



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Influence de cytokines (IL-10 et IL-6) et étude de leur production (IL-10) chez les cellules B CD5+ de bovins leucosiques

Buchet, Marc

*Award date:*  
1993

*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.

**Promoteur : J.J. LETESSON**

**INFLUENCE DE CYTOKINES (IL-10 ET IL-6)  
ET ÉTUDE DE LEUR PRODUCTION (IL-10)  
CHEZ LES CELLULES B CD5+ DE BOVINS  
LEUCOSIQUES.**

**BUCHET Marc  
Décembre 1993**

**Influence de cytokines (IL-10 et IL-6) et étude de leur  
production (IL-10) chez les cellules B CD5+ de bovins  
leucosiques.**

BUCHET Marc

**Résumé**

Les cellules B CD5+ forment une sous-population normalement minoritaire de lymphocytes B, exprimant un marqueur membranaire typique des lymphocytes T, le CD5. Nous avons étudié ces cellules chez le bovin en utilisant des cellules mononucléées sanguines d'animaux infectés par le Virus de la Leucose Bovine et au stade de lymphocytose persistante, qui voient leur taux de cellules B CD5+ augmenter drastiquement.

Nous avons étudié l'influence de cytokines sur les cellules B CD5+ et nous n'avons pas pu mettre en évidence d'influence de l'IL-6 bovine (comme c'est le cas sur les cellules B activées murines ou humaines) ou de l'IL-10 humaine sur la prolifération de ces cellules (comme c'est le cas chez la souris). De plus, la présence d'IL-10 humaine ne semble pas agir sur la sécrétion d'immunoglobulines ou sur une modification du phénotype cellulaire.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence, par des techniques d'hybridation moléculaire et d'amplification (RT-PCR), la présence d'un ARN messager IL-10 dans les cellules mononucléées de bovins sains ou infectés et en lymphocytose persistante.

Des approfondissements sont néanmoins nécessaires pour confirmer et développer ces résultats préliminaires et pour investiguer le rôle d'une éventuelle IL-10 bovine sur les cellules B CD5+ bovines.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

**Promoteur** : J.-J. Letesson

# Liste des abréviations utilisées.

AC	:	anticorps.
ACm	:	anticorps monoclonal.
ADN	:	acide désoxyribonucléique.
APC	:	Antigen Presentating cell, cellule présentatrice d'AG.
ARN	:	acide ribonucléique.
AG	:	antigène.
Amp.	:	ampicilline.
BLV	:	Bovine Leukemia Virus , virus de la leucose bovine.
CHO	:	Chinese Hamster Ovary cells, cellules d'ovaire de hamster chinois.
DEPC	:	Diéthyl pyrocarbonate.
DMSO	:	Diméthyl sulfoxyde.
Coll.	:	collègues.
CPM	:	coups par minute.
Dpt	:	département.
EDTA	:	Ethylène diamine tétra acétate.
ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
FACS	:	Fluorescence Activated Cell Sorter.
FCS	:	Fetal Clalf Serun, sérum de veau foetal.
FITC	:	Fluorescein Iso Thiocyanate, iso-thio cyanate de fluorescéine.
HS	:	Horse serum, sérum de cheval.
HTLV	:	Human T lymphotrope Virus.
IL	:	Interleukine.
IFN	:	Interféron
Ig	:	Immunoglobuline.
LTR	:	Long terminal repeat.
OPD	:	Ortho-phénylendiamine.
PBMC	:	Peripheric Blood Mononuclear Cells, cellules monoclées du sang périphérique.
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN.
POD	:	Peroxydase
RNA	:	Ribonucleic acid
RNAse	:	Ribonucléase
RPM	:	Rotations par minute.
RT	:	Reverse transcription
SAM	:	Sheep anti-Mouse, anticorps de mouton anti-souris.
SBN	:	Sérum de bovin normal.
SDS	:	Sodium Dodécyl sulfate.
TNF	:	Tumour Necrosis Factor.
TTL	:	Test de transformation lymphoblastique.

*Au terme de cette année, je tiens à remercier particulièrement le Docteur Jean-Jacques Letesson d'avoir accepté de promouvoir ce mémoire, d'avoir su susciter en moi le goût pour l'immunologie et de m'avoir accordé sa disponibilité.*

*Ma profonde gratitude va également à mademoiselle Anne Mager qui a consacré beaucoup de son précieux temps à me guider dans ce travail à travers les dédales sombres de l'immunologie cellulaire, et à me faire partager ses connaissances et son dynamisme.*

*Je remercie tout particulièrement monsieur Long Le, qui a su me donner goût à la biologie moléculaire et qui m'a transmis une partie de sa rigueur et de sa riche connaissance sur les acides nucléiques et sur la puissance de l'ADN recombinant.*

*J'adresse un merci tout spécial au Docteur Louis Droogmans pour m'avoir communiqué la connaissance et les outils nécessaires à la réalisation de ce travail et avoir toujours su être disponible pour répondre à mes questions.*

*Qu'il me soit également permis de remercier, le soutien et la gentillesse de Régine Masengo, la spontanéité et la sympathie de Jean-Philippe Matheise, les conseils précieux de Docteur Pil, ainsi que Catherine Gérard de l'hôpital Erasme pour m'avoir gentiment fourni une source l'interleukine 10.*

*Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire, qui m'ont permis de travailler dans une ambiance inoubliable, et qui m'ont tous à un moment ou à un autre, été d'une aide précieuse.*

*C'est du fond du cœur que je remercie Laurence pour son aide et son soutien de tous les instants, ainsi que mes parents pour m'avoir accompagné durant ces années d'études et m'avoir aidé dans les moments les plus durs.*

*Enfin, je ne voudrais pas terminer sans remercier toutes les personnes ayant directement ou indirectement participé à la réalisation de ce mémoire, ainsi que la nature d'avoir inventé la vie.*

**I. INTRODUCTION**

1. La réponse immunitaire.....	1
1.1. Réponse non spécifique.....	1
1.2. Réponse spécifique.....	2
1.3. Les lymphocytes B.....	3
1.3.1. Les lymphocytes B normaux.....	3
1.3.2. Les lymphocytes B CD5+.....	6
2. Les cytokines: les médiateurs immunitaires.....	11
2.1. Réseaux cytokiniques.....	12
2.2. Structure des gènes et expression.....	13
2.2.1. Voies d'activation par messagers secondaires.....	14
2.2.2. Facteurs transcriptionnels.....	14
2.2.2. Facteurs post-transcriptionnels.....	15
2.3. Transduction du signal par le récepteur.....	16
2.4. Types de lymphokines.....	16
2.4.1. Lymphokines agissant sur les cellules B.....	16
2.5. Lymphokines étudiées.....	18
2.5.1. L'interleukine 2.....	18
2.5.2. L'interleukine 6.....	19
2.5.3. L'interleukine 10.....	20
3. Le virus de la leucose bovine.....	24
3.1. La leucose bovine.....	24
3.2. Le BLV est un retroviridae.....	25
3.4. Le BLV et les cellules B CD5.....	26
4. But du travail.....	28

**II. MATERIEL & METHODES.**

<b>I. Techniques de biologie cellulaire.....</b>	<b>1</b>
1. Préparation du milieu de culture cellulaire.....	1
2. Origine et traitement du matériel cellulaire lymphocytaire.....	1
2.1. Isolement et conservation des cellules.....	2
2.2. Déplétion de la population mononucléée en lymphocytes T.....	3
2.2.1 Principe.....	3
2.2.2 Protocole.....	3
2.3. Origine du matériel d'origine cellulaire non lymphocytaire.....	4
2.3.1. Surnageant de cellules COS-IL-6 bovine.....	4
2.3.2. Surnageants de cellules CHO-IL-10 humaine.....	4
2.3.3. Cellules fibroblastiques VERO.....	5
3. Mise en culture des cellules.....	5
3.1 Test de transformation lymphoblastique (TTL).....	6
3.1.1 Principe du TTL.....	6
3.1.2 Mise en culture.....	6
3.1.3 Mesure de la prolifération.....	6
4. Mise en évidence de la production d'anticorps.....	8
4.1 Principe.....	8
4.2 Protocole.....	9
5. Analyse en immunofluorescence indirecte.....	10

5.1	Mise en culture en plaques macropuits . . . . .	10
5.2	Marquage des cellules. . . . .	10
5.2.1	Principe. . . . .	10
5.2.2	Protocole . . . . .	11
5.3	Analyse des résultats par cytométrie de flux (FACS). . . . .	11
<b>II.</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire. . . . .</b>	<b>12</b>
1.	Extraction d'ARN total de lymphocytes. . . . .	12
1.1	Généralités sur le traitement de l'ARN. . . . .	12
1.2	Méthodes d'extraction. . . . .	12
1.2.1.	Méthode aux sels de guanidine . . . . .	13
1.2.2	Méthode à la protéinase K et au LiCl. . . . .	13
1.2.3	Ultraspec™ RNA. . . . .	14
1.2.4.	Estimation de la quantité d'ARN extraite et stockage. . . . .	15
2.	Préparation et extraction de plasmides par Midiprep. . . . .	16
2.1	Principes. . . . .	16
2.2	Protocole. . . . .	16
3.	Synthèse d'une sonde ARN au 35S. . . . .	17
3.1	Principe. . . . .	17
3.1.1	Le système SP6/T7™. . . . .	17
3.1.2.	Synthèse d'une sonde sense ou antisense. . . . .	18
3.2	Protocole. . . . .	18
4.	Gel d'agarose pour ADN ou ARN. . . . .	20
4.1	Gel ADN. . . . .	21
4.1.1	Préparation des échantillons. . . . .	21
4.1.2	Préparation du gel et électrophorèse. . . . .	21
4.1.3	Utilisation de standards de poids moléculaires. . . . .	21
4.1.4.	Purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose. . . . .	22
4.2	Gel ARN. . . . .	22
4.3.1	Préparation des échantillons. . . . .	22
4.3.2	Préparation du gel et électrophorèse. . . . .	23
5.	Hybridation avec une sonde ARN. . . . .	23
5.1	Northern Blot. . . . .	24
5.1.1	Principe. . . . .	24
5.1.2	Protocole. . . . .	25
5.2	Dot Blot. . . . .	26
5.2.1	Principe. . . . .	26
5.2.2	Protocole. . . . .	26
5.3	Southern Blot. . . . .	26
5.3.1	Principe. . . . .	26
5.3.2	Protocole. . . . .	26
5.4	Hybridation avec sonde ARN au <sup>35</sup> S. . . . .	27
5.4.1	Principe. . . . .	27
5.4.2	Protocole. . . . .	27
6.	RT / PCR. . . . .	28
6.1	Principe . . . . .	28
6.2	Protocole. . . . .	30
6.2.1	Rétro-transcription (RT) . . . . .	30
6.2.2.	Polymérisation en chaîne (PCR). . . . .	30
8.	Restriction. . . . .	31
8.1	Principe . . . . .	31

8.2 Protocole.....	31
--------------------	----

### **III. RESULTATS**

1. Influence de cytokines sur les lymphocytes B CD5.....	1
1.1. Tests de transformation lymphoblastique.....	1
1.1.1. Action de l'IL-2h sur la prolifération des cellules B CD5. ....	1
A/ Contrôles de déplétion.....	1
B/ Effet de l'IL-2 humaine sur la prolifération des cellules B CD5. ....	2
1.1.2. Action de l'IL-6 bovine sur les cellules B CD5. ....	2
1.1.3 Action de l'IL-10 humaine sur les cellules B CD5.....	3
1.2. Mesure de la sécrétion d'immunoglobulines.....	5
1.3. Analyse du phénotype cellulaire.....	6
1.4. Discussion des résultats.....	7
2. Mesure de la production d'IL-10 par les lymphocytes bovins. ....	7
2.1. Détection du messageur IL-10 par Northern Blot. ....	8
2.1.1. Extraction d'ARN total de cellules mononucléées bovines. ....	8
2.1.3. Synthèse d'une sonde spécifique à l'ARNm de IL-10 bovine. ....	9
A/ Amplification du plasmide.....	10
B/ Linéarisation du plasmide et purification par GeneClean.....	10
C/ Synthèse de la sonde.....	10
2.1.4. Hybridation après Northern Blot. ....	11
2.1.5. Discussion sur les résultats du Northern blot. ....	11
2.2. Détection du messageur IL-10 par RT/PCR. ....	12
2.2.1. Extraction d'ARN total de lymphocytes bovins.....	12
2.2.2. Essai de RT/PCR sur l'actine comme contrôle interne de transcription. ....	13
2.2.3. RT/PCR sur le messageur codant pour l'IL-10 bovine.....	13
A/ Choix des oligonucléotides.....	13
B/ Reverse transcription et polymérisation en chaîne.....	13
2.2.4. Identification par hybridation du fragment amplifié.....	16
2.2.5. Discussion des résultats de RT/PCR sur l'ARNm codant pour l'IL-10b.....	17

### **IV. DISCUSSION ET CONCLUSION.**

1. Influence de l'IL-10 sur les cellules B CD5.....	1
2. Détection de la production d'IL-10 chez le bovin.....	2
2.1. Chez les cellules bovines en général. ....	2
2.2. Sur les cellules B CD5. ....	3
3. Influence de l'IL-6b sur la prolifération des B CD5.....	4
4. Conclusions générales.....	4

### **V. BIBLIOGRAPHIE.**

# I

## *Introduction*

# **1. La réponse immunitaire.**

Pour se défendre contre un intrus, l'organisme possède de nombreux moyens de destruction, basés sur la gestion d'un arsenal de défense compliqué et contrôlé à de nombreux niveaux. Bien qu'il soit possible pour la rigueur d'un exposé scientifique, de décrire ce système comme composé de sous-niveaux, il est dans la réalité bien moins facile de le délimiter de cette manière. Nous allons présenter ici en quelques mots le principe de la réponse immunitaire décrit selon les distinctions classiques entre la réponse immunitaire spécifique et la non-spécifique.

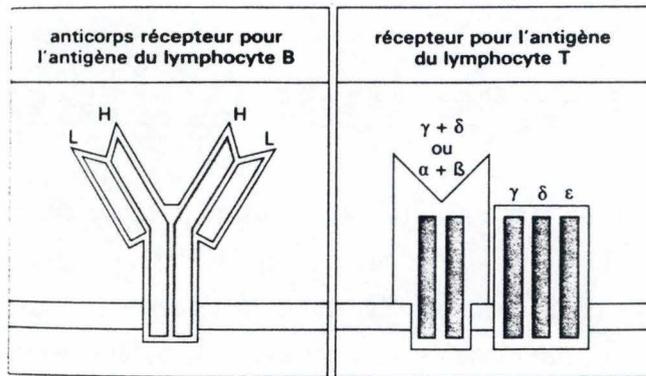
## **1.1. Réponse non spécifique.**

La réponse immunitaire face à un intrus (ou antigène, AG) peut faire intervenir des systèmes de lutte spécifique à l'agresseur ou bien déployer un système de destruction général. Le système général, ou non-spécifique, est constitué tout d'abord de la barrière naturelle que constituent la peau et les épithélia muqueux.

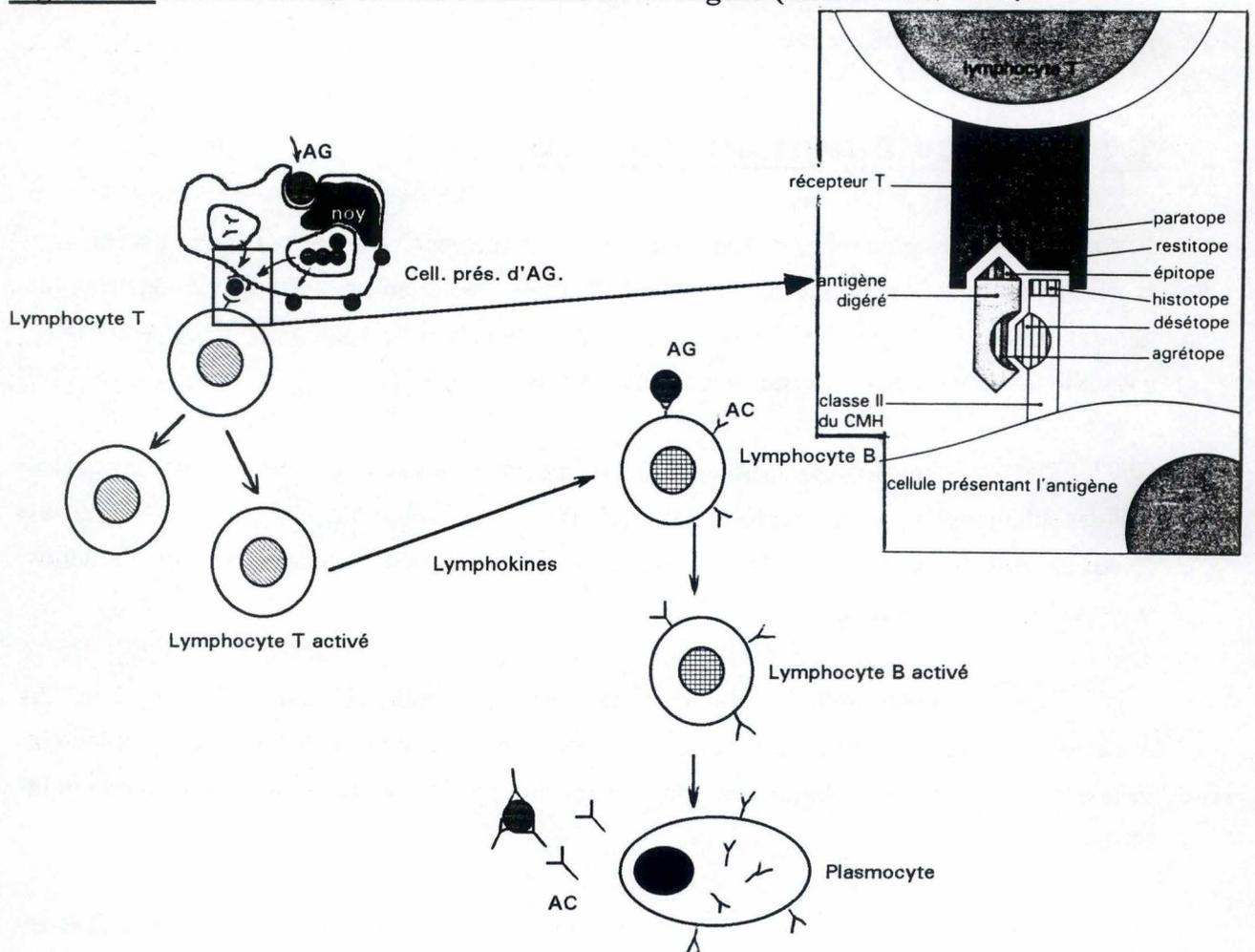
Ensuite viennent une série de cellules spécialisées dans la lutte contre l'intrus: les cellules phagocytaires qui englobent la cible et la digèrent, et les cellules tueuses (Natural Killer) qui lysent les cellules à altérations membranaires ou métaboliques importantes (Trinchieri G, 1992).

Des molécules solubles jouent également un grand rôle dans la protection, ce système est appelé humoral. Ces molécules sont principalement le système du complément et les protéines de phase aiguë, qui en se fixant non spécifiquement sur les intrus facilitent leur destruction.

Bien que décrit séparément le système non-spécifique est en étroite relation avec le système spécifique. Les anticorps (AC), par exemple, étant produits par des cellules de l'immunité spécifique font appel aux cellules non spécifiques et au système du complément pour détruire l'agresseur (voir plus loin).



**Figure 1-1:** Les molécules de reconnaissance de l'antigène (Roit et coll., 1989).



**Figure 1-2:** Schéma simplifié de l'immunité spécifique.

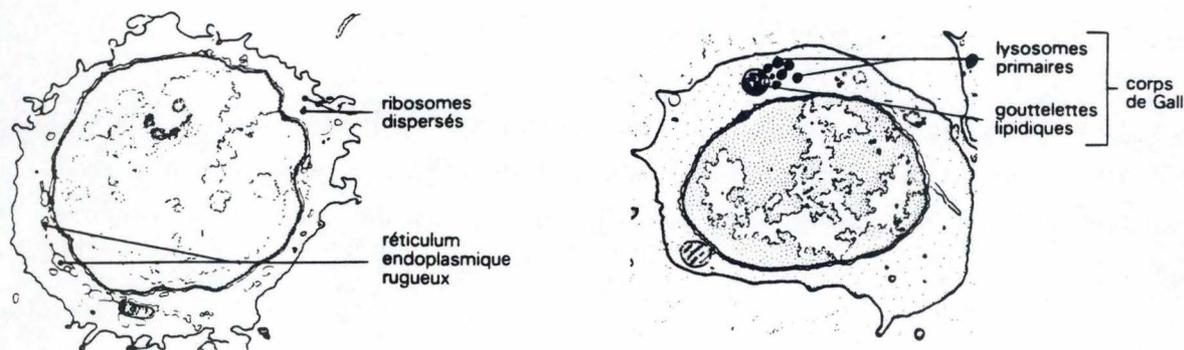
## 1.2. Réponse spécifique.

L'immunité spécifique est assurée par les lymphocytes B et T qui reconnaissent spécifiquement les AG via leurs récepteurs membranaires (**Figure 1-1**). Les lymphocytes communiquent entre eux par des contacts cellulaires et par des médiateurs protéiques solubles, les **lymphokines**.

Les lymphocytes B reconnaissent spécifiquement les intrus via leurs anticorps membranaires, leur fournissant ainsi un signal d'activation. Les anticorps sont des protéines (Immunoglobulines, Ig) qui se fixent spécifiquement à des structures moléculaires présentes sur les antigènes, les épitopes. Pour que la réponse immunitaire spécifique puisse se dérouler il faut que ces lymphocytes reçoivent d'autres signaux activateurs, et qu'ils puissent se diviser et se différencier en plasmocytes sécréteurs d'AC, ou en lymphocytes B mémoire.

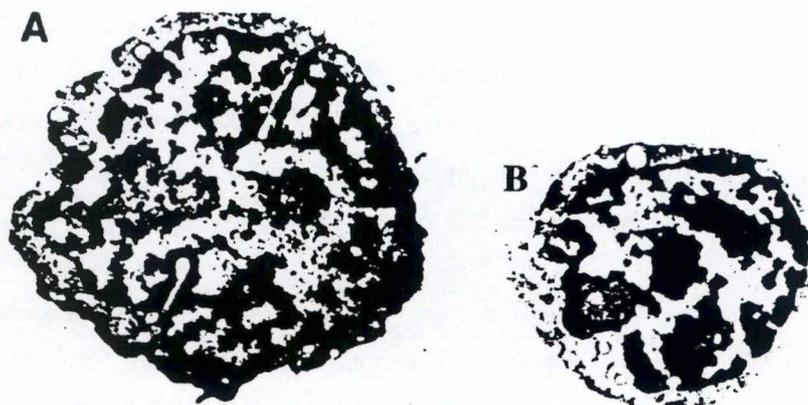
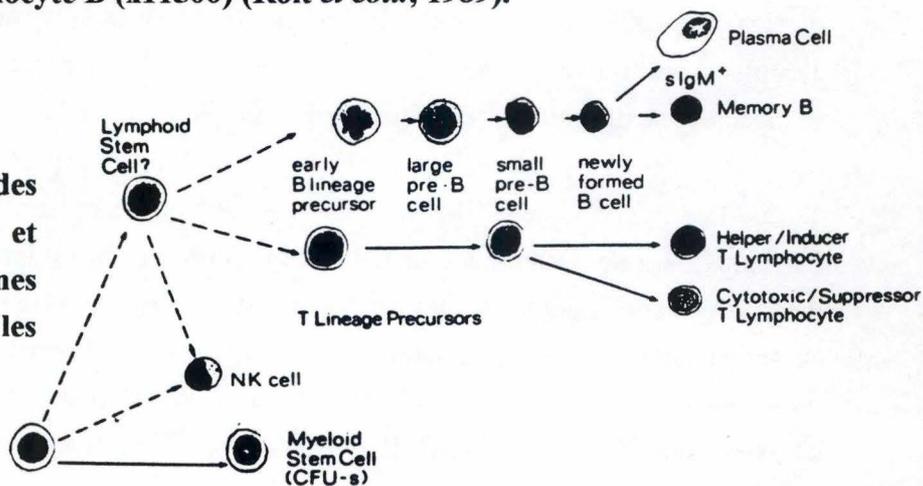
Les lymphocytes T helper (Th) peuvent apporter aux lymphocytes B les signaux costimulateurs nécessaires à leur activation (**figure 1-2**). Le lymphocyte Th est capable de reconnaître spécifiquement des fragments de l'intrus sous certaines conditions. L'intrus capté par des cellules présentatrices d'AG (Antigen Presenting Cells, APC), voit ses protéines être dégradées. Les peptides ainsi obtenus peuvent s'associer à des molécules d'histocompatibilité de classe II, être exportés en membrane et être présenté aux lymphocytes Th. Le lymphocyte Th reconnaît alors le complexe formé des molécules d'histocompatibilité et d'un peptide de l'intrus. La reconnaissance spécifique, et les émissions de signaux adéquats par l'APC, activent la cellule Th qui réagit en proliférant, puis en se différenciant. Ces cellules T helper vont alors synthétiser des cytokines qui vont constituer des signaux costimulateurs pour bon nombre de cellules effectrices. Ces cellules peuvent être des lymphocytes B, qui dans ce cas, et conjointement à la reconnaissance de l'AG, se transforment en plasmocytes et sécrètent des Ig spécifiques de l'AG.

Les lymphocytes T communiquent donc avec les cellules B via des molécules membranaires (jouant un rôle dans l'adhésion ou l'activation cellulaire), ou via des médiateurs solubles (agissant sur l'activation, la croissance ou la différenciation des cellules).



**Figure 1-3:** Ultrastructure des lymphocytes B et T au repos. A gauche un lymphocyte T (x10500), à droite un lymphocyte B (x11500) (Roit *et coll.*, 1989).

**Figure 1-4:** Filiation des lymphocytes (Kinkade et Gimble, 1989). (Les lignes discontinues décrivent les filiations non établies)



**Figure 1-5:** Micrographies électroniques de cellules pré B (A) et de B matures (B). (Ces photos ont été faites au même grossissement) (Kinkade et Gimble, 1989).

## **1.3. Les lymphocytes B.**

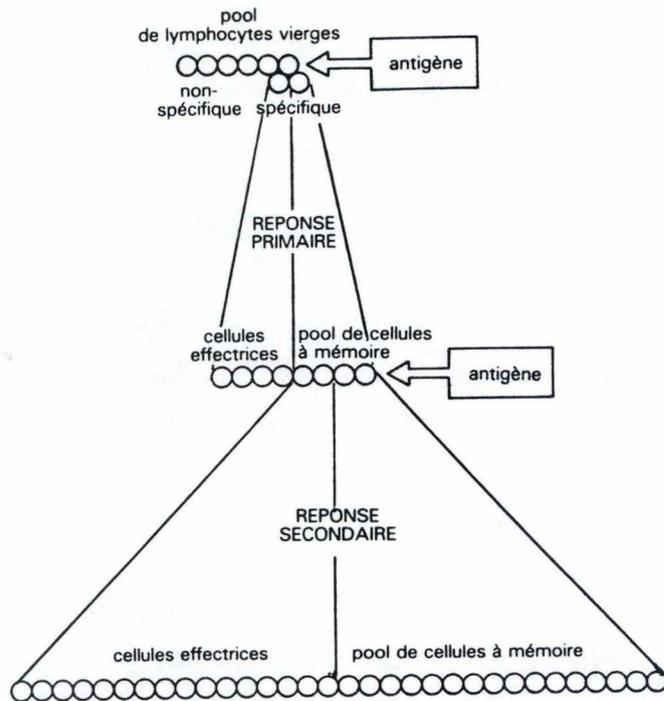
### **1.3.1. Les lymphocytes B normaux.**

Ce sont de petites cellules (5-10  $\mu\text{m}$ ) peu différenciables des cellules T du point de vue morphologique (**Figure 1-3**). Elles en sont différenciables principalement par leurs marqueurs membranaires et elles sont les seules à avoir des immunoglobulines (Ig) en membrane. La fréquence de ces cellules parmi les cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) est de l'ordre de 10% chez les humains adultes sains et de l'ordre de 20-25% chez les bovins sains.

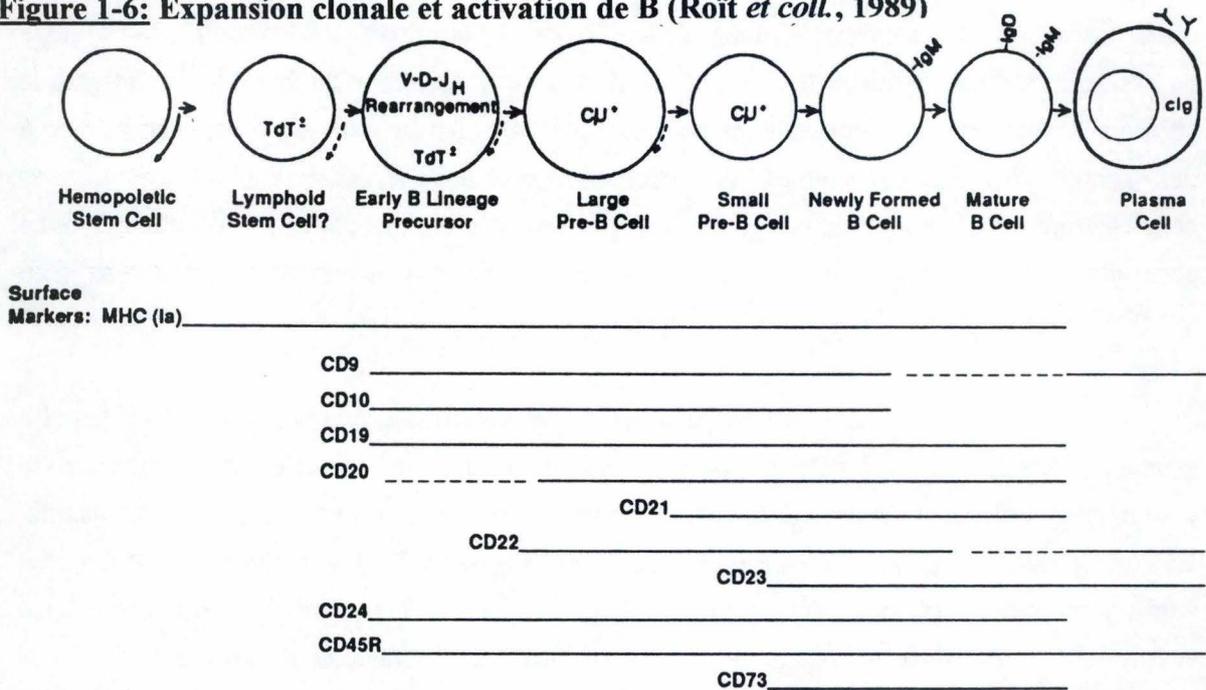
#### **A/ Ontogenèse des lymphocytes B.**

C'est au sein du foie fœtal ou dans la moelle osseuse chez l'adulte que commence le développement des cellules B. Les lymphocytes B ainsi que toutes les autres cellules sanguines, semblent dériver d'une ou de plusieurs cellules souches multipotentes. Ce type d'étude a été réalisé par marquage de ces cellules souches au niveau génomique, et par observation du phénotype de leur descendance (Abramson, S *et coll*, 1977). De nombreuses études de ce type ont permis de tracer un schéma de filiation hypothétique (**Figure 1-4**). Certaines cellules sont par exemple capables *in vitro* de donner naissance à des granulocytes, des érythrocytes, des macrophages et des mégacaryocytes. L'existence de cellules souches communes à la lignée lymphoïde n'a pas encore été mise en évidence avec certitude, mais les ressemblances entre les cellules B et T confortent l'hypothèse d'un ancêtre commun (Kincade et Gimble, 1989).

A l'origine des cellules B on trouve les cellules pro-B encore indifférenciées. La première cellule de la lignée B qui en est issue est une cellule pré-B dépourvue d'immunoglobulines en membrane, mais ayant des chaînes lourdes  $\mu$  dans le cytoplasme. Elle est de taille supérieure aux cellules B matures (**Figure 1-5**). C'est une cellule qui a déjà subi un réarrangement des gènes d'Ig. En effet l'extrême diversité des Ig produites par les cellules B ( $>10^8$ ), est due en grande partie à l'utilisation très variable de segments de gènes codants pour les différentes chaînes composant les Ig, et réarrangés au stade de cellule pré-B. L'arrangement final doit ainsi conduire la cellule à n'être capable de produire que des AC contre un seul type d'épitope.



**Figure 1-6: Expansion clonale et activation de B (Roit *et coll.*, 1989)**



**Figure 1-7: Marqueurs de différenciation de cellules B. (Kinkade et Gimble, 1989)**

L'étape suivante est l'acquisition de chaînes  $\mu$  en membrane. Les cellules deviennent alors des cellules B immatures. Ces cellules complètent leur maturation sur place ou migrent vers la rate et les ganglions lymphatiques. L'étape finale de maturation mènera à l'acquisition d'un grand nombre d'IgM membranaires ainsi que des marqueurs particuliers qui seront cités plus tard (par exemple les récepteurs au fragment Fc, les récepteurs au C3b et les molécules d'histocompatibilité de classe II). (Roitt *et coll.*, 1989). La différenciation ultime en plasmocyte sécréteur d'Ig ou en cellule B mémoire, précédée de la prolifération (expansion clonale), est sous la dépendance d'éventuelles rencontres avec des AG (**Figure 1-6**). Seules quelques rares cellules B portent les AC spécifiques à un épitope, il est donc nécessaire dès la reconnaissance que ces lymphocytes prolifèrent clonalement pour pouvoir inonder le sang d'anticorps spécifiques à l'intrus.

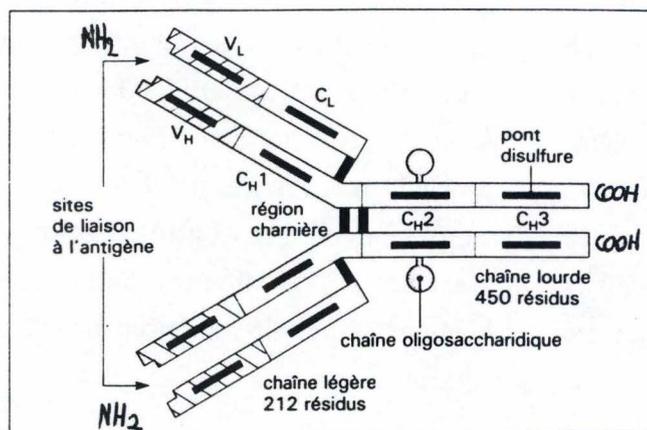
Chaque étape d'activation, de prolifération et de différenciation de ces cellules est régulée par l'émission et la réception de médiateurs solubles, les cytokines. Ces étapes sont également distinguées par la présence de marqueurs membranaires caractéristiques.

### **B/ Marqueurs membranaires.**

Cette progression vers la spécialisation s'accompagne de l'apparition ou de la disparition de marqueurs membranaires (**Figure 1-7**). En effet, au cours de la différenciation, bien d'autres marqueurs que les IgM se relaient en membrane. C'est le cas d'une série de glycoprotéines qui jouent le rôle de récepteur à cytokines, de molécules de reconnaissance ou de molécules d'adhésion. Ces molécules ont été définies et classées en groupe sur base de la reconnaissance par des groupes d'AC monoclonaux. Elles sont ainsi classées en groupes de différenciation (*Cluster of Differentiation*, CD).

Tandis que certaines de ces molécules sont exprimées tout au cours de la vie du lymphocyte B (comme les molécules d'histocompatibilité de classe II), d'autres sont caractéristiques de certaines étapes, mais aucun marqueur seul ne permet de déterminer l'étape de différenciation dans laquelle se situe une cellule de la lignée B.

Chez l'homme, la souris et le bovin sain, il existe une petite sous-population de lymphocytes B qui portent en membrane un marqueur typique des cellules T appelé CD5. C'est ce type de cellule qui retiendra le plus notre attention car il est à la base de ce travail et sera amplement détaillé plus loin.



**Figure 1-8:** Structure de base d'un anticorps (Roït *et coll.*, 1989).

Immunoglobulines	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	sIgA	IgD	IgE
Chaîne lourde	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	$\mu$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 1, \alpha 2$	$\delta$	$\epsilon$
Concentration sérique (mg/ml)	9	3	1	0.5	1.5	3	0.5	0.05	0.03	$5 \cdot 10^{-4}$
Masse moléculaire (Kda)	146	146	170	146	970	160	160	385	184	188
Demi-vie (jours)	21	20	7	21	10	6	6	?	3	2
% du contenu intravasculaire	45	45	45	45	80	42	42	trace	75	50
Constante de sédimentation	7S	7S	7S	7S	19S	7S	7S	11S	7S	8S
% d'hydrates de carbones	2-3	2-3	2-3	2-3	2-3	12	7-11	7-11	9-14	12

**Tableau 1-1:** Caractéristiques des immunoglobulines (Roït *et coll.*, 1989).

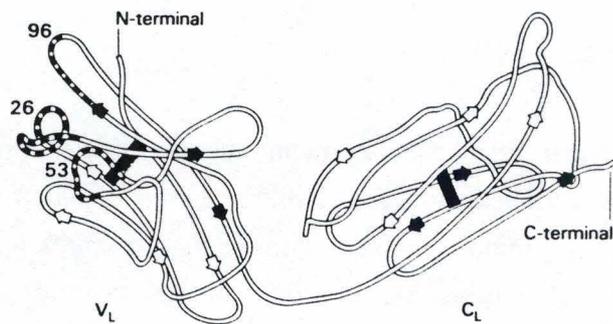
### C/ Les anticorps.

Les cellules B matures portent en membrane des anticorps spécifiques d'un épitope. Ces cellules une fois activées, peuvent donner naissance à des cellules plasmocytaires sécrétrices d'Ig ayant la même spécificité que les Ig présentes sur la cellule B dont ils dérivent. Les immunoglobulines, ou anticorps, sont des glycoprotéines présentes dans le sérum et les liquides intersticiels des vertébrés.

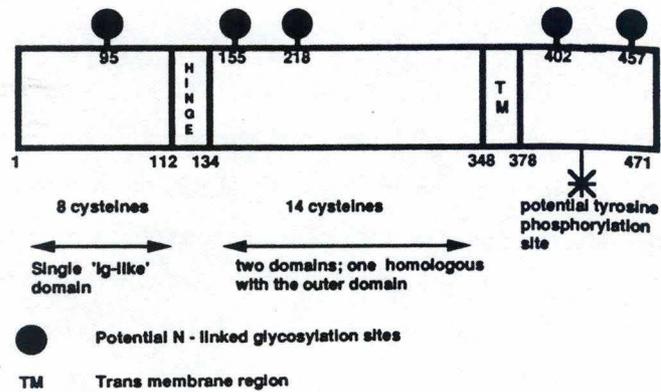
La structure de base commune à toutes les Ig est une unité de 2 chaînes polypeptidiques légères (25kDa) identiques et de 2 chaînes polypeptidiques lourdes (50-77 kDa) identiques. Les chaînes sont liées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 1-8**) pour former une structure térapeptidique. Les chaînes légères sont formées de deux régions distinctes. La moitié carboxy-terminale de cette chaîne est constante et est appelée région  $C_L$ . La moitié amino-terminale montre une grande variabilité de séquence et est appelée  $V_L$ . Selon la même logique, la région amino-terminale hautement variable des chaînes lourdes est nommée  $V_H$  et la longue région constante carboxy-terminale est nommée  $C_H$ . Cette partie  $C_H$  est elle même composée de trois domaines.

Les anticorps sont divisés en classes (ou isotypes) selon le type de chaîne lourde qu'ils possèdent. On distingue 5 classes d'Ig: les A, D, E, G et M déterminées par les chaînes lourdes  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\mu$ . Il existe de plus des sous-classes constituées de divers sous-groupes de chaînes lourdes. Ainsi les Ig de la classe G (IgG) et des sous-classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 ont des chaînes lourdes appelées respectivement  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  et  $\gamma_4$ . Il existe 2 types de chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$ , pouvant être trouvées sur toutes les classes d'Ig. Les caractéristiques des différentes Ig sont résumées dans le **tableau 1-1**.

