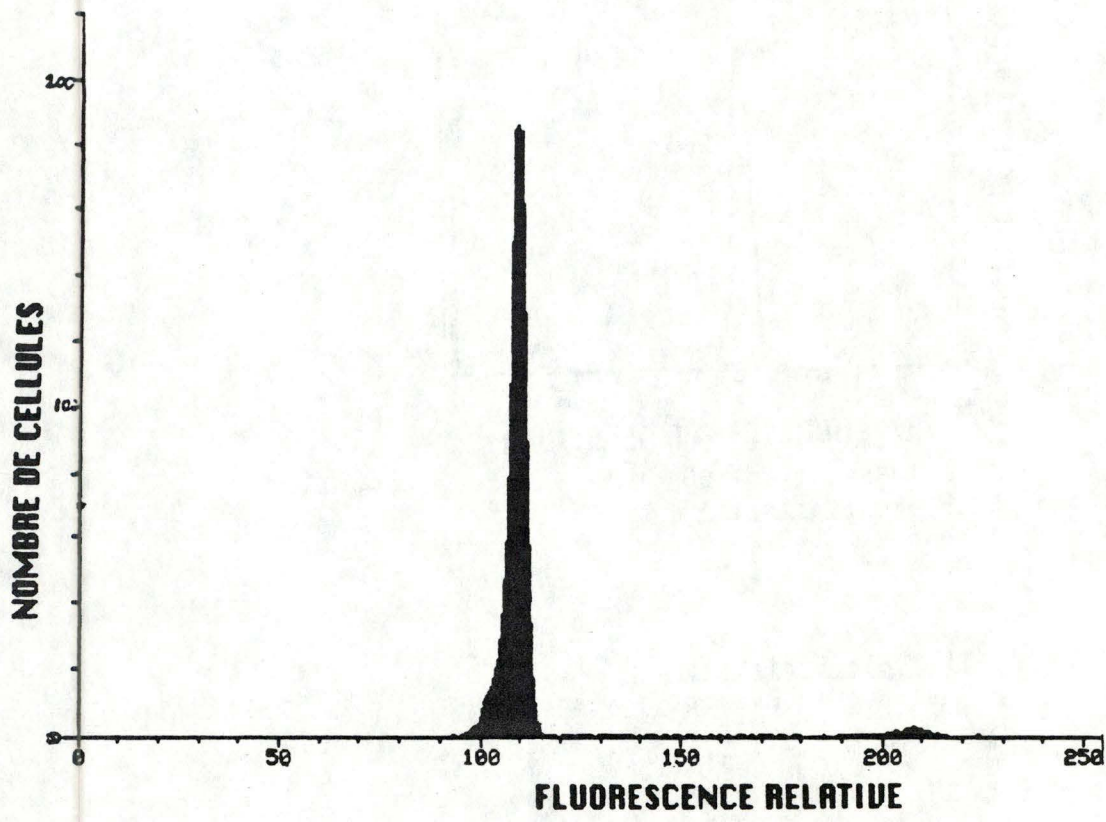
Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent
G1 :	2690	83
S :	211	7
G2M :	333	10
Total:	3234	100

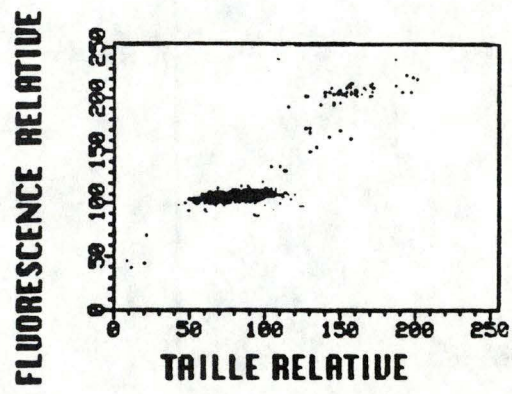
Graph 16 : Comparaison du marquage de DNA de cellules provenant de différents animaux (normaux ou leucosiques) et cela, après analyse par le modèle polynomial.



Graph 17 : Répartition de cellules leucosiques (animal 163) suivant la taille et la fluorescence résultant du marquage de DNA à l'iodure de propidium.



Graph 18 : Répartition des noyaux des cellules leucosiques (animal 163) suivant la fluorescence résultant du marquage de DNA à l'iodure de propidium.



Graph 19 : Répartition des noyaux de cellules leucosiques (animal 163) suivant la taille et la fluorescence résultant du marquage de DNA à l'iodure de propidium.

fonction de la taille) nous apprend qu'il n'existe pas de différences de taille notoires entre les cellules des populations en G0/G1 et G2/M (**Graphe 17**).

Si les cellules analysées ne sont pas agencées en agrégats, une double intensité de fluorescence (DNA 4n) pourrait être la conséquence de cellules binucléées (à ne pas négliger car il s'agit de cellules "leucémiques"). Nous avons donc réalisé un test capable de vérifier cette hypothèse.

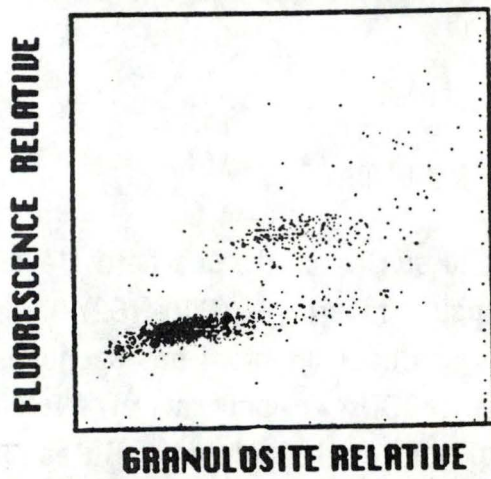
Il s'agit en fait d'extraire les noyaux (sans les altérer) de la cellule, de les marquer à l'I.P. et de les analyser en cytométrie de flux. Ce procédé a été appliqué chez un animal leucosique (163). Le diagramme obtenu (**Graphe 18**) présente des résultats analogues à ceux obtenus avec des préparations cellulaires, à savoir deux pools nucléaires bien individualisés. Le pic G2/M n'est donc pas la conséquence directe de cellules binucléées, ce phénomène étant par ailleurs tout aussi anormal que des cellules cyclantes au niveau du sang. De plus, ce processus met également en exergue une taille plus importante pour les noyaux G2/M (ne paraissant pas lors d'études de préparation cellulaire)(**Graphe 19**).

La population cellulaire sanguine (isolée sur "Ficoll") d'un animal leucosique en forte lymphocytose est donc constituée d'une majorité de cellules 2n (phase G0/G1), mais aussi d'une partie non négligeable de cellules en synthèse ou en phase G2/M du cycle. La nature de ces cellules "activées" peut être multiple puisque la préparation contient à la fois des lymphocytes B, des lymphocytes T et des monocytes. En effet, bien que la lymphocytose des cellules B soit un facteur généralement admis comme symptôme de la leucose bovine (Portetelle, 1990), il n'est pas impossible que d'autres cellules interviennent activement dans le processus de la maladie.

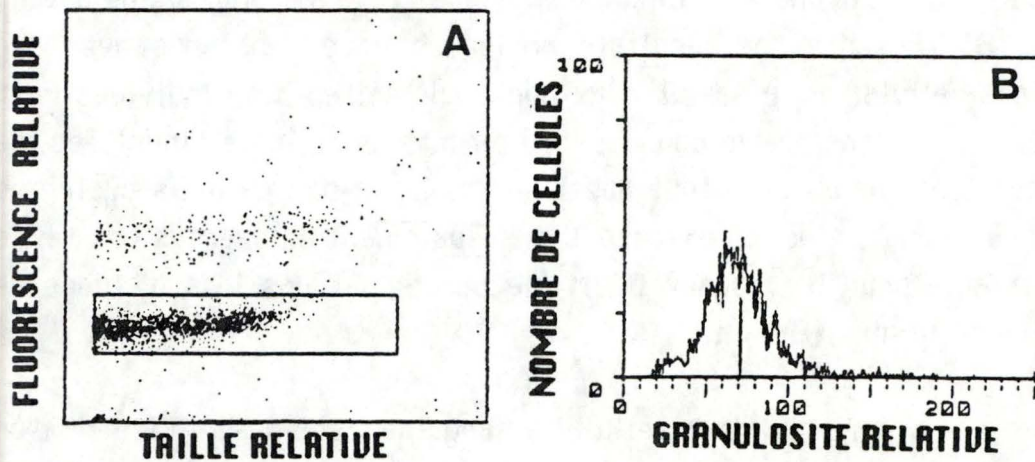
Nous avons tenté de lever le voile sur cette interrogation et d'identifier les cellules concernées par la phase G2/M. Dans cet ordre d'idée, deux paramètres ont été spécialement étudiés : la granulosité différentielle des populations en G0/G1 et G2/M et leur phénotype membranaire.

2.3. Identification des cellules en phase G2/M.

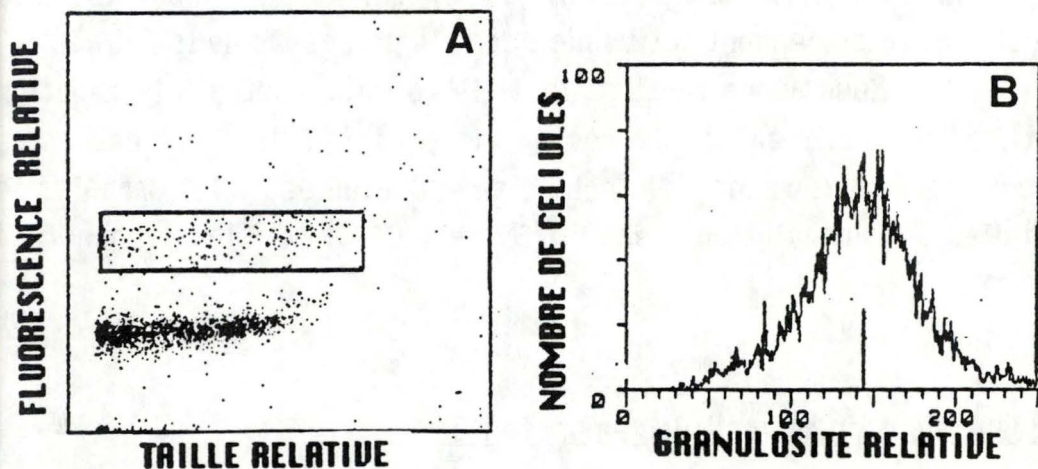
La cytométrie de flux met à notre disposition quatre paramètres : la taille, la granulosité et deux types de fluorescence. Chaque cellule peut être étudiée pour n'importe lesquels de ces paramètres pris deux



Graph 20 : Répartition des cellules leucosiques (animal 163) suivant la granulosity et la fluorescence résultant du marquage de DNA à l'iodure de propidium.



Graph 21 : Etude de la granulosity des cellules constituant la phase G0/G1.
 a). Délimitation d'une "fenêtre" entourant la population étudiée suivant ces caractéristiques de taille et de fluorescence due au marquage de DNA.
 b). Distribution des cellules G0/G1 (englobées dans la "fenêtre") en fonction de leur granulosity.



Graph 22 : Etude de la granulosity des cellules constituant la phase G2/M.
 a). Délimitation d'une "fenêtre" entourant la population étudiée suivant ces caractéristiques de taille et de fluorescence due au marquage de DNA.
 b). Distribution des cellules G2/M (englobées dans la "fenêtre") en fonction de leur granulosity.

à deux. C'est par ce biais que nous avons tenté de mieux cerner la nature des cellules en G2/M. Nous présentons ici les tests réalisés sur un animal en forte lymphocytose (163).

2.3.1. Granulosité.

Si les cellules des phases G0/G1 et G2/M ne présentent pas de différence de taille notable, il en est tout autrement au niveau de la granulosité. Le schéma global l'esquisse (**Graphe 20**), mais l'analyse séparée des deux phases rend encore mieux compte de ce phénomène.

Nous avons d'abord envisagé l'étude des cellules en phase G0/G1. Les cellules, circonscrites par une "fenêtre" précise, ont été analysées suivant la granulosité. Le graphe 21 représente la distribution cellulaire en fonction de leur granulosité. Dans ce cas, les cellules sont réparties autour d'un pic dans la granulosité moyenne vaut **71,31**.

L'examen d'une "fenêtre" englobant les cellules G2/M est ensuite envisagé (**graphe 22**). Vu la quantité moindre des cellules au niveau de cette phase, le test a été réalisé sur un plus grand échantillon total. Ceci explique pourquoi le nombre de cellules au niveau maximum du pic est plus élevé dans ce cas. Le schéma de cette population montre un glissement du pic et donc une moyenne plus grande (**144,94**). La plupart des cellules en phase G2/M semble donc plus granuleuses que les autres. A ce niveau, deux alternatives s'offrent à nous :

-soit les cellules G2/M sont des monocytes non activés (ceux-ci étant physiologiquement plus granuleux que les lymphocytes).

-soit il s'agit de cellules (lymphocytes ou monocytes) activées ayant subi un processus général de modifications physiologiques conduisant à des sécrétions intenses et/ou à un doublement de la quantité de DNA et des divers constituants cellulaire en vue d'une duplication.

Ce procédé serait à l'origine de l'augmentation de la granulosité.

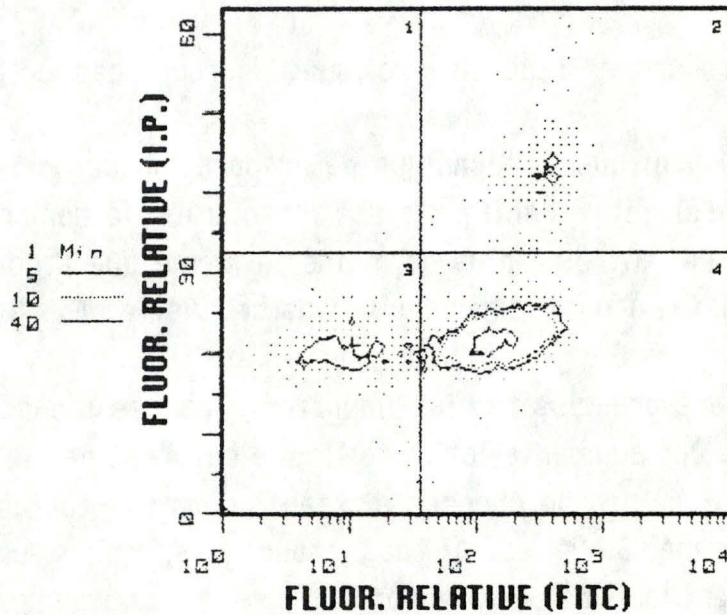
Dès maintenant, nous allons examiner ces deux solutions. A la lumière de l'analyse de granulosité, l'hypothèse des monocytes non activés est possible. Ceci nous obligerait en fait à revoir toute notre méthode menant à la séparation des populations G0/G1 et G2/M. Néanmoins, ceci est difficilement concevable.

