

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

#### Analyse du profil cytokinique (Th1/Th2) au cours d'une réponse immunitaire anti-BRSV dans un modèle murin

Lestrade, Pascal

*Award date:*  
1996

[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.

FACULTES UNIVERSITAIRES  
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

**FACULTE DES SCIENCES**

-----

**Analyse du profil cytokinique (Th1/Th2) au cours d'une réponse  
immune anti-BRSV dans un modèle murin**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences**

**biologiques**

**Pascal LESTRATE**

**1996**

## Analyse du profil cytokinique (Th1/Th2) au cours d'une réponse immune anti-BRSV dans un modèle murin

Lestrade Pascal

### Résumé

Le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) est responsable de nombreuses infections pulmonaires chez les veaux. Le manque à gagner occasionné lors d'épidémie de BRSV a fait de celui-ci un des points de mire de la recherche vétérinaire. Le HRSV, l'homologue humain du BRSV, est responsable d'infections pulmonaires aiguës chez les enfants en bas-âge. Les études menées sur le HRSV dans des modèles murins ont permis de mettre en évidence que les complications histopathologiques occasionnées par celui-ci étaient sans doute liées à la mise en place d'une réponse immune de type Th2. Dans ce travail, nous avons mis au point des techniques de détection d'ARN messagers cytokiniques chez la souris. A l'aide de ces techniques, les profils de transcriptions de l'IL-4, de l'IL-2 et de l'INF- $\gamma$  ont été étudiés. Nous avons pu montrer que la voie d'entrée de l'antigène ainsi que son adjuvantation influence d'une manière non négligeable l'orientation de la réponse. Nous avons également étudié la cinétique du profil transcriptionnel de l'IL-4, de l'IL-2 et de l'INF- $\gamma$ .

## Abréviations

Ac : Anticorps  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
Ag : antigène  
Amp : Ampicilline  
APC : Antigen Presentating Cell(cellule présentatrice de l'antigène)  
ARN : ARN standard  
ARN: Acide ribinucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
 $\beta$ 2m:  $\beta$ 2 microglobuline  
BRSV : Bovine Respiratory Syncytial Virus  
CD : Cluster of Differentiation  
CMH : Complexe Majeur d'Histicompatibilité  
CTL: Cytotoxic Lymphocyte  
DEPC : Diethylpyrocarbonate  
DHEA: Déhydroepiandrosterone  
DHEAs : DHEA sulfaté  
DO: Densité Optique  
DTH : Delayed Type Hypersensitivity (Hypersensibilité retardée)  
EBV : Epstein-Barr Virus  
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
eTh : Cellule Th effèctrice  
Fab : Fragment ab  
Fc : Fragment c  
GC : Glucocorticoïde  
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Stimulating Factor  
HIV : Human Immunodeficient Virus  
HRSV : Human Respiratory Syncytial Virus  
Ig : Immunoglobuline  
IL- : Interleukine-  
IM : Intramusculaire  
IN : Intranasal  
INF- $\gamma$  : Intreféron- $\gamma$   
kDa : kiloDalton  
LB : Lymphocyte B  
LPS : Lipopolysaccharide  
LT : Lymphocyte T  
Lt: Lymphotoxine  
M-MLV RT : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transriptase

mTh : Cellule Th mémoire  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor  $\kappa$ B  
NK : Natural Killer  
pb: Paire de bases  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
pg : Picogramme  
pTh : Précurseur de cellule Th  
QuilA : Extrait de la saponine. (Quiljajia Saponia Molina)  
RF : Ribonuclease free  
Rnase : Ribonucléase  
RSV : Respiratory Syncytial Virus  
RT : Reverse Transcription  
SIDA: Syndrome Immunodéficientaire Acquis  
TCR : T Cell Receptor  
Th : T helper lymphocyte  
Tm : Melting Temperature  
TNF- $\beta$  : Tumor Necrosis Factor- $\beta$

Je dédicace ce mémoire, à  
Mamette, Annou, Sophie,  
Marie, Mich et à Num.

"Le hasard apparent n'est rien d'autre que le nom que nous donnons à notre ignorance."