Le domaine de reconnaissance de l'AG est formé par le rapprochement des régions V d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde. Le repliement spatial de ces régions (**Figure 1-9**) va former le paratope, c'est-à-dire une structure moléculaire épousant la forme de l'épitope et étant capable de former avec lui un grand nombre de liaisons non covalentes. Le nombre et la solidité de ces liaisons sont des caractéristiques propres à chaque anticorps. Ces paramètres sont regroupés sous le terme d'affinité.



**Figure 1-9:** Structure spatiale de la région de fixation de l'AC à l'AG (Roit *et coll.*, 1989).



**Figure 1-10:** Structure du marqueur CD5 (Lydyard *et coll.*, 1992).

#### D/ Action des lymphocytes B.

En plus de leur rôle sécréteur d'Ig, ils sont capables d'ingérer des intrus reconnus via leurs AC, même quand la quantité d'AG est limitée, et d'en présenter des fragments digérés au sein de leurs molécules histocompatibilité aux lymphocytes T. Ils jouent alors le rôle d'APC. Cette reconnaissance induit une activation des lymphocytes T et une action ciblée du système spécifique.

Il existe néanmoins des lymphocytes B qui possèdent des caractéristiques qui les distinguent des lymphocytes B normaux. Nous allons étudier en particulier les lymphocytes B possédant à leur surface le marqueur CD5, inhabituel chez les cellules B.

#### 1.3.2. Les lymphocytes B CD5<sup>+</sup>.

Le CD5 est un marqueur présent sur la majorité des lymphocytes T périphériques. Même si ce marqueur est rare chez les lymphocytes B, il existe une petite sous-population de cellules B qui le porte en membrane. Cette population minoritaire suscite un intérêt particulier depuis la mise en évidence du fait que ces cellules pouvaient devenir majoritaires dans certaines maladies virales ou parasitaires (par exemple dans le cas d'infections par le virus de la leucose bovine ou la trypanosomiase). De plus elles montrent des caractéristiques inhabituelles par rapport aux cellules B normales. Les premières études concernant ces cellules ont été faites sur leur homologue murin appelé Ly-1. Une nomenclature récente accorde le nom de cellules B-1 aux cellules B portant le marqueur CD5 ou Ly-1 et de B-2 aux cellules B conventionnelles (Kantor A. B., 1991,a). Mis à part le CD5, ces cellules B CD5<sup>+</sup> n'expriment aucun autre marqueur typique des cellules T (Hardy R.R et Hayakawa K., 1986).

La protéine de CD5 mature a une masse de 67 000 Daltons. Elle est composée de trois parties (**Figure 1-10**), une partie extramembranaire NH<sub>2</sub> terminale de 347 acides aminés, une partie trans-membranaire de 30 acides aminés et une partie cytoplasmique COOH terminale de 94 acides aminés. Cette dernière partie cytoplasmique est hautement conservée entre le CD5 humain et le Ly-1 murin et de nombreuses études ont rapproché cette structure des domaines transducteurs de signaux de certains récepteurs cellulaires (site potentiel de phosphorylation de tyrosine) (Lydyard *et coll.*, 1992). La partie extramembranaire, elle, a une structure Ig-like (Huang *et coll.*, 1987). En effet, chez les

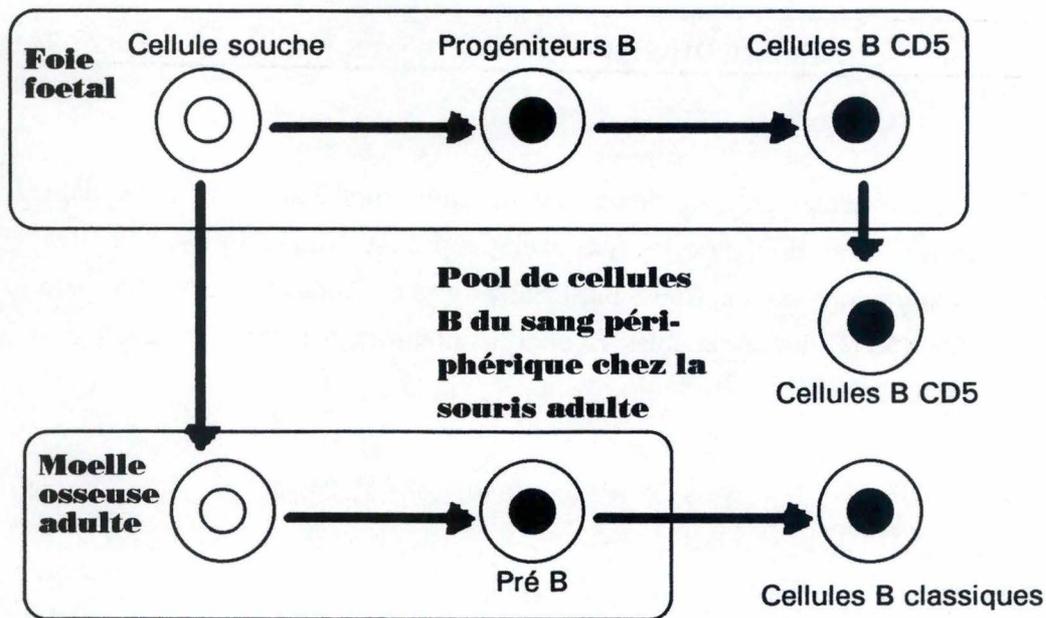
lymphocytes T cette protéine est considérée comme une molécule accessoire dans l'activation cellulaire. La liaison de molécules (par exemple des ACm spécifiques) aux CD5 induit d'ailleurs une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Le ligand de cette molécule nommé CD72, a été détecté sur les cellules B et jouerait un rôle dans l'activation des cellules T (Thielemans K. *et coll.*, 1991).

### A/ Origine des cellules B CD5<sup>+</sup>

Il existe deux hypothèses quant à l'origine de ces cellules. Il pourrait s'agir de cellules B normales qui seraient activées au point d'acquérir le marqueur CD5. Cette hypothèse est défendue par les caractéristiques d'activation de la cellule B CD5, et surtout par le fait que l'expression du CD5 est inductible sur des cellules B normales par l'utilisation de 12-o-tétradécanoylphorbol 13 acétate (TPA) (Lydyard *et coll.*, 1992). Le TPA diffère néanmoins des stimuli classiques dans le fait qu'il n'agit pas via un récepteur mais active directement la protéine kinase C (Nishizuka Y., 1984). Par ailleurs l'IL-4 inhibe spécifiquement l'expression du CD5 sur les cellules B de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (des cellules B qui normalement acquièrent le CD5 au cours de l'évolution de la maladie) (Hidaka T., *et coll.*, 1992). Mais, même si les lymphocytes B CD5 semblent être des cellules B activées, l'activation des lymphocytes B classiques par les voies habituelles (stimulation via les AC de surface) ne réussit pas à induire l'expression du marqueur CD5 (Kipps, T.J., 1989).

La seconde hypothèse consiste à penser que les cellules B CD5 font partie d'une lignée distincte des cellules B. L'apparition précoce de ces cellules chez le fœtus, et leur densité importante dans certains organes sont pour certains les preuves de l'existence d'une lignée distincte. Une partie des travaux de Hayakawa K. *et coll.* en 1985, même s'ils étaient prudents dans leurs affirmations, ont permis à plusieurs chercheurs d'étayer l'hypothèse de la lignée distincte. Par exemple, si on transplante de la moelle osseuse à une souris irradiée et ayant perdu toute sa population lymphocytaire, on n'observe aucune apparition de cellules B CD5. Donc les précurseurs des cellules B CD5 de souris seraient localisés ailleurs que dans la moelle osseuse (Hardy *et coll.*, 1985).

Ce même groupe sept ans plus tard expose une nouvelle hypothèse: il y aurait en fait deux lignées pour les cellules B chez la souris mais toutes deux issues d'un même



**Figure 1-11:** Filiation hypothétique des lymphocytes B murins. (Hardy R.R. *et coll.*, 1992)

Cellules B portant le marqueur donné.	Cordon ombilical	11 mois	1-6 ans	7-17 ans	18-70 ans
% de cellules B CD5+	72	68	64	56	27

**Figure 1-12:** Pourcentages lymphocytaires des cellules B CD5 par rapport au taux de cellules B chez l'homme en fonction de l'âge (Poster Immunology Today, juin 1992).

précurseur fœtal (Hardy R.R., 1992). Il y aurait une lignée issue des précurseurs des cellules B du foie fœtal procurant des cellules B CD5, et une lignée issue de la moelle osseuse procurant des lymphocytes B normaux (**Figure 1-11**). Des études génétiques ont permis de postuler pour un schéma de filiation hypothétique selon lequel les cellules B CD5 seraient originaires d'une voie de différenciation fœtale tandis que les cellules B CD5<sup>-</sup> émergeraient continuellement de précurseurs présents dans la moelle osseuse. Il existe cependant une contradiction à ce modèle: comment une cellule B CD5<sup>-</sup> pourrait acquérir le marqueur CD5 par stimulation? De plus, à l'opposé de la souris, la moelle osseuse humaine contient des cellules capables de générer des lymphocytes B CD5 (Ault K.A. *et coll.*, 1985).

### **C/ Distribution des cellules B CD5<sup>+</sup>**

Ces cellules sont minoritaires chez l'homme adulte, elles forment 27% de la population des cellules B, ce pourcentage varie fortement en fonction de l'âge. En effet dans le cordon ombilical humain elles forment 72% de la population des cellules B (**Figure 1-12**) et ce sont les premiers lymphocytes B à coloniser les tissus lymphoïdes au cours du développement du système immunitaire humain. Ces cellules fréquentes chez les nouveau-nés, diminuent en proportion au fur et à mesure que l'individu approche l'âge adulte (Lydyard *et coll.*, 1992). Elles constituent moins de 10% des cellules B spléniques chez l'adulte, mais peuvent atteindre jusqu'à 30% des cellules B dans les nœuds lymphoïdes et les amygdales enflammées (Kipps T.J., 1989).

Chez la souris, les lymphocytes B CD5 sont normalement absents des nœuds lymphoïdes, du sang ou de la moelle osseuse, mais elles constituent une sous-population lymphoïde majeure dans la **cavité péritonéale** (50% des cellules B péritonéales récoltées), (Kipps T.J., 1989). Un groupe a de plus rapporté que 70% du faible pourcentage des lymphocytes B présents dans le thymus (1%) portaient le marqueur CD5 (Miyama-Inaba M., *et coll.*, 1988). Mais les études qui ont tenté de confirmer cette observation n'ont pas pu mettre en évidence ces cellules B CD5 car leurs analyses se situaient dessous de la limite de détection de ce faible pourcentage de cellules. Ceci souligne le fait qu'au mieux les lymphocytes B CD5 constituent une sous-population rare dans le thymus murin.

Chez le bovin sain les cellules B CD5 sont détectables dans le sang circulant périphérique (23% des cellules B en moyenne) et dans la rate (6% des cellules B en

moyenne) mais sont à l'état de traces dans les nœuds lymphoïdes (3% des cellules B) et les plaques de Peyer (moins de 1% des cellules B) (Naessens J. et Williams D., 1992).

Les lymphocytes B CD5 sont par ailleurs présents voire constitutifs dans certaines leucémies chez l'homme (Leucémie Lymphoïde des Cellules B, B-CLL) (Youinou P. *et coll.*, 1993), ou chez le bovin (par exemple dues au virus de la leucose bovine, BLV) (Depelchin A. *et coll.*, 1989). On les retrouve également dans le sang de bovins atteints d'infections parasitaires (trypanosomiase) (Naessens J. et Williams D., 1992), et elles semblent également jouer un rôle dans des maladies auto-immunes (Lydyard *et coll.*, 1992). Dans le cas du HIV chez l'homme, on observe que le pourcentage de cellules B CD5 est beaucoup plus élevé chez les séropositifs que chez les individus normaux, et que ce taux montre une corrélation positive avec la progression des dommages immunitaires causés par le HIV. Ces résultats suggèrent une relation entre la proportion de cellules B CD5 et une série de phénomènes autoimmunitaires détectés au cours de l'infection HIV (Sampalo A., *et coll.*, 1993).

#### **D/ Caractéristiques et rôles des cellules B CD5<sup>+</sup>.**

Les cellules B CD5 ont de nombreux points communs avec les cellules B normales (par exemple concernant la capacité de servir d'APC). De plus les cellules B CD5<sup>-</sup> et les cellules B CD5<sup>+</sup> sont toutes capables d'être activées par "cross-linking" de leurs Ig de surface ou d'un marqueur membranaire nommé CD40, et elles montrent le même pattern de croissance en réponse à une stimulation cytokinique conjointe (Defrance T., *et coll.*, 1992).

La morphologie de ces cellules chez la souris est différente des cellules B normales, elles sont plus grandes et plus granuleuses (Hyakawa et Hardy, 1988). Leur taux d'IgM membranaires est de 3 à 5 fois supérieur, et le taux d'IgD nettement inférieur. Les cellules B CD5 sont, de plus, capables de synthétiser de l'IL-10, une cytokine produite généralement par les lymphocytes Th2 (voir plus loin) (O'Garra *et coll.*, 1992). Ces auteurs pensent que cette synthèse autocrine d'IL-10, pourrait expliquer la prolifération de ces cellules dans certaines maladies autoimmunes chez la souris ou dans les leucémies lymphoïdes des cellules B humaines (B-CLL).

Par ailleurs un pourcentage non négligeable des cellules B CD5<sup>+</sup> (8% en moyenne) sont, dans leur cycle cellulaire, en phase S de synthèse d'ADN (phase précédant la division

cellulaire) , ou peuvent y être ammenées par la présence d'IL-2 (Matheise JP, *et coll.*, 1992). Toutes ces caractéristiques sont en faveur d'un état d'activation généralisé (Werner-Favre *et coll.*, 1989). La question reste de savoir si ce sont des lymphocytes B CD5<sup>-</sup> activés au point d'exprimer le CD5, ou bien s'ils font partie d'une lignée distincte des cellules B normales. En effet, le fait que la liaison du ligand du CD5, le CD72, ainsi que d'esters de phorbol, puisse induire une phosphorylation du CD5, et puisse jouer un rôle dans leur état d'activation (Davis A. *et coll.*, 1992) appuie la première hypothèse.

Des études menées sur la souris et sur l'homme ont indiqué que cette sous-population de lymphocytes était responsable de la production d'AC polyréactifs et autoréactifs (contre par exemple l'actine ou l'insuline), et donnait naissance à des "anticorps naturels" présents dans le sérum (comme certains éléments bactériens ou viraux) (Kasaian M.T., *et coll.*, 1992). Le nom d'AC naturel est donné aux anticorps produits par certains lymphocytes B en dehors d'un contact préalable connu avec l'AG. De tels AC sont entre autre responsables de l'immunité contre le groupe ABO (Lydyard *et coll.*, 1992).

Le rôle de ces lymphocytes est encore inconnu, mais une hypothèse leur attribue un rôle dans la maintenance de la mémoire immunitaire. L'équipe de UytdeHaag F. *et coll.* (1991) propose que les régions V des anticorps des cellules B CD5 pourraient avoir une spécificité pour des idiotypes particuliers (structure antigénique de la région V des AC). Par ce fait, leurs AC pourraient mimer la présence de l'AG en l'absence de celui-ci et assurer une mémoire à long terme par la capacité qu'ont ces cellules à s'auto-renouveler. Il a été également montré que ces cellules sont responsables d'une grande partie des IgM circulants (Hayakawa K., *et coll.*, 1984) et de la production d'AC anti-bactériens (Mercolino T.J., *et coll.*, 1988). On suppose que la place importante qu'occupent ces cellules dans de nombreuses pathologies, pourrait s'expliquer par le fait que ce sont des cellules régulatrices et que leur mauvais fonctionnement entraîne de graves complications.

## 2. Les cytokines: les médiateurs immunitaires.

Les **cytokines** sont des polypeptides produits par des cellules du système immunitaire. Récemment au terme cytokine fut associée la définition suivante : "*groupe de régulateurs de protéines cellulaires, appelés soit lymphokines, monokines, interleukines ou interféron, et produits par une variété de cellules jouant un grand rôle dans les réponses physiologiques, impliquées dans la pathophysiologie d'une série de maladies et ayant des propriétés thérapeutiques*" (Balkwill F.R. et Burke F, 1989).

La classification actuelle des cytokines, divise celles-ci en Facteurs de Croissance, Lymphokines, "Colony stimulating factors", "Transforming Growth Factors" et interférons.

Les cytokines ont les caractéristiques communes suivantes: (Vilcek et Le, 1991)

- La production constitutive des cytokines est souvent basse ou nulle.
- La majorité des cytokines ont à l'extrémité 3' de leur ARN messager (ARNm) une séquence riche en A/U non traduite.
- Ce sont de simples polypeptides ou glycoprotéines d'un poids moléculaire de 15 à 30kDa (certaines formant des oligomères d'un poids moléculaire supérieur).
- Leur production est transitoire et leur temps de demi-vie est court (elles ont donc une action autocrine ou paracrine plutôt qu'endocrine).
- Bien que les actions des cytokines soient étendues et diverses, la majorité des cytokines agissent sur des cellules hématopoïétiques.
- Les cytokines exercent leurs effets en se liant à des récepteurs de haute affinité à la surface des cellules (Kd de l'ordre du  $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  M).
- La plupart des actions des cytokines peuvent être résumées en la modification de l'expression génique chez les cellules cibles. Elles peuvent induire une variété de réponses sur les cellules cibles, comme par exemple la variation du taux de prolifération ou des changements des états de différenciation cellulaire.

Les cytokines diffèrent des facteurs de croissance, en ce sens que ces derniers sont souvent produits constitutivement, rarement aussi finement régulés que les cytokines, et

agissant principalement sur les cellules non hématopoïétiques. Elles diffèrent des hormones par leur temps de demi-vie, par leurs cibles multiples et par le fait que si les hormones doivent être synthétisées le plus souvent par des cellules particulières (par exemple l'insuline produite par les cellules des îlots de Langerhans pancréatiques), une cytokine peut, elle, être produite par des cellules très différentes, même non apparentées (par exemple la production d'interféron- $\gamma$  par les cellules T et NK). Si de nombreuses homologies entre les cytokines de différentes espèces existent, le croisement interspécifique de leurs activités n'est pas une règle générale (par exemple l'IL-10 de souris n'agit pas sur les cellules humaines mais l'inverse est possible).

## 2.1. Réseaux cytokiniques.

Il existe un réseau extrêmement dense de communications chimiques entre les cellules, menant ou participant à leur activation, leur inhibition, ou plus généralement en modifiant leur état. Ce réseau est appelé réseau cytokinique.

Une caractéristique des cytokines est leur capacité de **stimuler ou d'inhiber** la production d'autres cytokines. Pour cette raison la plupart des actions des cytokines sont indirectes, augmentant ou diminuant le niveau de production d'autres molécules. Par exemple l'action stimulatrice de l'IL-1 via l'IL-2. Les macrophages stimulent la réponse des lymphocytes T en conjonction avec la reconnaissance antigénique, en libérant de l'IL-1 qui est nécessaire à la production d'IL-2 par les cellules T et à leur activation (Smith *et coll.*, 1980).

Par ailleurs, les cytokines au sein des réseaux, peuvent moduler le niveau d'**expression de récepteurs** à cytokines, comme la capacité qu'a l'IL-1 à stimuler l'apparition de récepteurs à l'IL-2 à la surface des lymphocytes T. Certaines de ces modulations semblent emprunter les voies d'activation de la protéine kinase C (Holtmann et Wallach, 1987).

Bien que de nombreux schémas aient été réalisés, compilant de nombreuses données sur des cytokines particulières, ces images sont très peu réalistes, car l'action des cytokines peut être fortement déterminée par le milieu dans lequel elles agissent et de la présence ou l'absence d'autres molécules biologiques. Pour mieux comprendre ces actions

antagonistes (s'opposant) ou **synergiques** (ayant un effet plus marqué que la somme des effets des cytokines séparées) de nombreuses études ont été entreprises analysant les propriétés des mélanges de cytokines (deux ou plus). On observe que les actions synergiques sont beaucoup plus rares entre des cytokines qui utilisent les mêmes voies d'action qu'entre des cytokines qui exercent des actions proches mais qui les manifestent par d'autres voies métaboliques.

Un mélange de cytokines peut non seulement agir synergiquement, mais également produire des **effets qualitativement différents** des cytokines utilisées seules. En effet deux cytokines n'ayant aucun effet séparément, même à haute concentration, peuvent se révéler très actives quand elles sont associées (Par exemple l'IFN- $\gamma$  qui autorise l'action cytotoxique du TNF sur les cellules tumorales, Vilcek et Le, 1991).

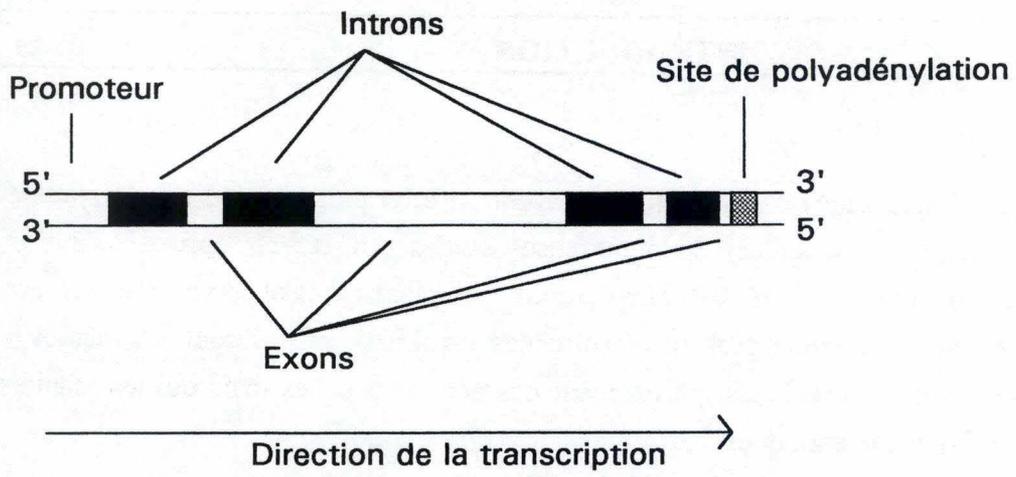
Au sein de ces réseaux, les cytokines montrent de nombreux rôles, et agissent aux différents niveaux présentés ci-dessous:

- Contrôle de la prolifération cellulaire.
- Contrôle de la différenciation cellulaire et du phénotype.
- Régulation de l'hématopoïèse.
- Régulation de la réponse immunitaire par le contrôle des défenses de l'hôte face aux infections, ainsi que la régulation des réponses inflammatoires et de la fièvre.
- Réparation de blessures.
- Remodelage osseux et formation de tissus.
- Influence sur le métabolisme cellulaire et sur le contrôle de l'équilibre d'azote.

Les connaissances sur les rôles des cytokines dans ces situations commencent à ouvrir des perspectives thérapeutiques.

## **2.2. Structure des gènes et expression.**

Les gènes de cytokines sont, comme la plupart des gènes eucaryotes, composés d'introns et d'exons. Les introns seront éliminés lors de l'épissage de l'ARNm, laissant les exons comme seules parties codantes. En **amont** des régions codantes de ces gènes (extrémité 5') se trouvent les séquences de contrôle destinées à amplifier ou promouvoir



**Figure 1-13: Structure d'un gène eucaryote.**

l'expression du gène (Enhancer et Promoteur). On trouve également des sites régulateurs ("Response Elements") "allumant" ou "éteignant" le gène en réponse à des facteurs de stimulation, c'est-à-dire lui permettant de s'exprimer ou non (**figure 1-13**). De tels mécanismes sont essentiels pour des gènes qui doivent réguler des réponses physiologiques rapides. En **aval** des régions codantes (extrémité 3') se trouvent des séquences qui contrôlent la terminaison de la transcription et l'addition d'une queue de polyadénine (poly A) sur l'ARN messager.

L'étude des séquences d'ADN et d'ARNm ne suffit pas à rendre compte de la séquence exacte en acides aminés de la cytokine mature et active, car les protéines précurseurs sont fortement soumises à des modifications après leur traduction tels que des **clivages protéolytiques**. Par exemple l'IL-1 $\beta$  est produit comme un long précurseur inactif, et est rendu actif par clivage d'une de ses extrémités.

Analysons maintenant les différents facteurs influençant la synthèse d'une cytokine.

### **2.2.1. Voies d'activation par messagers secondaires.**

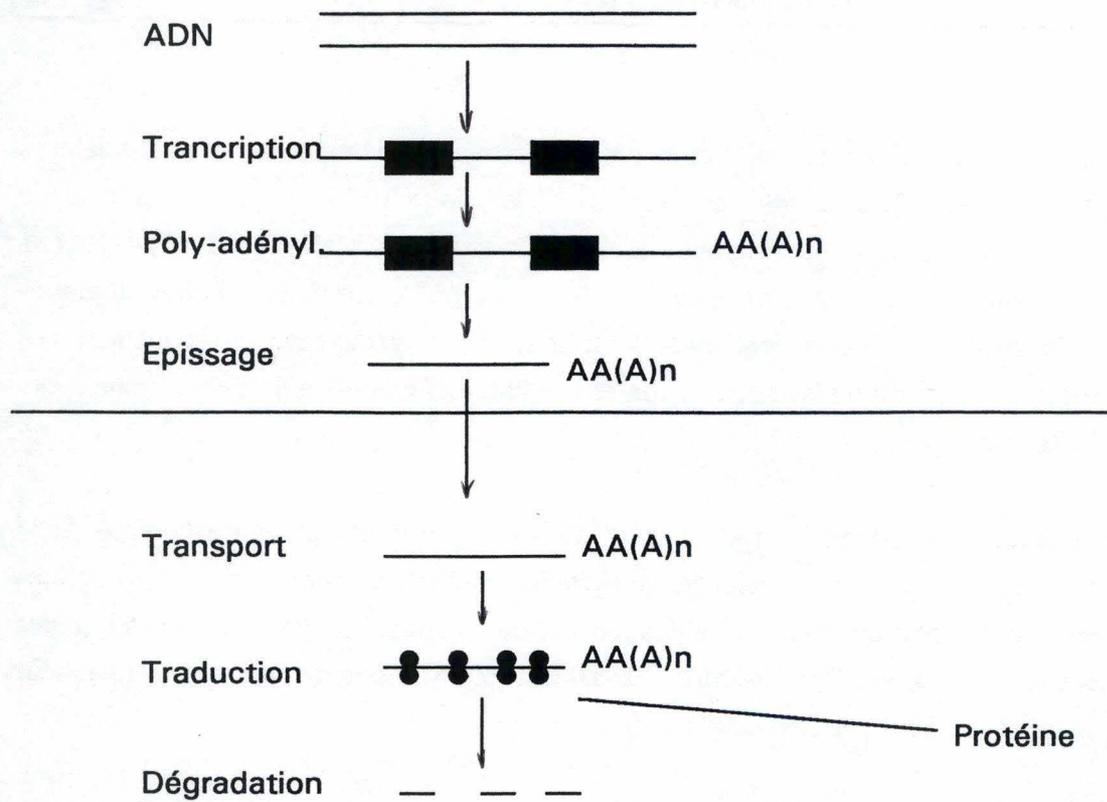
Comme on l'a vu avant, les lymphocytes synthétisent des cytokines sous certaines conditions et en réponse à certains stimuli. Ces stimuli sont le plus souvent des liaisons de ligands à des récepteurs membranaires. Ces liaisons induisent la transduction en un signal intracellulaire par le récepteur.

Les messagers intracellulaires déclanchant la synthèse d'une cytokine varient avec le type de cellule et le type de stimulus. Dans certains cas des stimuli peuvent induire la synthèse d'un groupe de cytokines. Les mécanismes se déroulant entre la libération de ces messagers intracellulaires et l'induction de la transcription sont encore très peu connus. (Trout A.B. et Kelso A., 1992)

### **2.2.2. Facteurs transcriptionnels.**

L'expression des gènes de cytokines, est régulée à différents niveaux:

- La maturation de l'ARNm
- Ses changements de stabilité et sa capacité d'être traduit en protéine.
- Mais le point de contrôle fondamental est la transcription, qui est, à l'état de repos,



**Figure 1-14: Niveaux de régulation post-transcriptionnelle.**

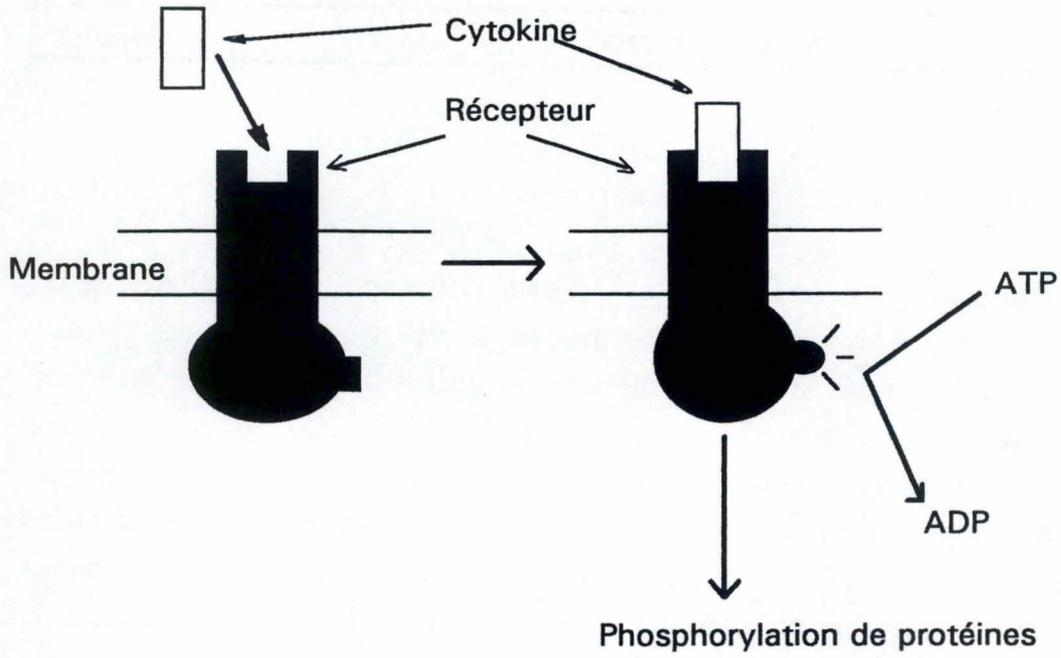
souvent réprimée d'une manière encore très mal connue.

La spécificité de l'expression des cytokines et des récepteurs à cytokines est un problème fondamental. L'expression de cytokines ou de récepteurs à cytokines par une cellule est rarement constitutive et nécessite une stimulation préalable. L'action de ces stimuli est basée sur leur transduction en facteurs **transactifs** pouvant agir au niveau des gènes de cytokine ou de récepteurs à cytokine. Il semble, bien souvent, que la phosphorylation de protéines rend celles-ci capables de se lier à des structures génomiques, induisant ou réprimant la transcription. Des protéines liant l'ADN ont été identifiées comme interagissant avec des "Response Elements" de l'IL-2, l'IL-6 et l'IFN- $\beta$ . Bien que certains de ces facteurs soient spécifiques au gène en question il semble que plusieurs de ces gènes puissent être activés par un même set d'activateurs (Trout A.B et Kelso A., 1992). L'accessibilité d'un gène particulier de cytokine à des facteurs de liaison de l'ADN est en fait l'élément clé qui permettra de comprendre la spécificité de la production de cytokines. (Kelso A., 1989).

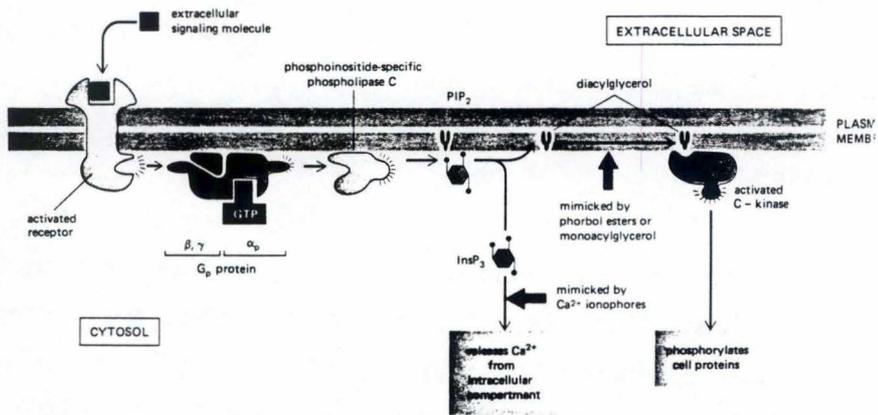
Il existe de plus une régulation encore inconnue, qui limite le temps de sécrétion d'une cytokine donnée. Des contrôles négatifs rendraient la cellule temporairement réfractaire à une stimulation ultérieure (Kelso A., 1989)..

### **2.2.2. Facteurs post-transcriptionnels.**

Il existe beaucoup de niveaux de régulation entre la transcription et la traduction (**Figure 1-14**). L'instabilité des ARNm (voir avant) semblerait en partie due à la présence de séquences riches en A-U à l'extrémité 3'. Des enzymes ont été identifiées comme reconnaissant et dégradant spécifiquement ces séquences (Malter J.S., 1989). Ces protéines contrôlent la quantité de cytokines secrétées. De plus, à chaque étape de la maturation des ARNm et des protéines correspond un niveau de régulation. Bref, l'expression d'un gène ou sa transcription ne rend pas compte nécessairement de la sécrétion réelle d'une cytokine active. Néanmoins, la détection du messager permet d'entreprendre une investigation plus profonde quant à la production d'une protéine active, alors que la non-détection assure de la non-production de la protéine ou d'une quantité de sécrétion très faible.



**Figure 1-15: Activité tyrosine kinase.**



**Figure 1-16: Régulation de l'activité de la protéine G.**

## 2.3. Transduction du signal par le récepteur.

Les cytokines produisent leurs effets en activant un récepteur membranaire, qui se charge de transmettre le signal à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs comportent trois parties, une extracellulaire, une membranaire et une cytoplasmique. Si les effets des cytokines peuvent être modifiés par leur taux de synthèse, ils peuvent aussi l'être par des régulations au niveau des récepteurs des cellules cibles (internalisation des récepteurs ou inactivation).

La transduction du signal se fait par la libération de messagers secondaires, par la phosphorylation de protéines et parfois même par l'internalisation du complexe récepteur-cytokine et action directe de celui-ci au niveau du noyau (Kushnaryov, V.M. *et coll.*, 1985). De rares récepteurs ont une activité enzymatique propre comme l'activité tyrosine kinase (Reich N.C. *et coll.*, 1990) (**figure 1-15**) mais la plupart nécessitent l'intervention de protéines G (liant le GTP) jouant le rôle de navette entre le récepteur activé et des enzymes, telles que les adénylate cyclases, qui libèrent des messagers secondaires (**Figure 1-16**). Ces messagers secondaires peuvent être l'AMPc, les phospholipases, ou plus généralement la voie impliquant les diacyl-glycérols ou des inositols tri-phosphate (Clemens M.J., 1991).

## 2.4. Types de lymphokines.

On peut classer les lymphokines de deux manières différentes, soit en les divisant selon les cellules productrices (par exemple les lymphocytes ou les monocytes) ou selon les cellules cibles (par exemple les lymphocytes B ou T). Quel que soit le mode de classement adopté il y aura des lymphokines qui se retrouveront dans plusieurs catégories. Ici nous choisirons arbitrairement la méthode de classement par cellules cibles, et nous allons citer en exemple des lymphokines agissant aux différentes étapes de la différenciation des cellules B.

### 2.4.1. Lymphokines agissant sur les cellules B.

La prolifération des cellules **pro-B** et **pré-B** est stimulée entre autre par l'IL-7. L'IL-4 joue un rôle fondamental dans l'activation et la prolifération des **cellules B matures**.

Elle induit une augmentation de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et du CD23 (récepteur des IgE) chez les lymphocytes B au repos, et les prépare à entrer en phase S du cycle cellulaire en réponse à des mitogènes (Rabin et coll., 1985).

L'IL-2 coopère avec d'autres lymphokines comme l'IL-4 et l'IL-5, pour soutenir la croissance des lymphocytes **B activés** et leur prolifération.

Une grande variété d'autres lymphokines comme l'IL-1, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 ou l'IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ , sont, elles, capables de stimuler la croissance des cellules B matures activées préalablement par d'autres molécules (*Staphylococcus Aureus* ou anti-Ig) (Vilcek et Le, 1991).

L'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  agissent en synergie pour faire introduire les lymphocytes B activés dans leur phase de différenciation **en plasmocytes**. L'IL-6 et l'IL-5 agissent toutes deux plus ou moins tardivement dans la phase finale de différenciation des lymphocytes B activés en plasmocytes.

Pendant une réponse immunitaire spécifique, sur les plasmocytes il se produit une commutation progressive de la classe d'immunoglobuline en fonction du type d'antigène. Ce phénomène est appelé la **commutation de classe** et est fortement influencé par l'environnement cytokinique. Il a, en effet, été démontré que l'IL-4 a un rôle dans la commutation de classe en induisant la production d'IgG1 par les plasmocytes (Snapper et Paul, 1987), que l'IL-5 joue un rôle dans la production d'IgA et que l'IFN- $\gamma$  favorise la sécrétion d'IgG2 et d'IgG3 (Roit *et coll.*, 1989).

Il existe de nombreuses autres cytokines pouvant également agir sur les lymphocytes B à des niveaux moins bien caractérisés. Les lymphocytes B CD5 de souris, par exemple, sont influencés par l'IL-10 alors que les cellules B classiques y semblent insensibles.

Nous allons maintenant passer en revue les lymphokines qui vont être impliquées dans ce travail.



## **2.5. Lymphokines étudiées.**

### **2.5.1. L'interleukine 2.**

#### **A. Structure de l'IL-2 et de son récepteur.**

L'interleukine 2 (IL-2) ou T-Cell Growth Factor est, dans l'espèce humaine, un polypeptide de 133 acides aminés, et est sécrété par les lymphocytes T activés. Sa "version" murine lui est à 70% similaire. L'IL-2 bovine a pu également être clonée et exprimée (Reeves *et coll.*, 1986). Le messager bovin a 81% d'identité avec le messager humain et la protéine bovine a 66% d'identité et 76% de similarité (Matrice de score de Dayhoff) avec son homologue humain (**Figure 1-17**). La structure de l'IL-2 humaine a été déterminée par analyse de diffraction aux rayons X (Bazan J.F., 1992) et semble très proche du "Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor" (GM-CSF). Son gène a été localisé chez l'homme et la souris sur les chromosomes 4 et 3 respectivement.

Le récepteur pour l'IL-2 (IL-2R) (**figure 1-18**) a également été l'objet de nombreuses recherches et les connaissances sur sa structure dimérique (chaînes H et L) sont maintenant bien avancées (Shaw A.R., 1991). On décrit, en fonction de leur affinité, trois types de récepteurs à l'IL-2: un récepteur p75 (ou H) ayant une affinité moyenne pour l'IL-2 et étant exprimé constitutivement par les cellules sensibles à l'IL-2; un récepteur p55 (ou L) de faible affinité nécessitant une activation de la cellule pour être exprimé; et un récepteur de haute affinité résultant de l'expression conjointe et de l'association des deux autres récepteurs. Lorsqu'elles sont activées de manière appropriée les cellules T sécrètent de l'IL-2, qui interagit avec les récepteurs à IL-2 et induit la croissance. Ce processus pourrait être de nature autocrine, ou paracrine (Roit I. *et coll.*, 1989)

#### **B. Activités biologiques principales de l'IL-2.**

L'IL-2 est produite par les lymphocytes T helper. L'IL-2 amplifie la croissance des cellules T et active les monocytes et les cellules Natural Killer (NK). L'IL-2 est un centre d'intérêt en thérapie immunosuppressive, car la compréhension des interactions ligand-récepteur pourraient permettre de développer des agents capables d'interrompre l'étape critique que cette lymphokine constitue dans la réponse immunitaire (Shaw, A.R., 1991). En clinique, de fortes doses d'IL-2 sont utilisées pour activer les précurseurs des NK en



lignées de Lymphokine Activated Killer (LAK) qui sont alors utilisées en immunothérapie anti-cancéreuse (Roit et coll., 1989).