Tout d'abord, il faudrait expliquer pourquoi ces cellules possèdent un DNA $4n$.

S'il est vrai que la technique de préparation des cellules ("Ficoll") ne permet pas d'éliminer l'entièreté des monocytes, le nombre de ces monocytes résiduels devrait être plus ou moins le même que l'individu soit normal ou leucosique. Or, nous ne trouvons pas de cellules en G2/M pour l'animal normal.

Enfin, une granulosité plus importante de ces monocytes devrait être corrélée avec une augmentation de taille, ce qui n'est pas le cas. En regard de ces explications, peu de chances existent pour que toutes les cellules considérées comme G2/M soient des monocytes, qu'ils soient impliqués ou non dans un phénomène d'activation.

Il nous reste donc la seconde hypothèse, à savoir des cellules B ou T activées. Néanmoins, l'identification précise ne peut se réaliser qu'à l'aide d'anticorps spécifiques d'antigènes membranaires de ces types cellulaires.



Parameters : FL1 FL2				Contour statistics	
				Gated events : 2875	
#	X & Y Lower	X & Y Upper	Events	% Gated	
1	1.00 33	33.40 63	1	0.03	
2	38.66 33	10000 63	254	8.83	
3	1.00 0	33.40 32	468	16.28	
4	38.66 0	10000 32	2152	74.85	

Graph 23 : Identification des cellules constitutives des phases G0/G1 et G2/M par marquages combinés du DNA et des IgM.

- a). Schéma rendant compte de la densité cellulaire associée aux deux paramètres de fluorescence (I.P. pour le DNA et FITC pour les IgM).
- b). Statistiques estimant la population de cellules IgM+ dans chaque quadrant.

RESULTATS

2.3.2. Phénotypes membranaires.

Afin de disposer d'un échantillon assez important de spécimens en G2/M, ces tests d'identification ont porté sur des populations cellulaires de trois animaux leucosiques en forte lymphocytoses (76, 77 et 163). Nous ne présentons ici que le résultat d'une seule étude (163), les autres étant ponctuées de conclusions analogues.

Les deux anticorps monoclonaux que nous avons utilisés étaient dirigés contre des antigènes membranaires de lymphocytes T (CD2) et de lymphocytes B (IgM). Ils sont nommés respectivement ILA 42 et 1H4 et sont reconnus par des anticorps secondaires couplés au FITC (cfr Matériels et Méthodes). Afin de ne perdre de vue les phases du cycle, ce marquage est réalisé en combinaison avec une détection du DNA à l'I.P.. De ce fait, les cellules subissent donc toujours un traitement à l'éthanol et au HCl. Le double marquage est analysé en cytométrie de flux et les cellules sont visualisées suivant les deux paramètres de fluorescence sur un graphe reflétant la densité de cellules associée à ces deux types de fluorescences.

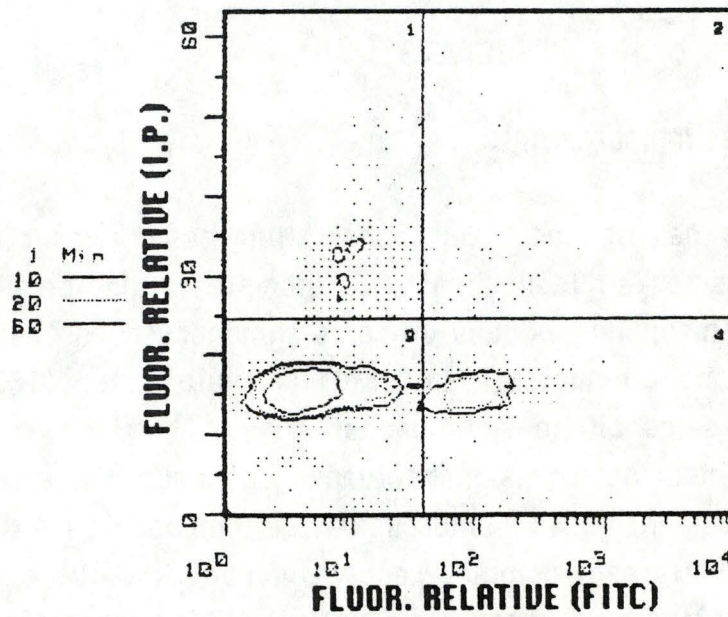
Ce diagramme permet l'identification de diverses populations parmi quatre quadrants, délimités après l'analyse de témoins négatifs (marquage à l'I.P. sans FITC et marquage FITC sans incorporation d'I.P.). Le quadrant n°1 est constitué de cellules en phase G2/M (double quantité de DNA fixé par l'I.P.) qui ne sont pas détectées par l'anticorps monoclonal, le n°2 de cellules en phase G2/M marquées par le monoclonal, le n°3 de cellules en phase G0/G1 non marquées en FITC et le dernier de cellules G0/G1 détectées par le monoclonal.

Ces différentes mises au point didactiques étant faites, nous pouvons maintenant aborder les tests réalisés.

a). Détection des cellules B exprimant des IgM (**graphe 23**).

Le marquage du DNA à l'I.P. propose toujours deux pools cellulaires bien individualisés. Comme l'étude du phénotype global de l'animal 163 l'avait montré, le pourcentage de cellules comportant des IgM (quadrants n°2 et 4) est très élevé (plus de 80%). Examinons maintenant les populations de chaque quadrant séparément.

Vu l'absence presque totale de cellules dans le quadrant n°1, on peut logiquement penser que la majorité des cellules en phase G2/M



Parameters : FL1 FL2 Contour statistics
 Gated events : 9349

#	X & Y Lower	X & Y Upper	Events	% Gated
1	1.00 25	33.40 63	583	6.24
2	38.66 25	10000 63	52	0.56
3	1.00 0	33.40 24	7432	79.50
4	38.66 0	10000 24	1282	13.71

Graph 24 : Identification des cellules constitutives des phases G0/G1 et G2/M par marquages combinés du DNA et du CD2.

- a). Schéma rendant compte de la densité cellulaire associée aux deux paramètres de fluorescence (I.P. pour le DNA et FITC pour le CD2).
- b). Statistiques estimant la proportion de cellules dans chaque quadrant.

RESULTATS

sont IgM⁺. Ceci confirme par ailleurs que l'hypothèse suggérant la présence exclusive des monocytes au sein de cette population n'entre plus en ligne de compte. Le reste de cellules IgM⁺ se situe donc en phase G0/G1. A ce stade, deux réflexions s'imposent. D'une part, nous savons maintenant que la plupart des cellules 4n sont des cellules B. D'autre part, il existe au moins 90% de ces lymphocytes B IgM⁺ (nombre de cellules IgM⁺ en G0/G1 / nombre total de cellules IgM⁺) ne se trouvant pas en phase G2/M. Toutes ces cellules ne sont donc pas au même niveau du cycle cellulaire.

Le dernier quadrant (n°3) ne nous renseigne pas outre mesure. En effet, si 16% des cellules ne comportent pas d'IgM et se trouvent en phase G0/G1, la constitution de cette zone peut être très hétérogène. Nous avons en effet la possibilité d'y retrouver des monocytes des lymphocytes T et des lymphocytes B exprimant d'autres isotypes d'immunoglobulines (bien que le phénotype nous indique que la majorité des lymphocytes B portent des IgM).

Il est également intéressant de se souvenir qu'un animal en forte lymphocytose ne possède que 15 à 20% de lymphocytes T. Il est donc possible que cette faible proportion empêche la mise en évidence de cellules T. Dans cet ordre d'idée, plus le nombre de cellules analysées est élevé, plus nous avons de chance de détecter les quelques spécimens constituant le pool T. Le test de détection de ce type de cellules s'est donc effectué sur un échantillon plus important (10.000 cellules contre 3000 pour le marquage anti-IgM).

b). Détection des cellules T. (graphe 24).

Dans ce cas, l'anticorps monoclonal reconnu en indirect par des anticorps couplés au FITC est spécifique d'un marqueur ubiquiste des cellules T (CD2). Les quadrants n°2 et 4 représentent donc l'ensemble des cellules T présentes, à savoir 14% du total de l'échantillon. Vu le degré de lymphocytose de l'animal 163, ce résultat est logique. De plus, il confirme les études phénotypiques.

L'examen des quadrants nous révèle que la majorité des cellules sont en phase G0/G1. Mais, contrairement à ce que le test précédent aurait pu nous faire croire, nous remarquons la présence de quelques cellules T en G2/M. Les lymphocytes B n'ont donc pas l'exclusivité de cette phase.

RESULTATS

Les quadrants n°1 et 3 confirment les résultats des marquages des IgM. Certes, le pourcentage de cellules B IgM⁺ en G2/M (10% du total des lymphocytes B IgM⁺) est beaucoup plus important que pour les cellules T (3% du total des cellules T), mais rien ne prouve que certaines cellules T ne soient pas impliquées dans un phénomène d'activation consécutif à l'infection par le BLV, comme cela semble le cas pour les lymphocytes B.

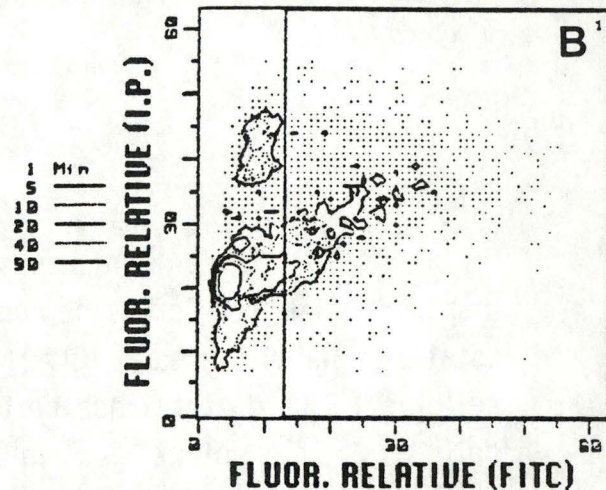
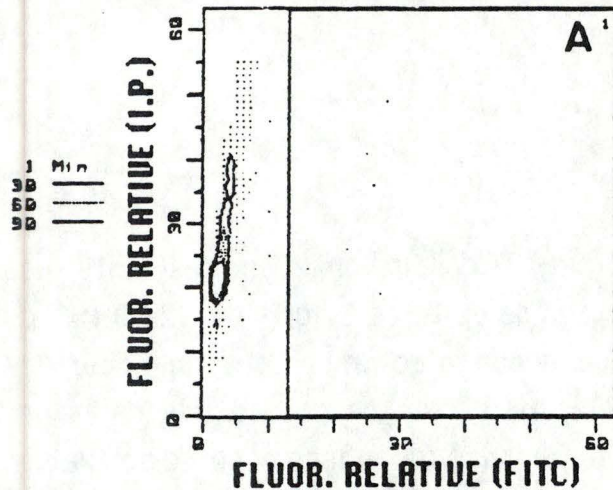
Par souci de clarté et vu la lourdeur du calcul statistique mettant en évidence la phase S, celle-ci n'a pas été abordée précédemment. Maintenant que nous avons mieux caractérisé les étapes G0/G1 et G2/M, il nous faut revenir à cette phase intermédiaire du cycle cellulaire.

2.4. Estimation de la phase de synthèse.

Comme nous venons de l'indiquer, la constitution de la phase S est quantifiable par une procédure mathématique très rigide, ne tenant pas totalement compte de la variabilité individuelle. Néanmoins un autre moyen de détection peut être envisagé. Celui-ci fait appel à un analogue de la thymidine, la bromodéoxyuridine (BrdU). Cette molécule est incorporée par les cellules actives après mises en culture à 37°C.. Après incubation, les cellules sont marquées avec un anticorps monoclonal anti-BrdU (détecté par des anticorps secondaires fluorescents) et analysée en cytométrie de flux. Afin de garder sous contrôle l'image des phases G0/G1 et G2/M, nous réalisons un traitement à l'I.P. en combinaison avec ce marquage anti-BrdU.

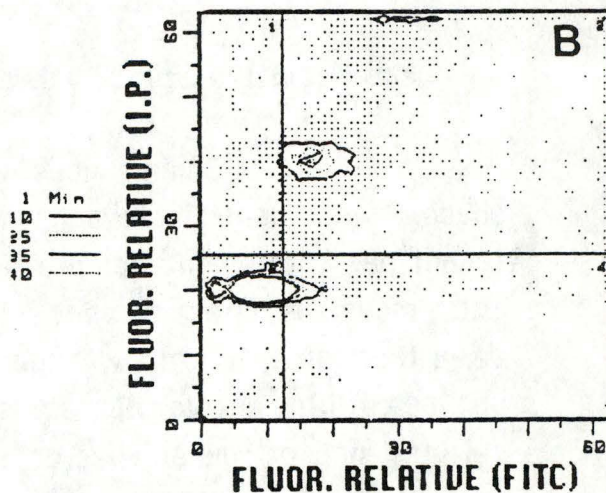
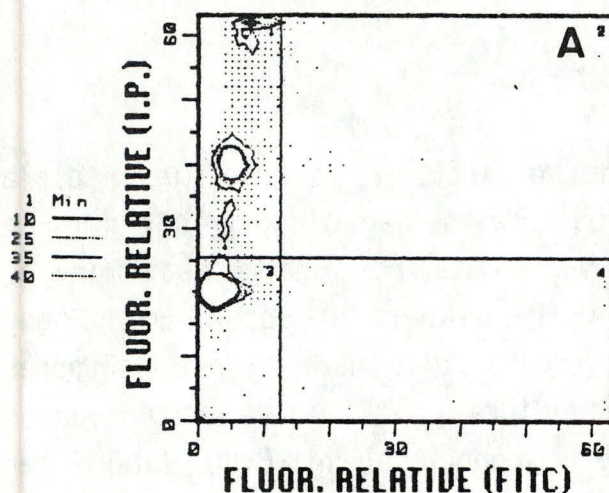
Avant tout, une mise au point est nécessaire afin de vérifier la possibilité de mise en oeuvre de cette technique et de déterminer un temps d'incubation pour lequel nous pouvons détecter la présence de cellules en synthèse. A cette fin, des cellules de la lignée MLA-144 (actives naturellement) ont été incubées dans un milieu de culture complété de BrdU 10 μ M. Après deux heures, elles sont récupérées et traitées en vue d'un marquage à l'I.P. avant d'être mises en présence d'anti-BrdU et des anticorps secondaires fluorescents (SAM-FITC).