(R. Littel)

C'est un dimanche matin à peu près comme les autres, Marc Isaï présente les classiques sur 21, ça sent bon le café dans la cuisine, des gens flânent dans la rue... Pourtant il y a comme une odeur d'imminence dans l'air, une ambiance de fin d'année, des gens de mon entourage courent dans tous les sens le front plissé, l'air soucieux. J'ai du mal à me concentrer, des souvenirs m'envahissent sans suite logique, une espèce de longue sarabande d'images décousues.

Photo 1 piste A: vaguement intimidé, j'aborde le Docteur J.J. Letesson "J'aimerais bien venir faire mon mémoire chez vous..." . Merci pour tout, de votre présence au dixième de la Liégeoise à votre accessibilité tout au long de l'année.

Photo 1 piste B: Présentation d'un séminaire en Immunologie, stress ma "superviseuse" est là, c'est le moment de mettre le paquet. Elle s'assoupit avant que je n'ai formulé ma première phrase... Isabelle alias "madame Ma". Cet assoupissement n'était que passager, j'ai trouvé en elle une personne attentive, critique et ouverte. Madame Ma le mot maternité vous va comme un gant, travailler avec vous est un plaisir, je recommence quand vous voulez.

Photo 1 piste C: J'ai une autre maman au laboratoire, Deb. Depuis qu'elle est partie, je suis comme la moitié d'un orphelin.

Photo 2 piste A: On m' a aussi collé une espèce de petite soeur, une vrai chipie comme toutes les soeurs mais si gentille qu'on lui pardonne tout. Merci Chantal.

Photo 2 piste B: J-P, Anderlecht attend que tu finisses ta thèse pour remonter le classement, il est temps de te dépêcher, on est déjà à la moitié de la saison. En tout cas tu es de meilleurs conseils que J. Boskamp.

Photo 2 pistes C et D: Martine et Sandra, beaucoup de serviabilité et de sympathie. Certains des résultats vous appartiennent, je ne l'oublie pas.

Photo 3 piste A: Pil, tu as une grande G... mais surtout un grand coeur. Je t'ai connu comme Magnus Magister et c'est toujours ce que tu seras pour moi, quelqu'un qui veille et qui est de bon conseil, une espèce de marqueur de poids moléculaire au quel on peut se référer sans crainte.

Photo 3 pistes B et C: Le "team phage", Docteur Poos je ne vous serai jamais assez reconnaissant de m'avoir appris à faire exploser un eppendorf avec de la carbo-glace (Sigma, USA). Je vous avais prévenu de maintenir un profil bas le temps que j'écrive mes remerciements mais il fallu que vous fassiez de l'humour... Je vous considère comme le petit lutin malicieux du labo. Ceci dit vos tuyaux m'ont été très profitable, vous m'avez fait découvrir de dimensions de la Bio-Mol dont je ne soupçonnais même pas l'existence, merci. Xa depuis ma deuxième candi. tu as toujours été celui qu'on va trouver pour s'éclaircir les idées. Merci pour tout ce temps que tu donnes sans compter.

Photo 4 pistes A, B, C: Anne, Christian, Dèdè et Fa. Compétence et amitié, merci.

Photo 5 pistes A, B, C, D, E, F, G: Cyndy, Kat, Mémé, Lili, Scratchi, Seb et Youssef. Je ne vous connais pas tous comme je le voudrais, juste un mot pour chacun d'entre vous. Cyndy: Rave Party, Kat: enthousiasme, Mémé: Platon et al. , Lili et Scratchi: mes Amis, Seb: pyjama, Youssef: cynisme.

Photo 6 toutes les pistes: A ma Grande Maîtresse qui prend beaucoup de place, merci pour 5 années d'amitié et d'encouragement.

Photo 7: Tous ceux que je n'ai pas cités et qui de près ou de loin ont contribué à mon mémoire.

Je tiens à remercier monsieur D. Shire, Mr Verbent et Mr Maisonneuve ainsi que Mr K. Walravens, qui m'ont tous fourni des éléments de construction utiles à mon mémoire.

Merci aux membres du jury qui ont accepté de lire ce mémoire.