L'IL-2 a de plus une activité sur les lymphocytes B activés par la reconnaissance antigénique, il est un des éléments induisant leur prolifération et leur sécrétion d'Ig.

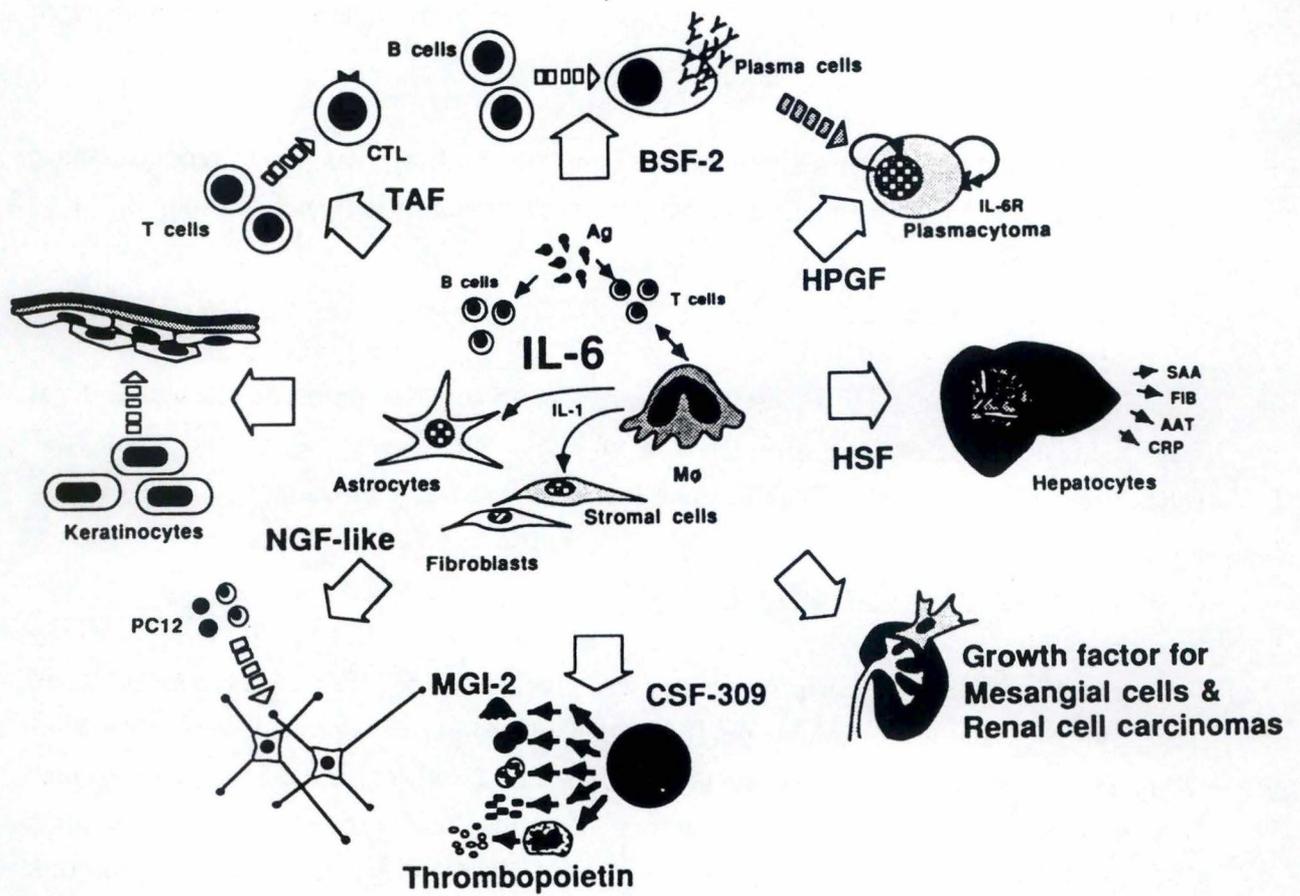
### **2.5.2. L'interleukine 6.**

L'interleukine 6 (IL-6) est également connue sous les noms de: facteur 26K, B Cell stimulatory factor 2 et  $\beta_2$ -interféron et elle a été récemment assimilée au HGF (Hybridoma Growth Factor) (Van Damme J. *et coll.*, 1988 et Van Damme J., 1989)

#### **A. Structure de l'IL-6 et de son récepteur.**

L'IL-6 humaine est produite en un précurseur de 212 acides aminés et est transformée en une forme soluble de 184 acides aminés par clivage d'un peptide signal de 28 résidus. La protéine mûre est une glycoprotéine de 26 kDa (Hirano *et coll.*, 1986) mais la glycosylation ne semble pas nécessaire à l'activité (l'IL-6 produite par *E. Coli* après insertion du gène est pleinement active). Le gène de l'IL-6 a été localisé sur le chromosome 7 humain et 5 murin. L'IL-6 peut être produite par une variété de cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les monocytes et les lymphocytes T. La séquence du messenger codant pour l'IL-6 bovine a été déterminée par Droogmans, L., *et coll.*, 1991. L'alignement des séquences des ARN messagers bovins et humains montre 78% d'identité, et l'alignement des séquences protéiques montre 54% d'identité et 69% de similarité (Matrice de score de Dayhoff), (**Figure 1-19**).

Le récepteur à l'IL-6 serait le résultat du "processing" d'un précurseur de 467 acides aminés avec une séquence signal de 19 résidus. La forme mûre comporte une région extracellulaire de 340 acides aminés, un domaine transmembranaire de 28 résidus et une région cytoplasmique de 82 résidus. Le domaine extracellulaire montre des homologies avec la famille des Ig et la partie intra-cytoplasmique ne montre pas l'activité tyrosine-kinase qui est observée dans le cas de nombreux récepteurs à cytokine (Shaw, R.A., 1991). L'expression du récepteur peut être régulée par l'état d'activation des B.



**Figure 1-20:** Actions pléotropiques de l'IL-6.

### **B.Activités biologiques principales de l'IL-6.**

Les activités biologiques de l'IL-6 sont si variées qu'il est difficile de prédire laquelle est d'un intérêt physiologique majeur (**Figure 1-20**). L'activité principale de l'IL-6 est sans doute, comme son ancien nom l'indique, de stimuler des lymphocytes B à se différencier en plasmocytes. Mais elle a de nombreuses autres propriétés comme, par exemple, celles d'un facteur de croissance pour les cellules B tumorales, de la synthèse de protéines dans le foie en réponse à une inflammation ou une blessure, ou d'un rôle d'amplificateur de signal pour de nombreuses activités des cellules T. (Clemens, M.J., 1991)

### **2.5.3. L'interleukine 10.**

Les interleukines-10 (IL-10) humaine et murine sont toutes deux codées par un gène présent sur le chromosome 1. On ne connaît pas encore la structure génomique de l'IL-10 humaine mais l'IL-10 de souris serait codée par cinq exons d'environ 5,1 kb. (Kim, J.M., et Moore, K.W. : données non publiées mais citées par de Waal Malefyt *et coll.*, 1992)

L'interleukine 10 (IL-10), aussi connue comme facteur inhibiteur de cytokine, est une "anticytokine" produite par les lymphocytes T-helper-2 (Th2) et inhibe la synthèse de cytokines par les T-helper-1 (Th1) (Mosman et Moore, 1991). Le cDNA de l'IL-10 de souris a été cloné, et montre une grande homologie avec l'open-reading frame BCRFI du virus Epstein-Barr (Moore, *et coll.*, 1990). Cette dernière remarque soulève l'hypothèse que le virus augmenterait ses chances de survie en inhibant la réponse immunitaire par l'apport d'un gène d'IL-10 "volé" aux eucaryotes et intégré au sein du virus.

L'IL-10 humaine est une protéine de 160 acides aminés et d'une masse de 18,5 kD, elle a un site potentiel de N-glycosylation mais n'est pas glycosylée chez les mammifères. Elle est issue d'un précurseur de 178 acides aminés. L'IL-10 humaine est en fait un homodimère de 39 KDa. (Vieira, P. *et coll.*, 1991).

Même si l'IL-10 de souris et l'IL-10 humaine ont 81% d'identité au niveau des ARNm et 73% de similarité au niveau protéique, l'IL-10 de souris ne produit pas d'effets sur les récepteurs à l'IL-10 des cellules humaines. Par contre l'inverse est possible.

Premier Exon:

1 ... ATGCCAGCA GCTCAGCCCT GCTCTGTTGC CTGGTCTTCC  
41 TGGCTGGGG TG.....

Deuxième et troisième exon.

1 CAAATGAAGG ACCAACTGCA CAGCTTACTG TTGACCCAGT CTCTGCTGGA  
51 TGACTTTAAG GGTTACCTGG CTTGCCAAGC CTTGTCGGAA ATGATCCAGT...

101 ... TTTACCTGGA AGAGTTGATG CCACAGGCTG AGAACCACGG GCCTGACATC  
151 AAGGAGCACG TGAACCTACT GGGGGGAAAG CAGAAGACCC TCCGGCTGCG  
201 GCTGCGGCGC TGT ...

**Figure 1-21:** Parties de séquences génomiques du gène l'IL-10 bovine. Séquences correspondant aux exons 1 (5' end), 2 et 3. (L. Droogmans, ULB, communication personnelle).

Chez le bovin une séquence génomique très homologue à l'IL-10 de souris a été mise en évidence dans les cellules bovines, mais l'expression de cette séquence n'a pas encore été mise en évidence (Droogmans L., (ULB), 1993, communication personnelle) (**Figure 1-21**).

### **A. Cellules productrices d'IL-10.**

Chez la souris plusieurs types cellulaires produisent l'IL-10: les lymphocytes Th2 et les lymphocytes B CD5<sup>+</sup> (O'Gara *et coll*, 1992a).

Chez l'homme les cellules Th1, Th2 et Th0 en produisent (Moore K. et Mosmann, 1992), ainsi que certaines cellules B (Suda T. *et coll.*, 1990), les monocytes (De Waal Malefyt, R., *et coll*, 1991a) et les cellules transformées par le EBV sous certaines activations (De Waal Malefyt, R., *et coll*, 1991a).

Chez l'homme et *in vitro*, le mRNA codant pour l'IL-10 apparaît 8 h après l'activation, et la protéine 24 h après activation. L'optimum de synthèse d'IL-10 se situe à 48 heures de culture *in vitro* (De Waal Malefyt, R., *et coll*, 1991a et Burdin, N., *et coll.*, 1993), *in vivo* le maximum de sécrétion tourne autour des 6 heures après stimulation par des anticorps anti-CD3 ou des lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Durez, P., *et coll.*, 1993).

### **B. Activités biologiques de l'IL-10.**

#### **B.1. Propriétés immunosuppressives de l'IL-10 *in vitro*.**

##### *1/ Rôle de Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (CSIF).*

L'IL-10 de souris produit par les Th2 **inhibe la sécrétion de certaines cytokines** par les Th1 indirectement via les macrophages, et ne semble avoir **aucun effet direct** sur les Th1 (Fiorentino, DF., *et coll.*, 1989, 1991). Des expériences similaires ont été entreprises sur les cellules humaines et ont donné des résultats identiques, mais cette fois avec les monocytes comme cellules intermédiaires (Del Prete *et coll.*, 1993).

De même l'IL-10 inhibe la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK si la préparation est enrichie en macrophages (Howard *et coll.*, 1992 et Del Prete G., *et coll.*, 1993)

L'IL-10 semble inhiber les fonctions d'APC des macrophages en agissant négativement sur l'expression des molécules de CMH de classe II (Howard M., *et coll.*, 1992).

*2/ L'IL-10 inhibe la prolifération dépendante de la reconnaissance antigénique des cellules T humaines.*

Quand des lymphocytes T au repos en présence de macrophages sont traités avec de l'IL-10, leur capacité à proliférer en réponse à une stimulation antigénique est inhibée. Cette caractéristique semble dépendante de la présentation antigénique via la diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II (de Waal Malefyt R., *et coll.*, 1991b).

## **B.2. Propriétés immunostimulatrices de l'IL-10 in vitro.**

*1/ L'IL-10 de souris est un facteur de différenciation des lymphocytes T.*

Il a été démontré que l'IL-10 n'a pas qu'une action inhibitrice sur les cellules T, il peut jouer le rôle de costimulateur de la prolifération des thymocytes CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>8<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> en combinaison avec de l'IL-2 (MacNeil I.A., *et coll.*, 1990). L'IL-10 aurait en fait un rôle de facteur de différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en cellules T cytotoxiques. En effet, des préparations purifiées de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cultivées en présence d'IL-10 et d'IL-2 montrent une activité cytotoxique significativement supérieure à ces mêmes cellules cultivées sans IL-10 (Chen et Zlotnik, 1991).

*2/ Augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe II sur les cellules B.*

Comme l'IL-4, l'IL-10 induit l'expression de molécules de CMH de classe II sur les cellules B au repos et maintient la viabilité de ces cellules in vitro. Par contre il semble que la voie d'action des ces deux interleukines soit différente car l'IL-10 n'est pas capable d'induire l'expression du CD23 sur les lymphocytes B, ce que l'IL-4 est capable de faire. (Go, NF., *et coll.*, 1990).

3/ L'IL-10 est facteur puissant de croissance et de différenciation des lymphocytes B humains activés.

L'IL-10 augmente la réponse proliférative des cellules B humaines préalablement activées par liaison à des anticorps anti- $\mu$ , ou en présence de *Staphylococcus aureus* Cowan I tués (Rousset, V., *et coll.*, 1992). De plus l'IL-10 induit les lymphocytes B activés à sécréter de grandes quantités d'IgG, d'IgA et d'IgM (Rousset F., *et coll.*, 1992). Les effets prolifératifs de l'IL-10 sur les cellules B activées par leurs AC est bien plus faible que les effets de l'IL-2 ou de l'IL-4, mais si ces cellules sont activées par leur CD40, l'IL-10 devient aussi puissant que l'IL-4 alors que l'IL-2 n'induit aucune réponse. Comme on l'a vu avant chez la souris, l'IL-10 est principalement produite par les cellules Th2, et comme ces lymphocytes Th2 sont impliqués préférentiellement dans la réponse immunitaire humorale, les influences de l'IL-10 sur les cellules B vont dans le sens d'une implication de cette lymphokine dans ce type d'immunité (Rousset F., *et coll.*, 1992).

### **B.3. Effets de l'IL-10 de souris *in vivo* (Howard M. *et coll.*, 1992).**

La majorité des études *in vivo* sont basées sur l'injection d'anticorps anti-IL-10 chez la souris. De telles souris semblent normales mis à part :

- 1/ La diminution du taux sérique d'IgM, d'IgA, d'IgG<sub>2a</sub> et d'IgG<sub>2b</sub>.
- 2/ Une augmentation des taux d'IFN- $\gamma$  et d'IL-6.
- 3/ L'absence de cellules B péritonéales compensée (du point de vue quantité de cellules) par une augmentation des lymphocytes T et des granulocytes.
- 4/ La déficience de la production d'AC contre certains AG.

Les points 1 et 2 sont en partie expliquables par la capacité qu'a l'IL-10 à inhiber la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-6 par les cellules Th1 et que l'IFN- $\gamma$  peut réguler la sécrétion d'IgG<sub>2a</sub> et d'IgG<sub>2b</sub>.

La réduction du taux d'IgM, et l'absence des cellules B péritonéales peuvent être expliquées par l'absence de cellules B CD5 chez les souris traitées par l'injection d'AC anti-IL-10. En effet, ces cellules sont reponsables chez la souris de la synthèse d'une majorité d'IgM (Hayakawa K., *et coll.*, 1984) et forment une majorité de cellules B péritonéales (Kipps T.J., 1989).

#### **B.4. Effets de l'IL-10 sur les cellules B CD5.**

*In vivo*, on a mis en évidence qu'une injection d'anticorps anti-IL-10 provoque la disparition des lymphocytes B CD5<sup>+</sup> (Ishida *et coll.*, 1992). On a également démontré chez la souris que les cellules B CD5<sup>+</sup> produisent de l'IL-10 de manière autocrine. Il semblerait même que l'IL-10 soit indispensable à leur prolifération (Kantor, 1991b, et O'Gara A. *et coll.*, 1992).

L'immunodéficience de certaines souris face à une agression bactérienne a été mise en relation avec l'absence de sécrétion d'IL-10 au sein des cellules B péritonéales (O'Gara A. *et coll.*, 1992). Il semblerait donc que l'IL-10 a un rôle dans l'immunité anti-bactérienne.

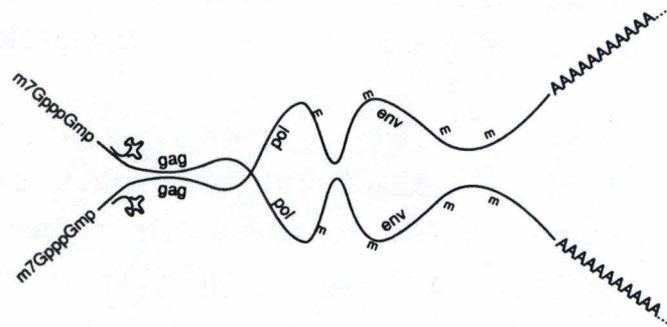
La production d'IL-10 par les cellules B CD5 peut également impliquer ces cellules comme immunorégulateurs (l'IL-10 étant associé à la fonction de CSIF et inhibiteur de l'expression des molécules d'histocompatibilité de classe II sur les macrophages).

### **3. Le virus de la leucose bovine.**

Les cellules infectées par le virus de la leucose bovine (BLV) appartiennent à la lignée lymphoïde B. Des études ont identifié la présence majoritaire de lymphocytes B CD5 au sein des PBMC de certains bovins infectés par ce virus et développant une lymphocytose persistante (PL) (Depelchin A. *et Coll.*, 1989 et Letesson JJ. *et coll.*, 1990). De tels animaux sont par conséquent une source de cellules B CD5 bovines.

#### **3.1. La leucose bovine.**

La leucose bovine est une maladie proliférative affectant les cellules de la lignée lymphoïde. En pathologie bovine elle constitue la néoplasie la plus fréquente de l'espèce. La leucose bovine enzootique (LBE), ou lymphosarcome de l'adulte, qui peut être associée à une étiologie virale peut mener pour 30% des individus atteints à l'apparition d'une lymphocytose persistante (Persistent Lymphocytosis, PL) qui est une augmentation du



**Figure 1-22: Structure génomique des rétrovirus.**

nombre des lymphocytes B périphériques.

L'agent étiologique viral a été identifié comme un rétrovirus, exogène à l'espèce bovine et appelé virus de la leucémie bovine (Bovine Leukemia Virus, BLV). L'étude du BLV a pris toute son importance dès la découverte de la probable parenté de ce virus avec les virus lymphotropes humains HTLV-I et HTLV-II. En effet, ces trois virus ont en commun une organisation génomique et structurale, et pourraient dériver d'un ancêtre commun (Burny *et coll.*, 1987).

La première phase de l'infection par le BLV se caractérise par la présence d'AC dirigés contre les protéines virales dans le sang des animaux atteints, ces animaux séropositifs ne présentent néanmoins aucun signe de désordre hématologique. Ensuite chez certains individus, il peut apparaître une prolifération polyclonale des cellules B CD5 se traduisant par la formation d'une lymphocytose persistante. Les animaux en PL ont jusqu'à 50% de cellules B CD5 parmi leurs cellules mononuclées du sang circulant. Cette lymphocytose peut se stabiliser pendant de très longues périodes mais peut progresser chez certains animaux (10%) en tumeur lymphoïde. De nombreux auteurs semblent en faveur d'un rôle transactivant du virus pouvant intervenir dans la leucémogénèse.

### **3.2. Le BLV est un *retroviridae*.**

Le BLV appartient à la famille des rétrovirus. Les rétrovirus sont subdivisés en trois sous-familles: les *lentiviridae*, les *spumaviridae* et les *oncoviridae*. Le BLV fait partie de ce dernier groupe. Les *oncoviridae* sont associées à plusieurs formes de cancer, tant chez l'homme que chez les animaux.

La structure commune à tous les rétrovirus est représentée à la **figure 1-22**. La structure génomique est formée de deux brins d'ARN. Ils possèdent une coiffe, une 6-méthylation, une polyadénylation (apparemment peu importante) et une paire d'ARN de transfert servant d'amorce à une transcriptase inverse. La transcriptase inverse, elle, est amenée par le virus lors de l'infection. L'ADN généré par la machinerie cellulaire lors d'une infection est formé d'une série de séquences codantes bordées de deux "Long Terminal Repeat" (LTR), ayant un rôle dans l'intégration de l'ADN viral dans la cellule cible.

La propriété commune de ces virus est leur cycle de réplication nécessitant la synthèse d'une copie d'ADN à partir de l'ARN génomique viral. Ce phénomène inverse au flux habituel de l'information génétique (de l'ADN vers l'ARN) est appelé "rétro- ou reverse- transcription" et est rendu possible par l'enzyme "transcriptase inverse". Le génome de ce virus peut également s'insérer au sein du génome de la cellule hôte par l'action de l'enzyme intégrase.

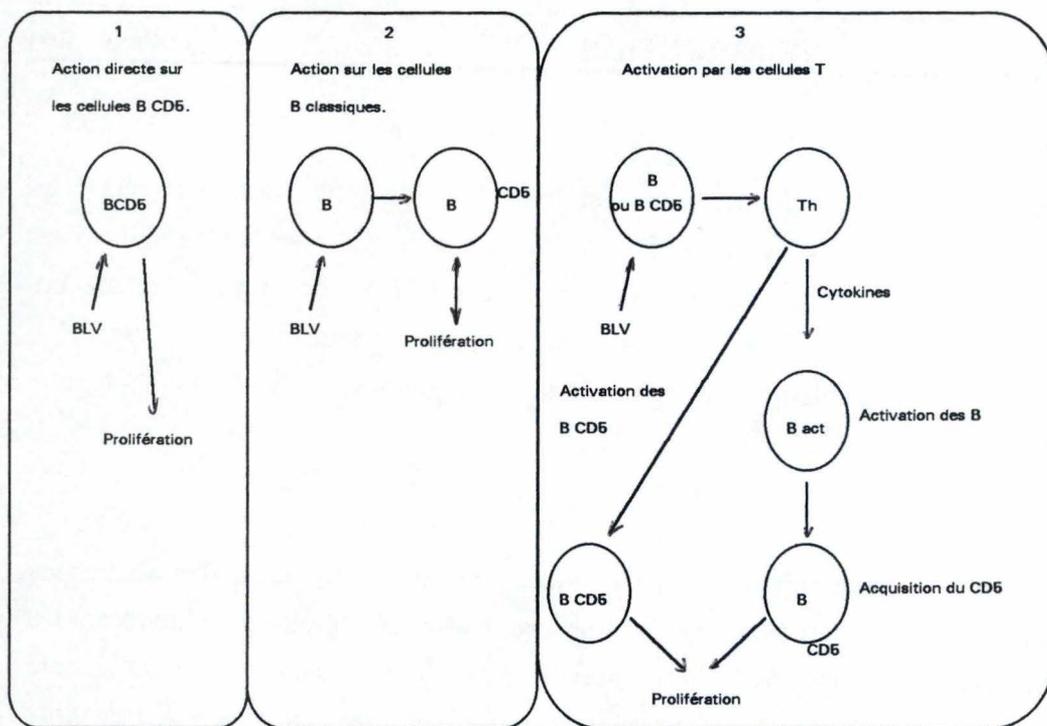
La séquence codante comporte les séquences: *gag*, *pol* et *env* et *X*. Ces séquences codent respectivement pour : un **précurseur polyprotéique** dont le clivage engendrera les protéines structurales de la capsid, une polyprotéine dont le clivage engendrera le **transcriptase inverse et l'intégrase**, des **protéines d'enveloppe**. La région *X* des virus BLV et HTLV consiste en des séquences chevauchantes codant pour au moins deux protéines, *tax* et *rex*. **tax** est une protéine trans-activatrice. On pense que la protéine *tax* aurait une action sur la transformation maligne de la cellule en transactivant les gènes responsables de la division, de la différenciation et de la prolifération de la cellule. **Rex** est une protéine régulatrice permettant le transport des protéines virales dans le cytoplasme cellulaire.

### 3.4. Le BLV et les cellules B CD5.

Comme vu précédemment, Depelchin A. et coll. ont mis en évidence la présence de ce type de cellules en grande quantité dans le sang circulant de bovins infectés par le virus de la leucose bovine et en lymphocytose persistante (PL). Ces animaux deviennent par le fait même un matériel de choix pour l'obtention et l'étude des cellules B CD5 bovines.

Il a été montré que les cellules B CD5 ont des caractéristiques de cellules activées, elles cyclent et sont sensibles à l'IL-2. Elles portent de plus des marqueurs membranaires normalement présents sur les monocytes (CD11b et CD11c) et y étant responsables de processus d'adhésion. Il reste néanmoins à déterminer le rôle exact de ces antigènes dans le contexte des cellules B CD5 (De la Hera et coll., 1988).

Dans le cas du BLV, la question se pose de savoir si le BLV active directement les



**Figure 1-23: Hypothèses de l'apparition de cellules B CD5 en cas d'infection par le BLV.**

lymphocytes B CD5 ou bien s'il active des cellules B normales au point d'induire leur expression du CD5. Ces questions sont encore loin d'être élucidées car le virus est loin d'avoir été recensé dans la majorité des cellules B CD5 des animaux atteints par le BLV.

La première explication est qu'un facteur transactivant produit par le provirus agisse directement ou indirectement sur le gène codant pour le CD5. L'expression du CD5 serait alors comprise dans la boucle métabolique citée précédemment. Cette hypothèse peut être étayée par la possibilité *in vitro* d'induire l'apparition du marqueur CD5 sur des cellules normales par activation artificielle de la protéine kinase C (voir avant) et par le phénotype de cellule activée que présentent les cellules B CD5 (voir plus haut) (**Figure 1-23(2)**).

Une autre possibilité est que le BLV pourrait avoir une action directe sur la sous-population de cellules B CD5 normalement présentes chez le bovin (voir avant) et induire sa prolifération directement (**Figure 1-23(1)**).

On peut également imaginer que le BLV puisse agir sur les cellules B par l'intermédiaire des lymphocytes T leur fournissant un stimulus (par exemple cytokinique) permettant aux cellules B CD5 de proliférer ou aux cellules B normales d'acquérir le marqueur CD5. (**Figure 1-23(3)**).

Néanmoins le problème est épineux car il semble bien que le virus soit présent dans d'autres cellules que les lymphocytes T, B ou helper (par ex. dans les macrophages et les Tc) (Levy D. et Cornyl I., communication personnelle).

## 4. But du travail.

Il a été montré chez l'homme et chez la souris que l'IL-6 agit à l'étape finale de différenciation des cellules B classiques en plasmocytes. Par ailleurs, il a été mis en évidence chez la souris que l'IL-10 était produit de manière autocrine par les cellules B CD5. C'est dans le cadre de l'étude des cellules B CD5 bovines que nous allons tenter de déterminer si ces cellules sont sensibles à l'IL-10, si elles sont capables de la produire de manière autocrine et si elles sont sensibles à l'IL-6 comme il peut l'être suspecté par "l'état d'activation" qui caractérise ces cellules.

Nous allons utiliser le BLV comme modèle d'étude des cellules B CD5 bovines car le sang périphérique des animaux en PL nous fournira les cellules B CD5 nécessaires.

Nous allons étudier l'effet de l'IL-6 et de l'IL-10 sur la prolifération de ces cellules, et tester les effets de l'IL-10 sur leur synthèse d'immunoglobuline et sur le phénotype. Pour cela nous utiliserons une source d'IL-6 bovine et une source d'IL-10 humaine (l'IL-10 bovine n'étant pas disponible).

Dans une deuxième phase nous tenterons de détecter la présence d'ARNm codant pour une éventuelle IL-10 bovine par des techniques d'hybridation moléculaire et d'amplification spécifique.

Si ces dernières techniques se révèlent efficaces nous pourrons envisager de détecter la production éventuelle d'IL-10 par les cellules B CD5 sous diverses stimulations.

# II

*Matériel*  
&  
*Méthodes*

# **I. Techniques de biologie cellulaire.**

## **1. Préparation du milieu de culture cellulaire.**

Le milieu de culture RPMI 1640 sous forme de poudre est reconstitué avec de l'eau bidistillée ultra pure et additionné des composants suivants :

- HEPES (N-2 hydroxyéthylpipérazine-N-2-éthanesulfonique) 25mM (Gibco).
- Hydrogénocarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ (Merck)) à 0,85g/l.
- Pyruvate de sodium 1mM (Gibco).
- Glutamine (Gibco) 2mM.
- 1% d'une solution de Pénicilline 10000IU/ml-Streptomycine 10000 UG/ml (Gibco)
- Mis à pH 7,2 avec du NaOH 5N (Merck).

Le milieu est ensuite stérilisé par passage sur un filtre de  $0,22\mu\text{m}$ . Il peut être conservé quelques mois à  $4^\circ\text{C}$  dans des bouteilles stériles. Ce milieu est appelé RPMI "Minimum" car il ne contient aucun sérum. Pour les cultures il sera additionné de 5% de Sérum de Veau Foetal (Fetal Calf Serum, FCS, Gibco) ou de Sérum de Cheval (Horse Serum ,HS, Gibco) et sera appelé milieu "complet". Au moment de toute mise en culture on ajoutera  $5 \cdot 10^{-5}$  M de  $\beta$ 2-mercaptoéthanol (Gibco) pour protéger les cellules de l'action des radicaux libres.

## **2. Origine et traitement du matériel cellulaire lymphocytaire.**

Les cellules mononucléées ont été isolées du sang de bovins infectés par le BLV et en lymphocytose persistante. Ces animaux ont été mis à notre disposition par le Dr. Mammerickx de l'Institut National de Recherches Vétérinaires (INRV). Les cellules d'animaux sains ont été prélevées dans des exploitations agricoles de la région namuroise.

**Solution 1: PBS-EDTA 1,5%**

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (merck) 0,9g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (UCB) 20g
- NaCl (Merck) 7g
- EDTA (UCB) 15g
- Porté à 1l par eau distillée.

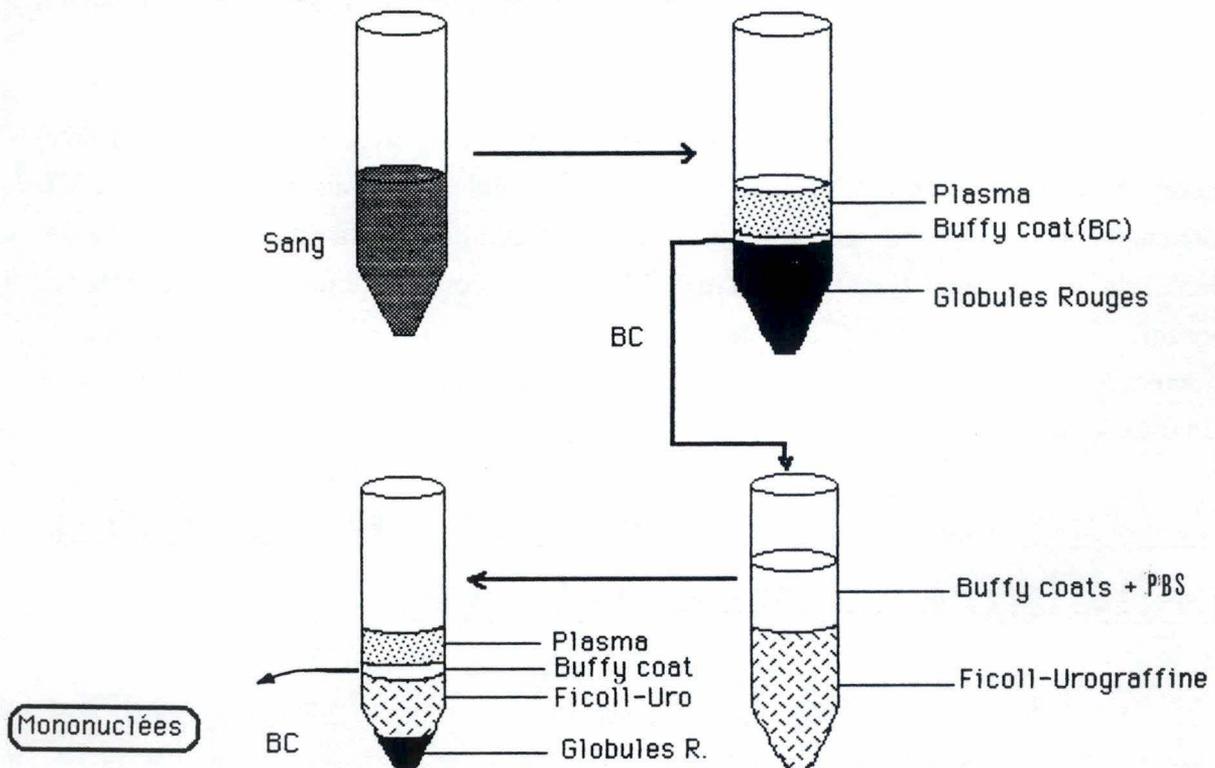
**Solution 2: PBS 10x**

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11,49g
- NaCl 80g
- KCl (UCB) 2g
- Porté à 1l par eau distillée.

Le PBS 1x est obtenu en diluant 100 ml de PBS 10x dans 900ml d'eau distillée.

**Solution 3: Ficoll-urographine.**

- Ficoll ( Pharmacia ) 7,65 g
- Urographine 76% (Schering) 18 ml
- Porté à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Laisser dissoudre.
- Mettre à pH 7,4 avec du NaOH 5N ou du HCl 5N.
- Ajouter 5 ml d'eau distillée.
- Vérifier que la densité est à 1,36 +/- 0,02.



**Figure 2-1 :** Préparation des cellules mononuclées sanguines.

Le sang est prélevé stérilement au niveau de la veine jugulaire et injecté dans des récipients contenant comme anti-coagulant du PBS-EDTA (**Solution 1**) à 10% par volume de sang. En effet, le EDTA (Ethylène diamine tétracétate, Kerstanal 2S, UCB) chélate les ions calcium intervenant dans le processus de coagulation.

## 2.1. Isolement et conservation des cellules.

Le principe de la séparation des cellules mononucléées est basé sur les différences de densité entre le plasma, les globules rouges et les cellules mononucléées.

Le sang récolté est réparti dans des tubes de centrifugation stériles de 50 ml (Nunc). Une première centrifugation à 1200g pendant 15 minutes va permettre de récolter un anneau blanchâtre (Buffy Coat) situé à l'interface entre le culot de globules rouges et le plasma, à l'aide d'une pipette pasteur (**Figure 2-1**). Cet anneau contient les cellules mononucléées. Les cellules récupérées sont diluées au moins deux fois dans du tampon PBS (**Solution 2**).

On dépose 20 ml de cette solution sur 15 ml de ficoll-urograffine (**Solution 3**). Après une centrifugation de 25 minutes à 1000g, on récolte les cellules situées à l'interface entre le PBS et le Ficoll (Spooner *et coll.*, 1978) et on redilue en PBS.

Les cellules sont lavées trois fois en PBS, c'est-à-dire suspendues dans du PBS et centrifugées 10 minutes à 100 g (vitesse faible pour éviter la sédimentation des plaquettes résiduelles).

Après comptage cellulaire sur une cellule de Thomas et mesure de la viabilité au bleu trypan (les cellules mortes apparaissent en bleu au microscope optique), les cellules sont resuspendues à  $50 \times 10^6$  cellules par millilitre dans du FCS-10% Diméthylsulfoxyde (DMSO, UCB) à 4°C. Le FCS est une source de protéines assurant un environnement protecteur lors de la congélation et le DMSO est un cryoprotecteur ayant pour rôle de minimiser la mortalité des cellules lors de leur congélation à -70°C. Le DMSO étant très toxique à température ambiante, les cellules, une fois resuspendues en FCS-DMSO sont gardées à 4°C. La suspension cellulaire est répartie dans des cryotubes (Nunc 1 ml) qui sont placés dans une boîte en frigolyte (pour éviter les variations trop brusques de température) stockée à -70°C.

Nom de l'AC	Origine	Source de l'AC	Structure reconnue	Cellule reconnue
1H8	FUNDP	Ascites dilués	CD6	Lymphocytes T
ILA 11	ILRAD Kenya	"	CD4	Lymphocyte T helper
ILA 105	"	"	CD8	Lymphocyte T cytotoxique
11F5	FUNDP	"	?	Cellules Nulles
CC63	ATCC	Surnageants	CD8	Cellules T cytotoxiques
11B2	FUNDP	"	CMH classe I	Toutes sauf globules rouges
7C7	"	"	CMH classe II	Monocytes, cellules B, cellules T activées.
1H4	"	"	Chaîne mu des IgM	Cellules B
8C11	"	"	CD5	Cellules T et cellules B chez animaux leucémiques
2G1	"	"	CD11c	Cellules T activées, macrophages et monocytes
14B4	"	"	CD18	Tous les leucocytes
1H11	"	"	LFA1	Tous les leucocytes
3B8	"	"	Chaînes légères des Ig	Cellules B

**Tableau 2-1: Anticorps monoclonaux utilisés.**

En vue de l'utilisation de ces cellules congelées, il faut éliminer le plus rapidement possible le DMSO. Ainsi, les cellules sont décongelées rapidement au bain-marie à 37°C, et transvasées dans des tubes de centrifugation pour subir 3 lavages en PBS. Après le dernier lavage il suffit alors de resuspendre le culot cellulaire dans le milieu désiré, estimer le nombre et la viabilité cellulaire et ajuster ensuite à la concentration voulue.

## **2.2 Déplétion de la population mononucléée en lymphocytes T.**

### **2.2.1 Principe.**

Pour déléter la préparation cellulaire, nous nous sommes basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (ACm) (**Tableau 2.1**) anti-lymphocytes T et de complément pour lyser les cellules T spécifiquement. Les complexes antigène-anticorps formés à la surface des lymphocytes T vont activer la voie classique du complément, en rendant accessible un site de fixation pour un composant du système du complément. Ce site se situe sur la partie constante des chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig). Ce système va mener à la lyse des cellules T.

Remarque: quand nous parlerons de cellules B CD5 nous entendrons les cellules résultant de la déplétion en cellules T d'une population de cellules mononucléées d'un animal infecté par le BLV et en PL.

### **2.2.2 Protocole.**

- Après lavage, les cellules à traiter seront resuspendues dans du PBS à une concentration finale de  $10 \cdot 10^6$  de cellules par ml (en tenant compte des volumes à ajouter par la suite!).
- Ajouter les anticorps (1H8, ILA11, 11F5, ILA105)(**Tableau 2-1**) chacun à une concentration finale de 1/1000.
- Incuber 30 minutes à 4°C (sur glace).
- Laver 1 fois en PBS (10 minutes à 200 g.)
- Resuspendre le culot cellulaire à une concentration de  $10^7$  cellules par millilitre en RPMI minimum contenant 10% de complément de lapin (Rabbit Complement, Sera Lab).
- Laisser agir 1 heure au bain-marie et sous agitation à 37°C.
- Laver 3 fois en PBS.
- Estimer la concentration cellulaire et la viabilité par coloration au bleu trypan.

## **2.3. Origine du matériel d'origine cellulaire non lymphocytaire.**

### **2.3.1. Surnageant de cellules COS transfectées par le cDNA codant pour l'IL-6 bovine.**

Les cellules COS (Cos 7 de singe, n° d'ATCC: CRL 1651) sont des cellules pouvant accepter une partie exogène d'ADN sous forme de cosmide. Les cosmides insérés dans les cellules qui nous ont servi, sont des vecteurs d'ADN construits à partir de plasmides bactériens et d'ADN du virus simien SV40. Ils sont conçus pour accepter l'insertion de longues séquences d'ADN (via un site de clonage), les amplifier par réplication en bactérie (via le site de réplication de *E.Coli*) et les exprimer dans une cellule eucaryote (via le promoteur de transcription du SV40). Les cellules COS sécrètent dès lors le produit de l'expression de l'insert.