Les graphes résultant de l'analyse cytométrique représentent la densité cellulaire associée aux deux paramètres (I.P.-anti-BrdU) simultanément. Si nous comparons la répartition des cellules marquées à



Grphe 25 : Mise au point sur cellules MLA-144 d'un test de détection de la phase de synthèse par marquage de la BrdU préalablement incorporée.

- a).Témoin négatif : Marquage du DNA de cellules non traitées à l'anti-BrdU.
- b).Schéma rendant compte de la densité cellulaire associée aux deux paramètres de fluorescence (I.P. pour le DNA et FITC pour l'anti-BrdU).



#	X & Y		Events	% Gated
	Lower	Upper		
1	0 26	12 63	278	2.78
2	13 26	63 63	2542	25.42
3	0 0	12 25	6372	63.72
4	13 0	63 25	808	8.08

Grphe 26 : Estimation de la proportion de cellules en phase de synthèse chez l'animal 163.

- a).Témoin négatif : Marquage du DNA de cellules non traitées à l'anti-BrdU.
- b).Schéma rendant compte de la densité cellulaire associée aux deux paramètres de fluorescence (I.P. pour le DNA et FITC pour l'anti-BrdU).
- c).Statistiques estimant la population cellulaire dans chaque quadrant

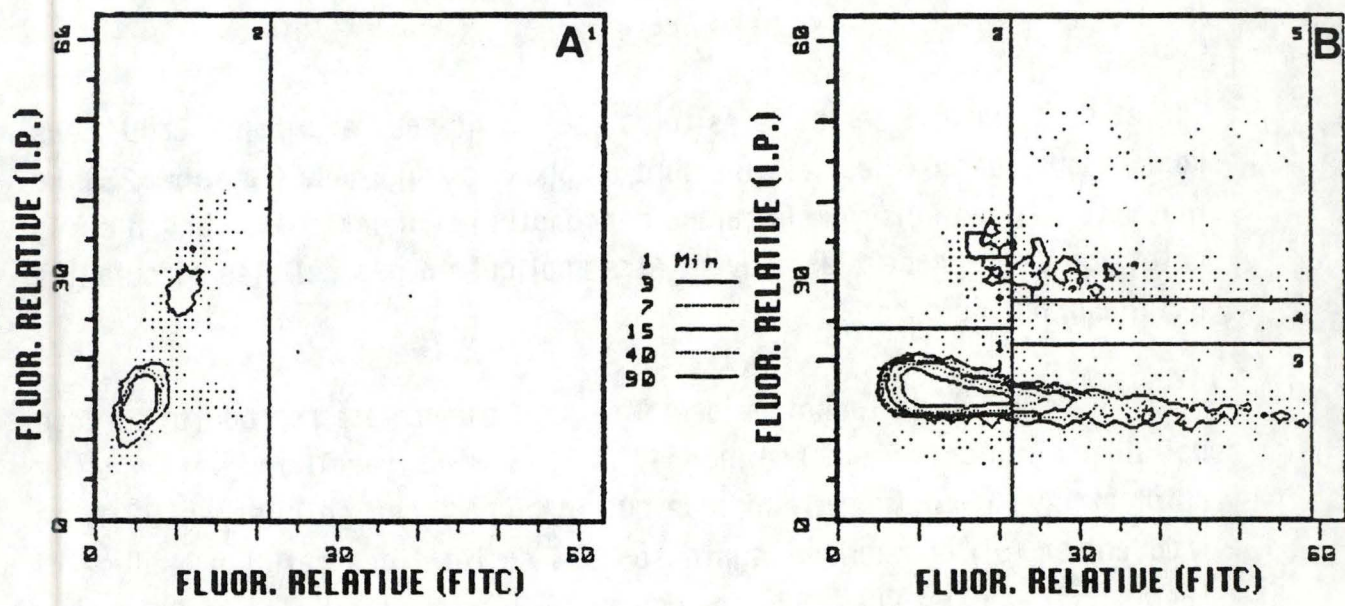
RESULTATS

l'IP et l'anti-BrdU à des cellules témoins n'ayant pas reçu d'anti-BrdU, nous remarquons que 28% des cellules sont en phase de synthèse (**Grphe 25**). La méthode utilisée ainsi que le temps d'incubation semblent donc convenir à la détection de la phase S et peuvent être appliqués à des cellules circulantes d'animaux leucosiques.

La technique décrite a tout d'abord été reproduite sur des cellules circulantes de l'animal 163. Le graphe résultant de l'analyse cytométrique (**Grphe 26**) indique que la plupart des cellules en G2/M se trouvent en fait en phase de synthèse (25% du total des cellules analysées) tandis qu'il en existe peu (2%) en véritable G2/M (quadrant n° 1 et 2). Notons que dans les 25% sont englobés les quelques spécimens étant en synthèse, mais pas en G2/M. Une très faible proportion (quadrant n°4) de cellules en G0/G1 est apparemment en phase S. Ces 8% détectés ne sont peut-être que la conséquence du glissement général des différentes populations vers une intensité de fluorescence FITC plus élevée.

Ce résultat est donc loin de reproduire l'image des cellules de la lignée MLA-144. De plus, si 25% des cellules sont en phase de synthèse, il est difficilement admissible qu'il n'en existe que peu en G2/M effectif. Comme les cellules ont été mises en culture, il est aussi possible que les cellules initialement en G2/M réapparaissent en G0/G1 après 2 heures. Néanmoins, la proportion de G0/G1 n'augmente pas après cette incubation (comparée au valeur que nous avons en 2.2.). De plus, comment expliquer que, parmi toutes les cellules en G0/G1, très peu soient en synthèse même après deux heures de culture? Ces tests ne nous comblant pas, nous nous sommes attachés à l'étude d'un autre animal en forte lymphocytose (76).

Le graphe obtenu (**27**) après double marquage paraît plus conforme à notre attente. En effet, si nous remarquons toujours un glissement des divers pools cellulaires par rapport au témoin, le marquage des cellules en synthèse est beaucoup mieux visualisé. Les quadrants n°1 et 2 donnent à présent une idée plus représentative des phases G0/G1 et G2/M. Elles représentent respectivement 80% et 2% du total. Nous remarquons encore que, bien qu'en phase S, 13% des cellules n'ont pas encore assez dupliqué leur DNA pour qu'une détection à l'IP. ne laisse présager leur présence en phase de synthèse (quadrant n°3). De même, 3% des cellules ont un DNA 4n, mais semblent toujours en train de composer leur matériel génétique. La moitié des cellules en phase G2/M serait en effet constituée de



#	X & Y Lower	X & Y Upper	Events	% Gated	C
1	0 0	21 24	7363	80.51	
2	0 25	21 62	186	2.03	
3	22 0	59 21	1216	13.30	
4	22 27	59 28	82	0.90	
5	22 28	59 62	324	3.54	

Graph 27 : Estimation de la proportion de cellules en phase de synthèse chez l'animal 76.

- a).Témoin négatif : Marquage du DNA de cellules non traitées à l'anti-BrdU.
- b).Schéma rendant compte de la densité cellulaire associée aux deux paramètres de fluorescence (I.P. pour le DNA et FITC pour l'anti-BrdU).
- c).Statistiques estimant la population cellulaire dans chaque quadrant.

ce type de cellules (quadrant n°5). Enfin, il existe très peu de spécimens en synthèse qui possèdent un DNA intermédiaire entre 2 et 4n (quadrant n°4).

Ces résultats, bien qu'exprimant avec plus de précision les étapes G0/G1, S et G2/M, doivent néanmoins être considérés avec quelques réserves. D'une part, les pourcentages obtenus sont la conséquence d'une barrière subjectivement établie à partir de témoin négatif (cellules sans anti-BrdU) et sont influencés par le glissement des populations (peut-être dû à un marquage non spécifique). Il ne s'agit pas ici de pools bien individualisés à propos desquels aucune équivoque ne serait possible. Bien que l'on distingue la présence de cellules en synthèse il est difficile d'en connaître la proportion exacte dans chaque quadrant.

D'autre part, les résultats présentent de grandes différences dans les deux cas envisagés (bien que les deux animaux soient en forte lymphocytose). Dans ce cas, plusieurs possibilités existent. Tout d'abord, les cellules conservées sous azote liquide pourraient subir des dommages importants lors de la congélation ou de la décongélation, ceci les rendant plus ou moins sensibles au BrdU. Ensuite, la variabilité individuelle pourrait être responsable d'une réaction différentielle au BrdU.

De toute manière, il est certain que des cellules circulantes d'animaux en lymphocytose font partie intégrante de la phase S et sont masquées par l'analyse statistique et le modèle polynômial. Dans cet ordre d'idée, les techniques d'incorporation et de marquage du BrdU semblent en mesure de nous venir en aide. Le sang d'autres animaux leucosiques doivent donc être testés afin de répondre le plus exactement possible à ce problème. De plus, comme la congélation risque d'être une source de difficultés, une étude de cellules fraîches paraît s'imposer.

2.5. Estimation des cellules en mitose par coloration histochimique.

La phase G2/M, si elle est constituée d'une proportion de cellules en phase S, en contient peut-être également quelques unes en mitose. Afin d'y voir plus clair, une coloration au May-Grunwald-Giemsa a été appliquée sur un frottis de cellules circulantes leucosiques (animal.163). Les différents composants de ce réactif permettent en effet de mieux discerner les noyaux en microscopie optique.

RESULTATS

Sur les trois frottis réalisés, nous n'avons pas pu mettre en évidence des cellules en mitose. Ceci pourrait cependant s'expliquer par la destruction de ces cellules (plus fragiles) lors de la congélation ou de la décongélation.

Ce problème pourrait être en fait réglé par l'utilisation d'une procédure de marquage en immunofluorescence et d'analyse cytométrique (Darzynkiewicz et al., 1977). Néanmoins, ce genre de méthode requiert une longue mise au point avant d'arriver une détection digne d'intérêt.

2.6. Enseignements générés par l'étude du cycle cellulaire.

L'établissement des phénotypes membranaires a confirmé les différentes perturbations du système lymphocytaire bovin consécutives à l'infection par le BLV et/ou à la lymphocytose résultante. De plus, certains indices (récepteurs des fragments Fc des Ig, récepteurs à l'IL-2, densité des IgM et des antigènes de classe II...) relevés sur quelques-unes des cellules ont orienté nos recherches vers un possible dérèglement physiologique des cellules circulantes des animaux leucosiques.

C'est dans cette optique qu'a été entreprise l'étude du cycle cellulaire. Après mise au point d'une technique *ad hoc*, nous avons été en mesure de mettre en évidence la constitution cellulaire de trois phases du cycle : G0/G1, S et G2/M. L'application de cette méthode à des cellules provenant de sang d'animaux leucosiques a révélé la présence d'une proportion importante des cellules en phases G2/M et S; cette dernière n'étant pas le véritable effet du nombre de cellules en synthèse (car issue d'un modèle mathématique rigide). Après avoir vérifié qu'il ne s'agissait pas d'artefacts (agrégats ou cellules binucléées), nous sommes en droit de penser qu'une quantité importante de cellules d'animaux leucosiques présentent des caractéristiques synonymes d'activation et donc de perturbations physiologiques du système immunitaire.

Le doute subsiste néanmoins au sujet de certaines phases. Ainsi, la phase S décrite par le modèle polynômial n'est pas totalement représentative du nombre effectif de cellules en synthèse. L'utilisation d'un analogue de la thymidine (BrdU) nous a permis de mieux cerner le problème. Certes, nous ne sommes pas encore en mesure de calculer précisément le nombre de cellules en synthèses ni d'émettre un schéma général quant à

RESULTATS

l'importance de ces cellules chez tous les animaux leucosiques, mais cette voie paraît riche en perspectives.

D'autres sources de problème proviennent des phases G0/G1 et G2/M, la procédure de marquage stoechiométrique du DNA n'étant pas en mesure de distinguer G0 de G1 ni G2 de M. Or, ceci pourrait être d'un grand intérêt en vue de confirmer l'hypothèse des cellules activées. Les cellules en G1 au lieu de G0 de même que quelques spécimens en mitose abonderaient évidemment dans ce sens. Des procédures de marquages en immunofluorescence existent en vue de distinguer ces phases, mais elles nécessitent une mise au point laborieuse. De plus, notre but initial étant d'avoir une idée générale au sujet du phénomène d'activation, il n'était pas primordial d'approfondir ce domaine.

Nous nous sommes donc efforcés de mieux définir la constitution la phase G2/M. Comme la préparation cellulaire englobe de multiples composants (lymphocytes B lymphocytes T et monocytes), il est nécessaire d'étudier plus profondément cette étape. L'analyse cytométrique des deux populations les plus importantes (G0/G1 et G2/M) nous apprend que s'il n'existe pas de variation notable de taille entre celles-ci, les cellules G2/M présentent par contre une granulosité nettement plus importante que les autres. Le pool de cellules G2/M ne reprend donc pas la totalité des caractéristiques des monocytes. Par ce fait, nous savons maintenant qu'en G2/M se situent des cellules plus granuleuses que la normale et contenant des noyaux de taille plus importante (analyse des noyaux, cfr. 2.2.). Ces caractéristiques pourraient par ailleurs être en relation avec les grandes cellules blastoïdes (représentant 3 à 10% des cellules circulantes) décrites par Fossum et al. (1988) en cas de lymphocytose. L'activation d'une cellule pouvant conduire à une production intense de nouveaux composés internes, cette hypothèse n'est pas dénuée de tout fondement.

D'autres constituants que les monocytes peuvent également faire partie du pool G2/M. Afin de mieux apprécier l'origine de ces cellules, nous avons réalisé séparément un marquage des lymphocytes B exprimant des IgM et de lymphocytes T et cela en combinaison avec une détection du DNA à l'I.P. Nous remarquons ainsi qu'il existe beaucoup de lymphocytes B IgM⁺ en G2/M, mais également que certains lymphocytes T (3% du total de ces cellules) se joignent à eux.

La perturbation physiologique n'est donc pas liée uniquement aux lymphocytes B, contrairement à ce qu'aurait pu faire croire

RESULTATS

l'étude phénotypique. Il reste maintenant à savoir de quelle manière les cellules en sont arrivées à ce stade. L'intégration du provirus pourrait être la cause de ce dérèglement, comme pour la lymphocytose d'ailleurs. Mais ce n'est pas la seule possibilité. Des cellules infectées seraient peut-être en mesure de sécréter des facteurs agissant sur elles-mêmes ou sur d'autres cellules (B ou T) en vue de les activer. Dans quelle mesure le provirus est-il la cause de ce bouleversement ? Seules des études complémentaires seront peut-être capables d'ébaucher une explication.