## Abréviations

Ac : Anticorps  
ADN: Acide désoxyribonucléique  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
Ag : antigène  
Amp : Ampicilline  
APC : Antigen Presentating Cell  
ARN : ARN standard  
ARN: Acide ribinucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
 $\beta$ 2m:  $\beta$ 2 microglobuline  
BRSV : Bovine Respiratory Syncytial Virus  
CD : Cluster of Differentiation  
CMH : Complexe Majeur d'Histicompatibilité  
CTL: Cytotoxic Lymphocyte  
DEPC : Diéthylpyrocarbonate  
DHEA: Déhydroépiandrostérone  
DHEAs : DHEA sufalté  
DO: Densité Optique  
DTH : Delayed Type Hypersensitivity (Hypersensibilité retardée)  
EBV : Epstein-Barr Virus  
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
eTh : Cellule Th effectrice  
Fab : Fragment ab  
Fc : Fragment c  
GC : Glucocorticoïde  
GM-CSF : Granulocyte Macrophage - Stimulating Factor  
HIV : Human Immunodeficient Virus  
HRSV : Human Respiratory Syncytial Virus  
Ig : Immunoglobuline  
IL- : Interleukine-  
IM : Intramusculaire  
IN : Intranasal  
INF- $\gamma$  : Interféron- $\gamma$   
kDa : kiloDalton  
LB : Lymphocyte B  
LPS : Lipopolysaccharide  
LT : Lymphocyte T  
Lt: Lymphotoxine  
M-MLV RT : Moloney Murine Virus Reverse Transriptase

mTh : Cellule Th mémoire  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor  $\kappa$ B  
NK : Natural Killer  
pb: Paire de bases  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
pg : Picogramme  
pTh : Précurseur de cellule Th  
QuilA : Extrait de la saponine. (Quilavia Saponia Molina)  
RF : Ribonuclease free  
Rnase : Ribonucléase  
RSV : Respiratory Syncytial Virus  
RT : Reverse Transcription  
SIDA: Syndrome Immunodéficientaire Acquis  
TCR : T Cell Receptor  
Th : T helper lymphocyte  
Tm : Melting Temperature  
TNF- $\beta$  : Tumor Necrosis Factor- $\beta$

**Introduction**

**1 La réponse immunitaire.....1**

1.1 Il était une fois ... l'immunité.....1

1.2 L'immunité naturelle.....3

1.2.2 La réponse humorale.....3

1.2.2 La réponse cellulaire.....4

1.3 L'immunité adaptative (spécifique).....4

1.3.1 La réponse humorale.....4

1.3.2 La réponse cellulaire.....5

**2 Le lymphocyte T helper, l'aiguilleur de la réponse  
immune.....6**

2.1 Caractérisation des cellules Th1 et Th2.....6

2.2 Caractéristiques majeures des principales cytokines  
Th1/Th2.....7

2.2.1 L'interleukine-2 (IL-2).....7

2.2.2 L'interféron-g (INF-g).....8

2.2.3 L'interleukine-4 (IL-4).....8

2.2.4 L'interleukine-10 (IL-10).....9

2.2.5 Les cytokines et la régulation croisée.....9

2.3 L'orientation de la réponse Th1/Th2.....10

2.3.1 La différenciation des T auxiliaires: des  
précurseurs aux cellules mémoires.....10

2.3.2 Influence de l'environnement cytokinique sur  
la différenciation.....11

2.3.3 Importance des cellules présentatrices de  
l'antigène (APC).....12

2.3.4 Influence de l'environnement sur l'orientation  
de la réponse.....14

2.3.5 Les CD8+ Th2 like.....14

2.3.6 L'orientation de la réponse, le modèle intégré.....16

2.4 Pathologies et thérapies associées au modèle  
Th1/Th2.....16

<b>3 Le virus respiratoire syncytial (RSV).....</b>	<b>1 8</b>
3.1 Généralités .....	1 8
3.1.1 Structure du virion.....	1 9
3.1.2 Réplication et transcription.....	2 0
3.1.2 Signes cliniques.....	2 1
3.1.2 Réplication et transcription.....	2 0
3.2 Le RSV, un casse tête immunitaire.....	2 1
3.2.1 Réponse immune anti-RSV .....	2 2
3.2.2 La réponse Th1/ Th2.....	2 4
<b>4 But du travail .....</b>	<b>2 6</b>