Des surnageants de culture de cellules COS transfectées de cette manière avec le cDNA codant pour l'interleukine-6 bovine (IL-6b) inséré dans le plasmide pSG5 (pSGIL-6bov), nous ont été aimablement donné par le Docteur Louis Droogmans (ULB, Rhodes-Ste-Genèse), en même temps que des surnageants de cellules témoins transformées avec un plasmide sans insert (pSG5 seul). Les surnageants de cellules transfectées avec l'IL-6b (COS IL-6b) contiennent donc cette interleukine et ont été testés sur des cellules portant le récepteur à l'IL-6b (lignée LB155) par une compétition de fixation avec de l'IL-6 humaine radioactive.

### **2.3.2. Surnageants de cellules CHO transformées avec le cDNA codant pour l'IL-10 humaine.**

Les cellules CHO sont des cellules d'ovaire de hamster chinois, transformées avec un vecteur semblable à un cosmide. Ces cellules ont la même fonction que les cellules COS. Nous avons obtenu des surnageants de culture de cellules CHO transformées avec le cDNA codant pour l'interleukine-10 humaine (IL-10h) de Catherine Gérard (Dpt. du Docteur Velu, Hopital Erasme, Bruxelles). Nous avons également reçu des surnageants témoins de cellules transformées avec un plasmide sans insert.

Les surnageants de cellules CHO transformées avec le cDNA codant pour IL-10h (CHO-IL-10h) contiennent de l'IL-10 et ont été testés en présence de cellules mononucléées sanguines humaines du sang périphérique (PBMC). Le test fonctionnel d'inhibition de la production d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) suite à une stimulation par des anticorps monoclonaux (ACm) anti-CD3 a donné les résultats suivants :

Dilution du surnageant CHO IL-10h	% d'inhibition de la production d'IFN- $\gamma$ .
1/10	98.4
1/20	96.1
1/40	90.5
1/80	73.6
1/100	60.0
1/300	20.0
1/640	16.8

### 2.3.3. Cellules fibroblastiques VERO.

Nous avons utilisé des cellules fibroblastiques de singe, VERO, comme source d'ARN non lymphocytaire. (ATCC n°: CCL81)

## 3. Mise en culture des cellules.

Les cellules fraîches ou dégelées peuvent être mises en culture afin d'étudier divers paramètres. Quel que soit le but recherché la base du milieu de culture sera toujours faite de RMPI 1640 (Gibco) 5% FCS ou HS et  $5 \cdot 10^{-5}$ M de  $\beta_2$ -mercaptoéthanol(Gibco).

Les lymphocytes sont mis en culture dans ce milieu complet dans des microplaques (Nunc) à fond plat ou dans des macroplaques (Nunc). Les plaques sont alors incubées dans une étuve à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

## **3.1 Test de transformation lymphoblastique (TTL).**

### **3.1.1 Principe du TTL.**

Ce test a pour objet de mettre en évidence des modifications des lymphocytes mis en culture dans certaines conditions. Ces conditions, dans notre cas, seront la stimulation par la présence dans le milieu de culture, de cytokines, de mitogènes ou d'autres molécules dont l'action sur les lymphocytes est connue ou suspectée. Les modifications détectées peuvent être une augmentation de la prolifération cellulaire, une sécrétion d'AC ou de cytokines, une modification du type ou du nombre d'antigènes membranaires. Le TTL classique se résume souvent à la mesure de la prolifération.

### **3.1.2 Mise en culture.**

Les cellules en RPMI complet, additionné ou non des molécules à tester, sont distribuées dans des microplaques stériles à 96 puits à fond plat (Nunc) à raison de 200 $\mu$ l par puits (2  $10^5$  cellules) et incubées à 37°C. Les cellules d'une même condition sont réparties en plusieurs réplicats (3-5) pour que les résultats aient une valeur statistique.

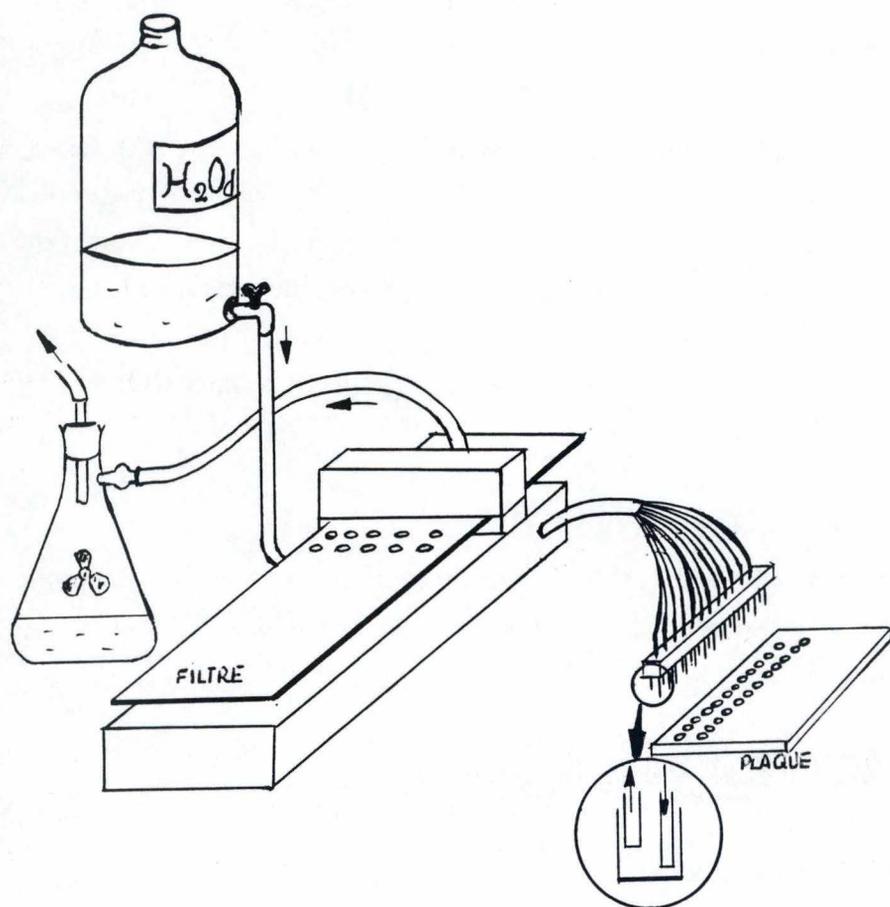
Pour nos culture nous utiliserons, outre les surnageants de cellules COS et CHO, les molécules suivantes:

- de la concanavaline A (ConA, Affiland),
- de la phytohémagglutinine (PHA),
- des membranes de *Staphylococcus Aureus* Cowan I (SAC I, Pansorbin®  
Calbiochem)

### **3.1.3 Mesure de la prolifération.**

#### **A/ Incorporation de thymidine tritiée.**

Pour mesurer les variations de prolifération des cellules en culture nous avons mesuré la quantité de thymidine tritiée incorporée dans l'ADN des cellules pendant un temps donné.



**Figure 2-2: Représentation schématique du Cell Harvester.**

Pour ce faire nous additionnons 0,8  $\mu$ Curie par puits de thymidine tritiée (Méthyl-<sup>3</sup>H thymidine, Amersham, 2 curies/mMole) en RPMI (40 $\mu$ l/puits). Les cellules en phase de synthèse d'ADN vont incorporer à leurs acides nucléiques néosynthétisés ces précurseurs radioactifs. Ce sont les radiations bêta émises par cet ADN cellulaire qui seront mesurées après récolte, estimant ainsi le taux de prolifération des cellules.

### **B/ Récolte des cellules.**

La récolte des cellules se fait 18 heures après l'addition de thymidine tritiée dans un "Cell harvester" (Titertek Cell Harvester 550) (**Figure 2-2**), dont le rôle est de lyser les cellules par un choc osmotique (eau distillée) et de récolter leur contenu en acides nucléiques sur un filtre (Printer Filtermat A, Wallac) prévu à cet effet. Le filtre est alors séché et scellé dans un sachet plastique contenant 10 ml de liquide scintillant (Ecoscint A, Kimberly Research).

### **C/ Mesure de la radioactivité bêta.**

La radioactivité émise par le contenu des différents puits récoltés, est mesurée en plaçant le filtre dans un compteur à scintillation (Wallac 1205 Betaplate). Le principe de cet appareil est de mesurer les photons émis par les atomes du liquide scintillant excités par les rayons bêta. Cette mesure permet de calculer le nombre de coups par minute (CPM) de l'isotope radioactif. Comme ici la quantité d'isotope présente est fonction de l'intégration de la thymidine dans l'acide désoxyribonucléique (ADN), les CPM mesurés sont proportionnels au taux de synthèse des cellules, donc de leur prolifération.

### **D/ Traitement des résultats.**

Les résultats seront présentés en moyennes et écarts-types des CPM des réplicats d'un même échantillon. Un indice de stimulation sera défini comme de nombre de CPM de l'échantillon test divisé par le nombre de CPM mesuré dans les échantillons en RPMI seul.

## 4. Mise en évidence de la production d'anticorps.

### 4.1 Principe.

La présence éventuelle d'anticorps dans le surnageant de culture est mesurée par un test ELISA de capture (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Ce test immunochimique permet la détection d'un antigène par un anticorps fixé à une surface adsorbante et par la fixation d'un second anticorps marqué dont la révélation donnera lieu à une coloration mesurable. Dans le cas qui nous concerne ce test va servir à détecter la sécrétion d'anticorps d'isotypes particuliers dans le milieu de culture.

Comme le but est de mesurer la synthèse d'AC par les cellules en culture, il est important de ne pas introduire d'AC parasite. En effet, la présence d'AC de ce type fausserait les résultats des tests de sécrétion, en sur-estimant la production. S'il n'est pas possible d'éviter l'apport d'AC parasites, il faut s'assurer que cet apport soit identique dans toutes les conditions testées. Ces AC parasites peuvent provenir du FCS qui contient toujours des AC bovins. On utilisera le plus souvent possible du Horse Sérum (HS) car il constitue un bon apport de facteurs de croissance, est disponible en grande quantité et il évite les problèmes de réactions faussement positives car il ne contient pas d'AC bovins.

Pour tester la sécrétion des IgM, IgG1 et IgG2 bovins, nous utiliserons les AC monoclonaux suivants:

#### Anticorps de capture :

- **1H4** : anti-chaînes  $\mu$  des IgM bovins.
- **ILA 74** : "  $\gamma 2$  "
- **1C8** : "  $\gamma 1$  "

#### Anticorps de détection :

- 3B8** couplé à la peroxidase: anti-chaînes légères d'Ig bovines.

Chacun de ces AC une fois déposés et absorbés dans le fond des puits d'une plaque MAXISORP (Nunc) à raison d'un type d'AC par puits (la plaque MAXISORP à une surface

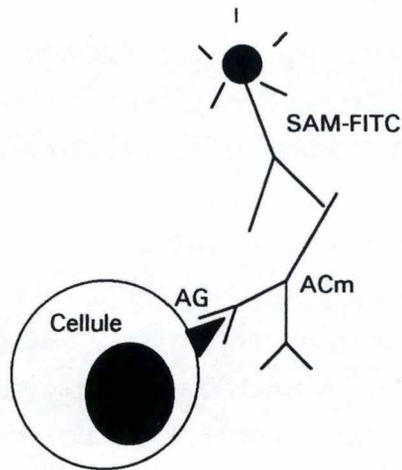


plastique riche en groupements négatifs qui facilitent l'adsorption des protéines), reconnaîtront les composants de l'échantillon qui leurs sont spécifiques. La surface des puits qui n'est pas recouverte d'AC sera saturée par de l'hydrolysate de caséine (**Solution 4**).

Les antigènes fixés (c'est-à-dire les AC sécrétés) sont révélés par l'utilisation de l'ACm **3B8** (anti-chaînes légères d'Ig bovins) couplés à la peroxydase (POD). En présence de ses substrats, le 1,2-Diaminobenzol dihydrochlorid (1,2-phénylendiamin) (OPD) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$  30%, Merck), la peroxydase va oxyder l'OPD qui deviendra coloré (**Figure 2-3**). C'est l'absorbance à 490 et 630 nm de ce composé coloré qui va rendre compte de la quantité d'AC fixés.

## 4.2 Protocole.

- Diluer les AC (1H4, ILA74, IC8) dans du PBS (**Solution 2**) à 5 $\gamma$ /ml.
- Déposer 50 $\mu$ l de cette solution par puits.
- Incuber une nuit à 4°C.
- Evacuer l'excès et saturer la plaque avec 150  $\mu$ l par puits d'hydrolysate de caséine 10% en PBS (PBS-HC 10%).
- Incuber 2 heures à 37°C ou une nuit à 4°C.
- Faire les dilutions des surnageants à tester en PBS-HC10%.
- Laver la plaque 5 fois avec du PBS-Tween 0,1% (**Solution 5**).
- Déposer 50  $\mu$ l par puits de chaque solution de surnageant.
- Incuber une heure à 37°C.
- Laver 10 fois en PBS-Tween 0,1%.
- Déposer 50  $\mu$ l par puits d'AC 3B8-POD 1/1000 en PBS-HC 10%.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Laver 10 fois en PBS-Tween 0,1%.
- Révéler en déposant 50  $\mu$ l d'OPD/puits (**Solution 6**) (GARDER A L'ABRI DE LA LUMIERE).
- Arrêter la réaction après 20 minutes avec 25  $\mu$ l par puits de  $H_2SO_4$  2M.
- Mesurer les valeurs d'absorbance à 490 et 630 nm sur un lecteur ELISA (EL 340, Biotek Instruments).



**Figure 2-4:** Représentation schématique de la reconnaissance de l'antigène par un marquage en immunofluorescence indirecte.

## **5. Analyse en immunofluorescence indirecte**

### **5.1 Mise en culture en plaques macropuits .**

Vu les quantités nécessaires de cellules, nous avons travaillé en macropuits à fond plat (Nunc). Pour les macropuits nous utilisons  $5 \cdot 10^6$  cellules par puits dans 2,5 ml de milieu RPMI complet et avec le mélange à tester en quantité voulue.

### **5.2 Marquage des cellules.**

#### **5.2.1 Principe.**

Le phénotype d'une population cellulaire, c'est-à-dire le pourcentage de cellules au sein de cette populations exprimant des marqueurs membranaires particuliers, peut être analysé par immunofluorescence. Les cellules sont incubées en présence d'anticorps monoclonaux de souris reconnaissant des marqueurs particuliers (**Tableau 2.1**), puis avec des anticorps de mouton anti-Ig de souris (Sheep Anti-Mouse, SAM) couplé à une molécule fluorescente (l'isothiocyanate de fluorescéine, FITC, Amersham) (**Figure 2-4**). Si les cellules ont les marqueurs membranaires en question, elles fixent les AC, et apparaîtront fluorescentes sous une source d'U.V. L'observation au microscope à fluorescence permet déjà de visualiser le marquage mais une analyse fine peut se faire par cytométrie de flux au moyen d'un FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter, Becton Dickinson).

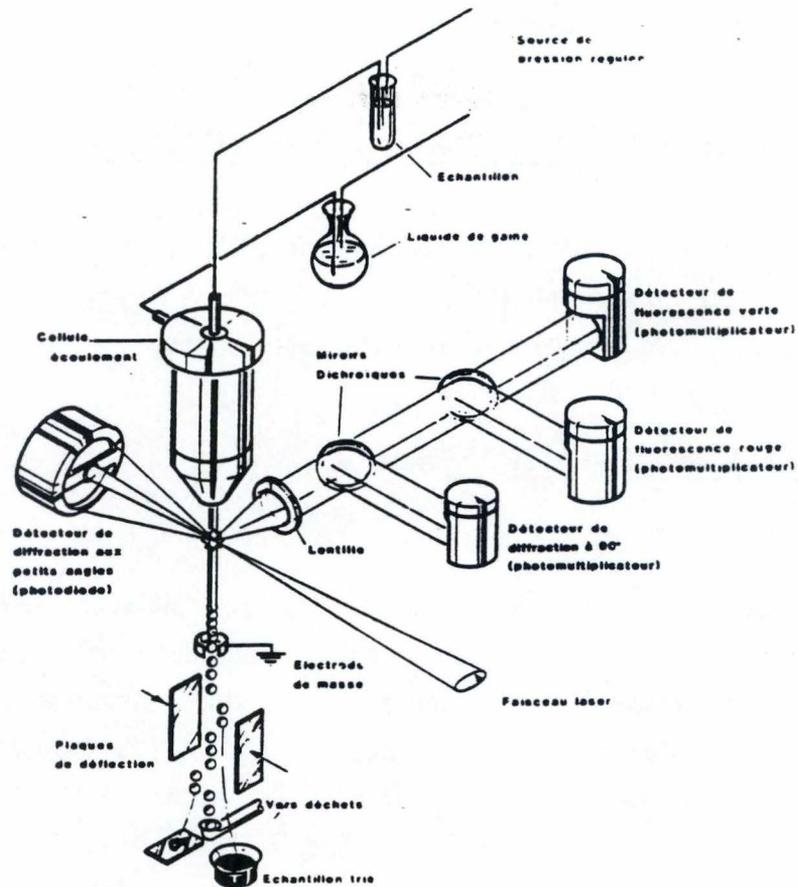
Lors du marquage il est important de figer la membrane cellulaire et d'éviter tout type de capping ou d'internalisation des AC, nous travaillons donc à 4°C et en présence d'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Ce dernier bloque la mobilité membranaire en inhibant le métabolisme cellulaire au niveau des mitochondries.

Il est également nécessaire de saturer la solution de SAM-FITC avec du sérum de bovin normal (SBN), De cette manière on évite que les AC polyclonaux de moutons qui croiseraient avec les Ig de membrane des cellules B bovines, ne s'y fixent pour donner de faux signaux positifs. Le SBN contenant des Ig bovines, fixe tout les AC de ce type et évite qu'ils ne marquent les cellules.

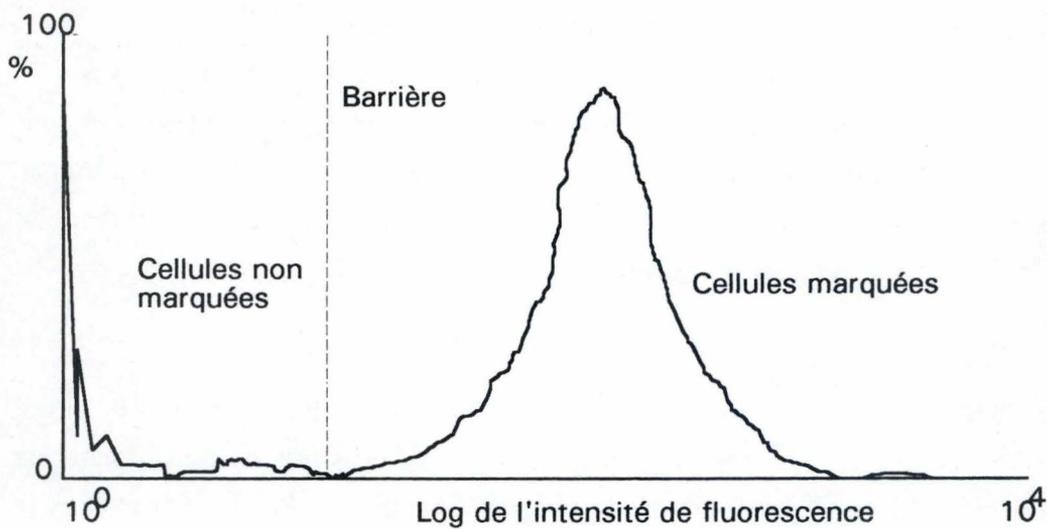
**Solution 7:** PBS- $\text{NaN}_3$  (0,1%)

-  $\text{NaN}_3$  0,5 g (UCB)

- Porter à 500 ml avec du PBS 1x (Solution 2)



**Figure 2-5:** Schéma du Fluorescence Activated Cell Sorter.



**Figure 2-6:** Schéma d'un type de résultat obtenu par analyse au FACS

### 5.2.2 Protocole

- Déposer 50  $\mu$ l d'une suspension cellulaire à environ 30  $10^6$  cellules par ml dans les puits d'une microplaque à fond conique (Laboratoire Bioplast Medical). Les cellules sont resuspendues dans du PBS- $\text{NaN}_3$  0,1% (**Solution 7**)
- 50  $\mu$ l d'anticorps par puits à la dilution appropriée sont alors ajoutés.
- Laisser incuber 30 minutes à 4°C sur de la glace.
- Les cellules sont lavées avec du PBS- $\text{NaN}_3$  0,1% (quelques gouttes et centrifugées à 200g, 5 minutes).
- Le surnageant est aspiré à la pompe à vide.
- 50  $\mu$ l par puits d'une solution de SAM-FITC (Amersham) dilué à 1/50 en PBS- $\text{NaN}_3$  0,1% contenant 10% de SBN sont ajoutés.
- Laisser incuber 30 minutes à 4°C.
- Les cellules sont lavées en PBS- $\text{NaN}_3$  0,1%.
- Enfin les cellules sont fixées par resuspension dans 100  $\mu$ l de paraformaldéhyde 1% en PBS- $\text{NaN}_3$  0,1%.
- Les cellules peuvent ainsi être conservées au frigo jusqu'à la lecture au FACS.

### 5.3 Analyse des résultats par cytométrie de flux (FACS).

Après marquage, les cellules sont injectées sous pression dans un dispositif (FACS) créant un jet de liquide assez fin pour ne laisser passer qu'une cellule à la fois (**figure 2-5**). Les cellules passent dans un faisceau un laser et les intensités lumineuses des faisceaux diffracté à petit et à grand angle sont enregistrées. Ces informations vont servir à estimer respectivement la taille et la granulosité des cellules. Si les cellules injectées sont couplées à des AC fluorescents, un troisième faisceau renseignera sur l'abondance d'un marqueur sur la membrane cellulaire.

Toutes ces informations sont traitées par un ordinateur qui les intègre en graphiques comme ceux présentés à la **figure 2-6**. Ces graphiques permettent de juger de la présence de certains marqueurs membranaires sur les cellules en référence à une population témoin non marquée.

Avant la prise des mesures on définit le type de cellules à analyser, c'est à dire on définit des barrières de taille et de granulosité au-delà desquelles le FACS n'analyse pas les paramètres. Cela permet d'éliminer les cellules mortes du comptage. Sur les graphiques d'analyse l'abscisse (FL1) représente l'intensité de fluorescence et l'ordonnée représente le pourcentage relatif de cellules. Pour l'analyse on définit d'après le témoin négatif (cellules en PBS) une zone de d'intensité de fluorescence correspondant au bruit de fond. Le pourcentage de cellules marquées sera le pourcentage de cellules dont la quantité de fluorescence est supérieure à cette limite. La majorité des résultats seront donnés en pourcentage de cellules marquées.

## **II. Techniques de biologie moléculaire.**

### **1. Extraction d'ARN total de lymphocytes.**

#### **1.1 Généralités sur le traitement de l'ARN.**

Pour obtenir des préparations d'ARN en bon état, il est nécessaire de neutraliser l'activité des ribonucléases (RNase) libérées durant la lyse cellulaire et d'éviter tout contact avec des produits ou des surfaces non exempts de RNases (non RNase-Free). On emploie donc de la verrerie passée au four 2 heures à 180°C., autoclavée, passée dans un mélange sulfo-chromique ou lavée avec du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS, Fluka) 2% en eau distillée ainsi que des mélanges RNase Free et si possible autoclavés. L'eau peut être traitée avec 0,1% de Diéthyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma) en eau distillée 12 heures à 37°C et portée à ébullition pendant 15 minutes.

#### **1.2 Méthodes d'extraction.**

Les techniques d'extraction présentées ici, sont basées sur la même séquence d'opérations : la lyse cellulaire, l'élimination des protéines par une solution à base de phénol, et la précipitation de l'ARN à l'isopropanol puis à l'éthanol. Nous avons utilisé trois

**Solution 8 solution D**

- 4 M thiocyanate de guanidium ( Fluka ).
- 25mM Citrate de sodium ( Merck) à partir d'une solution 0,75M à pH7.
- 0,5% de N lauryl sarcosine ( Sigma ).
- Ajuster juste avant usage à 0,1M en  $\beta$ -2-mercaptoéthanol (Gibco ).

**Solution 9:** TNE pH 8,3

- Tris-HCl 10 mM pH 8,3
- NaCl 105 mM (Merck)
- EDTA 1 mM (UCB)

**Solution 10:** Solution de lyse.

- 0,5% sodium dodécyl sulfate (SDS, Fluka ).
- Protéinase K (Boehringer) 400 $\mu$ g/ml
- En TNE pH 8,3

méthodes d'extraction, différentes par le choix des produits et le nombre d'étapes. Nous les avons toutes évaluées et nous avons opté finalement pour la méthode la plus rapide et au meilleur rendement pour l'application aux lymphocytes (voir résultats).

### 1.2.1. Méthode aux sels de guanidine

- Prendre  $500 \cdot 10^6$  cellules dans un tube Corex RNase-Free de 10ml.
- Déposer 1 ml de solution D (**solution 8**) (Pour lyser les cellules)
- Ajouter 0,1 ml d'acétate de sodium 2M et mélanger doucement.
- Ajouter 1 ml de phénol et mélanger.
- Ajouter 0,2 ml d'une solution de chloroforme:alcool isoamylique 24:1 (v/v).
- Agiter 10 secondes et laisser 15 minutes sur glace.
- Centrifuger à 9000 rpm dans une centrifugeuse sorval à rotor SS34, 20 minutes à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 volume d'isopropanol.
- Placer 1 heure à -20°C.
- Centrifuger à 10 000 rpm dans une centrifugeuse Sorval à rotor SS34, 20 minutes à 4°C.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 0,3 ml de solution D.
- Mettre en tubes Eppendorf de 1,5 ml et précipiter avec 0,3 ml d'isopropanol 1 heure à -20°C.
- Centrifuger à 12 000 g 10 minutes à 4°C dans une minifuge.
- Laver le culot dans de l'éthanol 75%, vortexer et laisser 10-15 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 12 000g 5 minutes dans une minifuge.
- Dissoudre le culot dans 50  $\mu$ l de Sodium dodécyl sulfaté 0,5% ou d'eau RNase Free et placer 5-10 minutes à 65°C.

### 1.2.2 Méthode à la protéinase K et au LiCl.

Après avoir centrifugé  $20 \cdot 10^6$  cellules pendant 10 minutes à 200g, enlever le surnageant et laver le culot cellulaire 2x avec 10 ml de TNE pH 8,3 (**Solution 9**). Eliminer le surangeant et traiter le culot cellulaire de la manière suivante:

- Lyser par resuspension du culot avec 6-8 ml de solution de lyse (**Solution 10**).
- Récupérer le lysat et l'incuber 15 minutes à température ambiante.
- Y ajouter 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (100:90:10, v/v) équilibré

**Solution 11: TES**

- Tris-HCl 10 mM (Boehringer)
- Ethylène Diamine Tétracétate (EDTA, Kerstanal 2S, UCB) 1mM.
- SDS 0,5M

avec du TNE pH 8,3 (extraction au phénol).

- Rendre le mélange homogène en aspirant à plusieurs reprises la solution dans une seringue par une fine aiguille, et ce pendant 1 minute (pour fragmenter l'ADN).
- Mettre dans un erlenmeyer et agiter 20 minutes.
- Transvaser en tube Corex et centrifuger 15 minutes dans une centrifugeuse Sorval SS34 à 10 000 rpm à 20°C.
- Récolter la phase aqueuse et refaire une extraction au phénol en agitant 10 minutes.
- Centrifuger 10 minutes dans une centrifugeuse Sorval SS34 à 10 000 rpm à 20°C.
- Prendre la phase aqueuse et amener à 0,2M NaCl.
- Précipiter avec 2 volumes d'éthanol à -20°C.
- Mettre à -20°C durant environ 15h.
- Centrifuger 40 minutes dans une centrifugeuse Sorval HB4 à 8500 rpm et à 4°C.
- Laver le culot à l'éthanol.
- Sècher sous vide.
- Resuspendre le culot dans 10-15 ml de TES (**Solution 11**).
- Amener à 2M LiCl avec du LiCl 4M (UCB).
- Incuber à 4°C durant une nuit.
- Laisser réchauffer à température ambiante pendant 10 minutes et centrifuger 60 minutes dans une centrifugeuse sorval HB4 à 9500 rpm et à 15°C.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot en H<sub>2</sub>O distillée.

### **1.2.3 Ultraspec™ RNA.**

#### **A/ Principe.**

La méthode de loin la plus rapide et rentable (voir résultats) est l'utilisation d'un produit d'extraction d'ARN commercial l'Ultraspec™RNA (Biotech Laboratories, INC). Elle intègre les avantages des méthodes précédentes mais minimise le nombre d'étapes et le temps. Sa composition est basée sur un mélange contenant du thiocyanate de guanidium, de l'urée et du phénol. Les étapes habituelles de précipitation à l'isopropanol et à l'éthanol subsistent.

**B/ Protocole.**

- Traitement de  $40 \times 10^6$  de lymphocytes avec 2 ml d'Ultraspec-RNA.
- Homogénéiser et aliquoter par 1 ml en tube eppendorf.
- Laisser 5 minutes sur glace.
- Ajouter 0,2 ml de chloroforme par tube eppendorf.
- Agiter 15 secondes.
- Laisser 5 minutes sur glace.
- Centrifuger à 12000g à 4°C 15' en minifuge.
- Récolter la phase aqueuse (supérieure) dans d'autres tubes eppendorfs.
- Ajouter 1 volume d'isopropanol.
- Laisser 10 minutes à 4°C
- Centrifuger 10 minutes à 12000g à 4°C.
- Enlever le surnageant et laver 2x à l'éthanol 75% (mélanger et centrifuger 5 minutes à 7500g).
- Enlever le maximum d'éthanol et dessiquer 5-10 minutes.
- Resuspendre l'ARN de chaque tube eppendorf dans 5-10  $\mu$ l d'eau.
- Mesurer la densité optique à 260 nm sur un aliquot dilué 50x.

**1.2.4. Estimation de la quantité d'ARN extraite et stockage.**

On estime la concentration en ARN en mesurant la densité optique (DO) de la solution d'ARN diluée par la formule suivante:

$$40 \times DO \times \text{Volume de l'échantillon en ml} \times \text{dilution} = \text{Quantité d'ARN total en } \mu\text{g}$$

En effet, une DO de 1,000 équivaut à une concentration de 40 $\mu$ g/ml d'ARN total. Les stocks d'ARN sont conservés à -80°C.

**Solution 12:** Milieu LB liquide.

- Tryptone (Difco) 4 g
- Yeast extract (Gibco) 2 g
- NaCl (Merck) 2 g

**Solution 13:** P1

- RNase A(Boehringer) 10 mg (faire bouillir et laisser refroidir)
- Tris (Boehringer) 0,605 g
- EDTA (UCB) 0,373 g

Porter à 100 ml avec de l'eau distillée, mettre à pH 8.

**Solution 14:** P2

- NaOH (Merck) 0,8 g
- SDS (Fluka) 1 g

Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.

**Solution 15:** P3

- Acétate de potassium 29,469 g

Porter à 100 ml avec de l'eau distillée et mettre à pH5,5.

## 2. Préparation et extraction de plasmides par Midiprep.

### 2.1 Principes.

La préparation de plasmides a été réalisée à partir du clone bactérien pBIL-10 (Dpt Immunologie FUNDP, 1993), (produit de PCR de l'Exon III du cDNA codant pour l'IL-10 bovine inséré dans un plasmide pAM 19/SP6 (Amersham) et introduit par choc thermique dans *Escherichia. Coli XL-1 Blue*.

Pour l'extraction des plasmides nous avons utilisé la procédure de purification Quiagen (GmbH) MidiPrep. Cette méthode combine l'extraction de l'ADN plasmidique par lyse alcaline et la purification sur une colonne échangeuse d'anions. Cette résine est basée sur une modification d'un silicagel, avec des particules de 100 $\mu$ m liées de manière covalente à une substance hydrophile.

### 2.2 Protocole.

Une préculture d'un jour d'une anse de platine de bactéries dans 10 ml de milieu LB (**Solution 12**) contenant 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline (Amp, Boehringer) est incubée à 37°C. 9 ml de la préculture sontensemencés dans 150ml de LB/Amp et cultivés à 37°C durant une nuit.

La culture est ensuite recueillie dans des tubes de centrifugation de 50 ml et centrifugée à **1500g** pendant 20 minutes. Le culot bactérien est alors traité de la manière suivante:

- Resuspendre le culot bactérien dans 4 ml de P1 (**Solution 13**).
- Y ajouter 4 ml de P2 (**solution 14**) et mélanger doucement.
- Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
- Ajouter 4 ml de P3 froid (**solution 15**) et mélanger immédiatement et doucement.
- Incuber 15 minutes sur glace et centrifuger en centrifugeuse Sorval SS34 à 12000 rpm 15minutes à 4°C.
- Prendre le surnageant et le recentrifuger dans les mêmes conditions que précédemment s'il n'est pas totalement clair. Appelons le surnageant clair: "surnageant DNA".

### Solution 16: QBT

- NaCl (Merck) 4,383 g
- MOPS (Sigma) 1,156 g
- Ethanol (UCB) 15 ml
- Triton X100 (Fluka) 150 $\mu$ l

Porter à 100 ml avec de l'eau distillé et ajuster le pH à 7.

### Solution 17: QC

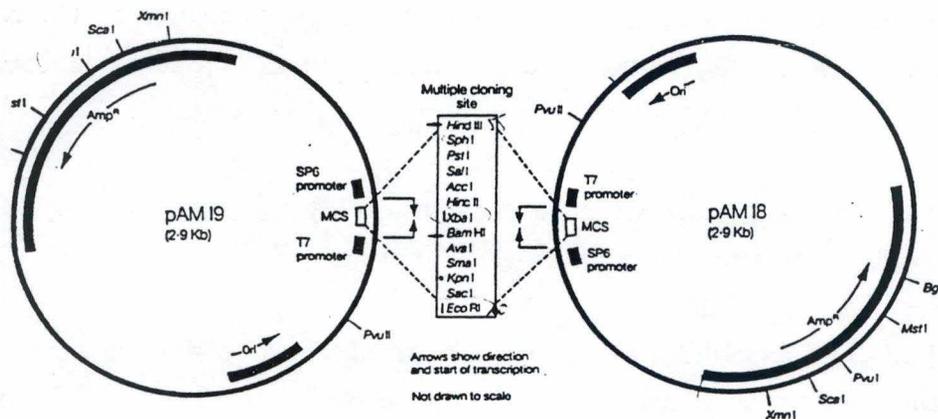
- NaCl (Merck) 5,844g
- MOPS (Sigma) 1,156 g
- Ethanol (UCB) 15ml

Porter è 100 ml avec de l'eau distillée et mettre à pH7,0

### Solution 18: QF

- NaCl (Merck) 7,305 g
- MOPS (Sigma) 1,156 g
- Ethanol (UCB) 15 ml

Porter à 100 ml avec de l'eau distillée et mettre à pH 8,5.



**Figure 2-7:** Schéma des plasmides pAM18 et pAM19 (du système SP6/T7, Amersham)

- Equilibrer une colonne Quiagen-tip 100 avec 4 ml de QBT (**solution 16**) et laisser descendre par gravité.
- Appliquer le "surnageant DNA" sur la colonne et laisser descendre par gravité.
- Laver la colonne avec 2 fois 10 ml de QC (**solution 17**).
- Eluer l'ADN avec 5 ml de QF (**solution 18**) dans un tube propre.
- Précipiter l'ADN avec 0,7 volumes d'isopropanol à température ambiante.
- Répartir en tubes eppendorfs de 1,5ml et centrifuger à 13 000g pendant 15 minutes en minifuge.
- Eliminer le surnageant et laver le culot 2 fois avec de l'éthanol 70% à -20°C (un lavage consiste en un dépôt de 1ml d'éthanol 70% et une centrifugation de 5 minutes à 13000g).
- Sécher au dessiccateur 10-20 minutes et resuspendre les culots dans un volume total de 100 $\mu$ l d'eau bidistillée.
- L'estimation de la quantité d'ADN peut se faire en mesurant la densité optique à 260 et 280 nm ou en déposant un  $\mu$ l de la solution dans 10 $\mu$ l de tampon d'électrophorèse sur un gel à 2% d'agarose (voir gel ADN) en présence de standards de poids moléculaires.

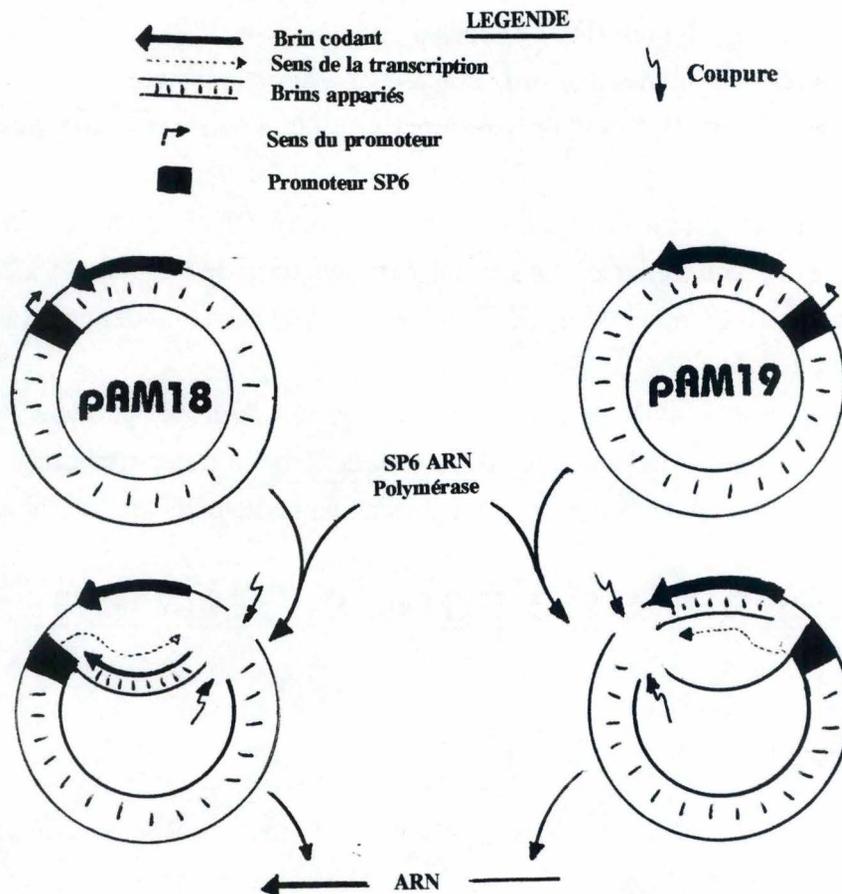
### 3. Synthèse d'une sonde ARN au <sup>35</sup>S.

#### 3.1 Principe.

Pour confirmer l'identité d'un fragment d'acide nucléique (ARN ou ADN) nous avons utilisé la technique d'hybridation moléculaire. Cette technique est basée sur la complémentarité des brins d'acides nucléiques. Un brin complémentaire du brin à identifier est synthétisé et marqué radioactivement. Dans certaines conditions de température et de salinité les brins complémentaires vont former des hybrides qui pourront être visualisés (voir hybridation). Dans notre cas nous devons, dans un premier temps, détecter des ARNm. Nous avons choisi de synthétiser une sonde ARN car, d'une part, les hybridations ARN/ARN sont plus stables que celles formées d'ADN et d'ARN et que d'autre part les moyens de synthèse nous étaient disponibles.