3. TESTS DE PROLIFERATION APPLIQUES AUX CELLULES CIRCULANTES D'ANIMAUX EN FORTE LYMPHOCYTOSE.

L'étude du cycle cellulaire de cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose nous incite à penser que certaines d'entre elles présentent quelques perturbations physiologiques (parmi lesquelles un éventuel phénomène d'activation). Ces caractéristiques ne sont pas exclusivement réservées à un type cellulaire particulier, puisque nous avons montré qu'à la fois des lymphocytes B et lymphocytes T sont concernés par ce processus.

Afin de vérifier cet état activé, nous avons tenté d'aborder le problème sous un autre angle. En effet, des cellules entrées en phase active de leur cycle devraient être plus réactives que les autres lors d'une culture à court-terme (7 jours maximum dans notre cas). C'est dans cette optique que nous avons réalisé leur mise en culture (avec présence de substances stimulantes) et une mesure de leur prolifération. De plus, la spécificité fonctionnelle de certains stimuli pourrait être en mesure de nous renseigner sur leur cycle. Les cellules choisies en vue de ce test provenaient d'un animal en très forte lymphocytose (163) pour lequel nous avons déjà mis en évidence des modifications phénotypiques et physiologiques.

La majorité des cellules répertoriées en G2/M sont constitutives du pool de cellules B (représentant par ailleurs 80% de la préparation). Il est donc logique de faire appel à des stimuli particulièrement destinés aux lymphocytes B. De plus, l'utilisation d'une technique de cytotoxicité (Ag-Ac dépendante) médiée par le système du complément est tout indiquée en vue d'une élimination des lymphocytes T et donc de l'étude plus spécifique des cellules B. Nous avons ainsi effectué le même genre de culture à court-terme avec une suspension cellulaire déplétée en lymphocytes T.

RESULTATS

3.1. Test de prolifération réalisé sur une population totale.

3.1.1 Modalités de la mise en culture.

Les cellules resuspendues à 40.10^6 /ml dans du RPMI "complet" ont été distribuées dans des micropuits à fonds plats à raison de 100 μ l/puits. Leur répartition en triplicate nous permet d'obtenir des résultats valables statistiquement et leur disposition en boîtes individuelles nous octroie la possibilité de réaliser des mesures de prolifération après 3, 5 et 7 jours (une boîte/jour).

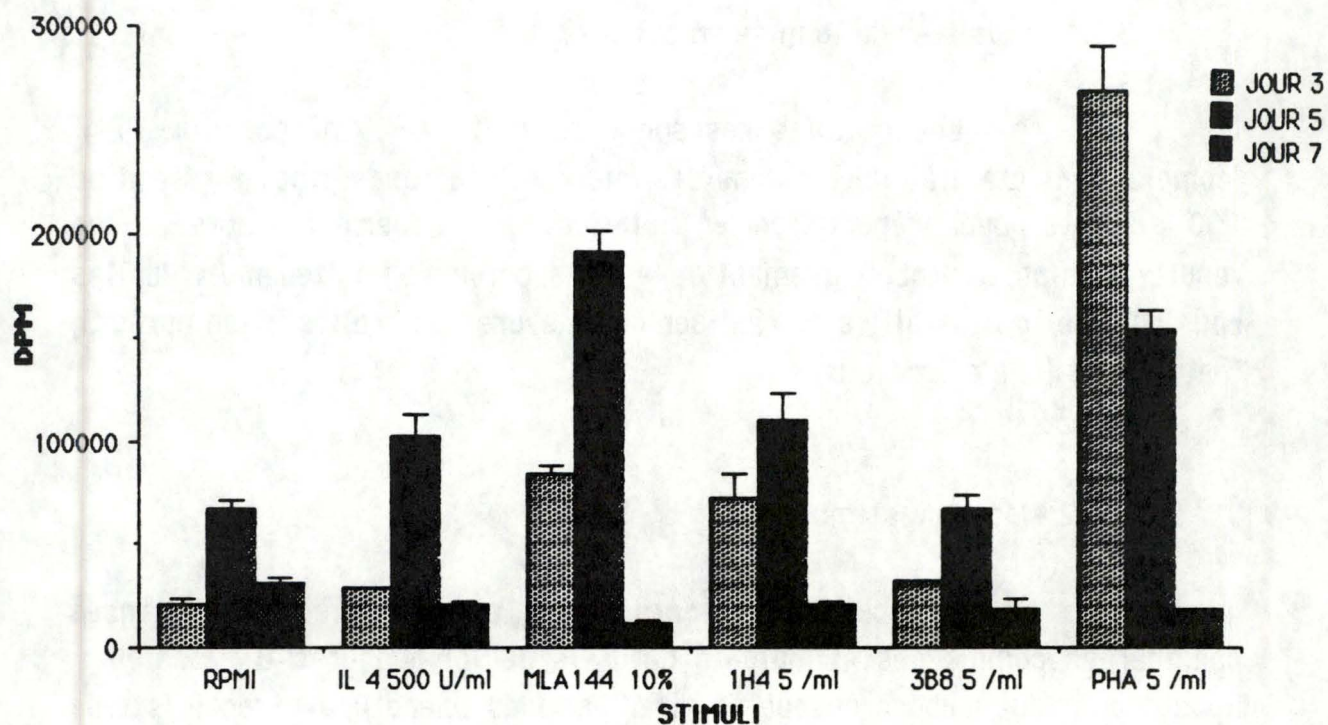
3.1.2. Modes de stimulation.

Les cellules ont été mises en présence de substances considérées comme des stimulants naturels de lymphocytes B classiques. Nous avons tout d'abord essayé de tirer parti du phénotype caractéristique des cellules leucosiques, à savoir 80% d'IgM membranaires. Ces récepteurs immunoglobuliniques sont en effet une source potentielle d'activation (cfr.1.2.1.4). Ne connaissant pas les antigènes susceptibles d'être reconnus par ces Ig, nous avons eu recours à l'utilisation d'anticorps anti-Ig de surface (1H4 contre les IgM et 3B8 contre les chaînes légères).

Une autre méthode d'activation utilise divers substances provenant des lymphocytes T (lymphokines). Ainsi, l'IL-4 agit sur les cellules B classiques en vue d'une synthèse de DNA et donc d'une entrée en phase active. L'IL-2 est quant à elle un facteur important du contrôle de la croissance des cellules B en phase G2.

Afin de confirmer la présence d'une certaine quantité de lymphocytes T, un mitogène de ces cellules (PHA, Phytohémagglutines) a été adjoint à l'ensemble de ces substances.

Les concentrations des solutions utilisées sont inspirées soit de l'expérience dont jouit le laboratoire en cette matière soit de la littérature (Freedman et al.1,1989).



Graph 28 : Mesure de prolifération (en DPM) de cellules leucosiques (animal 163) en réponse à plusieurs stimuli.

RESULTATS

3.1.3. Résultats et discussions.

Les mesures de prolifération sont permises grâce à l'incorporation à la culture de ^3H -thymidine 18 heures avant le prélèvement des cellules, le nombre de DPM (désintégrations par minute) détectés étant le reflet de la croissance cellulaire.

Le graphe 28 rend compte de la radioactivité mesurée en regard du stimulus ajouté à la culture. L'histogramme représente une moyenne calculée à partir de trois valeurs (puits en triplicate) et est surmonté de l'écart-type résultant. La capacité de chaque substance stimulante est comparée au pouvoir de prolifération de la suspension cellulaire à laquelle nous avons ajouté du RPMI minimum (sans FCS, ni indométhacine, ni mercaptoéthanol).

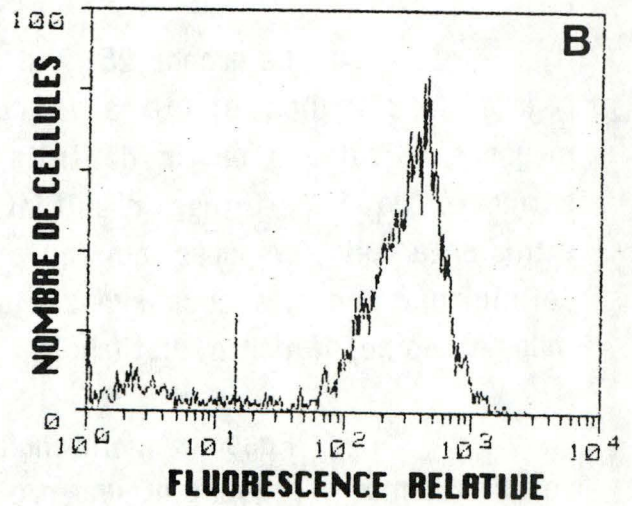
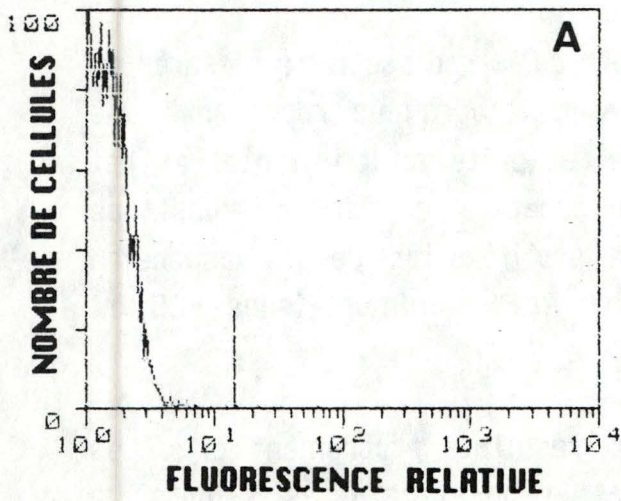
Passons maintenant aux résultats proprement dits. Les cellules-témoins présentent une prolifération maximale après 5 jours. Le déclin constaté après 7 jours peut éventuellement s'expliquer par l'épuisement du milieu en matières nutritives.

Vu la présence d'une population T (15%) et la puissance du mitogène utilisé, il est logique de remarquer une forte prolifération en réponse à la PHA. Tout en restant importante vis-à-vis du témoin, l'activité de cette lectine semble s'amenuiser au court du temps.

L'IL-4 paraît potentialiser légèrement la croissance cellulaire pendant les 5 premiers jours de la culture pour ensuite ne plus montrer de grande efficacité. Il en est tout autrement pour le surnageant MLA-144 (source d'IL-2). En effet, l'effet activateur est à ce niveau nettement marqué, que ce soit 3 ou après 5 jours.

Les deux anticorps monoclonaux utilisés présentent une évolution assez différente. Si l'anticorps anti-IgM semble jouer un rôle d'activateur après 3 et 5 jours (quoique nettement moindre que dans le cas du surnageant MLA-144), l'anti-chaînes légères n'est apparemment pas en mesure d'agir dans ce sens sur des cellules leucosiques. De plus, tout comme les autres stimulants, ces deux anticorps ne montrent plus d'activité après 7 jours.

A ce stade, ces résultats peuvent déjà susciter quelques réflexions. Tout d'abord, la présence de cellules T est effective dans la



Graphe 29 : Marquage en immunofluorescence des IgM sur des cellules leucosiques (animal 163) ayant subi une cytotoxicité dirigée contre les cellules T.

a).Témoin PBS.

b).Marquage des IgM.

RESULTATS

préparation cellulaire. Etant donné leur capacité à induire des facteurs en mesure d'interagir avec les lymphocytes B, il est difficile d'apprécier l'activité réelle de chaque substance testée. De plus, certaines cellules T (comme peut-être celles détectées en phase G2/M du cycle) ne sont pas insensibles à des lymphokines comme l'IL-2 et l'IL-4.

Cette mise en garde étant faite, les différents tests réalisés nous apprennent que certaines cellules de la préparation sont très réactives à l'IL-2 et moyennement à des anti-IgM et à l'IL-4. Les anti-chaînes légères ne semblent pas capables d'induire une prolifération des cellules leucosiques.