## Matériel et méthodes.

<b><u>A Techniques de biologie moléculaire.....</u></b>	<b><u>2 8</u></b>
<b>1 Extraction d'ARN.....</b>	<b>2 8</b>
1.1 Conditions RF.....	2 8
1.2 Extraction d'ARN messager (ARNm).....	2 8
1.2.1 Préparation des cellules.....	2 8
1.2.2 Isolement de l'ARNm.....	2 9
1.3 Isolement d'ARN total (ARN).....	3 0
1.3.1 Préparation des cellules.....	3 0
1.3.2 Préparation des tissus.....	3 0
1.3.3 Isolement de l'ARN.....	3 1
1.4 Quantification de l'ARN.....	3 1
<b>2 Amplification et extraction de plasmides.....</b>	<b>3 1</b>
2.1 Le plasmide pMus-3.....	3 1
2.2 Amplification de pMus-3.....	3 2
2.3 Extraction de pMus-3 par Midiprep .....	3 2
<b>3 Restriction .....</b>	<b>3 3</b>

<b>4</b>	<b>Transcription et purification de pMus-3</b> .....	<b>3 4</b>
4.1	Transcription de pMus-3.....	3 4
4.2	Purification de l'ARN.....	3 4
4.2.1	Contrôle du pouvoir de résolution des colonnes.....	3 5
4.2.2	Purification de pMus-3.....	3 5
<b>5</b>	<b>Gel d'agarose pour ADN OU ARN</b> .....	<b>3 6</b>
5.1	Gel ADN.....	3 6
5.1.1	Préparation des échantillons.....	3 6
5.1.2	Préparation du gel et électrophorèse.....	3 6
5.2	Gel ARN.....	3 7
5.2.1	Préparation des échantillons.....	3 7
5.2.2	Préparation du gel et électrophorèse.....	3 7
<b>6</b>	<b>RT-PCR</b> .....	<b>3 8</b>
6.1	Généralités.....	3 8
6.2	Étape de rétrotranscription.....	3 9
6.3	Amplification de l'ADNc.....	3 9
<b>7</b>	<b>Quantification d'ARNm par RT-PCR en présence d'un standard interne multispécifique (pMus-3)</b> .....	<b>4 0</b>
7.1	Généralités.....	4 0
7.2	RT-PCR semi-quantitative.....	4 1
<b>B</b>	<b>Techniques d'immunobiologie</b> .....	<b>4 1</b>
<b>1</b>	<b>Immunsation expérimentale</b> .....	<b>4 1</b>
1.1	Anesthésie et immunisation.....	4 2
1.2	Les antigènes, type et dose.....	4 3
1.2.1	Le BRSV.....	4 3
1.2.2	Erythrocytes bovins.....	4 3

<b>2</b>	<b>Mise en évidence de la production d'anticorps.....</b>	<b>4 4</b>
2.1	Généralités .....	4 4
2.1.1	Récolte du sérum sanguin.....	4 4
2.1.2	Préparation du virus en octyl. (selon Matheise et al, 1995).....	4 4
2.2	ELISA.....	4 4
<b>3</b>	<b>Splénocytes.....</b>	<b>4 5</b>
3.1	Isolement.....	4 5
3.2	Culture de splénocytes.....	4 7

## Résultats

<b>1</b>	<b>Quantification des ARNm de IL-2, de l'IL-4 et de l'INF-<math>\gamma</math> par RT-PCR compétitive.....</b>	<b>4 7</b>
1.1	Restriction, transcription et purification de pMus-3.....	4 7
1.1.1	Restriction.....	4 7
1.1.2	Transcription et purification de pMus-3.....	4 8
1.2	Mise au point de la RT-PCR sur le standard pMus-3.....	4 8
1.3	Détection d'ARN de cytokines.....	4 9
1.3.1	Détection d'ARNm de cytokines à partir de cellules isolées.....	4 9
1.3.2	Détection d'ARNm de cytokines à partir de rate.....	5 1
	A) Détection de b2m chez des souris naïves.....	5 1
	B) Immunisation de souris par voie intranasale ou intramusculaire avec du RB94 adjuvanté ou non.....	5 2
	C) Mise au point de la détection d'ARNm cytokiniques à partir de rates de souris immunisées avec du baculovirus recombinant exprimant la protéine de fusion.....	5 2
	D) Mise au point de la détection d'ARNm cytokiniques à partir de souris immunisées avec des érythrocytes bovins.....	5 3