#### 3.1.1 Le système SP6/T7™.

Pour synthétiser une sonde spécifique au messenger de l'IL-10 bovine nous avons utilisé un kit commercialisé par Amersham, le système SP6/T7™. Ce kit livre deux plasmides, les pAM18 et pAM19 (**Figure 2-7**), comportant, outre le gène de résistance à



**Figure 2-8:** synthèse d'une sonde sense ou anti-sens dans le système SP6/T7

**Solution 19: DTT 0,2M**

- 1,4 Dithiothreitol (Merck) 308mg
- Porter à 10ml avec de l'eau distillée RNase-Free.

l'ampiciline, un site multiple de clonage, et, de part et d'autre de ce site, un promoteur de transcription spécifique à l'ARN polymérase du bactériophage SP6 (P-SP6), et un promoteur de transcription spécifique à l'ARN polymérase du bactériophage T7.

Ce système de synthèse est basé sur la capacité qu'ont ces deux plasmides de promouvoir, via leurs P-SP6, la transcription de la séquence en aval de ce promoteur. Le promoteur étant orienté il n'autorise la transcription que d'un seul côté (du côté du site multiple de clonage). Toute séquence insérée dans ce site multiple de clonage peut ainsi être transcrite en ARN. Il est néanmoins nécessaire de couper le plasmide juste après la fin de l'insert pour éviter que le polymérase ne transcrive aussi le plasmide.

### **3.1.2. Synthèse d'une sonde sense ou antisense.**

Il est possible de forcer la transcription d'un des 2 brins de l'insert spécifiquement. En effet, d'une part, le site multiple de clonage étant asymétrique et d'autre part la polymérase avançant de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' du brin matrice, l'utilisation de l'un ou l'autre plasmide permet de synthétiser spécifiquement l'un ou l'autre brin (**Figure 2-8**). On nommera le brin codant, brin "sense" et son complémentaire, brin "anti-sens".

Le kit permet également ce type de sélection avec 1 seul plasmide en procurant le promoteur T7 qui se situe à l'opposé du SP6. Il suffit alors de choisir et d'utiliser soit la T7 ARN polymérase soit la SP6 ARN polymérase pour synthétiser l'un ou l'autre brin.

## **3.2 Protocole.**

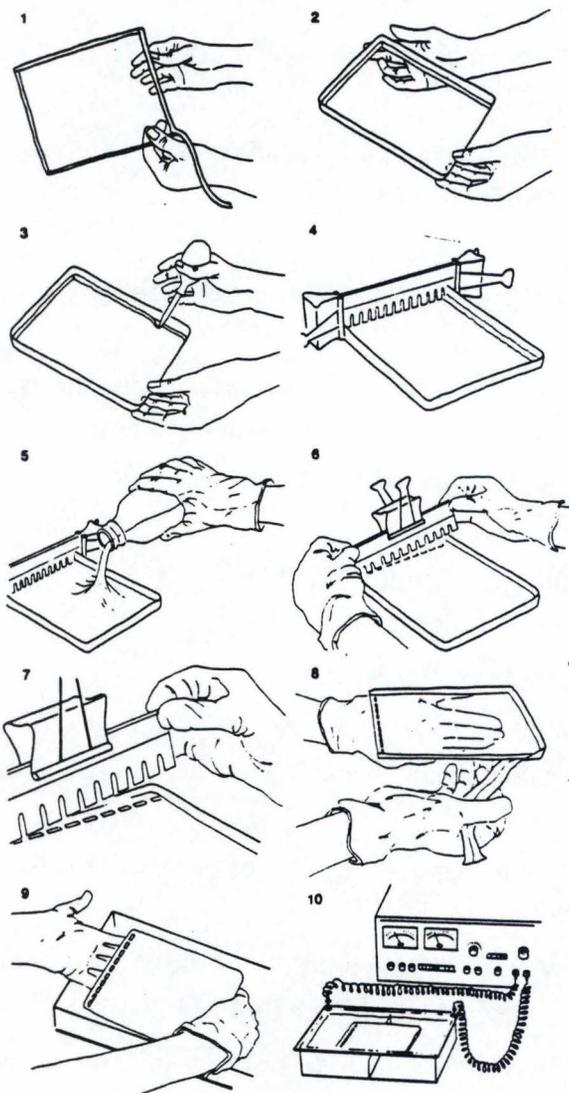
- Linéariser le plasmide par restriction à l'extrémité de l'insert opposée au promoteur SP6 (voir restriction).
- Préparer un milieu de réaction composée de:
  - 4  $\mu$ l du tampon de transcription 5x (Amersham, système SP6)
  - 1  $\mu$ l de 1,4 Dithiothreitol (DTT) 0,2M (**Solution 19**).
  - 1  $\mu$ l (20u) d'inhibiteur de RNase de placenta humain (HPRI).
  - 1,5  $\mu$ l d'un mélange de nucléotides équimolaire d'ATP, de CTP et de GTP (Kit SP6, Amersham).
- Ajouter à cette solution 2  $\mu$ g du plasmide linéarisé.
- Et ajouter 10  $\mu$ l de UTP marqué au  $^{35}$ S (Amersham, SJ263 UTP $\alpha$ S-S $^{35}$ )

- Porter à 20 $\mu$ l final avec de l'H<sub>2</sub>O distillée RNase Free pour que le volume final de la réaction (y compris la polymérase) soit de 20 $\mu$ l.
- Mélanger à température ambiante et ajouter 5 unités de SP6 ARN polymérase (Amersham)
- Incuber à 40°C pendant 1 heure.
- Eliminer l'ADN par incubation de 10 minutes à 37°C avec 2 unités de Désoxyribonucléase, (DNase, Amersham) et 20u de HPRI (Human Placental Ribonuclease Inhibitor).
- Extraire l'ARN au phénol (1 volume puis centrifuger 15' à 12000g en minifuge).
- Ajouter à la phase aqueuse récoltée 4  $\mu$ l d'acétate d'ammonium 5M et 40 $\mu$ l d'éthanol.
- Précipiter l'ARN de la sonde à l'éthanol pendant 30 minutes à -80°C ou toute la nuit à -20°C.
- Centrifuger 15 minutes à 12000g en minifuge à 4°C et enlever le surnageant. Resuspendre le culot dans de l'H<sub>2</sub>O distillée .

#### Calcul du pourcentage d'incorporation de radioactivité dans la sonde.

- Diluer 40 fois 1  $\mu$ l de la phase aqueuse (de l'extraction au phénol, voir avant) en eau
- Déposer 2x2  $\mu$ l du mélange sur deux filtres (A et B) (Whatman DE81)
  - Déposer 5  $\mu$ l du mélange sur un troisième filtre (C)
  - Laver les filtres B et C
    - 6 fois 5 minutes dans du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5M
    - 2 fois 1 minute dans de l'eau.
    - 2 fois 1 minute en éthanol 95%
- Sécher les 3 filtres à 37°C.
- Recouvrir les filtres avec le même volume de liquide scintillant (Ecoscint A, Kimberley Research)
- Compter le nombre de coups par minute dégagés par les filtres dans un compteur à scintillation Bêta.

Le filtre non lavé indiquera la radioactivité totale et les filtres lavés la radioactivité incorporée dans les acides nucléiques (le nombre de CPM du filtre B divisé par les CPM du filtre A donne le pourcentage d'incorporation d'UTP<sup>35</sup>S dans la sonde)



**Figure 2-9:** Coulage d'un gel d'agarose horizontal.

#### Préparation du milieu d'hybridation.

Pour l'expérience d'hybridation, dénaturer la sonde en la chauffant 3 minutes à 100°C et la déposer 5 minutes dans de la glace, puis prendre la quantité nécessaire de sonde pour qu'elle soit à une concentration de  $10^6$  CPM/ml dans le milieu d'hybridation (voir hybridation). La sonde resuspendue dans de l'eau distillée ou dans du milieu d'hybridation peut être conservée quelques mois à -20°C. La sonde peut être réutilisée plusieurs fois.

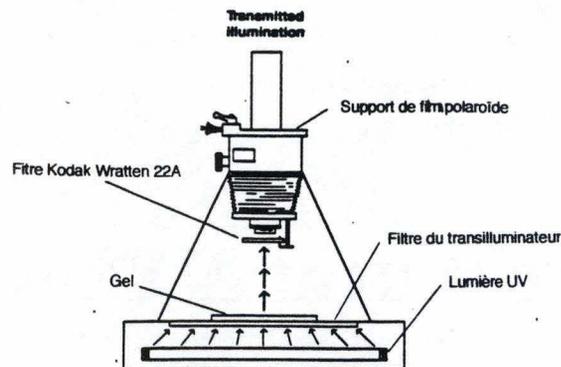
## 4. Gel d'agarose pour ADN ou ARN.

L'électrophorèse en gel d'agarose est la méthode standard utilisée pour séparer, identifier et isoler des fragments d'ADN et d'ARN. Les gels d'agarose ont un faible pouvoir de résolution mais ont une grande fourchette de séparation (150 pb-5000 Kb). Au sein d'un gel d'agarose, dans un tampon adéquat (voir préparation des gels et électrophorèses) et sous un champ électrique, l'ADN ou l'ARN migre alors dans le gel vers l'anode en fonction:

- de l'inverse du  $\log_{10}$  de sa taille en paires de bases (pb);
- du taux d'agarose: plus le gel est riche en agarose mieux les fragments sont différenciables et plus lente est la migration;
- du voltage appliqué : à faible voltage (50-100V) la migration est linéaire et proportionnelle à ce voltage;
- de la force ionique du tampon;
- de la forme de l'ADN : s'il est superenroulé, circulaire ou linéaire il freine plus ou moins son déplacement au sein du gel;

Les échantillons doivent être mis dans un tampon de chargement en fonction de leur nature (voir préparation des échantillons).

L'agarose est dissout à concentration voulue dans le tampon désiré et chauffé jusqu'à obtention d'un liquide clair. Il est ensuite refroidi à 65°C puis coulé et figé dans un moule par refroidissement à température ambiante (**Figure 2-9**). Le gel est ensuite déposé dans une cuve d'électrophorèse remplie du tampon *ad hoc* (voir gel ADN ou ARN) et de bromure d'éthidium à 0,5 $\mu$ g par ml. Les échantillons sont déposés dans les puits et un champ électrique de 50 à 100 V est appliqué.



**Figure 2-10: Photographie d'un gel d'agarose sous trans-illumination UV.**

**Solution 20: Tampon d'échantillons ADN.**

- Glycérol 5ml
- EDTA 1M 0,5ml
- Bleu de bromophénol 25 mg

Porter à 10 ml avec de l'eau distillée.

**Solution 21: TAE 1x (Tampon Tris-Acétate)**

Diluer 50x avec de l'eau distillée du TAE 50x composé de:

- Tris (Boehringer) 242g
- Acide acétique glacial (UCB) 57,1 ml

Porté à 100 ml avec de EDTA 0,5M

La localisation et la visualisation des fragments est rendue possible grâce à l'intercalation de bromure d'éthidium, un colorant fluorescent sous UV, entre les bases d'acides nucléiques. De 1 à 10 ng d'ADN sont ainsi visualisables sous une lumière UV. Il est possible de photographier ce gel avec un appareil Polaroid MP4 Land Camera équipé d'un film Polaroid 667 Prof Iso 3000/36°, d'un filtre Kodak Wratten n°22 et réglé sur une demi seconde d'exposition et 8 d'ouverture (**Figure 2-10**).

## **4.1 Gel ADN.**

### **4.1.1 Préparation des échantillons.**

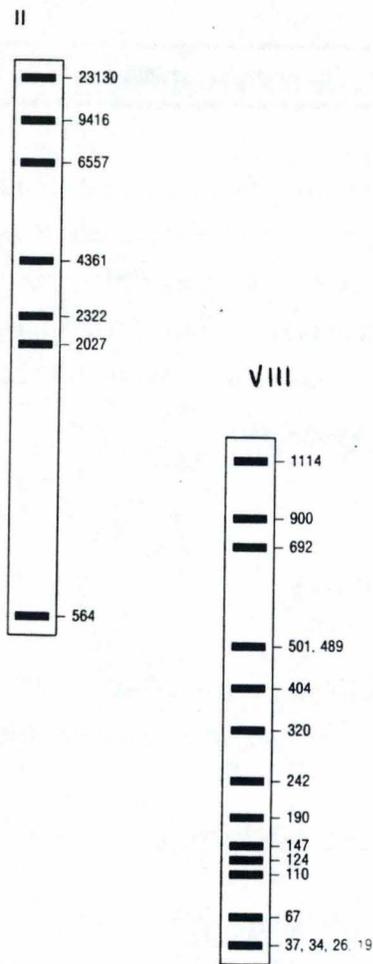
- Resuspendre l'ADN dans le volume désiré d'eau bidistillée.
- Ajouter du tampon pour échantillons pour ADN 10x concentré (**Solution 20**) pour obtenir une solution 1x concentrée en final.
- Déposer de 1 à 25  $\mu\text{l}$  de ce mélange sur gel ADN.

### **4.1.2 Préparation du gel et électrophorèse.**

- Dissoudre 2 g d'agarose (pour un gel 2%) dans 100 ml de TAE 1x (**Solution 21**) en chauffant sous agitation jusqu'à ce que le mélange soit clair.
- Laisser refroidir à 65°C.
- Couler dans le moule et placer les peignes en évitant les bulles d'air.
- Laisser solidifier 30 minutes.
- Enlever les peignes et charger le gel avec 1-25  $\mu\text{l}$  des échantillons d'ADN préparés comme précédemment.
- Déposer le gel et son support dans la cuve d'électrophorèse remplie de TAE 1x concentré avec 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de bromure d'éthidium.
- Appliquer un voltage de 100 volts et laisser migrer le front bleu jusqu'à 1 cm de la fin du gel (ou de la deuxième série de puits).

### **4.1.3 Utilisation de standards de poids moléculaires.**

Afin de pouvoir estimer la taille des fragments d'ADN on utilise des standards de poids moléculaires. Ces standards commerciaux sont constitués de fragments d'ADN de taille définie. En plus d'indiquer la taille des fragments ils permettent de mettre en relation intensité de fluorescence et quantité de matériel engagé. En effet, en connaissant la quantité



**Figure 2-11: Marqueurs de poids moléculaires ADN.**

**II: Marqueur n°2 de Boehringer Mannheim (ADN de phage  $\lambda$  digéré par HindIII)**

**VIII: Marqueur n°8 de Boehringer Mannheim (ADN du pUCBM21 digéré par Hpa II et ADN du pUCBM21 digéré par Dra I et Hind III)**

totale de marqueur déposée sur gel et en sachant le pourcentage en poids de chacun des fragments du marqueur, on peut associer à chaque bande du standard une quantité et une intensité. Il est possible alors, par comparaison des intensités, d'estimer la quantité de matériel que représente chaque bande inconnue. La **figure 2-11** montre le résultat de la migration des deux marqueurs que nous allons utiliser (2 et 8, de Boehringer Mannheim).

#### **4.1.4. Purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose.**

Pour purifier de l'ADN à partir d'un gel d'agarose préparatif, nous avons utilisé le kit GeneClean II™ (Westburg). Ce kit utilise la propriété qu'a une résine (Glass-milk™) de s'adsorber aux acides nucléiques dans certaines conditions de salinité. Le protocole suivi est celui préconisé par le fabricant.

La bande d'intérêt est excisée du gel préparatif d'agarose et son volume est déterminé. Ce morceau de gel est ensuite traité de la manière suivante:

- Ajouter 2 à 3 volumes d'une solution de NaI saturée.
- Incuber environ 10 minutes à 45-55°C. jusqu'au moment où tout l'agarose est fondu.
- Ajouter la solution de Glass-milk™ (10  $\mu$ l si la quantité d'ADN est inférieure à 5  $\mu$ g, ou 20  $\mu$ l si la quantité d'ADN est supérieure à 5  $\mu$ g).
- Incuber 5 minutes sur glace et centrifuger en minifuge 15 secondes pour éliminer le surnageant.
- Laver 3 fois avec la solution "New" (préparée à partir de 7ml de NewWash™ de 165 ml d'éthanol absolu et de 140 ml d'eau distillée).
  - Resuspendre le culot dans 10 à 50 fois son volume de "New"
  - Centrifuger 15 secondes en minifuge et éliminer le surnageant.
- Eluer l'ADN du Glass-milk™:
  - Resuspendre le culot dans 20  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O distillée.
  - Incuber 2-3 minutes à 45-55°C.
  - Centrifuger 30 secondes en minifuge et récupérer le surnageant.

## **4.2 Gel ARN.**

### **4.3.1 Préparation des échantillons.**

- Resuspendre de 1 à 10  $\mu$ g d'ARN dans de l'H<sub>2</sub>O distillée et ajouter 5 volumes de tampon

**Solution 22: Tampon de chargement pour ARN.**

- Formamide	0,75ml
- MOPS 10x (voir plus bas)	0,15 ml
- Formaldéhyde	0,24 ml
- Glycérol	0,1 ml
- Bleu de bromophénol à 10g/100ml	0,08 ml
- Eau bidistillée RNase-Free	0,1ml

**Solution 23: MOPS 10x**

- MOPS	20,93g
- NaAc	2,05g
- EDTA	1,861 ml

Porter à 500 ml avec de l'eau bidistillée RNase-Free.

Mettre à pH7.

de chargement (Electrophoresis Sample Buffer, **solution 22**). (Le volume total est fonction de la contenance des puits du gel).

- Chauffer 15 minutes à 65°C pour dénaturer l'ARN.
- Ajouter 1  $\mu$ l de bromure d'éthidium à 1mg/ml en eau bidistillée.

#### **4.3.2 Préparation du gel et électrophorèse.**

- Pour un gel de 100 ml dissoudre 1 g d'agarose dans 10 ml de MOPS 10x (**solution 23**) et 87 ml d'eau.
- Chauffer sous agitation jusqu'à ce que le mélange soit clair.
- Refroidir à 65°C.
- Ajouter 4 ml de formaldéhyde 37%.
- Couler le gel dans le support RNase Free équipé des peignes.
- Laisser refroidir une heure et enlever le peignes.
- Nettoyer les puits avec le tampon MOPS 1x.
- Charger les puits avec les échantillons.
- Remplir la cuve de MOPS 1x.
- Faire migrer l'ARN pour que le front bleu atteigne environ 1 cm de la fin du gel (ou de la seconde rangée de puits).

## **5. Hybridation avec une sonde ARN.**

Le principe est basé sur l'hybridation d'acides nucléiques fixés sur une membrane, avec une sonde ARN. Ces hybridations sont d'autant plus fortes que les deux séquences (sonde et acide nucléique cible) sont complémentaires. Le pourcentage de complémentarité entre deux séquences et la longueur des hybrides permettent de juger de la force de cette liaison et de calculer des conditions de température et de force ionique du milieu au-delà desquelles ces hybridations ne pourront plus se faire. On peut agir sur ces deux paramètres pour favoriser la spécificité d'hybridation. Plus la concentration en sels est basse et la température haute plus la spécificité sera grande.

Chaque hybridation dans des conditions chimiques données est donc caractérisée par une température de fusion ( $t_m$ , temperature of melting). Des formules du type de la suivante permettent de calculer ces températures suivant le type d'hybride :

Hybridation ADN/ARN.

$$T_m = 79,8 \text{ } ^\circ\text{C} - 18,5(\log_{10}[Na^+]) + 0,58(\%G+C) + 11,8(\%G+C)^2 - 0,35(\%formamide) - (820/l)$$

ou  $l$  = la longueur de l'hybride en paires de bases.

Il faut retrancher 1°C à ces températures par pourcent de bases non homologues entre les deux séquences. En pratique, la plupart des hybridations peuvent se faire dans les conditions moyennes (voir protocole présenté au point 5.4).

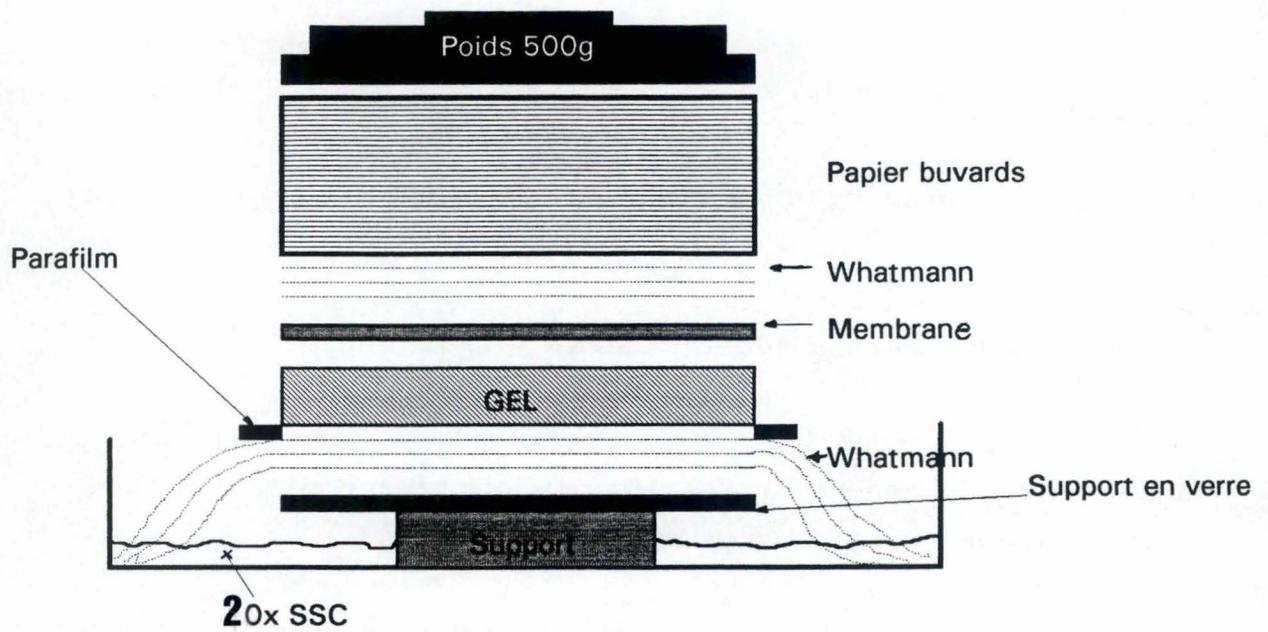
La technique d'hybridation reste la même quel que soit le système d'analyse utilisé (Northern blot, dot blot ou Southern blot). Seules les techniques de préparation des acides nucléiques diffèrent. Ces techniques vont maintenant être passées en revue.

## **5.1 Northern Blot.**

### **5.1.1 Principe.**

Le northern blot consiste à transférer de l'ARN à partir d'un gel sur un support solide (membrane de nylon ou de nitrocellulose) capable de permettre des hybridations spécifiques. De cette manière la position relative des bandes du gel d'agarose est préservée sur le support et la révélation de l'hybridation livre deux informations: la taille du fragment et son identité. Dans notre cas ce support sera une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim). Ce type de membrane résiste bien à de nombreuses hybridations ou lavages. Comme il est possible que des hybridations successives soient nécessaires nous avons préféré ce support résistant.

Le transfert va être réalisé par un entrainement du matériel nucléique hors du gel par capillarité. Une solution saline attirée par capillarité par des buvards est amenée à traverser le gel et à entrainer l'ARN sur une membrane de nylon. L'ARN est ensuite fixé au gel par cuisson et peut être conservé quelques semaines au sec.



**Figure 2-12:** Représentation schématique d'un montage en vue d'un transfert par Northern Blot.

**Solution 24: SSC 20x**

- NaCl 140,24g
- Citrate de sodium 65,76g

Porter à 800 ml avec de l'eau distillée RNase-Free.

### 5.1.2 Protocole.

- Découper 3 papiers Whatman 3MM et une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer) à la dimension du gel. Découper 6 papiers Whatman plus grand que le gel pour pouvoir tremper dans la solution de transfert (**Figure 2-12**). Découper des buvards à dimension du gel.
- Tremper la membrane dans de l'eau distillée RNase Free
- Tremper la membrane et les papiers dans du SSC 20x (**solution 24**).
- Eliminer le bromure d'éthidium du gel en trempant le gel 3 fois 20 minutes dans du MOPS 1x.
- Préparer le montage comme à la **figure 2-12**,
  - Placer une plaque de verre dans un récipient
  - Déposer une couche de 6 papiers Whatman 3MM larges s'étendant au delà de la plaque de verre et touchant le fond du récipient.
  - Déposer le gel face vers le haut au centre de la pile de papiers et repérer son orientation.
  - Recouvrir les papiers sur le périmètre du gel d'une bande de parafilm pour éviter les court-circuitages du flux de liquide des papiers vers les buvards sans passer par le gel.
  - Déposer la membrane de nylon sur le gel.
  - Déposer sur la membrane 3 épaisseurs de papiers Whatman 3MM coupé au dimensions du gel.
  - Placer sur les Whatman une pile de 10 cm de papiers buvards secs à dimension du gel.
  - Déposer au dessus du montage une plaque de verre et un poids d'environ 500g.
  - Humidifier le bas du montage (les longs papiers Whatman trempant dans le récipient) avec du SSC 20x.
- Laisser transférer 18 heures.
- Recueillir la membrane.
- Sécher délicatement la membrane en la déposant sur du papier Whatman.
- Cuire 1 heure 30 à 80°C.
- La membrane peut se conserver quelques semaines au sec.

## **5.2 Dot Blot.**

### **5.2.1 Principe.**

Le dot blot consiste à déposer des gouttes d'un mélange contenant les acides nucléiques à hybrider (en milieu aqueux) directement sur une membrane de nylon, formant ainsi des points (Dot) . L'étape de dénaturation se fait à 100 °C pendant 2 minutes suivie directement d'un dépôt sur glace. L'ADN plasmidique est mis en SSC 4x concentré.

### **5.2.2 Protocole.**

- Dénaturer les acides nucléiques pendant 2 minutes à 100°C.
- Déposer de suite sur glace.
- Découper une membrane de nylon, la tremper dans de l'eau bidistillée puis dans du SSC 20x concentré.
- Sécher 30 minutes à 37°C.
- Déposer sur la membrane de 1 à 10  $\mu$ l de la solution d'acides nucléiques à hybrider dans des cases tracées au crayon sur le filtre.
- Sécher 15 minutes à 37°C.
- Cuire 1h30 heures à 80°C.

## **5.3 Southern Blot.**

### **5.3.1 Principe.**

Le southern blot est basé sur le même principe que le northern blot, et en a les mêmes avantages, mais il est appliqué à l'ADN.

### **5.3.2 Protocole.**

- Faire migrer l'ADN sur un gel de 1,5% en agarose le temps désiré, avec du bromure d'éthidium (0,5  $\mu$ g/ml).
- Plonger le gel dans 500 ml d'une solution dénaturante de NaOH 0,5M/NaCl 1,5N fraîchement préparée sous légère agitation pendant 45 minutes.
- Neutraliser deux fois 30 minutes dans 500 ml de Tris-HCl 0,5M/NaCl 3M. (pH7)

**Solution 26: Milieu d'hybridation.**

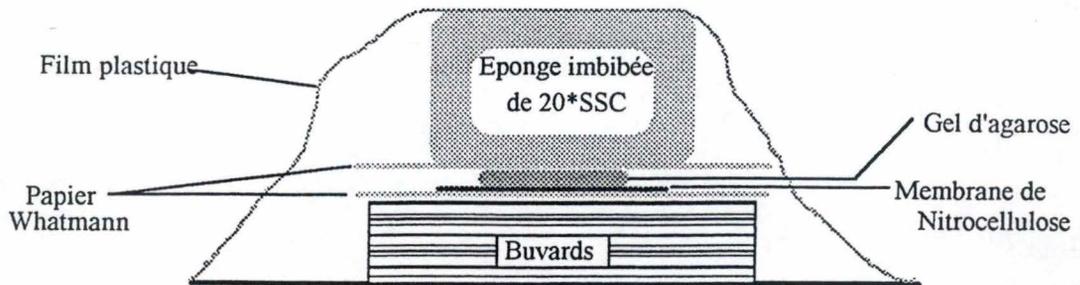
- Suspendre une sonde radioactive à  $10^6$ CPM/ml dans du milieu de préhybridation.

**Solution 27: SSC 2x / SDS 0,1%**

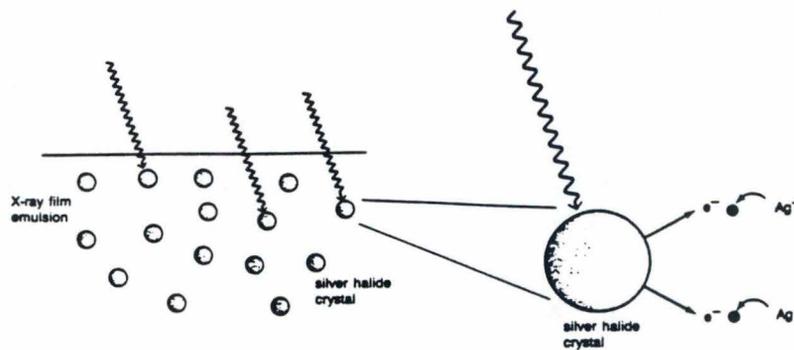
- SDS 1g
  - SSC 20x concentré 100 ml
- porter à 1 litre avec de l'eau distillée RNase-Free.

**Solution 28: SSC 0,2x / SDS 0,1%**

- SDS 1g
  - SSC 20x concentré 10 ml
- porter à 1 litre avec de l'eau distillée RNase-Free.



**Figure 2-13:** Représentation schématique du montage requis pour la réalisation d'un Southern Blot.



**Figure 2-14:** Événement conduisant à la formation d'une image autoradiographique.

**Solution 25: Milieu de préhybridation.**

- 10 ml d'une solution de SSC 20x concentrée diluée 3x en eau distillée.
- 10 ml de Denhardt composé de
  - 1g de Polyvinyl pyrrolidone (PVP)
  - 1g de Ficoll
  - 1g de Bovin Serum Albumin (BSA)
- 30 ml d'eau distillée RNase-Free
- 1 ml de SDS 10% (10g /100ml d'eau distillée RNase-Free)
- 30 ml de SSC 20x
- 1,25 ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé à 6mg/ml.
- 0,4 ml de SDS 10%
- 25 ml de formamide
- 3,25 ml d'eau distillée RNase-Free.

- Laisser baigner 20 minutes dans 500 ml de SSC 20x (Changer le SSC juste avant le transfert).
- Plonger la membrane de nylon dans du SSC 20x
- Réaliser le montage comme sur la **figure 2-13**.
- Laisser transférer durant environ 16 heures.
- Passer dans du SSC 3x sécher et cuire 2 heures à 80°C.

## 5.4 Hybridation avec sonde ARN au <sup>35</sup>S.

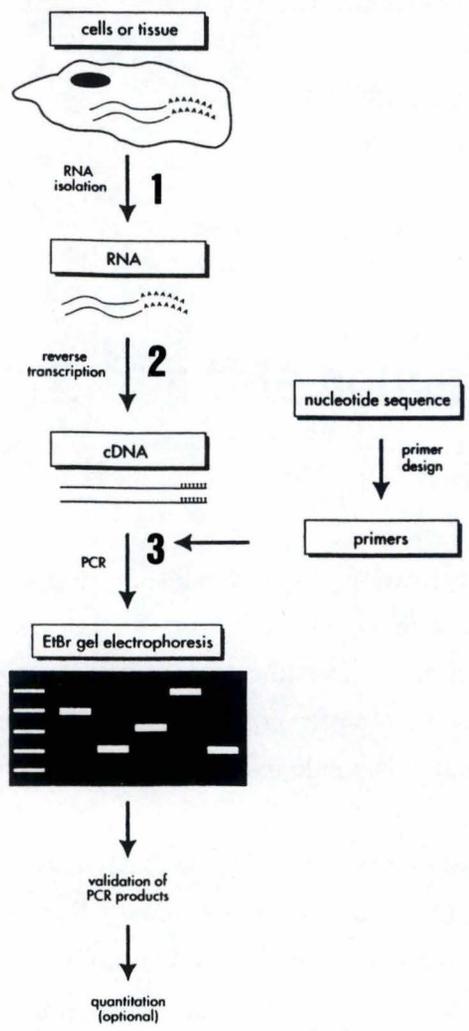
### 5.4.1 Principe.

Quel que soit la méthode de fixation d'acides nucléiques sur une membrane, la méthode d'hybridation est la même, elle consiste d'abord en une préhybridation pour recouvrir la surface de la membrane non recouverte d'acides nucléiques et ainsi limiter les attachements non spécifiques de la sonde à la membrane. Ensuite la membrane est mise en présence de milieu d'hybridation contenant la sonde marquée à raison de 10<sup>6</sup> CPM/ml.

Après hybridation à la température choisie (voir avant) des lavages à des conditions de stringence de plus en plus drastiques (température élevée et salinité basse), élimineront la sonde fixée à des structures non spécifiques. La révélation se fera en mettant la membrane en contact avec un film sensible aux rayons ionisants (Fuji NIF RX 100), la présence de radioactivité et donc de la sonde sera visualisée après révélation du film pour autoradiographie (**Figure 2-14**).

### 5.4.2 Protocole.

- Placer un récipient rempli de milieu de préhybridation (contenant du formamide) (**solution 25**) à 42°C sous agitation légère.
- Y baigner la membrane pendant deux heures.
- Récupérer le milieu de préhybridation.
- Verser dans le récipient le milieu d'hybridation (**solution 26**).
- Laisser incuber 15 heures à 42 °C sous légère agitation.
- Récupérer le milieu d'hybridation.
- Laver la membrane 3 fois en SSC 2x concentré/0,1% SDS (**Solution 27**) 30 minutes à 60°C .



**Figure 2-15: Diagramme schématique de la méthode de RT/PCR.**

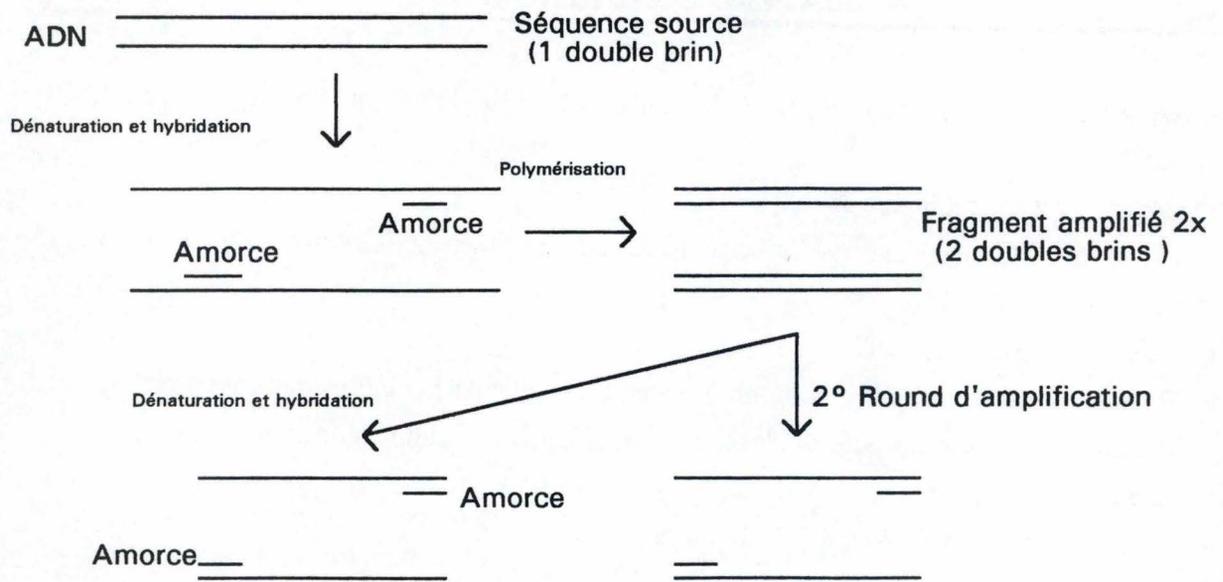
- Laver la membrane 2 fois en SSC 0,2x concentré/0,1% SDS (**Solution 28**) 30 minutes à 65°C.
- Sécher 30 à 60 minutes à 37°C.
- Placer la membrane dans une cassette d'autoradiographie (Kodak) en contact avec un film Fuji NIF RX 100.
- Placer la cassette à -70°C.
- Révéler le film en chambre noire en plongeant la pellicule 5 minutes dans le révélateur (Kodak), en la passant dans de l'eau, puis en la laissant 5 minutes dans du fixateur (Kodak).
- Rincer le film abondamment à l'eau claire.
- Laisser sécher.

## 6. RT / PCR.

### 6.1 Principe

Cette technique permet de mettre en évidence de très petites quantités d'un ARN messenger particulier. Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire du brin d'ARNm à détecter (Transcription inverse ou Reverse transcription (RT)), ce type d'ADN est appelé ADNc. Ensuite ce brin est amplifié, et par la suite son brin complémentaire, par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR, Polymerase Chain Reaction).

La transcription inverse (ou rétro-transcription) se fait ici à l'aide d'une enzyme, la reverse transcriptase (RTase) (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), Gibco), qui synthétise un brin d'ADN complémentaire d'un brin d'ARN (cDNA) à condition de fournir au système une amorce d'ADN (primer) de quelques dizaines de bases (20-30) complémentaire à la région 3' terminale de l'ARNm. La RTase allonge l'extrémité 3' de l'amorce en ajoutant des nucléotides complémentaires à la matrice d'ARN. Si on considère que la séquence de l'ARNm est une séquence "sense" c'est-à-dire codante, la séquence complémentaire est une séquence "anti-sense". Le primer capable de s'hybrider à la région 3' terminale de l'ARNm doit donc être "anti-sense". Comme illustré à la **figure 2-15**, l'ARN est tout d'abord isolé des cellules(1), cet ARN va servir de matrice à la transcription inverse en cDNA (2). Les primers peuvent être spécifiques au messenger ou bien consister en des polydéoxy-thymine (Oligo dT) spécifiques à la queue de poly-adénine



**Figure 2-16: Représentation schématique d'un cycle d'amplification PCR.**

commune à tous les ARN messagers. Dans ce dernier cas tous les messagers seront "rétro-transcript" en cDNA. Le cDNA sera produit en faible quantité et devra ensuite être amplifié par réaction de PCR (3).

La réaction de PCR permet d'amplifier jusqu'à un million de fois un fragment d'ADN double brin. Cette technique repose sur l'action d'une ADN polymérase capable de copier un brin d'ADN à haute température (72°C) (*Thermus brockianus* ADN polymérase, Dynazyme™). La stratégie consiste à faire fonctionner cette enzyme à partir d'un petit fragment d'ADN complémentaire d'une des extrémités de la région à amplifier. Cette amorce va s'hybrider à l'ADN et pourra être allongée par son extrémité 3'-OH libre par addition de nucléotides complémentaires à la séquence d'ADN matrice. Si on fait de même 50 à 2500 nucléotides plus loin sur l'autre brin, à l'autre extrémité de la zone à amplifier, avec une amorce spécifique à cette extrémité, et que l'on alterne sur un cycleur thermique des cycles de dénaturation des doubles brins, d'hybridation des amorces et de polymérisation, le nombre de doubles brins augmentera de manière exponentielle.

Les produits majeurs de cette réaction sont donc des doubles brins d'ADN d'une séquence comprise entre les deux amorces (**Figure 2-16**). En plus des ces fragments majoritaires, il y a production de fragments de longueurs variables mais le nombre de ces types de brins augmentera au cours des cycles de manière linéaire alors que le nombre des brins homologues augmentera de manière exponentielle. C'est la taille de ces doubles brins majoritaires qui sera visualisée, par après, sur un gel d'agarose.

Chaque cycle d'amplification comporte donc 3 étapes caractérisées par des températures différentes:

- L'ADN est chauffé à 95°C pour séparer les brins (Dénaturation).
- La température est baissée à 55 °C pour permettre aux amorces de se fixer (Hybridation).
- La température est ensuite montée à 72°C pour permettre le fonctionnement de la polymérase (Polymérisation).