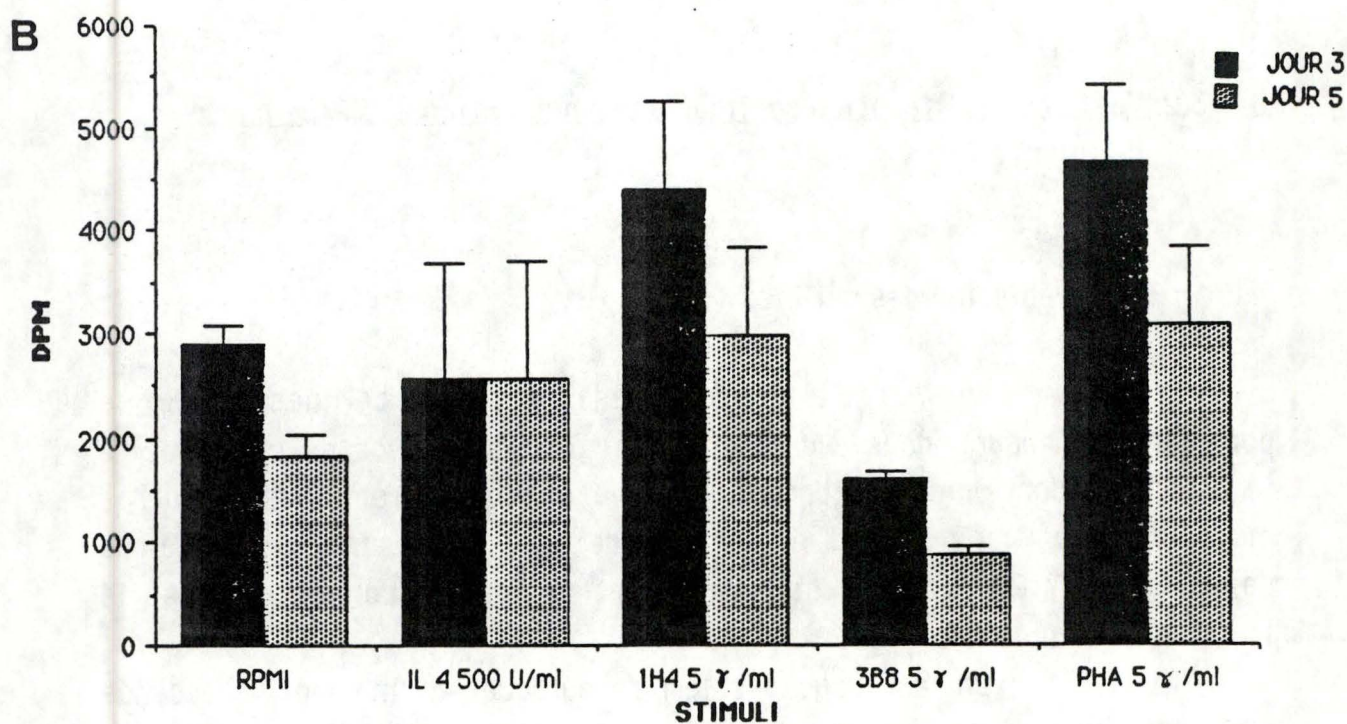
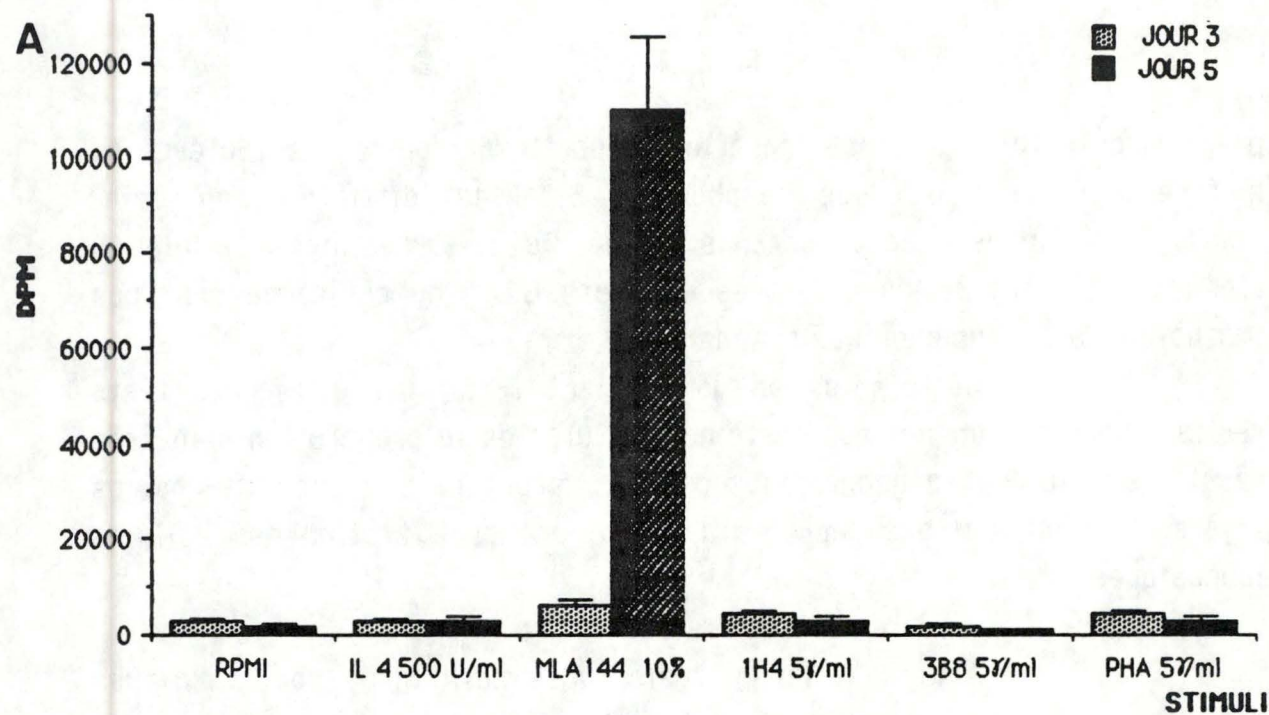
Afin de vérifier quels types cellulaires sont impliqués dans ces processus de croissance, il nous a semblé utile de dépler la population en cellules T.

3.2. Tests de prolifération appliqué à une population déplétée en cellules T.

3.2.1. Déplétion des cellules T.

En vue d'éliminer le maximum de cellules T de la population de départ, nous avons fait appel à un processus de cytotoxicité (Ag-Ac dépendante) médiée par le système du complément. Les anticorps monoclonaux utilisés étaient dirigés contre deux marqueurs membranaires des cellules T (CD2 et CD6) et exprimaient un isotype compatible avec la fixation du complément (IgG2a).

Un marquage des IgM de surface en immunofluorescence (méthode directe) réalisé après cytotoxicité montre que plus de 92% des cellules font partie de la population B (**Graph 29**). Quant aux 8% restant, une analyse de **taille** et de **granulosité** (en cytométrie de flux) indique qu'il s'agit certainement de monocytes.



Graph 30 : Mesure de la prolifération (en DPM) de cellules leucosiques (animal 163) ayant subi une cytotoxicité anti-T en réponse à plusieurs stimuli.

a).Schéma global.

b).Schéma ne tenant plus compte de la prolifération induite par le surnageant MLA-144.

RESULTATS

3.2.2. Mise en culture et modes de stimulation.

La mise en culture de la population déplétée en cellules T ainsi que les diverses substances stimulantes utilisées sont analogues à celles évoquées pour la population totale. Seul le nombre de cellules par puits (300.000) varie quelque peu du fait de l'impossibilité de prévoir précisément la quantité de cellules restant après cytotoxicité. De plus, vu la diminution très sensible de la capacité proliférative après 7 jours de culture, il ne nous a pas semblé utile de renouveler ce test. Notre investigation s'est donc limitée à l'étude de la croissance cellulaire après 3 et 5 jours.

3.2.3. Résultats et discussions.

Le pouvoir prolifératif mesuré en DPM pour chaque stimulus est comme précédemment comparé à la valeur obtenue pour des cellules en milieu RPMI minimum.

Le graphe 30a nous indique cette fois une prolifération moindre après 5 jours. Ce résultat peu en partie s'expliquer par l'utilisation du complément. Son action ne se limite pas toujours aux cellules marquées par l'anticorps. Il est en effet possible que certaines cellules soient malmenées par ce système très complexe et présente une moins grande capacité proliférative par la suite.

Lors de ces tests, notre première préoccupation est de confirmer la déplétion de cellules T. Etant donné la valeur obtenue pour la population totale en cas de stimulation à la PHA, la moyenne obtenue dans ce test (bien que plus importante que pour les cellules-témoins) nous rassure quant à l'absence quasi totale de cellules T.

Au-delà de ces importantes considérations de base, notre attention se porte surtout sur la prolifération cellulaire en réponse au surnageant MLA-144. Après 3 jours, la valeur enregistrée correspond déjà au double de notre témoin. Mais, le phénomène le plus remarquable se situe au jour 5. En effet l'histogramme correspondant indique une prolifération nettement plus élevée que pour le témoin et les autres stimuli.

Afin de mieux visualiser la radioactivité détectée suite à la présence d'autres stimuli, nous examinons un graphe (30b) ne tenant plus compte de la stimulation du surnageant MLA-144.

RESULTATS

Les cellules semblent cette fois beaucoup moins sensibles à l'IL-4. L'histogramme représentant le jour 5 ne peut véritablement prouver une activité précise de l'IL-4 vu l'importance de l'écart-type.

Les résultats provenant de l'incorporation à la culture des deux anticorps (anti-IgM et anti-chaînes légères) sont le reflet de ceux révélés par l'étude de la population totale. En comparant la radioactivité, issue de l'intégration par ces deux facteurs, aux DPM générés par la croissance des cellules en RPMI minimum, nous constatons que l'anti-IgM stimule (mais de façon moindre que la MLA-144) la population déplétée en cellules T à la fois après 3 et 5 jours. Ceci permet de supposer que les cellules B, cibles des anti-IgM, ne sont pas complètement insensibles à cet anticorps.

Par contre, les anti-chaînes légères ne paraissent pas agir positivement *in vitro* sur des cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose. Notons également que l'activité proliférative des cellules B due aux lymphokines est maximum au jour 5, ce qui n'est pas le cas pour les anti-IgM.

L'étude plus spécifique du comportement des cellules B a permis d'éclaircir certains problèmes inhérents à une culture de population totale. La cytotoxicité n'étant pas dirigée contre les monocytes résiduels, ceux-ci sont donc bien toujours présents au sein de la préparation cellulaire. Néanmoins, vu la faible quantité de ces cellules, celles-ci ne semblent pas en mesure de jouer un rôle très important. De plus, les stimuli choisis ne sont pas particulièrement opérants vis-à-vis des monocytes. Privées d'interaction éventuelles avec les cellules T (via un antigène), ces cellules ont également perdu une grande partie de leur pouvoir stimulant sur les lymphocytes B.

Avant d'aborder les renseignements générés par ces tests, il nous faut attirer l'attention sur le poids des conclusions émises après culture *in vitro*. En effet, bien qu'étant une source d'indications très importantes, cette étude ne permet que d'ébaucher une explication d'un système physiologique très complexe.

Cette mise au point étant faite, il est très intéressant de remarquer qu'une partie non négligeable de cellules B prolifère fortement en réponse à une source d'IL-2 (surnageant de MLA-144). Il est donc certain que ces lymphocytes possèdent des récepteurs à l'IL-2 et sont plus que probablement en phase active de leur cycle. Ceci confirme donc la présence des éventuels marqueurs d'activation détectés lors de l'étude phénotypique (parmi lesquels les récepteurs à l'IL-2 chez l'animal 132). De plus, la

RESULTATS

détermination des étapes du cycle des cellules leucosiques nous avait orienté vers la présence de certaines d'entre elles en phase G2/M. Or, l'intervention de l'IL-2 se situe surtout au niveau des cellules en G2/M. Les trois premiers axes de notre travail révèlent donc une certaine convergence.

Si l'IL-4 montrait une certaine activité proliférative sur la population totale, il semble que les lymphocytes B seuls réagissent moins bien face à cette lymphokine. Il est aussi possible que l'IL-4 fonctionne moins bien en présence de cellules B peut-être à cause de l'absence d'autres stimuli (provenant de lymphocytes T) ou simplement parce que l'IL-4 est inopérante sur des lymphocytes B leucosiques.

Les anticorps anti-Ig membranaires s'affichent aussi comme des facteurs susceptibles d'induire l'activation de cellules dont la principale caractéristique est la forte expression d'Ig de surface. Dans cette optique, deux anticorps anti-Ig ont été ajoutés à la culture. Le premier, dirigé contre les chaînes légères des Ig, ne paraît pas déclencher de prolifération. Cette échec pourrait s'expliquer soit par la reconnaissance par les anticorps d'un épitope non impliqué dans le processus d'activation soit par la non-transmission du signal d'activation par les Ig de surface.

Cette dernière hypothèse est néanmoins très improbable en regard de la prolifération induite par des anti-IgM. Les cellules B leucosiques ne sont donc pas insensibles à ce stimulus. Bien que cette étude s'effectue *in vitro*, nous pouvons penser que la présence physiologique des antigènes reconnus par des IgM permettrait de reproduire ce phénomène *in vivo*. Il reste cependant à connaître la spécificité des IgG membranaires et éventuellement à détecter l'antigène dans le sang circulant.

RESULTATS

4. PRODUCTION D'ANTICORPS *IN VITRO* PAR DES CELLULES D'ANIMAUX EN FORTE LYMPHOCYTOSE.

Les trois premiers volets de notre étude des cellules d'animaux en forte lymphocytose nous ont permis de mieux caractériser leur phénotype, leur état physiologique et leur comportement *in vitro*. Nous détenons maintenant des indications suggérant l'état activé d'une proportion non négligeable de cellules circulantes. Celles-ci sont en outre très sensibles à l'IL-2 et prolifèrent en réponse à cette lymphokine.

Etant donné la capacité proliférative potentielle des cellules leucosiques, il serait intéressant de savoir si celles-ci ne poursuivent pas leur maturation jusqu'à la production d'anticorps. Bien qu'il ait été montré que la quantité d'Ig sériques diminue chez les animaux infectés, il n'est pas exclu que ces cellules, une fois extraites du contexte physiologique global, soient en mesure de sécréter des Ig.

Par ailleurs, les Ly-1 B murines sont réputées pour avoir une propension à produire spontanément *in vitro* des Ig de spécificités très particulières (dirigées contre le DNA, les thymocytes ou des érythrocytes traités à la broméline)(Hayakawa et Hardy, 1988).

Par contre, chez l'homme, un stimulus (staphylocoques dorés) est nécessaire pour générer des Ig (en l'occurrence anti-DNA, anti-IgG et anti-thyroglobine)(Casali et al., 1987).

Dans cet ordre d'idée, il serait utile d'apprécier si la source d'IL-2 ne permet pas d'orienter les cellules vers la différenciation terminale (plasmocyte) et de ce fait vers une sécrétion d'anticorps.

C'est dans ce but que nous avons envisagé une mise en culture de cellules d'un animal en forte lymphocytose (163) avec ou sans incorporation de surnageant MLA-144 (source d'IL-2) dans le milieu. La détection globale des Ig se réalise par une méthode immuno-enzymatique, tandis que les anticorps monoclonaux utilisés dans ces tests permettent une détection d'isotypes particuliers (IgM et IgG¹).

RESULTATS

4.1. Modalités de la mise en culture.

Le but ultime de cette manipulation résidant en la détection d'anticorps, il nous fallait réunir les meilleures conditions possibles de culture. C'est en vertu de ce principe que la préparation cellulaire concernée n'a pas été déplétée en lymphocytes T (vu le rôle très important de l'interaction B-T dans le procédé d'élaboration des Ig).

De plus, afin d'éliminer toute trace d'Ig au sein du milieu de base, les cellules ont été resuspendues à $4 \cdot 10^6$ /ml dans un milieu RPMI sans FCS (Fetal Calf Serum). Elles ont ensuite été disposées en macropuits à raison de 1ml/puits. A cette suspension cellulaire a été ajouté soit 1 ml de milieu RPMI sans FCS, soit 1 ml de milieu contenant 10% de surnageant MLA-144 (produit dans ce cas par des cellules MLA-144 cultivées en milieu sans sérum). Enfin, la disposition des puits a été étudiée en fonction de prélèvements (de 200 μ l de surnageant) effectués après 3, 5 et 7 jours. Les aliquots sont ensuite testés en ELISA ("Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay")

4.2. Test de détection.

La technique utilisée est un test ELISA de capture (méthode indirecte), les micropuits *ad hoc* étant tapissés d'une solution d'Ig de lapin anti-Ig bovines (Rabbit anti-Bovine) et saturés à la gélatine (afin d'éviter les fixations non spécifiques et imprévisibles d'anticorps sur le plastique).