---

E) Mise au point la détection d'ARNm chez des souris immunisées par du BRSV adjuvanté en alun ou non.....	5 4
F) Étude de la cinétique de l'expression de l'INF-g, de l'IL-4 et de l'IL-2 après immunisation avec du BRSV adjuvanté ou non.....	5 4
1.4 RT-PCR compétitive.....	5 8
<b>2 Synthèse de l'IL-4, de l'INF-<math>\gamma</math> et de l'IL-2 après restimulation in vitro.....</b>	<b>6 1</b>
2.1 Dosage de l'IL-4.....	6 1
2.2 Dosage de l'INF $\gamma$ .....	6 2
2.3 Mise en évidence de la synthèse d'IL-2.....	6 3
<b>3 Analyse sérologique.....</b>	<b>6 4</b>
 <b><u>Discussion</u></b>	
Discussion générale.....	6 6
 <b><u>Conclusions et perspectives</u></b>	
Conclusions et perspectives.....	7 0
 <b><u>Bibliographie</u></b>	
Bibliographie.....	7 0

# **INTRODUCTION**

## **1 La réponse immunitaire**

(ouvrages de ref. (, a; , b; Roitt, 1993; Janeway; Travers, 1995))

Une des caractéristiques principales de tout système vivant est son adaptabilité. Un être vivant incapable de s'accommoder aux variations de son environnement est irrémédiablement voué à disparaître. Les champions de l'adaptabilité sont sans aucun doute les micro-organismes, la plasticité de leur génome leur permet de s'adapter rapidement à des données environnementales nouvelles. Pour s'en convaincre il suffit de considérer le nombre croissant de pathogènes résistants à nos antibiotiques. Il est étonnant que, malgré la relative fixité de leur génome, les organismes supérieurs parviennent à contrer cette multitude de pathogènes. Cela sous-entend qu'ils possèdent l'information nécessaire à la lutte contre les microbes avant même d'avoir rencontré ceux-ci. En effet, de nombreuses cellules phagocytaires possèdent des récepteurs leur permettant de reconnaître des carbohydrates étrangers; de même, un système de recombinaisons génétiques permet aux cellules lymphocytaires de faire face à n'importe quel déterminant antigénique, la capacité que nous avons de discriminer ces éléments étrangers repose sur un système complexe, héritage d'une évolution commune de plus de 600 millions d'années. Avant de décrire les divers éléments de notre système de défense, nous rappellerons les grandes lignes de son évolution.

### **1.1 Il était une fois ... l'immunité**

L'apparition d'entités pluricellulaires, il y a environ 600 millions d'années, a fourni de nouveaux biotopes aux micro-organismes. Au cours de l'évolution, ceux-ci ont opté pour diverses stratégies de colonisation: commensalisme, parasitisme, symbiotisme,... Nous nous intéresserons ici aux micro-organismes pathogènes, qui ont choisi de mener une guerre ouverte contre leur hôte, guerre pouvant mener à la destruction pure et simple de l'hôte. Les métazoaires durent, pour assurer leur survie, mettre en place différentes lignes de défense.

groupe de vertébrés	synthèse d'anticorps	chaînes lourdes d'immunoglobulines				
		M	G/Y	A	D	E
mammifères	■	■	■	■	■	■
oiseaux	■	■	■	■	□	□
reptiles	■	■	■	?	□	□
grenouilles/crapauds	■	■	■	▤	□	□
salamandres/tritons	■	■	■	□	□	□
poissons à poumon	■	■	■	□	□	□
téléostéens	■	■	?	□	□	□
élasmobranchés	■	■	■	□	□	□
poissons agnathes	■	▤	□	□	□	□
 présence/homologie		 présence probable		 absence probable		 données insuffisantes

Tableau I.1: Chaînes lourdes observées dans différents groupes de vertébrés (Roitt, Brostoff et Male, 1993)

La solution la plus simple étant d'empêcher l'entrée des microbes indésirables, ces invertébrés mirent en place des barrières physico-chimiques (mucus, coquille, exosquelette...). Cependant ces systèmes ne s'avérant pas assez efficaces, il fallut mettre en place des moyens de défense "intra-muros". C'est à cette époque que l'immunité naturelle (non spécifique) trouve ses fondements.

Au niveau cellulaire, on note l'apparition de cellules phagocytaires, les amœbocytes, capables de faire la différence entre le soi et le non-soi. Bien que ne possédant pas l'équivalent des anticorps (Ac), les invertébrés ont à leur disposition une palette de facteurs humoraux naturels, constitutifs ou inductibles, leur permettant de détruire les éléments étrangers; on peut citer: les lysozymes, les agglutinines, les défensines ainsi que ce que nous pouvons appeler les précurseurs du système du complément (voir plus loin). La constatation de l'existence d'une reconnaissance allogénique chez de nombreux invertébrés laisse supposer l'existence de gènes ancestraux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez ces animaux.