## 6.2 Protocole.

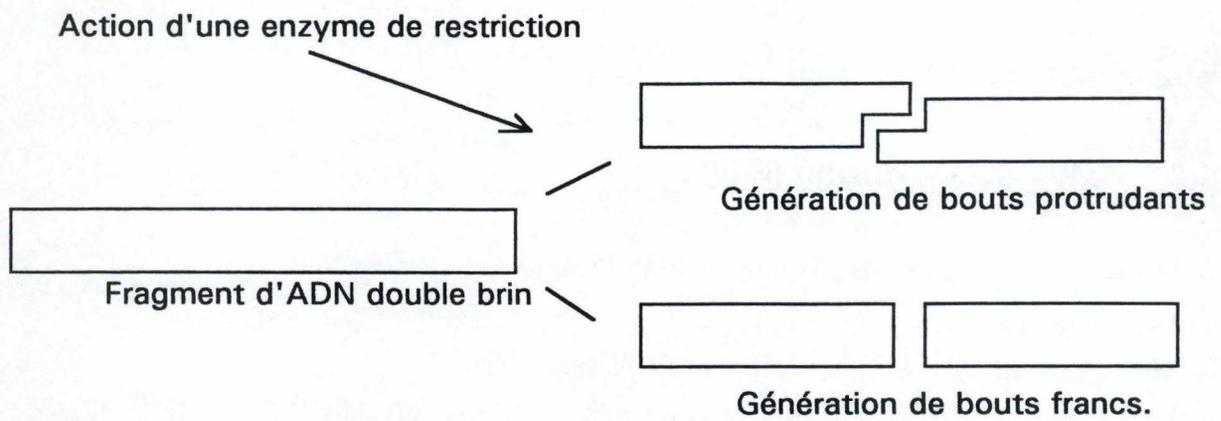
### 6.2.1 Rétro-transcription (RT)

- Dénaturer 5 $\mu$ g d'ARN dans 5 $\mu$ l d'eau distillée RNase-Free pendant 4 minutes à 100°C.
- Déposer de suite sur glace.
- Mettre ces 5 $\mu$ l dans un eppendorf pour PCR Rnase Free.
- La réaction aura lieu dans 20  $\mu$ l dans les conditions finales suivantes :
  - tampon M-MLV RTase™ (Gibco) 1x concentré
  - 10mM de 1,4 Dithiothréitol (DTT, Gibco)
  - 500  $\mu$ M de chaque nucléotide (dNTP)
  - l'oligonucléotide spécifique de la région 3' du messenger à 5 $\mu$ M.
  - 60u d'inhibiteur de RNase (Human Placental Ribonucleases Inhibitor, HPRI, Amersham)
  - 200u de M-MLV RTase™ (Gibco)
- Porter ce mélange à 20 $\mu$ l par de l'eau distillée RNase-Free.
- Réaliser le cycle suivant sur un cycleur thermique (Techne PHC-3, New Brunswick Scientific) :
  - 10 minutes à 23°C.
  - 60 minutes à 37°C.
  - 5 minutes à 95°C.
- Déposer sur glace ou congeler à -20°C.

### 6.2.2. Polymérisation en chaîne (PCR).

Porter les 20 $\mu$ l du résultat de la RT à 100 $\mu$ l dans les conditions suivantes:

- Tampon 0,1x concentré PCR/Dynazyme™.
- 0,1 mM de dNTP
- Oligo 3' à 1pM/ $\mu$ l.
- Oligo 5' à 1pM/ $\mu$ l.
- 4u de polymérase Dynazyme™.
- Porter à 100 $\mu$ l par de l'H<sub>2</sub>O distillée RNase Free.
- Ajouter délicatement une couche de 100  $\mu$ l d'huile minérale pour éviter l'évaporation.
- Lancer la PCR sur un cycleur thermique et réaliser les cycles suivants:
  - 95°C 10 minutes



**Figure 2-17: Représentation schématique du type de coupure engendrée par les enzymes de restriction.**

et 36 fois le cycle suivant:

95°C 1 minute

55°C 1 minute

72°C 1 minute

Ajouter une étape à 72°C 1 minute.

- A la fin de la PCR congeler à -20°C.

- Une fois gelé, enlever l'huile restée liquide de l'échantillon.

- Déposer 10-20% du résultat de la RT-PCR sur gel d'agarose 2%. (Préparer l'échantillon avec

10% de tampon d'électrophorèse, voir gel ADN).

## **8. Restriction.**

### **8.1 Principe**

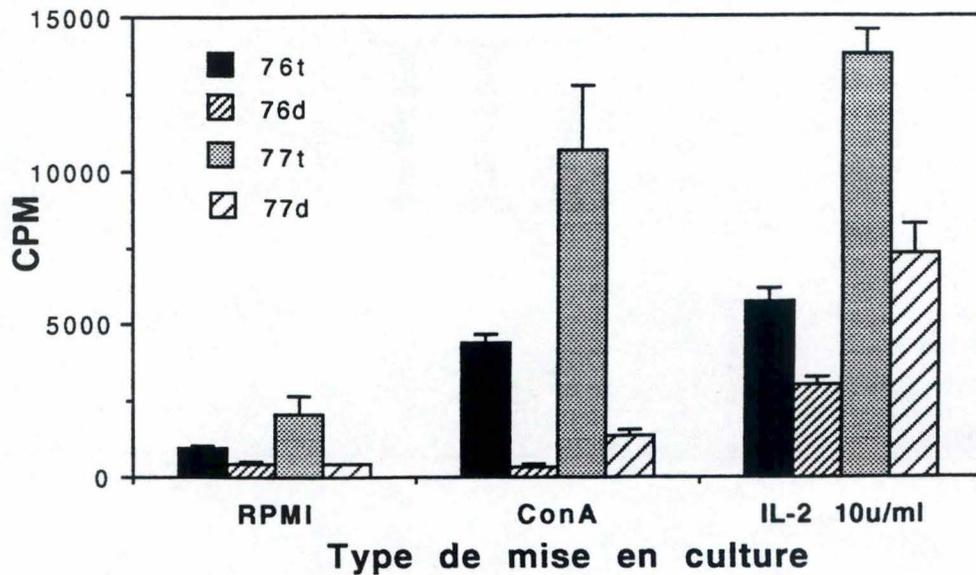
Les enzymes de restriction peuvent couper avec précision de l'ADN, en reconnaissant des séquences spécifiques. La plupart des enzymes de restriction ont une séquence de reconnaissance palindromique de 4 à 6 paires de bases. Il y a deux types d'enzymes, celles qui coupent au centre de cette séquence générant des bouts francs ou celles qui coupent à quelques nucléotides de distance générant elles, des bouts protrudants (**Figure 2-17**). Nous avons utilisé ce dernier type d'enzyme pour exciser les parties de plasmides, ou linéariser des plasmides en des sites spécifiques.

### **8.2 Protocole.**

- Déposer l'ADN à restreindre dans un tube eppendorf de 1,5ml.
- Ajouter du tampon de restriction 10x concentré pour que le mélange final soit à une concentration en tampon de 1x.
- Introduire 1-10u d'enzyme de restriction pour 1 µg d'ADN.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- La réaction peut être arrêtée en inactivant l'enzyme par chauffage pendant 15 minutes à 65°C ou à 85°C si elle est thermo sensible, sinon par extraction au phénol. (Eco RI, par exemple est inactivé en la chauffant à 65°C. puis en la refroidissant 20 minutes à température ambiante).

# III

## *Résultats*



**Figure 3-1:** Prolifération de populations lymphocytaires de bovins en PL déplétées (d) ou non (t) en ses lymphocytes T après 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de tests réalisés en triplicates. (RPMI=milieu seul, ConA=milieu additionné de 20 $\mu$ g/ml de Concanavoline A, IL-2 = IL-2h à 10u/ml, CPM=coups par minute).

# 1. Influence de cytokines sur les lymphocytes B CD5.

La première partie de ce travail a consisté en l'observation de l'influence de l'interleukine-10 et de l'interleukine-6 sur les lymphocytes B CD5 bovins. Ces cellules sont issues du sang périphérique de bovins infectés par le BLV et en lymphocytose persistante. Des études entreprises par d'autres groupes sur la souris ayant révélé la sensibilité des cellules B CD5 murines à l'IL-10 murine (O'Gara *et coll.*, 1992a), nous avons envisagé une étude similaire sur les cellules B CD5 bovines d'animaux en PL. Pour mettre en évidence une telle sensibilité, nous avons utilisé des tests de prolifération, des tests de sécrétion d'immunoglobulines et des marquages en immunofluorescence.

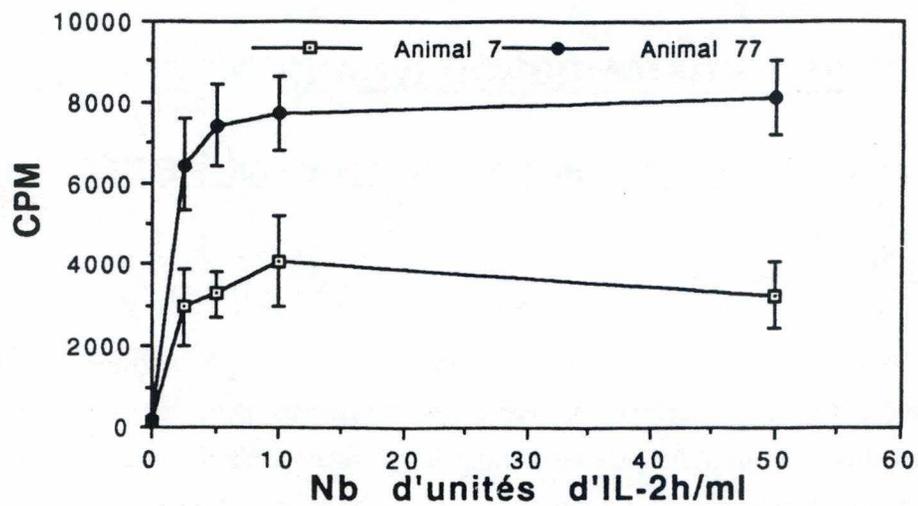
## 1.1. Tests de transformation lymphoblastique.

### 1.1.1. Action de l'IL-2h sur la prolifération des cellules B CD5.

#### A/ Contrôles de déplétion.

Afin de s'assurer de la bonne déplétion en cellules T des populations lymphocytaires B CD5, lors de chaque test ces cellules ont été mises en présence d'un mitogène des lymphocytes T, la concanavaleine A (Con A). Cette lectine d'origine végétale n'influençant pas la prolifération des cellules B, une non-prolifération des cultures en présence de ConA assure d'une déplétion convenable en cellules T.

Nous avons mis en culture des populations lymphocytaires totales de deux bovins en PL (animaux 76 et 77) et cette même population déplétée en ses lymphocytes T en présence ou non de 20  $\mu\text{g/ml}$  de concanavaleine A. Le taux de prolifération de ces cellules a été mesuré par incorporation de thymidine tritiée (exprimée en CPM) après 6 jours de culture. Comme présenté à la **figure 3-1**, on voit que l'indice de stimulation des populations totales en présence de ConA est de 5 à 6. Par contre l'indice de stimulation des populations déplétées en présence de ConA est de 0 à 2. On voit donc que la ConA donne une indication sur la déplétion de la population en ses cellules T. Par exemple la population 76 été très bien déplétée (indice de stimulation de 0) tandis que pour la population 77 la déplétion a été imparfaite (indice de stimulation de 2).



**Figure 3-2:** Courbe dose/réponse d'une stimulation par l'IL-2h d'une population lymphocytaire déplétée en cellules T d'animaux en PL. La culture s'est déroulée pendant 6 jours.

Par ailleurs, on observe que les taux moyens de prolifération peuvent varier significativement entre deux animaux (par exemple du simple au double entre les animaux 76 et 77 non déplétés en RPMI) et que la prolifération moyenne des populations déplétées est inférieure à celle des populations totales.

#### B/ Effet de l'IL-2 humaine sur la prolifération des cellules B CD5.

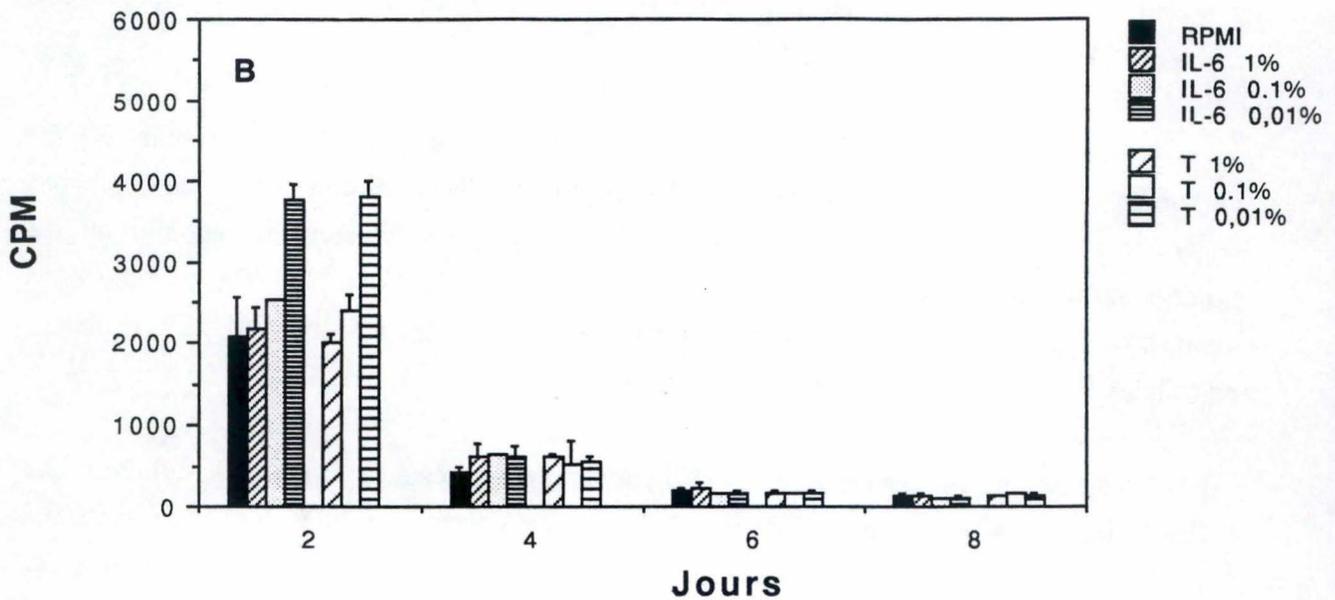
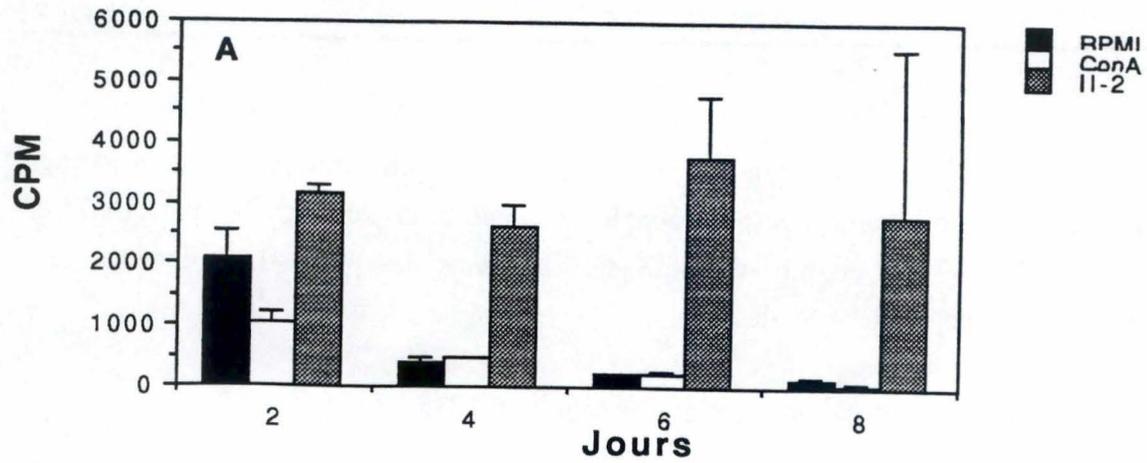
En référence aux travaux réalisés au laboratoire, et dans le but d'avoir un témoin positif de prolifération, nous avons testé l'influence de l'IL-2 humaine à 10 u/ml sur les mêmes populations lymphocytaires que précédemment. La **figure 3-1** indique que les populations totales et les populations déplétées prolifèrent en présence de cette interleukine, les indices de stimulation sont de 6 (animal 76) à 14 (animal 77). Les cellules B CD5 comme la population totale prolifèrent donc en présence d'IL-2h

Nous avons également testé des concentrations variables d'IL-2h sur des cellules B CD5 en vue de choisir une concentration en IL-2 suboptimale. Dans ces conditions nous pourrions tester son action conjointe avec une autre cytokine, et pourrions détecter une inhibition ou une synergie entre les deux cytokines pour la prolifération des cellules B CD5. Dans ce but nous avons incubé pendant 6 jours des populations lymphocytaires des animaux 76 et 77, déplétées en cellules T, en présence de concentrations croissantes d'IL-2h (0, 2.5, 5, 10 et 50 u/ml).

Les résultats d'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine, présentés à la **figure 3-2**, montrent que l'effet de l'IL-2h est encore bien marqué à 2,5 u/ml. On constate un effet dose/réponse de 0 à 10u/ml d'IL-2 et un effet de plateau à des concentrations supérieures à 10u/ml. Ces observations nous permettent de choisir une concentration d'IL-2 suboptimale de 1 à 2,5u/ml d'IL-2 pour nos prochains tests.

#### 1.1.2. Action de l'IL-6 bovine sur les cellules B CD5.

Ayant à notre disposition du surnageant de culture de cellules COS transfectées avec le cDNA de l'IL-6 bovine (COS-IL-6b) nous avons testé l'effet de celui-ci sur les cellules B CD5 de l'animal 76 cultivées au cours du temps. L'IL-6 agissant dans l'étape finale de différenciation des cellules B normales, il était intéressant de voir si les cellules B CD5 étudiées y étaient sensibles.



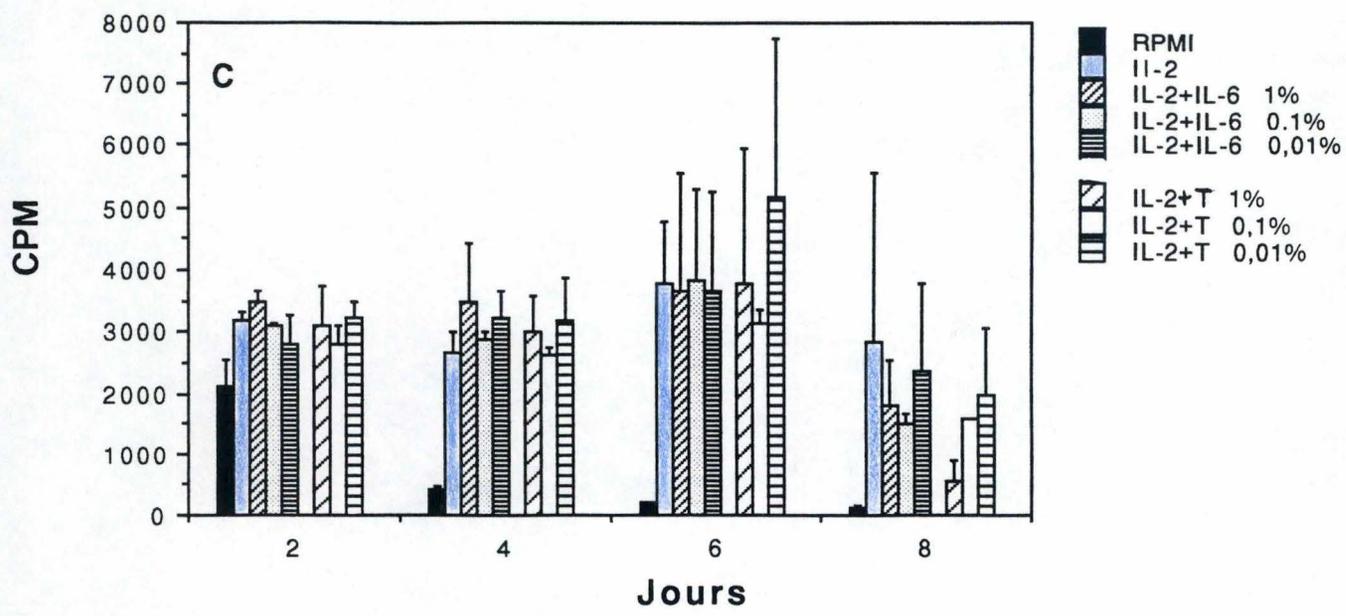
**Figure 3-3: Prolifération de cellules B CD5, cultivées de 2 à 8 jours, en présence de:**

- Milieu de culture seul (RPMI)
- Milieu avec 20 $\mu$ g/ml de ConA (ConA)
- Milieu avec 1u/ml d'IL-2h (IL-2)
- RPMI avec x% de surnageant COS-IL-6b ou témoins (IL-6 x% et T x%)
- RPMI avec 1u/ml d'IL-2h et x% de surnageant COS-IL-6b ou témoins (IL-2+IL-6 x% et IL-2+T x%)

**A : Témoins**

**B : IL-6 seul**

**C : IL-6+IL-2**



**Figure 3-3: (Suite)**

Nous avons cultivé ces cellules dans des puits contenant du milieu de culture seul (RPMI), et des puits contenant du milieu additionné :

- de ConA à 20 $\mu$ g/ml comme témoin de déplétion (ConA),
- de surnageant COS-IL-6 à 10, 1, 0.1 et 0.01% (nos surnageants à tester) (IL-6 x%),
- de surnageants témoins de cellules COS non transformées avec le gène de l'IL-6 bovine (COS-T) à 10, 1, 0.1 et 0.01% (T x%),

ou bien dans des puits contenant du RPMI à 1u/ml d'IL-2h seul (IL-2), ou additionné :

- de surnageant COS-IL-6 à 10, 1, 0.1 et 0.01% (IL-2+IL-6 x%),
- de surnageant COS-T à 10, 1, 0.1 et 0.01% (IL-2+T x%).

Ces dernières conditions permettront de tester les éventuelles synergies ou antagonismes entre l'IL-2 et l'IL-6.

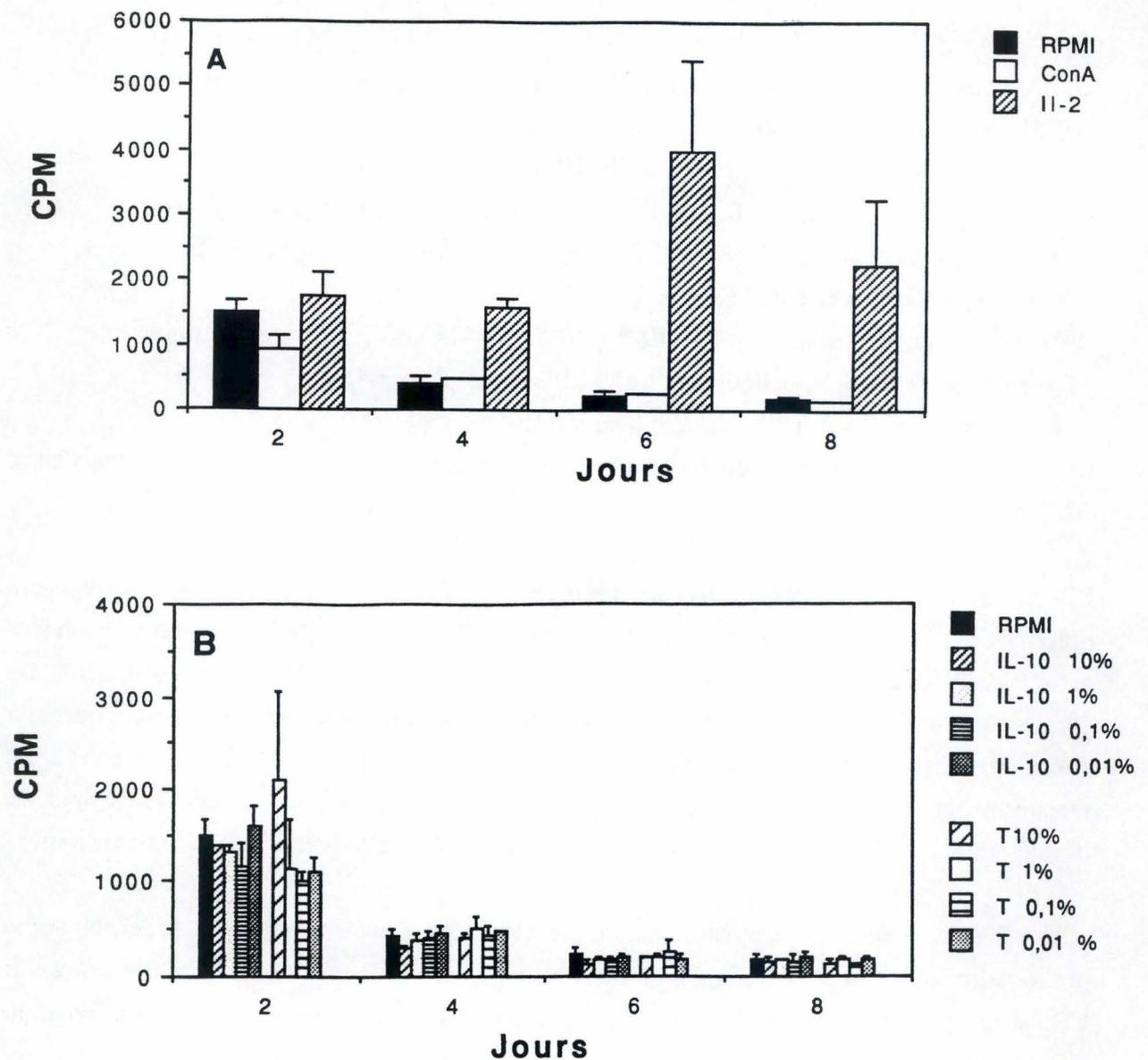
Les résultats des proliférations mesurées après 2, 4, 6 et 8 jours de culture sont présentés à la **figure 3-3**. Aucune prolifération significativement différente n'est observable entre les cellules cultivées en RPMI seul ou avec les surnageants COS-IL-6b ou les COS-T. De plus aucune différence de prolifération significative n'est observée entre le RPMI contenant 1u/ml d'IL-2h et ce milieu additionné des surnageants COS-IL6b et COS-T. Par contre, on remarque par la ConA que la déplétion en cellules T est bonne, et que le témoin de prolifération, l'IL-2h, est efficace et a un indice de stimulation maximum (16) au sixième jour.

Il semble donc que ce test ne puisse pas mettre en évidence l'influence de l'IL-6b sur la prolifération des cellules B CD5. On pourrait attribuer ce résultat à l'insensibilité des cellules B CD5 à cette cytokine, mais il serait nécessaire de réaliser d'autres tests pour confirmer ou infirmer cette hypothèse (tests de sécrétion d'Ig ou de variation phénotypique).

### **1.1.3 Action de l'IL-10 humaine sur les cellules B CD5.**

Pour mettre en évidence l'effet éventuel de l'IL-10 humaine (IL-10h) sur les cellules B CD5 bovine, nous avons réalisé le même type de test que précédemment avec l'IL-6b mais cette fois avec des surnageants de cellules CHO transformées (CHO-IL-10) ou non (CHO-T) avec le gène codant pour l'IL-10h.

Nous avons cultivé ces cellules dans des puits contenant du milieu de culture seul (RPMI), et des puits contenant du milieu additionné :



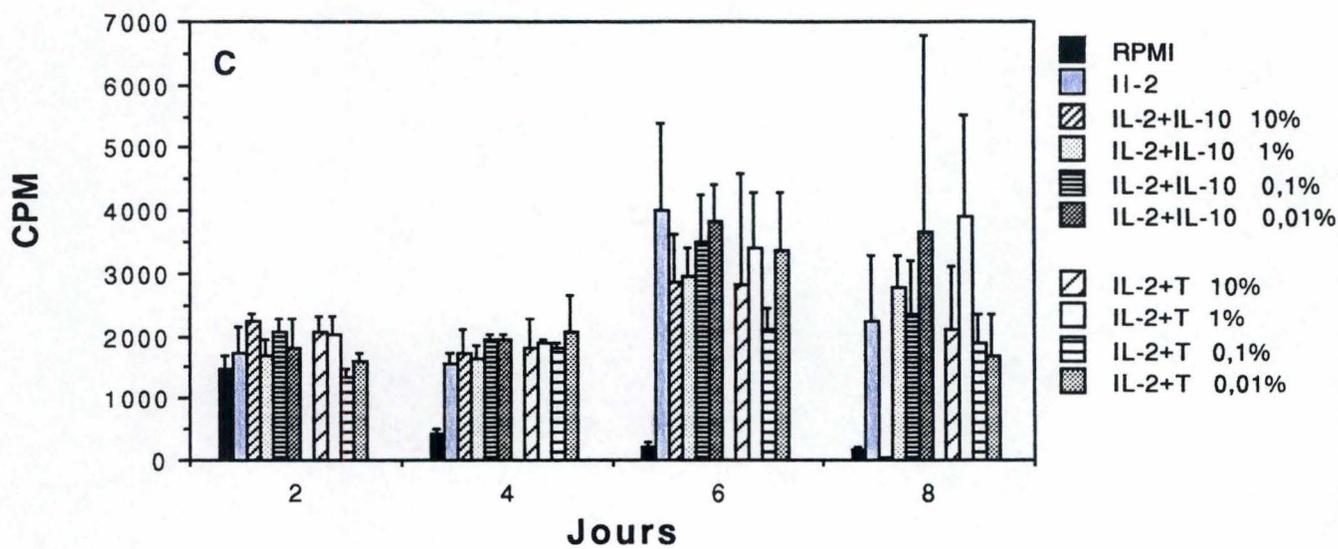
**Figure 3-4: Prolifération de cellules B CD5, cultivées de 2 à 8 jours, en présence de:**

- Milieu de culture seul (RPMI)
- Milieu avec 20 $\mu$ g/ml de ConA (ConA)
- Milieu avec 1u/ml d'IL-2h (IL-2)
- RPMI avec x% de Surnageant CHO-IL-10h ou témoins (IL-10 x% et T x%)
- RPMI avec 1u/ml d'IL-2h et x% de surnageant CHO-IL-10h ou témoins (IL-2+IL-10 x% et IL-2+T x%)

**A : Témoins**

**B : IL-10 seul**

**C : IL-10+IL-2**



**Figure 3-4: (Suite)**

- de ConA à 20 $\mu$ g/ml comme témoin de déplétion (ConA),
  - de surnageant CHO-IL-10 à 10, 1, 0.1 et 0.01% (nos surnageants à tester) (IL-10 x%),
  - de surnageant CHO-T à 10, 1, 0.1 et 0.01% (T x%),
- ou bien dans des puits contenant du RPMI à 1u/ml d'IL-2h seul (IL-2), ou additionné :
- de surnageant CHO-IL-10 à 10, 1, 0.1 et 0.01% (IL-2+IL-10 x%),
  - de surnageant CHO-T à 10, 1, 0.1 et 0.01% (IL-2+T x%).

Ces dernières conditions permettront de tester les éventuels synergies ou antagonismes entre l'IL-2h et l'IL-10h sur les B CD5.

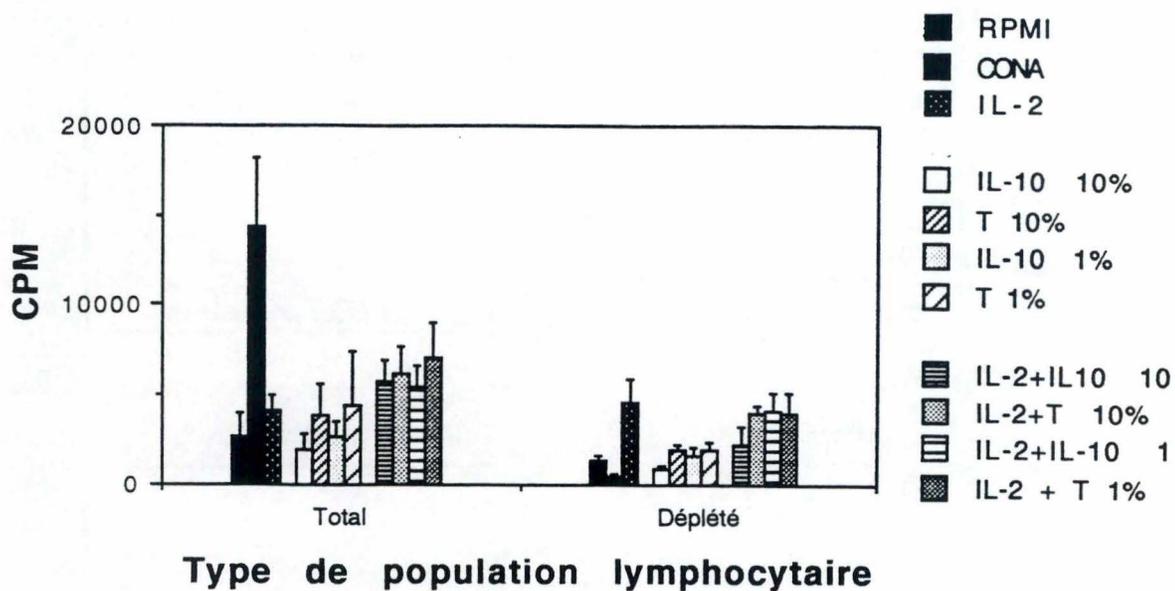
Les résultats des proliférations mesurées après 2, 4, 6 et 8 jours de culture sont présentés à la **figure 3-4**. Aucune prolifération significativement différente n'est observable entre les cellules cultivées en RPMI seul ou avec les surnageants CHO-IL-10h et CHO-T. De plus aucune différence de prolifération significative n'est observée entre le RPMI contenant 1u/ml d'IL-2h et ce milieu additionné des surnageants CHO-IL10h et CHO-T. Par contre, les témoins de déplétion (ConA) renseignent de la pureté relative de la préparation de cellules B CD5.

Il n'est donc pas possible d'attribuer une action de l'IL-10 humaine sur la prolifération des cellules B CD5 bovines, que ce soit une activation ou une inhibition. On pourrait attribuer cette absence de prolifération à l'insensibilité des cellules B CD5 à l'IL-10. Il se peut qu'elles ne possèdent pas de récepteur à l'IL-10. On peut également penser qu'elles possèdent les récepteurs à l'IL-10 mais que l'IL-10 humaine n'ait que peu ou pas d'affinité pour les cellules bovines. Il est également possible que l'action de cette cytokine sur les cellules B CD5 bovines ne consiste pas en une modification de la prolifération cellulaire mais induise d'autres types de réponses.

Pour vérifier si les surnageants CHO-IL-10h sont inactifs même sur une population non déplétée de lymphocytes, nous avons mis en culture une population lymphocytaire totale et déplétée en cellules T de l'animal 76 pendant 6 jours. Ces cellules ont été cultivées avec :

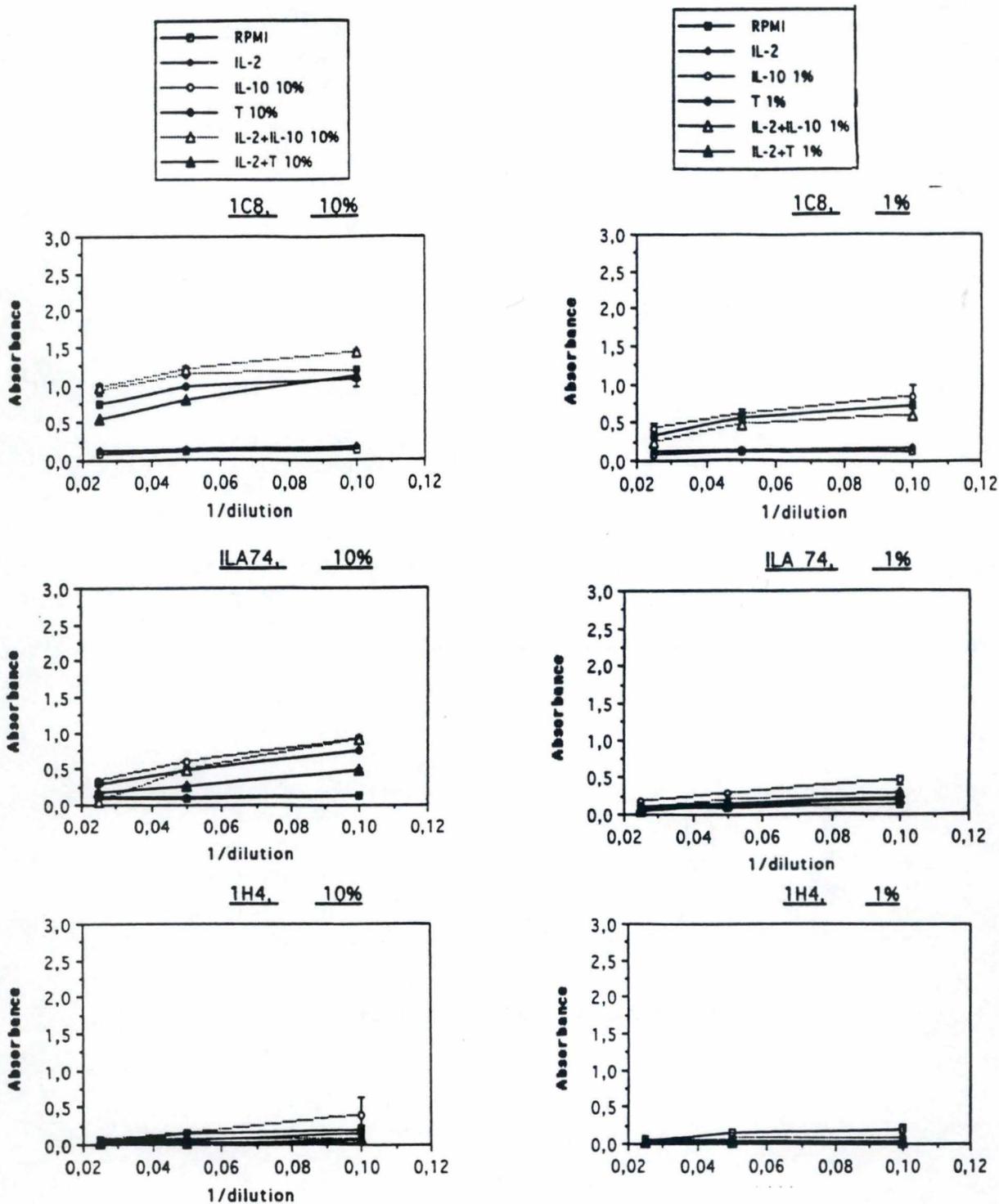
soit du RPMI seul (RPMI) soit du RPMI additionné:

- de ConA à 20 $\mu$ g/ml comme témoin de déplétion (ConA),
  - de surnageant CHO-IL-10 à 10 et 1% (IL-10 x%),
  - de surnageant CHO-T à 10 et 1% (T x%),
- soit de RPMI à 1u/ml d'IL-2h seul ou additionné :
- de surnageant CHO-IL-10 à 10 et 1% (IL-10 x%),



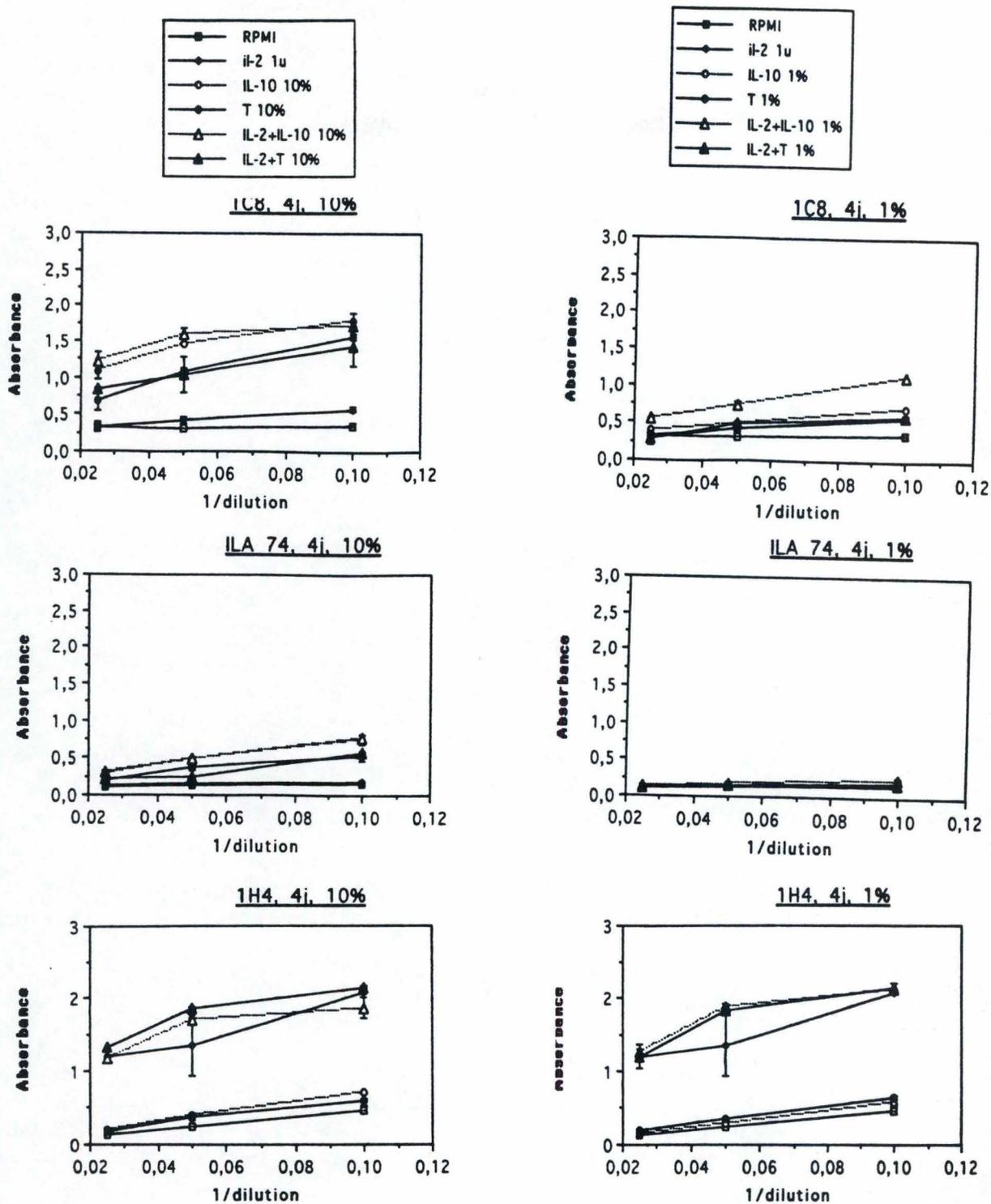
**Figure 3-5: Prolifération de cellules issues d'une population lymphocytaire déplétée ou non en cellules T d'animal en PL (n°76), incubée pendant 6 jours de culture en présence de:**

- RPMI seul (RPMI)
- avec 20µg/ml de ConA (ConA)
- avec 1u/ml d'IL-2h (IL-2)
- RPMI avec x% de surnageant CHO-IL-10h ou témoin (IL-10 x% et T x%)
- RPMI avec 1u/ml d'IL-2h et x% de surnageant CHO-IL-10h ou témoins (IL-2+IL-10 x% et IL-2+T x%)



**Figure 3-6 (A): Résultat d'ELISA de détection d'Ig dans différents milieux de culture (avant culture).**

- RPMI seul (RPMI)
- RPMI avec 1u/ml d'IL-2h (IL-2)
- RPMI avec x% de surnageant CHO-IL-10h ou témoins (IL-10 x% et T x%)
- RPMI avec 1u/ml d'IL-2h et x% de surnageant CHO-IL-10h ou témoins (IL-2+IL-10 x% et IL-2+T x%)



**Figure 3-6 (B): Résultat d'ELISA de détection d'Ig dans le surnageant de culture de cellules B CD5 cultivées 4 jours dans les milieux suivants:**

- RPMI seul (RPMI)
- RPMI avec 1u/ml d'IL-2h (IL-2)
- RPMI avec x% de surnageant CHO-IL-10h ou témoins (IL-10 x% et T x%)
- RPMI avec 1u/ml d'IL-2h et x% de surnageant CHO-IL-10h ou témoins (IL-2+IL-10 x% et IL-2+T x%)

- de surnageant CHO-T à 10 et 1% (T x%).