Le procédé de détection des anticorps éventuellement fixés sur le RAB fait appel à deux monoclonaux dirigés chacun contre un isotype particulier (IgM pour 1H4 et IgG₁ pour 1C8). Ceux-ci sont ensuite mis en présence d'anticorps secondaires (SAM-peroxydase). Après révélation, la densité optique (D.O.) résultante est lue à 405 nm.

Pour chacun des prélèvements, le test est réalisé en duplicate et le résultat (moyenne des deux valeurs) obtenu est comparé à la D.O. mesurée pour le témoin négatif relatif à l'anticorps monoclonal utilisé. Ces témoins rendent compte d'une éventuelle fixation non spécifique des monoclonaux ou des anticorps secondaires. Leur mise en oeuvre réunit les mêmes conditions que le dosage d'Ig, mais dans ce cas, le surnageant n'est

			Jour 3		Jour 5		Jour 7	
Stimuli	Ac.	Valeur Témoin PBS	DO mes.	DO - témoin	DO mes.	DO - témoin	DO mes.	DO - témoin
RPMI	1H4	0,080	0,107	0,027	0,105	0,025	0,100	0,080
	1C8	0,188	0,218	0,030	0,210	0,022	0,190	0,002
MLA 144	1H4	0,080	0,100	0,020	0,117	0,037	0,083	0,003
	1C8	0,188	0,291	0,103	0,228	0,040	0,203	0,015

Témoin PBS RAM : 0,020

Témoin RPMI 1H4-SAM PEROXYDASE : 0,090.

Témoin RPMI 1C8-SAM PEROXYDASE : 0,188.

Tableau XII : Détection d'Ig produites *in vitro* par des cellules d'un animal leucosique (163), stimulées ou non par le surnageant MLA144.

pas ajouté aux puits. Afin de vérifier l'absence d'Ig dans le milieu de base, un témoin RPMI (milieu en lieu et place du surnageant) a également été envisagé.

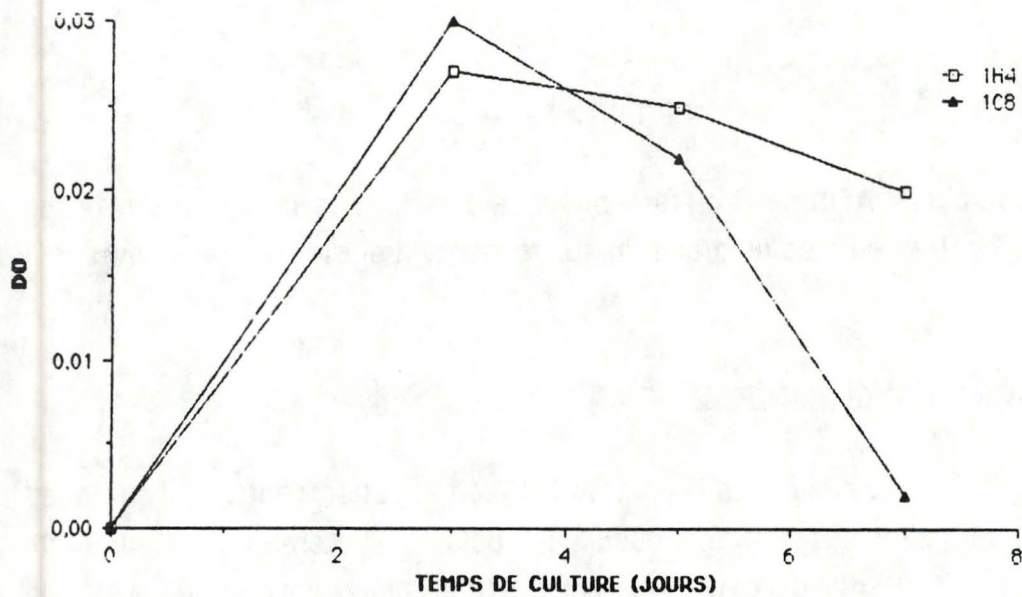
4.3. Résultats et discussions.

Les résultats repris au tableau XII suscitent déjà quelques réflexions au travers des D.O. mesurées pour les témoins (1H4-SAM-peroxydase et 1C8-SAM-peroxydase). Leur étude nous permet en fait de remarquer une certaine fixation non spécifique des anticorps monoclonaux. Cet artefact pourrait trouver son origine soit dans une saturation incomplète de la part de la gélatine, soit dans une reconnaissance non spécifique du RAB par les monoclonaux ou le SAM-peroxydase. Cette toute dernière hypothèse ne semble par ailleurs expliquer que très partiellement ce processus, vu la DO obtenue (0,020) pour le témoin "SAM-peroxydase". De toute manière, les valeurs mesurées pour les témoins seront retranchées aux valeurs-tests. Examinons maintenant les résultats de ce dosage global d'Ig.

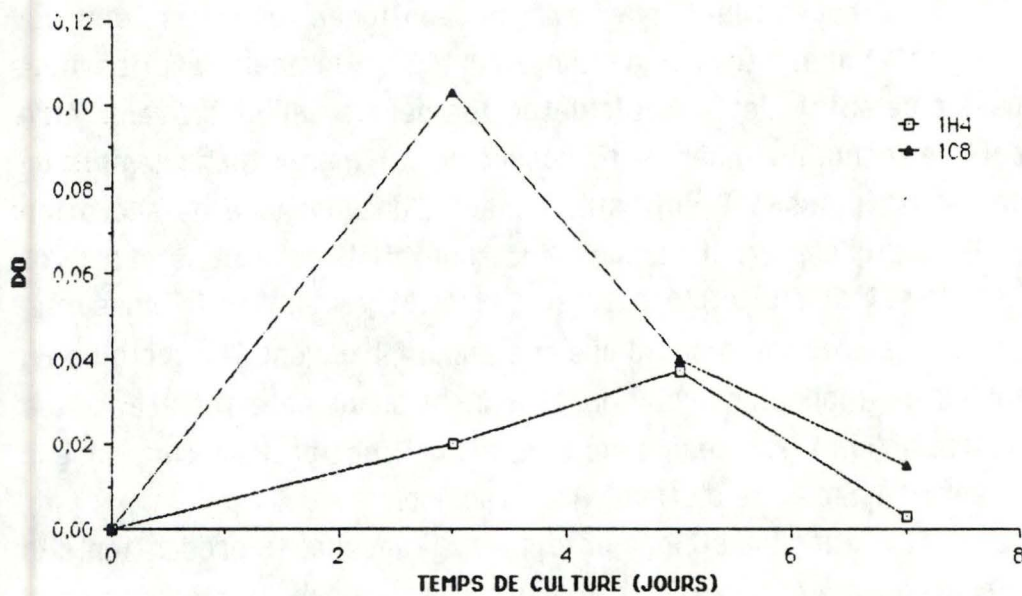
Il nous faut tout d'abord souligner que les signaux enregistrés ne sont jamais très importants (0,103). Plusieurs explications sont envisagées à ce sujet. Cette faible détection peut en effet provenir être soit d'un problème technique inhérent au dosage en lui-même (par exemple un révélateur pas assez puissant), soit simplement d'une absence de sécrétion des cellules leucosiques. Etant donné l'indisponibilité d'étalons d'IgM et d'IgG₁ purifiés, il est difficile d'apprécier quantitativement la DO mesurée. Néanmoins, il semble très improbable que ces ennuis trouvent leur origine au niveau des anticorps (monoclonaux ou pas), ceux-ci ayant en effet été testés à maintes reprises. Au niveau technique, seule l'utilisation d'un chromogène plus puissant serait en mesure d'affiner la détection.

Dans les conditions précisées ci-dessus, la production d'Ig spontanée ou provoquée *in vitro* n'est de toute manière pas énorme. Bien que des études complémentaires s'imposent, ceci nous incite à penser que les BCDS bovines n'ont pas un comportement physiologique particulièrement destiné à la synthèse d'anticorps.

Si un dosage quantitatif des anticorps dirigés contre des isotypes particuliers n'est pas réalisable dans l'état actuel des choses, l'examen de l'évolution de la production d'Ig au cours du temps pourrait peut-



Graph 31 : Cinétique de production des IgM et des IgG₁ produits *in vitro* par des cellules leucosiques (animal 163) sans stimulation.



Graph 32 : Cinétique de production des IgM et des IgG₁ produits *in vitro* par des cellules leucosiques (animal 163) stimulées par le surnageant MLA-144.

être nous renseigner quant au processus physiologique touchant les cellules en culture.

Dans un milieu minimum (**Graphe 31**), bien que la détection d'Ig soit faible., il semble qu'au jour 3, l'isotypie évaluée par les monoclonaux concerne autant les IgG₁ que les IgM. Par contre, si la quantité d'Ig mesurée diminue au cours du temps, le phénomène paraît plus prononcé pour les IgM que pour les IgG₁. Cette chute, plus ou moins rapide, pourrait éventuellement s'expliquer par un épuisement du milieu (déjà privé au départ de sérum de veau foetal).

La détection des IgM paraissant logique vu le phénotype des BCD5, il n'en est pas de même pour les IgG₁. En effet, il est très probable que peu de cellules circulantes leucosiques comportent des Ig de cet isotype en membrane (cfr. III.1.). Deux explications peuvent être avancées à ce sujet : soit les cellules à Ig membranaires sont capables de produire à dose élevée ce type d'anticorps, soit certaines BCD5 IgM⁺ ont déjà connu un remaniement génique en faveur des IgG₁.

L'incorporation de MLA-144 donne lieu à certaines modifications (**Tableau XII**). Tout d'abord, la production d'Ig semble globalement légèrement plus élevée. De plus, dans ce cas, la différence entre la synthèse d'IgG₁ et d'IgM est beaucoup mieux marquée. L'importance toute relative d'IgG₁ peut être vue sous le même angle que ci-dessus, mais cette fois, l'IL-2 paraît un peu amplifier le phénomène.

Une autre différence concerne l'évolution de la synthèse différentielle d'IgM et d'IgG₁ au cours du temps (**Graphe 32**). En effet, si la séquence de production des IgG₁ est analogue au test précédent, les IgM paraissent connaître leur maximum de synthèse au jour 5. Ce fait pourrait être en rapport avec la prolifération très élevée enregistrée après 5 jours en réponse à l'incorporation de MLA-144 dans le milieu.

4.4. Enseignements générés par l'étude de la production d'anticorps *in vitro*.

Dans le temps imparti pour ce travail, il était difficile de cerner de très près le problème de la production d'anticorps.

RESULTATS

D'une part, la détection des Ig en ELISA requiert une certaine mise au point (boîtes utilisées, processus de saturation et de révélation...).

D'autre part, une culture *in vitro* isole totalement la population cellulaire. Si ce procédé est en mesure de lever une inhibition inhérente à la présence d'un facteur plasmatique *in vivo* (comme cela pourrait être éventuellement le cas chez les animaux leucosiques), il n'en élimine pas moins un ensemble de substances concourant au fonctionnement optimal des cellules. De plus, notre milieu devant impérativement être vierge de toute Ig dès le départ, l'utilisation du sérum de veau foetal (vecteur de facteurs de croissance) a été proscrite.

Eu égard à ces explications, les enseignements fournis par ce test doivent être considérés comme des indices et non comme un fait acquis. Venons-en maintenant aux résultats. S'il semble que la production ne soit pas énorme, la détection d'isotypes particuliers d'Ig génèrent quelques réflexions.

Les cellules semblent produire autant d'IgM que d'IgG₁ dès le troisième jour, ce qui présente une discordance avec le phénotype IgM constaté pour la majorité des cellules B. Afin de vérifier l'hypothèse éventuelle d'un remaniement génique en faveur des IgG₁ précoce (inférieur à trois 3 jours), il serait bon d'envisager des prélèvements de surnageants au cours des trois premiers jours. Si la détection majoritaire d'IgM était effective au début de la culture, cela abonderait en faveur du "switch" précoce des Ig.

Le surnageant de MLA-144 ne paraît par contre pas modifier fortement la quantité d'Ig produites par les cellules leucosiques. Seule la synthèse d'IgM observée au jour 5 permettrait peut-être d'associer la production d'Ig à la prolifération très sensible constatée au cinquième jour de culture en présence de surnageant MLA-144.

Le test de détection des Ig n'a donc pas pu, faute de temps, être optimisé. Seules une étude pointue des conditions favorables de culture et une mise au point très méthodique de la technique ELISA appliquée au dosage d'anticorps sont en mesure de fournir de sérieux compléments d'informations quant à la synthèse *in vitro* d'Ig.

CONCLUSIONS

1. CONCLUSIONS.

La leucose bovine, pathologie néoplasique la plus fréquente chez le bovin, affecte la lignée lymphoïde. Son agent étiologique est un rétrovirus nommé Virus de la leucose bovine (*Bovine Leukemia Virus*). L'étude des cellules circulantes des animaux en lymphocytose persistente a permis de déceler un phénotype particulier des cellules B. Celles-ci expriment en effet pour la plupart un marqueur de lymphocyte B (IgM), mais aussi un Ag présent habituellement sur les lymphocytes T (CD5).

Cette perturbation apparente de la lignée B a été de suite mise en parallèle avec la découverte de BCD5⁺ chez la souris (au niveau de certaines souches) ou chez l'homme (patients atteints de leucémies lymphocytaires chroniques à cellules B ou d'arthrite rhumatoïde). Néanmoins, des BCD5 ont également été découvertes sur des bovins infectés par des *Trypanosoma congolense* (Williams et al., 1989). Deux hypothèses sont émises quant à l'origine de ces cellules : soit une lignée distincte de lymphocytes B se différenciant des autres lors de l'ontogenèse, soit un pool cellulaire ayant acquis ces Ag par suite d'une activation.

Notre travail s'est intéressé aux diverses caractéristiques pouvant rendre compte de l'analogie entre les BCD5 murines, humaines et bovines, tout en gardant à l'esprit que les enseignements générés par cette étude pourraient apporter une modeste contribution à l'éclaircissement du problème de l'origine des BCD5. De même, il est probable qu'une meilleure compréhension de la leucose bovine passe par une connaissance des cellules impliquées dans le processus de leucémogénèse.

Les marquages spécifiques de certains Ag membranaires en immunofluorescence ainsi que la détection en cytométrie de flux confirment les résultats publiés par Depelchin et al. (1989). Ceux-ci rendaient compte en effet de l'expression d'IgM et du CD5 sur une majorité de cellules leucosiques d'animaux en lymphocytose.

Mais, les perturbations du phénotype ne s'arrêtent pas là. Comme les principales cibles de ces modifications paraissent être les lymphocytes B, il est logique de constater une variation dans les mêmes

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

proportions du nombre de cellules exprimant des Ag en relation étroite avec les cellules B (chaînes légères et Ag de classe II). La diminution des cellules T est quant à elle matérialisée par la chute de cellules portant le CD2.

Plus intéressante est la mise en évidence de deux classes d'intégrines (CD11b et CD11c) sur une proportion importante de cellules leucosiques. Ces molécules, par ailleurs décrites sur des BCD5⁺ humaines (De la Hera et al., 1988), sont très peu présentes sur des lymphocytes B classiques. Vu le rôle qu'elles jouent habituellement dans les processus d'adhésion cellulaire, elles pourraient être à l'origine de perturbations importantes du système immunitaire. De plus, comme Chadburn et al. (1990) ont identifiés ces Ag sur des cellules T activées, nous sommes en droit de nous poser des questions sur l'état physiologique des lymphocytes B leucosiques. Cette idée est par ailleurs soutenue par la découverte ponctuelle ou plus étendue de signes classiques d'"activation" sur ces cellules (RfC, RIL-2 et densité des IgM et des Ag de classe II). Néanmoins, ces caractéristiques (bien que mises parfois en évidence chez la souris ou chez l'homme) ne constituent pas une raison suffisante pour abandonner totalement l'idée d'une lignée ayant acquis ces différents marqueurs lors de l'ontogenèse.

Nous avons dès lors tenter d'aborder le problème sous un autre angle. C'est dans cet ordre d'idée qu'a été entreprise l'étude du cycle des cellules circulantes d'animaux en forte lymphocytose. Après avoir mis au point une technique fiable (de détection de DNA et analyse statistique des résultats) et vérifié l'absence d'éventuels artefacts (agrégats ou cellules binucléées), nous avons été en mesure de déterminer la constitution cellulaire de 3 phases du cycle : G0/G1, S et G2/M. L'application de cette méthode sur des cellules circulantes d'animaux leucosiques a montré qu'une proportion non négligeable de ces cellules se situent en phase G2/M. Une étude plus spécifique révèle que les cellules constitutives de cette phase sont beaucoup plus granuleuses que leurs homologues G0/G1 et possèdent également un noyau de taille plus importante. De plus, si un marquage d'Ag membranaires en immunofluorescence nous permet d'affirmer que la majorité de ces cellules sont des lymphocytes B IgM⁺, nous ne pouvons pas exclure que des cellules T (détectées en très faible quantité en G2/M) cyclent *in situ*. Il semble donc de plus en plus probable que certaines cellules B (et peut-être même T) sont impliquées dans un processus d'activation consécutif à l'infection par le BLV.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Il est certain que ces résultats pourraient être affinés jusqu'à la distinction de chaque étape du cycle. Néanmoins, nos investigations se limitant à la détection d'indices éventuels d'"activation", une étude approfondie du cycle ne s'imposait pas dans l'immédiat. Ceci pourrait être envisagé, mais la mise au point de techniques *ad hoc* est longue. Nous en avons d'ailleurs fait l'expérience lors de l'élaboration du marquage de la phase S.

A la lumière de cette étude du cycle cellulaire, nous pouvons donc penser que les perturbations des cellules leucosiques ne se limitent pas au phénotype.

Vu l'état activé d'une proportion importante de ces cellules, il était également utile d'analyser leur comportement en culture. C'est dans cette optique que s'est dessinée la troisième partie de ce travail. Il n'est en effet pas illusoire de penser qu'une cellule activée présente une sensibilité plus développée vis-à-vis de certains stimuli ou possède simplement une plus grande propension à proliférer *in vitro*. Nous avons donc entrepris de mesurer la prolifération de cellules infectées en réponse à divers stimuli et cela au cours du temps. Cette étude a révélé la sensibilité importante des cellules B leucosiques par rapport à une source d'IL-2 et dans une nettement moindre mesure à des anti-IgM. Comme l'IL-2 agit préférentiellement au niveau de spécimens en phase G2, ces résultats corroborent ceux émanant de l'étude du cycle.

La suite de notre raisonnement nous a conduits à nous demander si ces cellules activées n'étaient pas en mesure de poursuivre leur développement jusqu'à la sécrétion d'anticorps. Le quatrième volet de notre travail s'est donc attaché à estimer la production d'anticorps *in vitro* avec ou sans incorporation de source d'IL-2. Malheureusement, faute de temps, une mise au point préalable des conditions optimales de culture et d'un test de détection irréprochable n'a pas pu être mise en oeuvre. Dans ces conditions, il est difficile de tirer des conclusions précises quant à la production d'Ig en culture. S'il nous semble, à la lumière des résultats obtenus, que l'IL-2 ne permet pas particulièrement d'augmenter la synthèse d'Ig, la sécrétion importante (toute proportion gardée) d'IgG₁ par rapport au IgM après 3 jours de culture est en droit néanmoins d'éveiller en nous quelques réflexions en regard du phénotype IgM⁺ de la plupart des cellules leucosiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence que le bouleversement des lymphocytes B et peut-être T imputable à l'infection par le BLV concernent à la fois leur phénotype et leur physiologie. Ces perturbations semblent ainsi en relation avec un phénomène d'activation (du moins pour une proportion importante de cellules). Néanmoins, bien que ces phénomènes aient été constatés au niveau de BCD5 issues d'autres espèces, il serait hâtif de tirer trop de conclusions quant à l'origine de ces cellules.

2. PERSPECTIVES.

Ce travail s'inscrivant dans le cadre général de l'étude des caractéristiques des BCD5 bovins, il est certain que les recherches en ce domaine sont loin d'être clôturées. Nos perspectives se sont volontairement limitée aux types d'investigation abordées dans ce mémoire.

Ainsi, l'étude phénotypique des cellules leucosiques pourrait s'étendre à d'autres Ag membranaires. Dans cet ordre d'idée, la production d'anticorps monoclonaux en vue de la détection de "marqueurs classiques d'activation" (RIL-2, CD20,...) serait d'un grand secours. Une voie encore plus intéressante concerne l'Ag "tumeur-associé". La caractérisation d'un anticorps monoclonal spécifique de cette molécule rendrait des services énormes quant à la détection d'une évolution éventuelle de la maladie vers un stade tumoral.

D'autre part, à condition de disposer des animaux présentant des degrés de lymphocytose très différents, l'étude de l'expression des divers Ag membranaires pourrait révéler des informations très importantes au sujet du développement de la leucose.

Le cycle cellulaire n'a pas non plus livré tous ses secrets. Les techniques permettant la distinction des 5 phases du cycle existent. Moyennant une fine mise au point, il serait possible d'encore mieux caractériser l'état physiologique des cellules circulantes d'animaux en lymphocytose. Dans cet ordre d'idée, la découverte de cellules leucosiques en phase G1 souscrirait parfaitement à l'"hypothèse d'activation". De la même manière que nous avons apprécié la constitution en cellules B et T en G2/M, d'autres anticorps pourraient être utilisés en combinaison avec de l'iodure de

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

propidium afin de déterminer le phénotype global des cellules de chaque phase.

Comme c'est le cas pour le phénotype et le cycle cellulaire, il serait utile d'étendre l'étude de prolifération à d'autres animaux en lymphocytose. Ceci permettrait en effet de vérifier la sensibilité des cellules leucosiques à l'IL-2 et éventuellement de tester d'autres stimuli (IL-5, IL-6, interféron γ ,...). Dans cet ordre d'idée, il a prouvé que des lymphocytes T stimulés à la PHA (phytohémagglutinines) voient leur prolifération amplifiée par l'adjonction d'anticorps anti-CD5. Malgré que cela n'ait jamais été décrit, un test similaire (en remplaçant peut-être la PHA par un stimulant des cellules B) peut être envisagé dans le but de prouver que le CD5 joue également un rôle dans le processus d'activation des cellules B.

Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué, de futures investigations pourraient s'atteler à doser la quantité d'Ig produites éventuellement *in vitro*. Après une mise au point optimale de tous les composants de ce test, il n'est pas exclu que l'on puisse un jour détecter une production (provoquée ou non) d'anticorps induite par des BCD5 en culture.

Jusqu'à présent, nous avons limité notre champs d'action au dosage global des Ig, mais sans attacher d'importance à leur spécificité antigénique. Or, cette caractéristique n'est peut-être pas dénuée d'intérêt dans le contexte de cellules BC5. En effet, si le taux d'Ig sériques diminue chez les animaux infectés (Portetelle, 1990), il est possible que les anticorps produits par les BCD5 possèdent un répertoire très restreint (comme c'est le cas pour leurs homologues murines ou humaines). Dans cet optique, un test de détection d'autoanticorps (anti-DNA, anti-IgG,...) pourrait peut-être susciter des enseignements très intéressants. Si une production d'anticorps *in vitro* par les cellules leucosiques était conséquente, cette manipulation serait également de mise.

L'étude des cellules BCD5 est donc loin d'être close et maintes recherches seront nécessaires avant d'ébaucher une explication quant à l'origine de ces cellules.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE.

- BRAUN J. (1983)
"Spontaneous *in vitro* occurrence and long-term culture of murine B lymphoblast cell lines."
Immunol.; 130, 2113-2120.
- BRAUN J., CITRI Y., BALTIMORE D., FOROUZANPOUR F., KING L., TEHERANIZADEH K., BRAY M. and KLIEWER S. (1986)
"B-Ly1 cells: Immortal Ly-1⁺ B lymphocyte cell lines spontaneously arising in murine splenic cultures."
Immunological Reviews; 93, 6-21.
- BURNY A., CLEUTER Y., KETTMANN R., MAMMERICKX M., MARBAIX G., PORTETELLE D., VAN DEN BROEKE A., WILLEMS L. and THOMAS R. (1987)
"Bovine leukaemia : facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer."
Cancer Surveys; 6 (1), 139-159.
- CALIGARIS-CAPPIO F., GOBBI M., BOFILL M. and JANOSSY G. (1982)
"Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia."
J. Exp. Med.; 155, 623-628.
- CASALI P., BURARSTERO S.E., NAKAMURA M., INGHIRAMI G. and NOTKINS A.L. (1987).
"Human lymphocytes making rheumatoid factors and antibodies to single stranded DNA belong to the Leu-1⁺ B cell subset."
Science; 236, 77-81.
- CHADBURN A., INGHIRAMI G. and KNOWLES D.M. (1990)
"Hairy cell leukemia-associated antigen LeuM5 (CD11c) is preferentially expressed by benign activated and neoplastic CD8 cells."
American Journal of pathology, 136 (1), 29-37.
- COFFMAN R.L., SEYMOUR B.W.P., LEBMAN D.A., HIRAKI D.D., CHRISTIANSEN J.A., SHRADER B., CHERWINSKI H.L., SAVELKOUL H.F., FINKELMAN F.D., BOND M.W. and MOSSMAN T.R. (1988)
"The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation."
Immunol. Rev.; 102, 5.
- CORNIL I. and LEVY D. (1989)
"*In vivo* inhibition of Bovine Leukemia Virus (BLV) expression."
Leukemia; 3 (2), 159-161.

- CUNNINGHAM A.J. (1974)
"Large number of cells in normal mice produce antibody components of isologous erythrocytes."
Nature; 252, 749-751.
- DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F., SHARPLESS T. and MELAMED M.R. (1976)
"Lymphocyte stimulation : A rapid parameter analysis."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 73 (8), 2881-2884.
- DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F., SHARPLESS T. and MELAMED M.R. (1977)
"Recognition of cells in mitosis by flow cytofluormetry."
J. Histochem Cytochem.; 25 (7), 875-880.
- DEAN P.N. (1985)
"Methods of data analysis in flow cytometry."
in: Flow cytometry : Instrumentation and data analysis.
By Van Dilla M.A., Dean P.N, Learum O.D. and Melamed M.R. (Eds.).
Academic Press Inc., London.
Chap. 6, pp. 195-225.
- DEFRANCE T., AUBRY J.-P., VANBERVLIET B. and BANCHEREAU J. (1986)
"Human interferon- γ acts as a B cell growth factor in the IgM antibody co-stimulatory assay but has no direct B cell differentiation activity."
J. Immunol.; 137, 3861.
- DEFRANCE T., VANBERVLIET B., DURAND I. and BANCHEREAU J. (1989)
"Human interleukin 4 down-regulates the surface expression of CD5 on normal and leukemic B cells."
Eur. J. Immunol.; 19, 293-299.
- DE LA HERA A., ALVAREZ-MON M., SANCHEZ-MADRID F., MARTINEZ C. and DURANTEZ A. (1988)
"Co-expression of Mac-1 and p150,95 on CD5⁺ B cells. Structural and functional characterization in a human chronic lymphocytic leukemia."
Eur. J. Immunol.; 18, 1131-1134.
- DELCOMMENNE M. et al.
"Characterization of a monoclonal antibody recognizing CD11c on bovine leukocytes."
Manuscrit en préparation.

- DEPELCHIN A., LETESSON J.-J., LOSTRIE-TRUSSART N., MAMMERICKX M., PORTETELLE D. and BURNY A. (1989)
"Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-cells express a marker similar to the CD5 T cell marker."
Immunology Letters; 20, 69-76.
- DJILALI S. and PARODI A.-L. (1989)
"The BLV-induced lymphosarcoma complex in sheep."
Veterinary Immunology and Immunopathology; 22, 233-244.
- DZIARSKI R. (1982)
"Preferential induction of antibody secretion in polyclonal activation by peptidoglycan and lipopolysaccharide. II. *In vivo* studies."
J. Immunol.; 128, 1026-1030.
- FEY H., PFISTER H., MESSERTI J., STURZENEGGER N. and GROLIMUND F. (1976)
"Methods of isolation, purification and quantation of bovine immunoglobulins."
Zbl. Vet. Med.; 23, 249.
- FORSTER I. and RAJEWSKY K. (1987)
"Expansion and functional activity of Ly-1⁺ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice."
Eur. J. Immunol.; 17, 521-528.
- FOSSUM C., BURNY A., PORTETELLE D., MAMMERICKX M. and MOREIN B. (1988)
"Detection of B and T cells with lectins or antibodies, in healthy and Bovine Leukemia Virus-infected cattle."
Veterinary Immunology and Immunopathology; 18, 269-278.
- FREEDMAN A.S., FREEMAN G., WHITMAN J., SEGIL J., DALEY J. and NADLER M. (1989) (1)
"Studies of in vitro activated CD5⁺ B cells."
Blood; 73, 202-208.
- FREEDMAN A.S., FREEMAN G., WHITMAN J., SEGIL J., DALEY J., LEVINE H. and NADLER L.M. (1989) (2)
"Expression and regulation of CD5 on in vitro activated human B cells."
Eur. J. Immunol.; 19, 849-855.
- GARMAN R.D., JACOBS K.A., CLARK S.C. and RAULET D.H. (1987)
"B-cell-stimulatory factor 2 (β -2 interferon) production by mature murine T cells."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84, 7629.