Les résultats présentés à la **figure 3-5** confirment que les surnageants CHO ne semblent pas agir sur la prolifération des cellules B CD5. D'autre part, la prolifération de la population totale ne semble pas non plus être influencée par les surnageants.

Nous avons donc envisagé de tester d'autres manifestations éventuelles de l'influence de l'IL-10h sur les cellules bovines comme la sécrétion d'Ig ou les variations phénotypiques.

## **1.2. Mesure de la sécrétion d'immunoglobulines.**

Un test ELISA de capture a été réalisé pour tester l'éventuelle sécrétion d'Ig dans les surnageants de culture de cellules B CD5 cultivées en présence des surnageants CHO-IL-10h. Des cellules B CD5 ont été isolées de la population lymphocytaire de l'animal 76, et mises en culture dans du milieu RPMI seul ou additionné de:

- 1 ou 10% de surnageant CHO-IL-10h (IL-10 x%),
- 1 ou 10% de surnageant CHO-T (T x%),

ou bien mises en culture dans du RPMI à 1u/ml d'IL-2h (IL-2) seul ou en présence de:

- 1 ou 10% de surnageant CHO-IL-10h (IL-2+IL-10 x%),
- 1 ou 10% de surnageant CHO-T (IL-2+T x%).

Il a été montré au laboratoire que l'IL-2 induit la production d'IgM par les cellules B CD5 bovines, les milieux en contenant nous livreront donc un témoin positif, ou un moyen de mettre en évidence une inhibition de synthèse ou une synergie.

Nous avons d'abord testé la présence d'IgM, d'IgG1 et d'IgG2 bovins dans les différents milieux de culture pour avoir une référence avant culture. Pour cela, un test ELISA de capture a été réalisé avec les anticorps 1H4, IC8 et ILA74 (reconnaissant spécifiquement les IgM, les IgG1 et les IgG2 bovins) sur les milieux de culture dilués 10, 20 et 40x. Nous observons à la **figure 3-6a** que les milieux de culture contenant du surnageant de cellules CHO contiennent des IgG1, peu d'IgG2 et pas d'IgM. La présence d'IgG1 et d'IgG2 dans ces surnageants est due à l'utilisation de FCS dans la culture des cellules CHO.

Nous avons ensuite testé de la même manière la présence de ces Ig dans les surnageants de culture des cellules B CD5 incubées sous différentes conditions pendant 4 jours. A la **figure**

Type de cellules	% de cellules marquées par le 1H4 (IgM+)	% de cellules marquées par le 8C11 (CD5+)	% de cellules marquées par le 1H8 (CD6+, cellules T)	% de cellules marquées par le 7C7 (CMH classe II+)	% de cellules marquées par le 2G1 (CD11c+)	% de cellules marquée en PBS (témoin négatif)
Animal 76 Non déplété	76.3	87.1	25.5	85.2	54.8	6.4
Animal 76 déplété en T	96.7	82.2	5.0	91.1	46.8	1.4
Animal 163 Non déplété	66.5	86.0	16.1	74.9	42.5	2.5
Animal 163 déplété en T	94.3	80.2	3.7	91.5	25.6	1.3

**Tableau 3-1:** Résultats de marquage en immunofluorescence (FACS) montrant le pourcentage de cellules de différentes origines, marquées (intensité de fluorescence > au témoin négatif). Les animaux 76 et 163 sont des bovins infectés par le BLV et en PL.

**3-6b** on remarque que seules les cellules cultivées en présence d'IL-2 secrètent des IgM. On ne détecte aucune sécrétion d'IgG1 et d'IgG2 à aucune condition. Par ailleurs, la présence de surnageant CHO(T et IL-10) dans le milieu de culture n'induit (si présent seul) ni ne modifie (si en présence d'IL-2) la sécrétion d'IgM.

On ne peut donc pas affecter à nos surnageants CHO-IL-10h, la capacité d'induire la sécrétion d'IgM, d'IgG1 ou d'IgG2 chez les cellules B CD5 bovines.

### **1.3. Analyse du phénotype cellulaire.**

Le phénotype des cellules mononucléées totales et déplétées en lymphocytes T d'animaux en PL a été observé au FACS après marquage en immunofluorescence. Les résultats de ce marquage montrent qu'après déplétion de la population lymphocytaire en cellules T, le pourcentage de cellules portant le CD5 (marqueur habituellement propre aux cellules T) diminue à peine (**Tableau 3-1**). Ceci indique que d'autres cellules que les lymphocytes T expriment ce marqueur. Par ailleurs le pourcentage de lymphocytes B (cellules IgM<sup>+</sup>) augmente après déplétion, pour former la quasi totalité de la population cellulaire, tandis que les cellules T disparaissent presque totalement (marquées via leur CD6). Le pourcentage élevé de cellules marquées au niveau de leurs molécules de CMH de classe II après déplétion, confirme la richesse de la population cellulaire en lymphocytes B.

Nous avons tenté de mettre en évidence un éventuel changement phénotypique d'une population lymphocytaire déplétée ou non en cellules T au cours d'une culture en présence des surnageants CHO (T ou IL-10). Dans aucune condition nous n'avons pu détecter une modification phénotypique par marquage en immunofluorescence.

## **1.4. Discussion des résultats.**

Le surnageant de cellules CHO contenant de l'IL-10 humaine semble ne pas agir sur la prolifération, la sécrétion d'Ig ou le phénotype des cellules bovines. Aucun des tests utilisés n'a permis de mettre en évidence une action de ce type.

Ces résultats ne permettent néanmoins pas, de nier catégoriquement l'action de l'IL-10h sur les lymphocytes B CD5 bovins. En effet, il est possible que les cellules B CD5 ne possèdent pas de récepteur à l'IL-10, que l'IL-10h soit inactive sur les cellules bovines, ou que les récepteurs à l'IL-10 bovine aient une très faible affinité pour la molécule humaine et que nos tests ne soient pas assez sensibles pour mettre les effets en évidence. En effet, si l'IL-10h peut se substituer *in vitro* à l'IL-10 de souris et produire des effets analogues, l'inverse est impossible (Vieira, P et coll., 1991). Pour vérifier ces hypothèses on pourrait utiliser de l'IL-10h marquée radioactivement et tester sa fixation spécifique à des récepteurs sur les cellules bovines par analyse de Scatchard.

Enfin, les tests n'ayant pas été réalisés avec de l'IL-10 purifiée, mais avec des surnageants de culture de cellules CHO, il est possible que d'autres molécules présentes dans ces surnageants aient, pour une raison inconnue, un effet inhibiteur sur l'action de l'IL-10h sur les cellules bovines.

## **2. Mesure de la production d'IL-10 par les lymphocytes bovins.**

Le but suivant que nous nous étions fixé était de déterminer si les cellules B CD5 de bovins en PL étaient capables de produire de l'interleukine-10. N'ayant à l'heure actuelle aucune information sur la protéine d'IL-10 bovine et n'ayant aucun outil pour la détecter (par exemple par ELISA), nous nous sommes affairés à mettre en évidence la présence d'ARN messager codant pour l'IL-10 au sein de la masse d'ARN total présente dans les lymphocytes. Avant de tester la présence de messagers IL-10 chez les cellules B CD5 en culture, il était primordial de trouver une méthode de détection fiable et de mettre en évidence ce messager dans l'ARN d'une population de cellules bovines. C'est la raison pour laquelle nous avons tout d'abord étudié l'expression de ce messager dans la population mononucléée de bovins sains où sa présence est suspectée.

Type et temps de culture en heures	Nb de cellules traitées (x10 <sup>6</sup> )	Quantité d'ARN total récolté (µg)
Non stimulées 17H	500	319
Non stimulées 41H	500	58
Stimulées 17H	500	297
Stimulées 41H	500	112

**Tableau 3-2:** Quantités d'ARN total récoltées après culture de cellules mononucléées d'un bovin sain en RPMI (non stimulées) seul ou en présence de SAC I à 0,05%, d'IL-2 à 10u/ml et de PHA 5µg/ml (stimulées) après 17 et 41 heures de culture.

Le séquence génomique du gène IL-10 bovin a été obtenue par L. Droogmans après criblage d'une banque génomique bovine. Cette séquence est à plus de 85% homologue au gène codant pour l'IL-10 de souris. La séquence du messenger IL-10 a été déterminée par homologie avec l'ARN messenger murin.

## 2.1. Détection du messenger IL-10 par Northern Blot.

### 2.1.1. Extraction d'ARN total de cellules mononucléées bovines.

Après avoir récolté  $2 \cdot 10^9$  cellules mononucléées d'un bovin adulte sain, nous avons divisé cette population en 4 x 5 échantillons de  $100 \cdot 10^6$  cellules et nous les avons mis en culture dans 25 ml de milieu RPMI. A 10 de ces cultures sont ajoutés  $5 \mu\text{g/ml}$  de phytohémagglutinine (PHA), 0,05% de membranes de *Staphylococcus Aureus* Cowan I et  $10 \text{u/ml}$  d'IL-2h. Ce dernier milieu, nommé "milieu de stimulation" a été choisi par référence aux travaux de Burdin N., *et coll.* (1993) sur la détection de l'IL-10 dans les cellules mononucléées humaines. Le but de cette stimulation est d'induire la synthèse de cytokines dont l'IL-10.

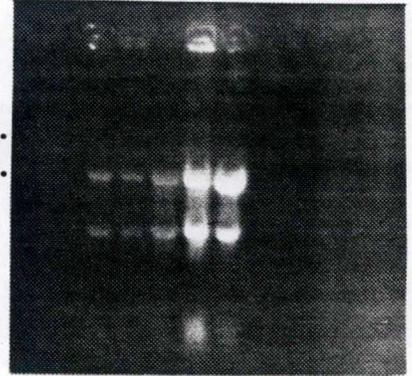
Nous avons cultivé la moitié des cellules dans le milieu de stimulation (2x5 échantillons) pour respectivement 17 et 41 heures (17S et 41S), et nous avons fait de même avec les cellules en RPMI seul (17NS et 41NS). Nous avons opté pour ces temps de culture en sachant que chez l'homme, *in vitro*, la détection la plus précoce de ce messenger a été faite 8 heures après activation et que la protéine a son optimum de synthèse après 48h (De Waal Malefyt, R., *et coll.*, 1991 et Burdin, N., *et coll.*, 1993). Il faut néanmoins garder à l'esprit que la synthèse d'un messenger précède chronologiquement la synthèse de la protéine qu'il encode, et que les optima de synthèse des deux n'ont pas lieu au même moment après la stimulation.

Après 17 et 41 heures de culture, les cellules correspondantes stimulées ou non, ont été récoltées et traitées par la méthode d'extraction d'ARN aux sels du guanidium. L'ARN des 5 échantillons du même type ( soit 17S, 41S, 17NS ou 41NS) ont été rassemblés. Les quantités d'ARN total obtenues (**tableau 3-2**), mesurées par l'absorbance à 260 nm, sont plus faibles pour les cellules cultivées plus longtemps. Mais la reproductibilité des extractions d'ARN que nous avons réalisées avec cette méthode est faible, et ces différences ne semblent pas refléter un processus physiologique si ce n'est la mortalité plus importante de ces cellules pour des temps

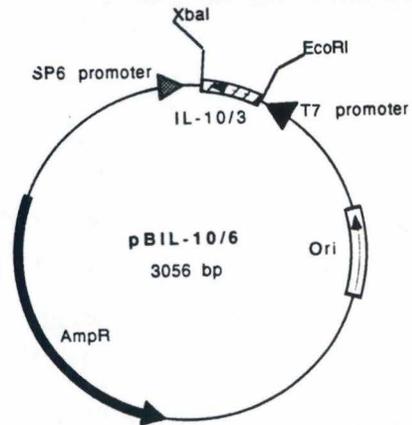
1 2 3 4 5

**Figure 3-7: Photo du gel ARN 1% d'agarose :**

- ARN total de cellules cultivées 17h et non stimulées (piste 1).
- ARN total de cellules cultivées 41h et non stimulées (piste 2).
- ARN total de cellules cultivées 17h et stimulées (piste 3).
- ARN total de cellules cultivées 41h et stimulées (piste 4).
- ARN total de cellules VERO (piste 5).



**Construit par :** Long LE, Dpt immunologie FUNDP.  
**Taille:** 3056 pb  
**Date de construction :** 1/1993  
**Commentaires:** 3ème exon de l'IL-10b + 20pb de l'intron de l'extrémité 3' de cet exon. Amplifié par PCR et cloné aux sites XbaI et EcoRI du pAM19/SP6.



**Figure 3-8: Schéma du plasmide pBIL-10/6**

```

,1
ATGCCCAGCAGCTCAGCCCTGCTCTGTTGCCTGGTCTTCCTGGCTGGGGTG...CAAATGAA IL-10b

GGACCAACTGCACAGCTTACTGTTGACCCAGTCTCTGCTGGATGACTTTAAGGGTTACCTGG IL-10b
5' ..... CCAATGGACC S

GTTGCCAAGCCTTGTTCGGAAATGATCCAGTTTTACCTGGAAGAGGTGATGCCACAGGCTGAG IL-10b
CAACGGTTCGGAACAGCCTTTACTAGGTCAAAATGGACCTTCTCCACTACGGTGTCCGACTC S

AACCCAGGGCCTGACATCAAGGAGCACGTGAACTCACTGGGGGAGAAGCTGAAGACCCCTCCG IL-10b
TTGGTGCCCGACTGTAGTTCCTCGTGCACCTGAGTGACCCCTCTTCGACTTCTGGGAGGC S

GCTGCGGCTGCGGCGCTGTgtgagtagcaggccagctctgc.....3' IL-10b
CGACGCCGACGCCGACACTCATCGTCCGGTCGAGACG-3' S
329'

```

**Figure 3-9: Séquence génomique d'une partie du gène d'IL-10 bovine (partie 5' de l'exon 1, et exons 2 et 3) et séquence complémentaire à la sonde (S) soulignée. Les exons sont en majuscule et l'intron en minuscule.**

de culture plus avancés. Mais rappelons que si le taux moyen de production d'ARN total chute, il n'en est pas nécessairement de même pour des ARN messagers particuliers.

10  $\mu$ g d'ARN total de chaque culture par condition (17h et 41h, stimulé ou non) ont été déposés sur un gel ARN à 1% d'agarose, ainsi que 10 $\mu$ g d'ARN total extrait de cellules VERO par la méthode citée ci-dessus. Les cellules fibroblastiques constituent une source d'ARN ne contenant pas de messagers IL-10. La photo du gel (**figure 3-7**) nous montre pour chaque échantillon deux bandes bien visibles correspondant à l'ARN ribosomal (ARN 28S au dessus et ARN 18S en dessous). La présence de ces bandes sur toutes les pistes nous assure d'avoir de l'ARN en bon état. Les taches situées dans les parties inférieures des pistes sont des ARN de petits poids moléculaire.

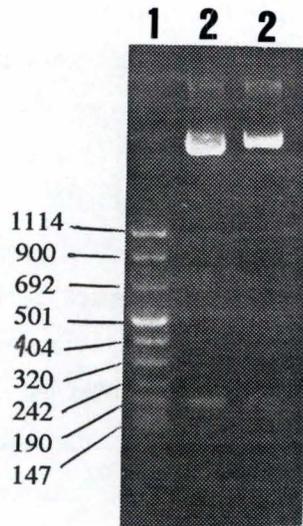
L'intensité importante des deux dernières pistes peut être expliquée par une mauvaise estimation de la concentration en ARN des échantillons au spectrophotomètre. Des contaminations protéiques peuvent en effet fausser les mesures d'absorbance.

Pour repérer la présence d'un messager IL-10 parmi la population d'ARN total, nous avons réalisé un northern blot de ce gel et nous l'avons hybridé avec une sonde radioactive spécifique à ARNm IL-10 bovin.

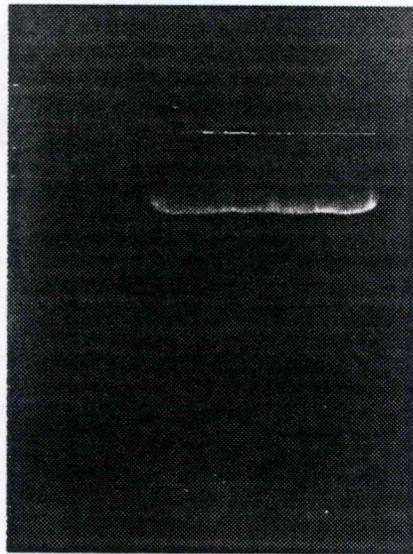
### **2.1.3. Synthèse d'une sonde spécifique à l'ARNm de IL-10 bovine.**

La sonde a été réalisée et caractérisée à partir du plasmide pBIL-10/6 (**figure 3-8**) (cloné par L. Le, Dpt. immunologie, FUNDP) formé par l'insertion du 3<sup>ème</sup> exon du gène codant pour l'IL-10 bovine ainsi que 22pb de l'exon 3' flanquant, dans le site multiple de clonage d'un plasmide pAM19/SP6 aux sites de restriction XbaI et EcoRI. Le fragment inséré est issu d'une amplification PCR sur un plasmide contenant le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> exon, reçu du Docteur L. Droogmans (ULB).

Le plasmide pBIL-10/6 coupé par EcoRI et transcrit par la SP6 ARN polymérase, donnera une sonde ARN de 184pb, dont la séquence présentée à la **figure 3-9**, est complémentaire du messager IL-10b sur 179pb.



**Figure 3-10:** Gel ADN après restriction (XbaI/EcoRI) du plasmide pBIL-10/6 (2% agarose).  
 - Plasmide pBIL-10/6 digéré par XbaI et EcoRI (Piste 2)  
 - Marqueurs de poids moléculaire n°8 (Piste 1)



**Figure 3-11:** Gel préparatif pour l'isolement et la purification du plasmide pBIL-10/6 digéré en EcoRI.

On observe une bande supérieure (très peu visible) correspondant au plasmide circulaire et une bande inférieure (bien marquée) correspondant au plasmide linéarisé.

### A/ Amplification du plasmide.

Pour la synthèse de la sonde, nous avons cultivé le clone PBIL-10/6 de *E. Coli XL1-blue* contenant le plasmide pBIL-10/6 pour amplifier ce dernier et nous avons isolé 74 $\mu$ g de plasmide par la méthode Midipred de Quiagen-Tip™.

En vue de vérifier la préparation de plasmide ainsi que sa nature, nous avons digéré 1 $\mu$ g de plasmide par EcoRI et XbaI et nous avons déposé la moitié de ce mélange de restriction sur un gel d'agarose 2% (**figure 3-10**). La présence d'une bande d'environ 3000pb signe la présence du plasmide et la bande d'environ 190 pb indique que la restriction EcoRI et XbaI a libéré l'insert de 184pb attendu.

### B/ Linéarisation du plasmide et purification par GeneClean™.

10  $\mu$ g de pBIL-10/6 ont été ensuite digérés par EcoRI, linéarisant ainsi le plasmide à l'extrémité terminale de l'insert à transcrire. La digestion étant imparfaite (vu sur gel agarose, résultat non montré) nous avons réalisé un gel préparatif de 2% d'agarose (**figure 3-11**) en vue d'une purification d'ADN par GeneClean™ de la bande correspondant au plasmide linéarisé.

### C/ Synthèse de la sonde.

La sonde a été réalisée sur 2 $\mu$ g du plasmide pBIL-10/6 par le système SP6™. Le pourcentage de radioactivité incorporée via l'UTP-<sup>35</sup>S dans le transcript est de 36,4%. La quantité d'ARN synthétisée peut être calculée par la formule suivante:

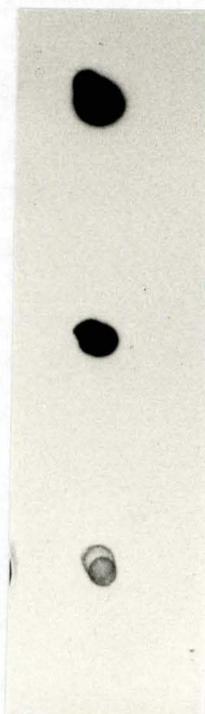
$$\text{Quantité d'UTP}^{35}\text{S utilisé (nmoles)} \times (100/\% \text{UTP dans la sonde}) \times (\% \text{ d'incorporation}/100) \times 330 = \text{ng d'ARN synthétisé}$$

où 330 est la masse moléculaire moyenne d'un nucléotide en ng/mole.

Dans notre cas la formule nous livre 276 ng (0,5 x 4,6 x 0,364 x 330). Ayant mesuré 33.10<sup>6</sup> CPM dans notre mélange contenant la sonde, nous avons donc une activité spécifique de 1,196.10<sup>8</sup> CPM/ $\mu$ g (33 10<sup>6</sup>/0,276). La sonde a été resuspendue à 10<sup>6</sup>CPM/ml dans du milieu d'hybridation.

Type d'ARN	% par rapport à la masse d'ARN total
Précurseurs d'ARN ribosomal	4
ARN ribosomal cytoplasmique (ARNr)	71
ARN nucléaire hétérogène (ARNhn)	7
ARN messagers cytoplasmiques	3
ARN de transfert et autres ARN stables	15

**Tableau 3-3:** Pourcentages des différents types d'ARN dans une cellule de mammifère type au repos (fibroblaste de souris). (Adapté de: "Molecular biology of the cell", Alberts B. *et coll.* 1989)



**Figure 3-11 bis:** Résultat de dot blot du plasmide pBIL-10 révélé avec une sonde IL-10b radioactive. ( de haut en bas résultats pour 900ng , 90 ng et 9 ng de plasmide).

### **2.1.4. Hybridation après Northern Blot.**

Un northern blot sur membrane de nylon a été réalisé à partir d'un gel ARN contenant 10 $\mu$ g par piste d'ARN total de chaque échantillon récolté (voir plus haut, point 2.1.1), pour permettre une hybridation avec la sonde ARN spécifique au messager codant pour l'IL-10b. En parallèle, un dot blot sur membrane de nylon a été réalisé avec 15, 30 et 45  $\mu$ g d'ARN total de chaque échantillon (17 et 41 non stimulés, 17 et 41h stimulés et VERO). De plus, des contrôles positifs composés de 9, 90 et 900 ng du plasmide pBIL-10/6 dénaturé, ont été ajoutés au dot blot. (**figure 3-11 bis**).

Les membranes (une par demi-gel) ont été préhybridées puis hybridées avec le milieu d'hybridation à 42°C pendant 14h. Les membranes lavées et séchées, ont été soumises à autoradiographie pendant 1, 5 et 10 jours. L'exposition n'a révélé aucune d'hybridation visible de notre sonde au résultat du northern blot et de notre dot blot.

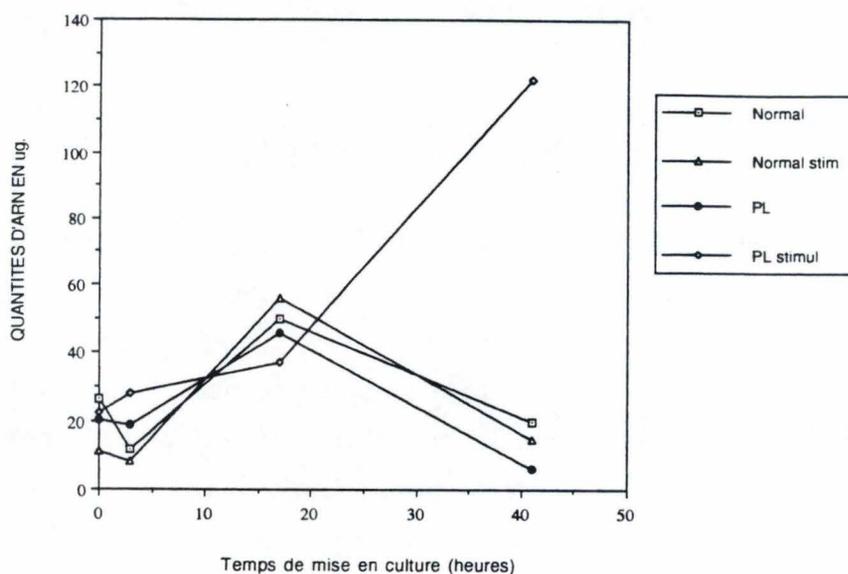
Les témoins positifs montrent néanmoins que l'expérience d'hybridation s'est bien déroulée et qu'une hybridation spécifique même avec 9ng de plasmide donne un signal bien intense.

### **2.1.5. Discussion sur les résultats du Northern blot.**

Ces résultats négatifs en ce qui concerne l'IL-10, ne permettent pas d'affirmer l'absence de messager IL-10 dans ces échantillons. Il est très probable que le taux de synthèse de ce messager soit très bas et ne puisse être mis en évidence par cette technique. Il faut préciser qu'environ 3% ( $\approx$  300ng dans notre cas) d'ARNm sont présents dans la masse totale d'ARN déposée, et qu'un faible pourcentage de cet ARNm code pour l'IL-10 (probablement moins de 1%,  $<$  3ng dans notre cas) (**tableau 3-3**). Néanmoins les temps de culture pour lesquels nous avons opté peuvent avoir été mal choisis, et l'ARNm codant pour l'IL-10 peut être faiblement présent ou absent des lymphocytes bovins à ces temps. Pour ces deux raisons nous avons opté pour la suite de ce travail pour une méthode rapide d'extraction d'ARN nous permettant de choisir une plus grande variété de temps de culture et pour la méthode de RT/PCR nous permettant d'amplifier spécifiquement l'éventuel messager IL-10.

Caractéristiques	Ultraspec-RNA™	Sels de guanidine	Protéinase K
Temps (temps de précipitation compris)	1 heure 30	4 heures 30	33 heures
Simplicité	+++	++	+
Volumes nécessaires	Possible en tube de 1,5ml	En tubes Corex de minimum 30ml	En tubes Corex de minimum 30ml au début
Qté d'ARN extraite sur 10 10 <sup>6</sup> lymphocytes	10-30 µg +++	2-6 µg +	5-7 µg ++
Inconvénients	Cher et toxique. Contient du DEPC et du thiocyanate de guanidium très toxiques.	Le thiocyanate de guanidium est cher et toxique. Contient du DEPC très toxique.	Longue et à beaucoup d'étapes.
Avantages	Très rapide et efficace.	Moyennement rapide et efficace.	Efficace, bon marché, non toxique.

**Tableau 3-4:** Tableau comparatif de trois méthodes d'extraction d'ARN total.



**Figure 3-12:** Quantité d'ARN extraite de cellules mononucléées d'un bovin sain ou en PL stimulées ou non, et récolté à différents temps de culture.

## 2.2. Détection du messager IL-10 par RT/PCR.

### 2.2.1. Extraction d'ARN<sub>total</sub> de lymphocytes bovins.

Nous devons choisir pour notre travail une méthode d'extraction d'ARN rapide et efficace. Pour cela nous avons estimé les temps nécessaires pour réaliser 3 méthodes d'extraction différentes. Ces temps ainsi que les avantages et inconvénients de chaque technique sont présentés dans le **tableau 3-4**. La méthode d'extraction à l'Ultraspec-RNA™ semble de loin la plus rapide et les rendements sont très bons comparés aux deux autres méthodes.

Nous avons mis en culture des populations mononucléées d'animaux sains (N) et en PL (PL) non stimulées ou stimulées (S) avec 5µg/ml de Phytohémmagglutinine (PHA), 0,05% de membranes de *Staphylococcus Aureus* Cowan I et 10u/ml d'IL-2h. La population mononucléée de chaque animal a été divisée en 8 tubes de 40.10<sup>6</sup>cellules nommés N ou PL. 4 tubes N et 4 tubes PL ont été cultivés à 4.10<sup>6</sup> cellules par ml dans du RPMI seul. Les 4 autres tubes N et PL ont été cultivés à 4.10<sup>6</sup> cellules par ml dans du milieu de stimulation (S). Nous avons donc 4 tubes par animal et par condition de culture, dont les cellules pourront être récoltées après 0, 3, 17 et 41 heures de culture.

L'ARN des cellules a été extrait par la méthode Ultraspec-RNA™ au moment désiré. Les quantités totales récoltées au cours du temps sont présentées à la **figure 3-12**. On observe que la quantité d'ARN récoltée est pour la plupart des échantillons maximale après 17 heures de culture. Il ressort néanmoins de cette figure que les cellules stimulées de l'animal en PL voient leur taux d'ARN augmenter significativement après 41 heures de culture. Ces résultats uniques doivent être confirmés, et pourraient être attribués à l'état d'activation généralisé des cellules d'animaux en PL.

Nous allons maintenant déterminer un contrôle positif de RT/PCR sur base de la détection du messager codant pour l'actine bovine.

**Oligo s'hybridant à la région 3' du cDNA**

5' CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC 3'

**Oligo s'hybridant à la région 5' du cDNA**

5' TGG GAC GAC ATG GAG AAG ATC 3'

**Figure 3-13:** Séquences des oligonucléotides permettant la détection des messager d'actine bovine par RT/PCR.



**Figure 3-14:** Gel de RT/PCR sur l'actine (2% agarose).

- Résultat de RT/PCR actine sur l'ARN de cellules mononucléées bovines (piste 2).
- Marqueurs de poids moléculaires (piste 1).

**Oligo s'hybridant à la région 3' du cDNA**

3'-TACGGTGTCCGACTCTTGGTGCCCGGA-5'

**Oligo s'hybridant à la région 5' du cDNA**

5'-GCCCTGCTCTGTTGCCTGGTCTTCCTG-3'

**Figure 3-15:** Séquences des oligonucléotides permettant la détection de l'ARNm de l'IL-10 bovine par RT/PCR.

### **2.2.2. Essai de RT/PCR sur l'actine comme contrôle interne de transcription.**

Nous avons réalisé une réaction de RT/PCR sur l'actine, dont le messenger est abondant dans les cellules de mammifère, comme contrôle interne. Nous avons utilisé des oligonucléotides disponibles dans le département et spécifiques pour le messenger de l'actine bovine dont les séquences sont présentées à la **figure 3-13**. La RT/PCR a été réalisée sur 5  $\mu$ g d'ARN total extrait sur des lymphocytes de bovins sains non cultivés.

Un dixième du cDNA obtenu par RT/PCR a été déposé sur gel d'agarose 2 % en présence d'un standard de poids moléculaires. La photo du gel à la **figure 3-14** montre une bande majoritaire de 850pb (taille du fragment attendu après amplification) et une minoritaire de 600pb inconnue. Cette dernière bande est probablement due à une hybridation non spécifique des oligos nucléotides à un autre ARN. Ce problème disparaîtrait probablement en augmentant la température d'hybridation.

Ces résultats vont nous permettre d'utiliser le messenger actine comme contrôle interne de RT/PCR.

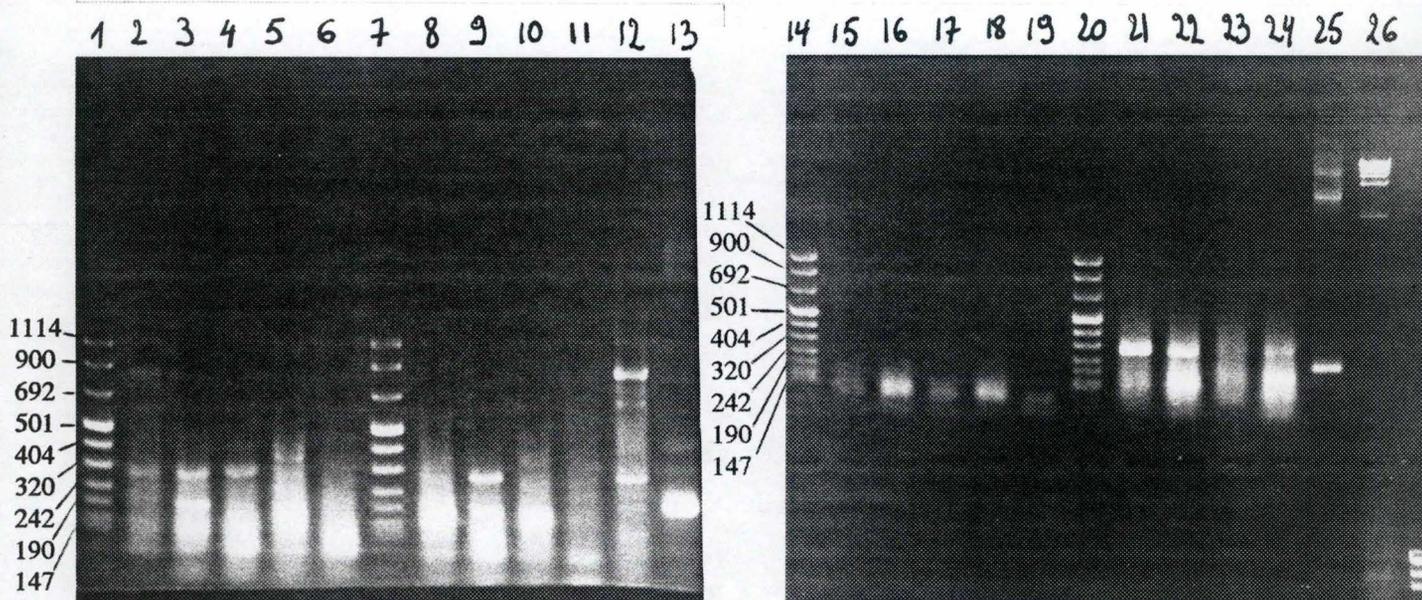
### **2.2.3. RT/PCR sur le messenger codant pour l'IL-10 bovine.**

#### A/ Choix des oligonucléotides.

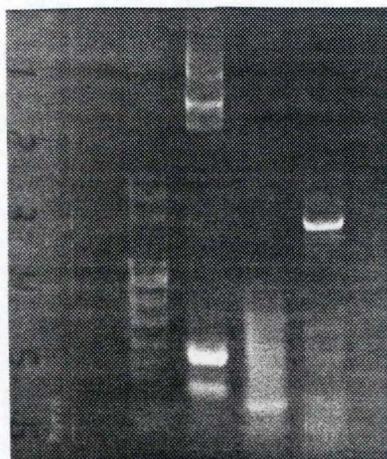
Pour amplifier un fragment de 297pb, des amorces ont été choisies sur base de la séquence génomique de l'IL-10b, partiellement séquencée par L. Droogmans (**figure 3-15**). Ce fragment recouvrira la séquence sur le messenger IL-10 correspondant au premier exon et aux exons 2 et 3 du gène de l'IL-10b.

#### B/ Reverse transcription et polymérisation en chaîne.

La RT/PCR a été réalisée sur 5  $\mu$ g d'ARN de chaque échantillon récolté avant sur des cellules de bovins sains et en PL (voir point 2.2.1., "stimulé" et "non-stimulé"). Ce test a été réalisé avec pour contrôle positif de PCR, le plasmide pBIL-10/6 amplifié avec les amorces utilisées dans la construction de ce plasmide. Pour toute l'étape de RT/PCR un contrôle positif



A B C D



**Figure 3-16: Gel de RT/PCR sur l'IL-10 (agarose 2%):**

- échantillons 0N, 0Ns, 0PL et 0PLs (Pistes 3-6)
- échantillons 3N, 3Ns, 3PL et 3PLs (Pistes 8-11)
- échantillons 17N, 17Ns, 17PL et 17PLs. (Pistes 16-19)
- échantillons 41N, 41Ns, 41PL et 41PLs (Pistes 21-24)
- échantillons pBIL-10/6 (Piste 25, 13 et B)
- échantillon 0N actine (Piste 2)
- échantillon 3PLs actine (Piste 12)
- échantillon 17N actine (Piste 15).
- échantillon IL-10/VERO (piste C)
- échantillon Actine/VERO (piste D)
- marqueurs de poids moléculaires n°8 (Pistes 1, 7, 14, 20 et A)
- marqueurs de poids moléculaires n°2. (Piste 26)

(Explication de la numérotation voir texte)

d'amplification de l'actine (vu avant au point 2.2.2) a été utilisé sur un échantillon d'ARN de lymphocytes et de cellules VERO (échantillons 0N/Actine et Actine/VERO). Un contrôle négatif a consisté en l'utilisation d'amorces spécifiques à l'IL-10b sur de l'ARN de cellules VERO (IL-10/VERO), qui ne produisent pas d'IL-10.

Un cinquième du cDNA obtenu a été déposé sur un gel d'agarose 2% en présence de standards de poids moléculaires. La **figure 3-16** montre la photo du gel de RT/PCR 2% agarose; les échantillons sont nommés comme suit:

- xN: amplification du messenger IL-10 sur l'ARN de cellules d'animaux sains extrait après x heures de culture en RPMI (pistes 3, 8, 16 et 21),
- xNs: amplification du messenger IL-10 sur l'ARN de cellules d'animaux sains extrait après x heures de culture en milieu de stimulation. (pistes 4, 9, 17 et 22),
- xPL: amplification du messenger IL-10 sur l'ARN de cellules d'animaux en PL extrait après x heures de culture en RPMI (pistes 5, 10, 18 et 23),
- xPLs: amplification du messenger IL-10 sur l'ARN de cellules d'animaux en PL extrait après x heures de culture en milieu de stimulation (pistes 6, 11, 19, 24),
- pBIL-10/6: l'amplification de l'exon 3 du messenger IL-10b présent dans pBIL-10/6 (contrôle négatif de PCR, pistes 25 et B),
- Actine/VERO: amplification du messenger actine sur l'ARN de cellules VERO (contrôle positif de RT/PCR, piste D),
- IL-10/VERO: RT/PCR sur de l'ARN de cellules VERO en présence d'amorces spécifiques à l'IL-10b (contrôle négatif de RT/PCR, piste C),
- 0N et 17N Actine: amplification du messenger actine sur l'ARN de cellules d'animaux sains extrait après 0 et 17 heures de culture en RPMI (pistes 2 et 15),
- PM8: standards de poids moléculaires n°8 (pistes 1,7, 17 et 20),
- PM2: standards de poids moléculaires n°2 (piste 26 et A).

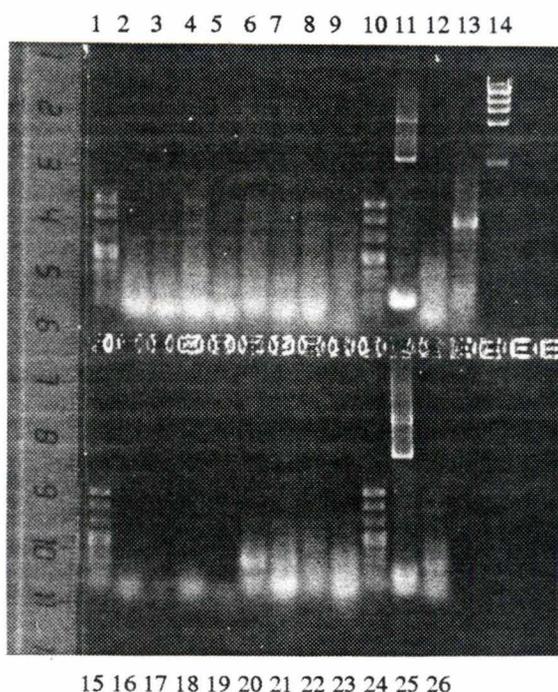
On observe sur cette figure que la RT/PCR du messenger codant pour l'IL-10b donne une bande d'environ 300pb plus ou moins visible dans presque tous les échantillons (pistes 3 à 5, 8 à 10, 21, 22 et 24). Les échantillons d'ARN extraits après 17 heures de culture n'ont donné aucun résultat (pistes 16-19). Il en est de même pour le contrôle actine (piste 15). Ce problème serait causé par la dégradation de l'ARN à ces temps par l'utilisation d'une solution contaminée par des RNAses lors de l'extraction d'ARN. En effet la visualisation de l'intégrité de l'ARN source de ce temps de culture sur un gel ARN montre une dégradation importante.

En plus de la bande d'environ 300pb proche de celle attendue par l'amplification du messenger IL-10b (297pb) on trouve une bande d'environ 180pb inconnue et parfois très intense (pistes 3, 4, 8 à 10, 22 et 24). Il s'agirait d'amplifications non-spécifiques. La comparaison de la séquence des amorces avec une banque de donnée n'a pas permis de trouver quelle pourrait être la séquence inconnue amplifiée dans notre test.

On observe enfin que certains échantillons (0PLs 3PLs et 41PL, pistes 6, 11 et 23) n'ont donné aucune amplification. Il est impossible de donner une explication physiologique à cette absence d'amplification sur base de ces résultats seuls. Il est possible que cet ARN ait pu être dégradé par des RNAses au cours des manipulations.

L'amplification du messenger actine sur l'ARN des cellules mononucléées donne la bande de 800pb attendue pour l'actine confirmant que la réaction de RT/PCR s'est bien déroulée (piste 12). Le témoin Actine/VERO (piste B) a bien donné une bande d'environ 800 pb comme celle attendue pour l'actine bovine. On observe que les amorces spécifiques du messenger codant pour l'actine bovine sont aussi spécifiques au messenger actine des cellules VERO de singe. Ce même ARN traité avec les amorces spécifiques à l'IL-10 ne montre aucune amplification assurant ainsi que ces amorces IL-10b sont suffisamment spécifiques pour ne pas produire d'amplifications parasites sur ces cellules. Le contrôle de PCR (piste B), c'est-à-dire l'amplification de l'exon 3 du messenger IL-10b du pBIL-10/6, montre une série de 3 bandes correspondant au plasmide dans ses différentes formes (enroulé ou super-enroulé). La bande de 175 pb correspond au fragment de l'exon 3 et une partie d'intron du gène IL-10b amplifié spécifiquement par la PCR. En addition une bande d'une centaine de pb se trouve amplifiée probablement non spécifiquement. En effet, le même contrôle réalisé avec une autre préparation plasmidique (piste 25) ne montre pas cette bande parasite.

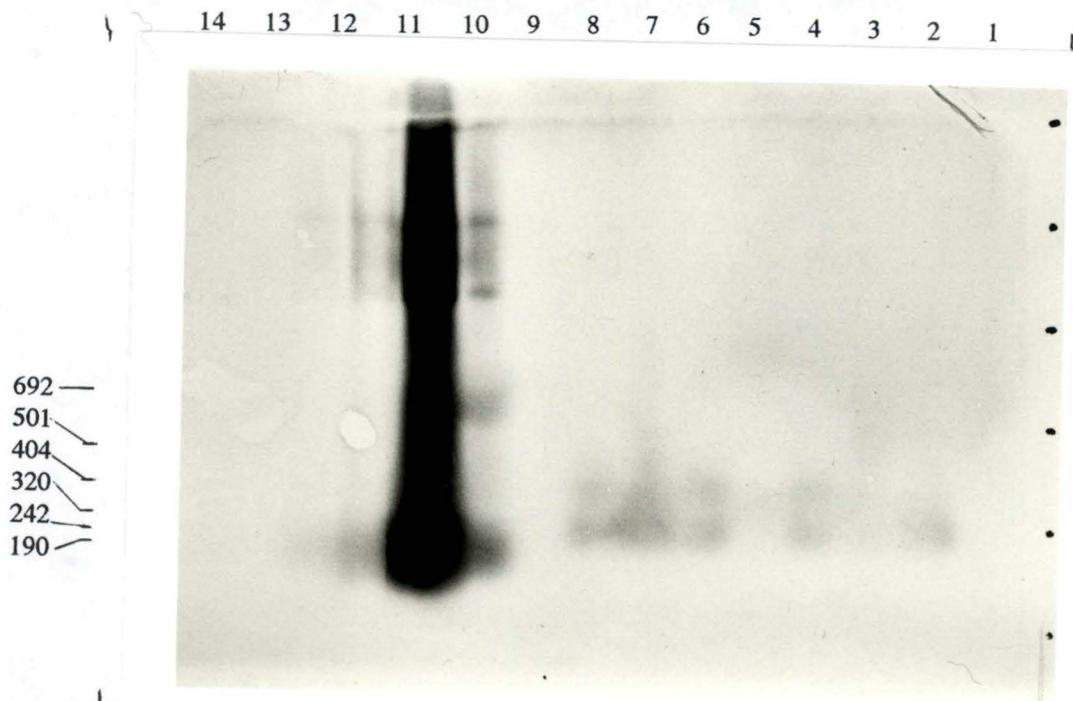
Bien que la bande d'environ 300pb corresponde probablement à l'amplification du messenger IL-10, il convient de confirmer l'identité de ce fragment. Nous allons pour cela réaliser un tranfert de ces échantillons d'un gel d'agarose sur une membrane de nylon par southern blot, pour les hybrider avec notre sonde ARN spécifique au messenger IL-10.



**Figure 3-17:** Gel de transfert par southern blot après RT/PCR sur l'IL-10.

- échantillons 0N, 0Ns, 0PL 0PLs, 3N, 3Ns, 3PL et 3PLs. (Pistes 2-9)
- échantillons 17N, 17Ns, 17PL 17PLs, 41N, 41Ns, 41PL et 41PLs (Pistes 16-23)
- échantillons pBIL-10/6 (Pistes 11 et 25)
- échantillon actine/VERO (Piste 12)
- échantillon IL-10/VERO (Piste 13):
- échantillon 17N actine (Piste 26)
- marqueurs de poids moléculaires n°8 (Pistes 1,10,15 et 24)
- marqueurs de poids moléculaires n°2 (Piste 14)

(Explication de la numérotation voir texte)



**Figure 3-18:** Autoradiographies résultant de l'hybridation du résultat de southern Blot du gel présenté à la figure 3-17, avec une sonde, marquée au  $^{35}\text{S}$ , spécifique du messenger codant pour l'IL-10b.

- échantillons 0N, 0Ns, 0PL 0PLs, 3N, 3Ns, 3PL et 3PLs. (Pistes 2-9)
- échantillons 17N, 17Ns, 17PL 17PLs, 41N, 41Ns, 41PL et 41PLs (Pistes 16-23)
- échantillons pBIL-10/6 (Pistes 11 et 25)
- échantillon actine/VERO (Piste 12)
- échantillon IL-10/VERO (Piste 13):
- échantillon 17N actine (Piste 26)
- marqueurs de poids moléculaires n°8 (Pistes 1,10,15 et 24)
- marqueurs de poids moléculaires n°2 (Piste 14)

#### **2.2.4. Identification par hybridation du fragment amplifié.**

Nous avons déposé à nouveau un cinquième des échantillons de RT/PCR sur un gel d'agarose, cette fois à 1,5% d'agarose pour faciliter le transfert ultérieur sur une membrane de nylon. Le résultat de migration de ces échantillons est présenté à la **figure 3-17**.

Les échantillons sont répartis sur le gel de la manière suivante:

- Echantillons 0N, 0Ns, 0PL, 0PLs, 3N, 3Ns, 3PL et 3PLs aux pistes 2 à 9,
- Echantillons 17N, 17Ns, 17PL, 17PLs, 41N, 41Ns, 41PL et 41PLs aux pistes 16 à 23,
- Echantillon pBIL-10/6 aux pistes 11 et 25,
- Echantillon Actine/VERO à la piste 12,
- Echantillon IL-10/VERO à la piste 13,
- Echantillon 17N actine à la piste 26,
- Marqueurs de poids moléculaires n°8 aux pistes 1, 10, 15 et 24,
- Marqueurs de poids moléculaires n°2 à la piste 14.

Les bandes ne s'observent plus aussi nettement que celles visibles à figure 3-16. En effet, la résolution du gel augmente avec le taux d'agarose (qui ici de 1,5% et qui était de 2% à la figure 3-16). Ce résultat d'électrophorèse a été ensuite transféré sur membrane de nylon par southern blot. La membrane a été mise à hybrider à 42°C 14 heures. L'hybridation a été révélée par autoradiographie. Le résultat après 72 h d'exposition est présenté à la **figure 3-18**.

On observe que les bandes aux alentours de 300pb qui étaient visibles à la figure 3-16 sont bien marquées par la sonde (piste 1, 3, 5, 6, 7, 20, 21, et 23) et donc nous confortent dans l'idée que ces bandes correspondent à l'amplification d'un fragment de l'ARNm codant pour l'IL-10b. Par ailleurs les bandes qui étaient visibles à 180pb (figure 3-16, pistes 3, 4, 8 à 10, 22 et 24) ne sont pas reconnues par la sonde, confirmant la spécificité de la sonde. D'autre part, une hybridation est visible aux alentours de 400pb au niveau des échantillons des temps 0 et 3 heures (pistes 2 à 8) mais plus aux temps 17 et 41 heures (pistes 26 à 23). Cette bande n'est pas visible sur le gel d'agarose, et est donc probablement le résultat d'une hybridation non spécifique à une séquence suffisamment proche de la séquence du messenger IL-10 bovin pour être révélée par la sonde. Il est possible que l'on ait amplifié non spécifiquement une séquence encore inconnue et proche de la séquence de l'exon 3 de l'IL-10b.

On observe enfin, que les contrôles sont bons. Les contrôles positifs, les plasmides pBIL-10/6 amplifiés par PCR (pistes 11 et 25), ont bien joué leur rôle de témoin d'hybridation. La quantité de matériel engagée provoque une forte hybridation. Les pistes 10 et 24, correspondant aux marqueurs de poids moléculaires, ayant été contaminées par les échantillons plasmidiques donnent une image moins intense des pistes correspondant au plasmide (11 et 25). La sonde IL-10 révèle ainsi aux pistes 10, 11, 24, et 25 les trois bandes déjà visibles à la figure 3-16. Une quatrième tache aux alentours de 700pb est également mise en évidence. Un fragment de cette taille ne peut être expliqué que par l'amplification non spécifique d'une partie du plasmide. La spécificité de l'hybridation semble ne pas devoir être mise en cause car les fragments d'ADN des marqueurs (pistes 1, 10, 14, 15 et 24) où les amplifications des messagers d'actine (pistes 12 et 26) ne sont pas mis en évidence par la sonde.

### **2.2.5. Discussion des résultats de RT/PCR sur l'ARNm codant pour l'IL-10b.**

Après hybridation on observe deux types d'intensités de radioactivité: une forte intensité visible dans les contrôles plasmidiques due à la quantité de matériel engagée, et une intensité faible mais bien visible au niveau des échantillons d'ARN IL-10 bovin amplifié. Les contrôles négatifs ne révélant aucune hybridation, et la bande de 180pb (visible à la figure 3-16) n'étant pas révélée par la sonde on est en droit de penser que notre fragment de 300pb amplifié et révélé serait le messenger IL-10b. La bande inconnue supplémentaire de 400 pb serait une séquence d'ARN proche de l'exon 3 de l'IL-10b et encore inconnue.

Nous avons donc probablement mis en évidence l'existence d'une transcription d'un messenger IL-10 aussi bien dans les cellules mononucléées de bovins sains qu'en PL. Mais ces résultats préliminaires se doivent d'être confirmés et développés par une étude plus approfondie. On pourrait d'une part envisager de réaliser une cinétique plus fournie (aux temps d'extractions plus rapprochés) pour optimiser la détection, et d'autre part tester la transcription d'IL-10 sur l'ARN de cellules B CD5 purifiées.

Enfin, il est également envisageable d'appliquer cette technique de RT/PCR pour mettre en évidence la production d'autres cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, ...) par les cellules bovines en général et les cellules B CD5 en particulier et pour établir un profil de sécrétion cytokinique.

# IV

*Discussion  
et conclusion*

# 1. Influence de l'IL-10 sur les cellules B CD5.

Pour tester l'action de l'IL-10 sur les cellules B CD5, l'IL-10 bovine n'ayant pas encore été purifiée, nous avons été amenés à utiliser un surnageant contenant de l'IL-10 humaine. Nous avons tenté de mettre en évidence l'influence de ce surnageant sur la prolifération, la sécrétion d'Ig et le phénotype membranaire de la population de cellules B CD5 bovines. Aucun de ces tests n'a permis de détecter une influence de ce surnageant sur les différents paramètres testés.

La première hypothèse pour expliquer ces absences d'effets, est que ce surnageant peut être inactif sur les cellules bovines car l'IL-10 humaine **ne peut pas se fixer, ou se fixe avec peu d'affinité** sur le récepteur à l'IL-10 bovine. Les raisons de la non-fixation ou de la mauvaise fixation peuvent être multiples, soit les cellules ne possèdent pas de tel récepteur, soit la molécule humaine est structurellement ou chimiquement trop différente de l'IL-10 bovine pour se lier au récepteur. Pour ces raisons il pourrait être intéressant de marquer de l'IL-10h radioactivement et de vérifier si cette molécule se fixe aux lymphocytes bovins, et si oui avec quelle affinité.

Il est également possible que l'IL-10h se fixe sur les cellules bovines mais n'induit aucun des différents effets étudiés car les **signaux co-stimulateurs utilisés (IL-2h) sont non appropriés**. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait réaliser d'autres tests de mise en présence du surnageant de cellules CHO et des cellules mononucléées bovines dans différents états (stimulées à un niveau suboptimal avec d'autres molécules, activées par différents agents ou au repos).

En outre, il serait intéressant également de tester l'inhibition de la production d'interféron gamma par une population de PBMC activée. Ce test a d'ailleurs été réalisé chez l'humain pour quantifier la présence d'IL-10 dans les surnageants de cellules CHO que nous avons reçus.

Enfin, les tests effectués ne permettent peut-être pas de rendre compte de l'action de l'IL-10. Effectivement, il est concevable que les actions de l'IL-10 sur les cellules bovines ne se manifestent pas par une modification de la prolifération cellulaire, de la sécrétion d'Ig ni de

variations phénotypiques. On pourrait tester, par exemple, les variations de pattern de sécrétion de cytokines des cellules B CD5 en présence d'IL-10 (voir plus loin).

Les résultats obtenus ne permettent donc pas d'en savoir plus sur l'éventuelle action de l'IL-10h sur les cellules B CD5 bovines et sur l'existence de récepteurs à l'IL-10 sur ces cellules.

## **2. Détection de la production d'IL-10 chez le bovin.**

### **2.1. Chez les cellules bovines en général.**

Pour cette partie du travail nous avons basé nos études sur la mise évidence chez le bovin d'une séquence génomique à plus de 80% d'identité avec le gène codant pour l'IL-10 de souris (Droogmans L. *et coll.*, communication personnelle). Cette séquence a été assimilée à l'éventuelle IL-10 bovine mais jusqu'à l'heure actuelle ni le messenger ni la protéine correspondante à ce gène n'avaient pu être mis en évidence. La grande homologie entre les séquences bovines et murines permet néanmoins de suspecter l'existence d'IL-10 chez le bovin. L'analyse de ce gène et sa comparaison avec le gène et l'ARN messenger codant pour l'IL-10 chez la souris, a permis d'établir une séquence qui pourrait correspondre au messenger IL-10 bovin.

Nous avons synthétisé une sonde radioactive spécifique à ce messenger, et nous avons montré que les cellules mononucléées bovines du sang circulant, d'animaux sains ou en PL (cultivées de 0 à 41 heures en milieu de culture seul ou stimulées avec des mitogènes et des activateurs cellulaires), synthétisaient des ARN messagers d'une séquence identique au messenger attendu. Il semble donc que les cellules bovines expriment un transcript homologue à l'IL-10 de souris. Cependant, il a fallu amplifier spécifiquement ce messenger par RT/PCR pour pouvoir le détecter. Il se peut que la synthèse de ce messenger soit fugace et que nous n'ayons pas choisi des temps d'extraction où il est le plus abondant. Il est également possible que la méthode de stimulation (IL-2+PHA+SAC I) ne soit pas appropriée pour induire la synthèse d'IL-10 par les cellules bovines.

Il faut signaler également que l'hybridation a révélé une bande inconnue, de taille non attendue et n'ayant pas été amplifiée aussi fortement que le messenger IL-10. Cette bande pourrait être attribuée à la présence d'une séquence inconnue proche de celle de l'IL-10. Il serait dès lors bon de refaire ces RT/PCR sur de l'ARNm purifié et en augmentant la température d'hybridation des amorces PCR pour éliminer les hybridations non spécifiques. De même on pourrait augmenter la température d'hybridation de la sonde ou diminuer la force ionique des milieux de lavages, pour éviter les hybridations non spécifiques. Si dans ces conditions les deux types de bandes persistent encore aux temps précoces, il faudra envisager d'isoler les deux fragments et de les caractériser soit par leur séquençage soit par comparaison de leurs profils de restriction.

D'autre part, l'existence effective du messenger IL-10b ne permet pas non plus de prétendre qu'elle s'accompagne d'une traduction en protéine et encore moins d'une sécrétion de celle-ci. Effectivement, comme il a été précisé précédemment, de nombreux obstacles parsèment le devenir d'un transcrypt de cytokine. L'initiation de la traduction, la maturation et la sécrétion des protéines sont autant d'étapes de régulation durant lesquelles la voie menant au relargage de la protéine mature hors de la cellule peut être stoppée.

Une des perspectives envisageables est de cloner le cDNA complet de l'IL-10b dans un vecteur d'expression. De cette manière on pourrait synthétiser la protéine d'IL-10b. Cette protéine peut d'une part servir à développer des ACm dirigés contre l'IL-10b, d'autre part la purification de la protéine nous serait utile pour vérifier la présence de récepteurs à l'IL-10 des cellules bovines (voir plus haut).

Les ACm anti-IL-10 bovine nous permettraient de tester la production d'IL-10 par les cellules bovines cultivées sous différentes stimulations.

## **2.2. Sur les cellules B CD5.**

Les résultats obtenus en présence de cellules B CD5 ne permettent pas de tirer une conclusion sur la production d'IL-10 par ces cellules. En effet, n'ayant pas travaillé sur une population purifiée de cellules B CD5, quels que soient les effets observés il n'est possible d'avancer que des hypothèses. Par ailleurs, la technique de RT/PCR n'étant ici pas quantitative il nous est impossible d'évaluer une différence de transcription entre les animaux sains et en PL.

### **3. Influence de l'IL-6b sur la prolifération des B CD5.**

Au terme de ce travail, il ressort peu d'informations sur l'action de l'IL-6 bovine sur les cellules B CD5. Nous n'avons pu tester qu'un seul type d'influence car nous ne possédions que peu de surnageants de cellules COS transfectées avec le cDNA codant pour l'IL-6b, et que les études concernant l'IL-10 nous ont pris la majorité de notre temps. Les résultats de mesure de prolifération n'ont pas permis d'associer l'IL-6 bovine à la modification de la capacité de prolifération des cellules B CD5 bovines. Il est néanmoins possible que ces cellules répondraient différemment si un signal costimulateur différent de l'IL-2h était utilisé.

Il serait toutefois intéressant d'analyser la capacité qu'ont ces surnageants d'influencer la transformation des cellules B CD5 en plasmocytes sécréteurs d'Ig. Des études portant sur la variation du phénotype cellulaire lors de cultures en présence d'IL-6b, et de sécrétion d'Ig pourraient apporter plus d'informations.

Il est de plus possible que les cellules B CD5 bovines ne possèdent pas de récepteurs à l'IL-6. L'utilisation d'IL-6 bovine marquée radioactivement pourrait permettre de détecter la présence de tels récepteurs à la surface des lymphocytes B CD5.

Il est enfin concevable que l'action de l'IL-6 bovine sur les cellules B CD5 soit indirecte et nécessite la présence d'autres cellules. Dans cette optique des expériences similaires à celles réalisées ici pourraient être entreprises sur des populations totales de cellules et des populations déplétées en différents types cellulaires.

### **4. Conclusions générales.**

Chez la souris un rôle autocrine a été associé à l'IL-10 produite par les cellules B CD5 (O'Gara, *et coll.*, 1992b). Chez les bovins infectés par le Virus de la Leucose Bovine et en lymphocytose persistante, le nombre de ces cellules B CD5 croit considérablement. Dans cette optique il semblait intéressant de vérifier si une telle observation était possible chez le bovin.

Dans ce contexte nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet de l'IL-10 humaine sur les cellules bovines en général et sur les cellules B CD5 en particulier. L'action de l'IL-6 bovine sur la prolifération des cellules B CD5 bovines n'a pas non plus pu être mise en évidence.

Dans la deuxième partie du travail nous avons pu mettre en évidence que les cellules bovines d'animaux sains ou en PL synthétisaient des ARNm d'IL-10b. Les résultats obtenus se doivent d'être confirmés par d'autres tests sur les cellules bovines en général et également sur une population purifiée de cellules B CD5.

A la fin de ce travail, nous possédons des outils qui peuvent être développés et améliorés pour permettre des études ultérieures sur le rôle hypothétique d'une IL-10 bovine sur les cellules B CD5 et sur les capacités sécrétoires de ces cellules en général. De telles études nous font espérer en connaître plus sur la physiologie et le phénotype de cette sous-population de lymphocytes B, encore méconnue, qui semble impliquée dans de nombreuses pathologies.

# V

## *Bibliographie*

- ABRAMSON S., MILLER R.G. ET PHILLIPS R.A. (1977): *The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems.* J.Exp.Med 145: 917-924.
- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. (1989): *Molecular Biology of the cell.* ed. Garland Publishing, Inc., New York, London.
- ASHWELL J.D.,(1992): *Mechanism of cellular cooperation.* Encyclopedia of immunology, ed. par Ivan Roitt, ed. Academic Press, p.403.
- AULT K.A., ANTIN J.H., GINSBURG D., ORKINS S.H., RAPPEPORT J.M., KEOHAN M.L., MARTIN P., ET SMITH B.R. (1985): *Phenotype of recovering lymphoid cell populations after bone marrow transplantation.* J.Exp.Med. 161: 1483-1490.
- BALKWILL F.R. ET BURKE F. (1989): *The cytokine network.* Immunology Today 10: 299-304.
- BAZAN, J. FERNANDO (1992): *Unraveling the structure of IL-2.* Science 257: 410-413.
- BURDIN N., PÉRONNE C., BLANCHEREAU J. ET ROUSSET F. (1993): *Epstein-Barr Virus transformation Induces B lymphocytes to produce Human IL-10.* J.Exp.Med., 177: 295-304.
- BURNY A., CLEUTER Y., KETTMANN R., MAMMERICKX M., MARBAIX G., PORTETELLE D., VAN DEN BROEKE A., WILLEMS L. ET THOMAS R. (1987): *Bovine leukaemia : facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer.* Cancer Surveys, 6 (1): 139-159.
- CHEN W.F., ET ZLOTNIK A. (1991) : *IL-10 a novel cytotoxic T cell differentiation factor.* J.Immunol. 147: 528-534.
- CLEMENS, M.J.(1991): *Cytokines;* Bios scientific publishers, Oxford. Ed. par Read A.P. et Brown T., 3-70.
- COHEN, S., BIGAZZI, FE ET YOSHIDA, T.(1974) Cell.Immunol. 12: 150-159.
- DAVIS A., LEY S.C ET CRUMPTON M.J.(1992): *CD5 is phosphorylated on tyrosine after stimulation of the T-cell antigen receptor complex.* Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89: 6368-6372.

DEFRANCE T., VANBERVLIET B., DURAND I., BRIOLAY J., ET BLANCHEAU J. (1992): *Proliferation of human CD5<sup>-</sup> and CD5<sup>+</sup> B cell subsets activated through their antigen receptors or CD40 antigens.* Eur.J.Immunol 22: 2831-2839.

DE LA HERA A., ALVAREZ-MON M., SANCHEZ-MADRID F., MARTINEZ C. ET 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.

DEL PRETE G., DE CARLI M., ALMERIGOGNA F., GIUDIZI M.G., BIAGIOTTI R. ET ROMAGNANI S. (1993) *Human IL-10 is produced by both type 1 helper and type 2 helper cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.* J.Immunol. 150(2): 353-360.

DE WAAL MALEFYT R., ABRAMS J., BENNET B., FIGDOR C.G. ET DE VRIES J. (1991a): *Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.* J.Exp.Med 174: 1209-1220.

DE WAAL MALEFYT R., HAANEN J., YSSEL H., RONCAROLO M.G., TE VELDE A., FIGDOR C., JOHNSON K., KASTELEIN R., SPITS H. ET DE VRIES J.E. (1991b): *IL-10 and v-IL-10 strongly reduce antigen specific human T cell responses by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via down regulation of class II MCH expression.* J.Exp.Med. 174: 915-924.

DE WAAL MALEFYT, YSSEL H., RONCAROLO M.G., SPITS H. ET DE VRIES J.E. (1992): *Interleukin-10.* Current Biology 4: 314-320.

DEPELCHIN A., LETESSON J.J., LOSTRIE-TRUSSART N., MAMMERICKX M., PORTETELLE D. ET BURNY A. (1989): *Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-Cells express a marker similar to the CD5 T-cell marker.* Immunology Letter, 20: 69-76.

DUREZ P., ABRAMOWICZ, GÉRARD C., VAN MECHELEN M., AMRAOUI Z., DUBOIS C., OBERDAN L., VELU T. ET GOLDMAN M. (1993): *In Vivo Induction of IL-10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin A.* J.Exp.Med. 177: 551-555.

FIorentino, D.F., Bond M.W. ET Mosmann T.R. (1989): *Two type of mouse T helper cells.* J.Exp.Med. 170: 2081-2095.

FIorentino, D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M. ET O'Garra A. (1991): *IL-10 acts on the APC to inhibit cytokine production by Th1 cells.* J. Immunol. 146(10): 3444-51.

Go, N.F., ET COLL. (1990): *IL-10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency cells.* J.Exp.Med., 172(6): 1625-31.

HARDY R.R ET HAYAKAWA K. (1986): *Development and physiology of Ly-1B and its Human homologue, LEU 1B.* Immunol.Rev., 93: 53-79.

HARDY R.R. (1992): *Variable usage, physiology and development of Ly-1<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>) B cells.* Current Opinion in Immunology, 4: 181-185.

HAYAKAWA K., HARDY R.R. HONDA M. ET HERZENBERG L.A. (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. ET HERZENBERG L.A. (1985): *Progenitor for Ly 1B Cells are distinct from progenitors for other B cells.* J.Exp.Med., 161: 1554-1568.

HAYAKAWA K. ET HARDY R.R. (1988): *Normal, autoimmune and malignant CD5<sup>+</sup> B cells: the Ly-1 B lineage?* Annu.Rev.Immunol., 6: 197-218.

HIDAKA T., KITANI A., HARA M., HARIGAI M., SUZUKI K., KAWAGUSHI Y., ISHIZUKA T., KAWAGOE M., ET NAKAMURA H. (1992): *IL-4 down regulates the surface expression of CD5 on B cells and inhibits spontaneous immunoglobulin and IgM-rheumatoid factor production in patients with rheumatoid arthritis.* Clin.Exp.Immunol, 89: 223-229.

HIRANO T., YASUKAWA K. HARADA H., TAGA T., WATANABE Y. ET MATSUBA T. (1986): *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulins.* Nature 324: 73-76

HISHIDA, H., HASTINGS R, KEARNEY J., ET HOWARD M. (1992): *Continuous Anti-IL-10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells.* J.Exp.Med. 175: 1213-1220.

HOLTMANN, A. ET WALLACH, D. (1987): *Down regulation of the receptor for TNF by IL-1 and IL-4,  $\beta$ -phorbol 1,2-myristate-13-acétate.* J.Immunol. 139: 1161-1167.

HOWARD M., O'GARA A., ISHIDA H., DE WAAL MALEFYT R. ET DE VRIES J. (1992): *Biological properties of Interleukin 10.* J.Clin.Immunol. 12(4): 239-247.

HUANG H.-J.S., JONES N.H., STROMINGER J.L. ET HERZENBERG L.A.I. (1987): *Molecular cloning of Ly-1, a transmembrane 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: 204-208.

JERNE, NK. *Toward a Network Theory of the immune system.* (1974) Annals of immunology, Paris 125C, 373.

KANTOR, A. B. *A new nomenclature for B Cells.* (1991,a) Immunology Today, 12(11): 388-389.

KANTOR, A. B. *The developpement and repertoire of B-1 cells.* (1991,b) Immunology Today, 12(11): 389-391.

KAPPLER J. ET MARRACK P. (1989): *Lymphokines.* Handbook of experimental immunology 2, chap 59. Ed. par D.M. Weir, Blackwell Scientific Pub.

KASAIAN M.T., IKEMATSU H. ET CASALI P. (1992): *Identification and analysing of a novel human surface CD5<sup>-</sup> B lymphocyte subset producing natural antibodies.* J.Immunol 148: 2690-2702.

KELSO A (1989): *Cytokine structure, function and synthesis.* Curr.Opin.Immunol. 2:215-255.

KINKADE P.W. ET GIMBLE M. (1989): *B lymphocytes.* Fundamental Immunology Second edition, edited by Paul, Raven press Ltd., New York, 41-67.

KIPPS T.J. (1989): *The CD5 B cell*. Advances in Immunology 47: 177-185.

KUSHNARYOV V.M., MACDONALD H.S., DESMAK J.J. ET GROSSBERG S.E. (1985) Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 82: 3281-3293.

LETESSON J.J., MAGER A., DIDEMBOURG CH. ET DEPELCHIN A. (1990): *Monoclonal antibody specific for bovine CD5 antigen which enhances mitogen-induced blastogenesis and IL-2 production*. Vet.Immunol.Immunopath., 25: 249-257.

LYDYARD P.M., MACKENZIE L. E., YOUINOU P.Y.(1992): *CD5*. Encyclopedia of Immunology, de Ivan Roitt , ed. Academic Press, 306-308.

MACNEIL I.A., TAKASHI S., MOORE K., MOSMANN T.R. AT ZLOTNIK A. (1990) : *IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells*. J.Immunol. 145: 4167-4173.

MALTER J.S. (1989): *Identification of an AUUUA-specific messenger RNA binding protein*. Science 246: 664-666.

MATHEISE J.P., DELCOMMENNE M., MAGER A., DIDEMBOURG C.H. ET LETESSON J.J. (1992): *CD5 B cells from bovine leukemia virus infected cows are activated cycling cells responsive to IL-2*. Leukemia, 6(4): 304-309.

MERCOLINO T.J., ARNOLD L.W. ET HAUGHTON G. (1986): *Phosphatidyl choline is recognized by a series of Ly-1<sup>+</sup> murine B cell lymphomas specific for erythrocyte membrane*. J.Exp.Med. 163: 155-165.

MERCOLINO T.J., ARNOLD L.W., HAWKINS L.A. ET HAUGHTON G., (1988): *Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1 (CD5<sup>+</sup>) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes*. J.Exp.Med. 168: 687-693.

MIYAMA-INABA M., KUMA S., INABA K., OGATA H., IWAI H., YASUMITZU R., MURAMATSU S., STEINMAN R.M., ET IKEHARA S. (1988): *Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice*. J.Exp.Med. 168: 811-816.

MOORE, K.W., VEIRA P., FIORENTINO D.F., TROUNSTINE M.L., KHAN T.A. ET MOSSMAN T.R. (1990): *Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRFI*. Science 248: 1230-1234.

MOORE K.W. ET MOSMANN T., (1992): *Interleukin-10*. Encyclopedia of Immunology, de Ivan Roitt , ed. Academic Press., 925-930.

MOSMANN, T.R, ET MOORE, K.W. (1991): *The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses*. Immunol. Today 12(3): 49-53.

NAESSENS J. ET WILLIAMS D.J.L. (1992): *Characterisation and measurement of CD5<sup>+</sup>B cells in normal and trypanosoma congolense-infected cattle*. Eur.J.Immunol., 22: 1713-1718.

NISHIZUKA Y. (1984) : *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion*. Nature 308: 693-698.

O'GARRA A. ET HOWARD (1992): *M. IL-10 production by CD5-B cells* Ann.NY.Acad.Sci., 651: 182-199.

O'GARRA A., CHANG R., GO N., HASTINGS R., HAUGHTON G. ET HOWARD M. (1992): *Ly-1B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10*. Eur.J.Immunol. 22: 711-717.

RABIN, E.M., ET COLL. (1985): *B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells*. Proc Natl Acad Sci USA 82: 2935-2939.

REEVES, SPIES A.G., NISSEN M.S., BUCK C.D., WEINBERG A.D., BARR P.J., MAHNUSON N.S. ET MAGNUSON J.A. (1986): *Molecular cloning of a functional bovine interleukine 2 cDNA*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 3228-3232.

REICH, N.C. ET PFEFFER L.M.. (1990): *Evidence of involvement of protein kinase C in the cellular response to IFN alpha*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87: 8761-8765.

ROÏTT I., BRISTOFF J. ET MALE D. (1989). *Immunologie fondamentale et appliquée*. ed. MEDSI/McGraw-Hill Health care group.

ROUSSET, F., GARCIA E., DEFRANCE T., PERRONE C., VEZZIO N., HSU D.H., KASTELEIN R., MOORE K.W. ET BLANCHEREAU J. (1992): *IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89: 1890-1893.

SAMPALO A., LOPEZ-GOMEZ M., JIMENES-ALFONSO J., ORTIZ F., SAMANIEGO F. ET GARRIDO F. (1993): *CD5<sup>+</sup>B lymphocytes in HIV infection: relationship to immunological progression of disease*. Clin.Immuno.Immunopathol., 66(3): 260-268.

SHAW, ALAN R.(1991): *The cytokine handbook "Molecular Biology of Cytokines"* Ed. par Angus Thomson, Academic Press Limited

SMITH, K.A.,L.B. LACHMAN, J.J. OPPENHEIM, ET M.F. FAVATA (1980): *The functional relationship of the interleukins*. J.Exp.Med., 151: 1551-1556.

SNAPPER, C.M., FINKELMAN F.D. ET PAUL W.E.(1987) :*Regulation of IgG1 and IgE production by IL-4*. Immunol.Rev. 102,51.

SPOONER R.L., LEVEZIEL H., GROSECLAUDE F., OLIVIER R.A. ET VAIMAN M. (1978): *Evidence for a possible MCH in cattle*. J Immunogenet 5: 335-346.

SUDA T., O'GARRA A. ET MACNEIL I. (1990): *Identification of a novel thymocyte growth promoting factor derived from B cell lymphomas*. Cell.Immunol., 129, 228-240.

THIELEMANS K., VAN DE VELDE H., VON HOEGEN I., LUO W., PARNES J.R. (1991): *The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5*. Nature, 351: 662-664.

TRINCHIERI GIORGIO (1992): *Natural Killer (NK) Cells* Encyclopedia of Immunology, de Roit I. et Delves P. Academic Press, 1136-1138.

TROUT A.B. ET KELSO A. (1992): *Regulation of cytokine gene*. Encyclopedia of Immunology Roit I. et Delves P., Academic Press, 434-436.

UYTDEHAAG F., VAN DER HEIJDEN R. ET OSTERHAUS A. (1991): *Maintenance of immunological memory: a role for the CD5<sup>+</sup>B cells*. Immunology Today, 12(12): 439-442 .

VAN DAMME, JO, ET COLL. (1988): *Separation and comparison of 2 monokines with lymphocyte activating factor activity: IL-1 $\beta$  and HGF*. J Immunol 140: 1434-1541.

VAN DAMME JO (1989): *Biochemical and biological properties of HPGF/IL-6*. Ann. NY. Acad. Sci. 557: 104-113.

VIEIRA, P., DE WAAL MALEFIJT R., DANG M.N., JOHNSON K.E., FIORENTINO D.F., DE VRIES J.E., RONCAROLO M.G., MOSMANN T.R. ET MOORE K.W.(1991): *Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr open reading frame BCRFI*. Immunology 88: 1172-1176.

VILCEK J. ET LE J. (1991): *The cytokine handbook. "Immunology of cytokines"* Ed. par Angus Thomson, Academic Press Limited

WERNER-FAVRE C., VISCHER T.L., WOHLWEND D. ET ZUBLER R.H.(1989): *Cell surface antigen CD5 is a marker for activated human B cells*. Eur.J.Immunol., 19: 1209-1213.

YOUINOU P., MACKENZIE L.E., LAMOUR A., MAGEED R.A ET LYDYARD P.M (1993): *Human CD5 positive B cells in lymphoid malignancy and connective tissue diseases*. Eur.J.Clin.Invest 23(3): 139-150.