- GATHINGS W.E., LAWTON A.R. and COOPER M.D. (1977)
"Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans."
Eur. J. Immunol.; 7, 804.
- GHYSDAEL J., BRUCK C., MAMOON R. and BURNY A. (1987)
"Genetic structure of Bovine Leukemia Virus genome and biosynthesis of Bovine Leukemia Virus proteins."
in: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus.
By Burny A. and Mammerickx M. (Eds.).
Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
Chap. 8, pp 105-112.
- GLICK B., CHANG T.S. and JAAP R.G. (1956)
"The bursa of Fabricius and antibody production."
Poult. Sci.; 35, 224.
- GORDON J., ROWE M., WALKER L. and GUY G. (1986)
"Ligation of the CD23, p15 (Blast-2, EBVCS) antigen triggers the cell-cycle progression of activated B lymphocytes."
Eur. J. Immunol.; 16,1075.
- GREIMERS R. (1990)
"Cytométrie en flux : Analyses multiparamétriques et tri cellulaire."
- HARDY R.R. and HAYAKAWA K. (1986)
"Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B."
Immunological Reviews, 93, 54-79.
- HARDY R.R., DANGL J.L., HAYAKAWA K., JAGER G., HERZENBERG L.A I. and HERZENBERG L.A. II. (1986)
"Frequent λ light chain gene rearrangement and expression in a Ly-1 B lymphoma with a productive κ chain allele."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 83, 1438-1442.
- HARDY R.R., HAYAKAWA K., SHIMIZU M., YAMASAKI K. AND KISHIMOTO T. (1987)
"Rheumatoid factor secretion from human Leu-1⁺ B cells."
Science; 236, 81-83.
- HAYAKAWA K., HARDY R.R., PARKS D.R. and HERZENBERG L.A. I (1983)
"The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective and autoimmune mice."
J. Exp. Med.; 157, 202-208.

- HAYAKAWA K., HARDY R.R., HONDA M., HERZENBERG L.A. II, STEINBERG A.D. and HERZENBERG L.A. I. (1984)
"Ly-1 B cells : Functionally distinct lymphocytes that secrete IgM auto-antibodies."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 81, 2494-2498.
- HAYAKAWA K., HARDY R.R. and HERZENBERG L.A. I (1986)
"Peritoneal Ly-1 B cells : genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression."
Eur. J. Immunol.; 16, 450-465.
- HAYAKAWA K. and HARDY R.R. (1988)
"Normal, autoimmune and malignant CD5⁺ B cells: The Ly-1 B lineage ?"
Annu. Rev. Immunol.; 88.6: 197-218.
- HIRSH R.L. (1982)
"The complement system."
Microbio Revue; 46, 71-85.
- HOLLANDER N. (1982)
"Effects of anti-Lyt antibodies on T-cell functions."
Immunological Reviews; 68, 43-66.
- HUANG H.-J.S., JONES N.H., STROMINGER J.L. and HERZENBERG L.A. I. (1987)
"Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and subset of B cells: Molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5)."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84, 204.
- KARASUYAMA H., ROLINK A. and MELCHERS B F. (1988)
"Recombinant interleukin 2 or 5, but not 3 or 4, induces maturation of resting mouse B lymphocytes and propagates proliferation of activated B cell blasts."
J. Exp. Med.; 167, 1377.
- KETTMANN R. (1986)
"Etude du rôle du provirus dans la leucémogénèse par le virus de la leucémie bovine."
Mémoire-Agrégation de l'Enseignement Supérieur.
Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

- KETTMAN R., COUEZ D., GREGOIRE D. and BURNY A. (1987)
"Leukemogenesis by Bovine Leukemia Virus."
in: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus.
By Burny A. and Mammerickx M (Eds).
Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
Chap. 11, pp. 153-160.
- KINASHI T., HARADA H., SEVERINSON E., TANABE T., SIDERAS P., KONISHI P.,
AZUMA C., TOMINAGA A., BERGSTED-LINDQVIST S., TAKAHASHI M.,
MATSUDA F., YADITA Y., TAKATSU K. and HONJO T. (1986)
"Cloning of complementary DNA encoding T-cell replacing factor and
identity with B-cell growth factor II."
Nature; 324, 70.
- KISHIMOTO T. and HIRANO T. (1988)
"Molecular regulation of B lymphocyte response."
Annu. Rev. Immunol.; 6, 485.
- KISHIMOTO T. and HIRANO T. (1989)
"Lymphocyte activation, proliferation and immunoglobulin secretion."
in: *Fundamental Immunology, Second Edition.*
By Paul W.E. (Eds.).
Raven Press Ltd., New York.
Chap. 14, pp. 385-411.
- LEISERING A. (1871)
"Hypertropy der Malpighischen Körperchen der Milz."
Vet.-Wes. Kgr. Sachsen; 16, 15-16.
- LETESSON J.J., COPPE P., LOSTRIE-TRUSSART N. and DEPELCHIN A. (1983)
"A bovine Ia-like antigen detected by xenogenetic monoclonal antibody."
Animal Blood Groups and Biochemical Genetics; 14, 239-250.
- LETESSON J.J., LOSTRIE-TRUSSART N. and DEPELCHIN A. (1985)
"Production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'isotypes d'immunoglobulines bovines."
Ann. Med. Vet.; 129, 131-141.
- LETESSON J.J., COPPE P., LOSTRIE-TRUSSART N., GREIMERS R. and
DEPELCHIN A. (1986)
"Production and characterization of monoclonal antibodies raised against
BoLA class I antigens."
Veterinary Immunology and Immunopathology; 13, 213-226.

- LETESSON J.J., MAGER A., DIDEMBOURG C. and DEPELCHIN A. (1990) (1)
"Monoclonal antibody specific for bovine CD5 antigen which enhances mitogen-induced blastogenesis and IL-2 production."
Veterinary Immunology and Immunopathology; 25 (3), 249-257.
- LETESSON J.J., VAN DEN BROEKE A., MARBAIX Y., DELCOMMENNE M., MAMMERICKX M. and BURNY A. (1990) (2)
"Facs analysis on Bovine Leukemia Virus infected cell lines of the monoclonal antibodies to B cells and to monocytes/macrophages submitted to the workshop."
Accepté pour publication dans *Veterinary Immunology and Immunopathology*.
- LING N.R. and KAY J.L. (1975)
"Metabolic changes during lymphocyte stimulation."
in: Lymphocyte stimulation.
Ed. North Holland/American Elsevier.
pp. 303-355.
- LOGDBERG L. and SHEVACH E.M. (1985)
"Role of the Ly 1 antigen in interleukin 1-induced thymocyte activation."
Eur. J. Immunol.; 15, 1007-1013.
- MAIND V.C., HAYMAN M. J. and CRUMPTON M.J. (1975)
"Relationship between enhanced turnover of phosphatidylinositol and lymphocyte activation by mitogen."
Biochem. J.; 146, 247.
- MANET G., GUILBERT X., ROUX A., VUILLAUME A., and PARODI A.-L. (1989)
"Natural mode of horizontal transmission of Bovine Leukemia Virus (BLV) : the role of tabanids (*Tabanus* spp.)."
Veterinary Immunology and Immunopathology; 22, 255-263.
- MILLER J. et OLSON C. (1987)
"Discovery of Bovine Leukemia Virus."
in: *Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus..*
By Burny A. and Mammerickx M. (Eds.).
Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
Chap. 5, pp. 87-90.
- MOND J.J., CARMAN J., SARMA C., DHARA J. and FINKELMAN F.D. (1986)
"Interferon- γ suppresses B cell stimulation factor (ESF-1) induction of class II MCH determinants on B cells."
J. Immunol.; 131,315.

- NISHIMURA Y., BIERER B.E. and BURAKOFF S.J. (1988)
"Expression of CD5 regulates responsiveness to IL-1."
J. Immunol.; 141, 3438-3444.
- OLSON C. et MILLER J. (1987)
"History and terminology of enzootic bovine leukosis."
in: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus..
By Burny A. and Mammerickx M. (Eds.).
Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
Chap. 1, pp. 3-12.
- ONUMA M. (1987)
"Transforming activity of Bovine Leukemia Virus and properties of tumor-associated antigen on bovine lymphosarcoma."
in: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus.
By Burny A. and Mammerickx M (Eds).
Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
Chap. 10, 145-151.
- ONUMA M. (1989)
"Tumor-associated Antigen on Bovine Leukemia Virus-induced bovine lymphosarcoma."
Veterinary Immunology and Immunopathology; 22, 213-221.
- PAUL W.E. and OHARA J. (1987)
"B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4."
Annu. Rev. Immunol.; 5, 429.
- PLATER-ZYBERK C., MAINI R.N., LAM K., KENNEDY T.D. and JANOSSY G. (1985)
"A rheumatoid arthritis B cell subset expresses a phenotype similar to that in chronic lymphocytic leukemia."
Arth. Rheum.; 28, 971-976.
- PORTETELLE D. (1989-90)
"Leucose bovine enzootique et virus de la leucemie bovine."
Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur
Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux

- RIGAL D., ANDREONI C., VERMOT-DESROCHES C., ROSSET F., SOUILLET G. et ROBERT J. (1988)
"Rôle physiopathologique des protéines de l'adhésion leucocytaire : LFA-1, CR3, p150-95 chez l'Homme."
in: Pédiatrie.
Elsevier (Eds), Paris.
Chap. 43, pp. 185-190.
- ROITT I., BROSTOFF J. et MALE D. (1985)
Immunologie fondamentale et appliquée.
Edition MEDSI sous la direction de FRIDMAN W. H.
- ROSEN C., SODROSKI J., KETTMANN R and HASELTINE W. (1985)
"Trans-activation of the bovine leukemia virus long terminal repeat in BLV-infected cells."
Science; 227, 320-322.
- ROSSE C. (1981)
"Perspectives of lymphocyte production and cellular traffic in bone marrow."
Handb. Cancer Immunol.; 6, 250
- SALSANO P., FROLAND S.S., NATVIG J.B. and MICHAELSON E. (1974)
"Same idiotype of B lymphocyte membrane IgD and IgM. Formal evidence for monoclonality of chronic lymphocytic leukemia virus."
Scand. J. Immunol.; 3, 841.
- SCHER I., SHARROW S.O. and PAUL W.E. (1976)
"X-linked B-lymphocyte defect in CBA/N mice. Anormal development of B-lymphocyte populations defined by their density of surface immunoglobulin."
J. Exp. Med.; 144, 507-518.
- SHAW S. (1987)
"Characterization of human leukocyte differentiation antigens."
Immunology Today; 8 (1), 1-3.
- SIDMAN C.L., SHULTZ L.D., HARDY R.R., HAYAKAWA K. and HERZENBERG L.A. II. (1986)
"Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1⁺ B cells in viable M^otheaten and normal mice."
Science; 232, 1423-1425.

- SMITH K.A. (1988)
"The bimolecular structure of the interleukin 2 receptor."
Immunology today; 9 (2), 36-37.
- SNAPPER C.M., FINKELMAN F.D. and PAUL W.E. (1988)
"Regulation of IgG₁ and IgE production by interleukin 4."
Immunol. Rev.; 102, 51.
- SPOONER R.L., LEVEZIEL H., GROSECLAUDE F., OLIVIER R.A. and VAIMAN M. (1978)
"Evidence for a possible M.C.H. in cattle."
J. Immunogenet.; 5, 335-346.
- STONE W. H. (1981)
"The Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) system."
in: The ruminant immune system.
By Butler E. (Eds).
Plenum Press, New York and London.
Chap. 2, pp. 433-450.
- STRAUB O.C. (1987)
"Detection of bovine virus infection by non specific methods; haematology and tumor screening."
in: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus.
By Burny A. and Mammerickx M (Eds).
Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
Chap. 13, pp. 177-186
- TEDER T.F., CLEMENT L.T. and COOPER M.D. (1984)
"Expression of C3d receptors during human B cell differentiation: Immunofluorescence analysis with the HB-5 monoclonal antibody."
J. Immunol.; 133, 678.
- UNGAR-WARON H. and TRAININ Z. (1987)
"Immunological aspects of enzootic bovine leukosis."
in: Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus.
By Burny A. and Mammerickx M (Eds).
Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
Chap. 12, pp. 163-173.
- VAN DEN BROEKE A., CLEUTER Y., CHENG G., PORTETELLE D., MAMMERICKX M., ZAGURY D., FOUCHARD M., COULOMBEL L., KETTMANN R. and BURNY A. (1988)
"Even transcriptionally competent proviruses are silent in bovine leukemia virus-induced sheep tumor cells."
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 85, 9263-9267.

- VINDELOV L.L., CHRISTENSEN I. J. and NISSEN N.I. (1983)
"A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis."
Cytometry; 3, 323-327.
- WERNER-FAVRE C., VISCHER T.L., WOHLWEND D. and ZUBLER R.H. (1989)
"Cell surface antigen CD5 is a marker for activated human B cells."
Eur. J. Immunol.; 19, 1209-1213.
- WETZEL G.D. (1989)
"A study of interleukin-5, CD5⁺ (Ly1/Leu1) B lymphocytes and their interaction."
Bull. Inst. Pasteur; 87, 229-246.
- WILLIAMS D.J.L., NEWSON J. and NAESSENS J. (1989)
"Humoral immune responses in trypano-tolerant and susceptible breeds of cattle following secondary challenge with *Trypanosoma congolense*"
in: Second International Veterinary Immunology Symposium.
By G. Fisher (Eds.), Stuttgart.
- WINTROBE M.M., LEE G.R., BOGGS D.R., BITHELL T.C., ATHENS J.W. and FOERSTER J. (1976) (1)
"Origin and development of the blood and blood-forming tissues."
in: Clinical hematology.
By Kimpton H. Publishers (Eds.), London.
Chap. 6, pp. 286-350.
- WINTROBE M.M., LEE G.R., BOGGS D.R., BITHELL T.C., ATHENS J.W. and FOERSTER J. (1976) (2)
"Lymphocytes and lymphatic tissues and their relation to humoral and cellular immunity."
in: Clinical hematology.
By Kimpton H. Publishers (Eds.), London.
Chap. 2, pp. 41-80.