Chez les vertébrés, on assiste à la mise en place de tissus spécialisés dans la production de cellules immunitaires circulantes. On peut distinguer de nombreux types de cellules. C'est chez les poissons agnathes que l'on trouve les précurseurs de nos lymphocytes B (LB) capables de synthétiser des anticorps de type IgM. Petit à petit se mettent en place les systèmes génétiques permettant la multiplicité des isotypes (Tableau I.1). En ce qui concerne les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), on pense que le CMH a dû apparaître il y a environ 350 millions d'années lorsque batraciens et mammifères ont divergé. C'est à cette époque que les précurseurs des molécules du récepteur de lymphocytes T (TCR) ont vu le jour. Enfin le système du complément s'est complexifié en créant une voie d'activation dépendante des anticorps. Les grandes lignes du fonctionnement de notre système immunitaire sont rappelées dans les paragraphes suivants.

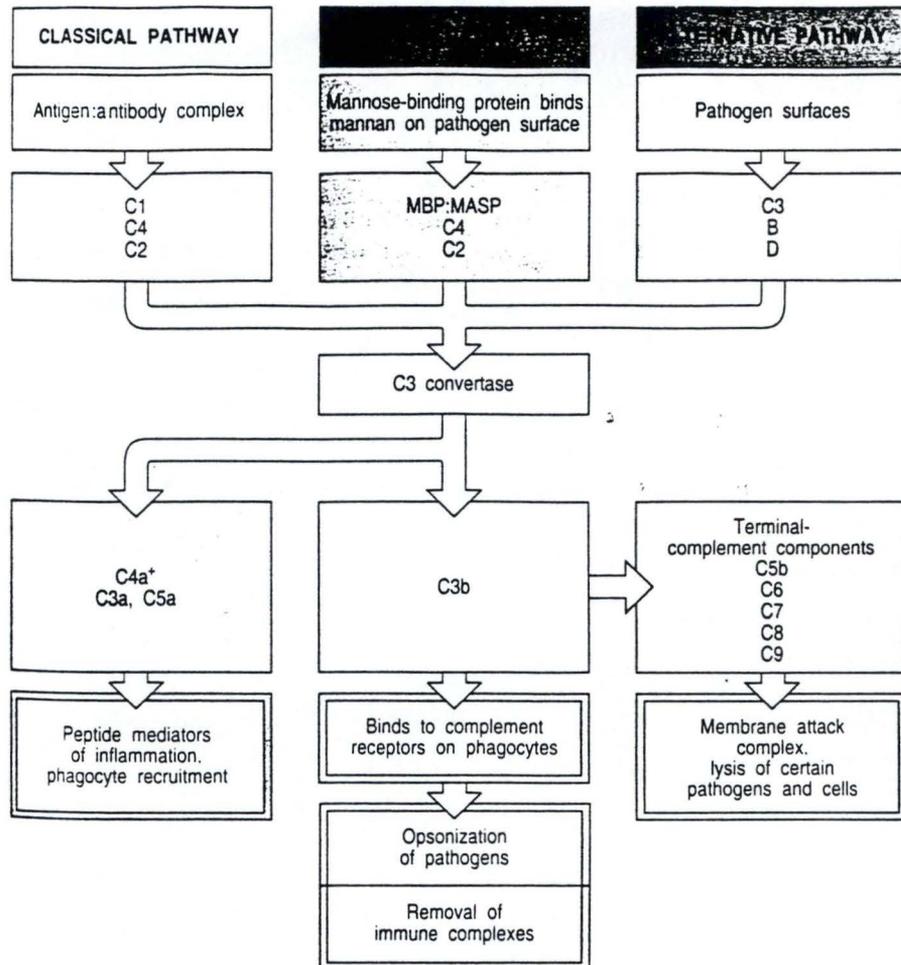


Figure I.1: Voies d'activation du complément (Janeway et Travers, 1996)

## 1.2 L'immunité naturelle

L'immunité naturelle (non spécifique) procure une réponse antimicrobienne rapide mais incomplète. On peut distinguer deux types de réponse naturelle: la réponse humorale et la réponse cellulaire.

### 1.2.1 La réponse humorale

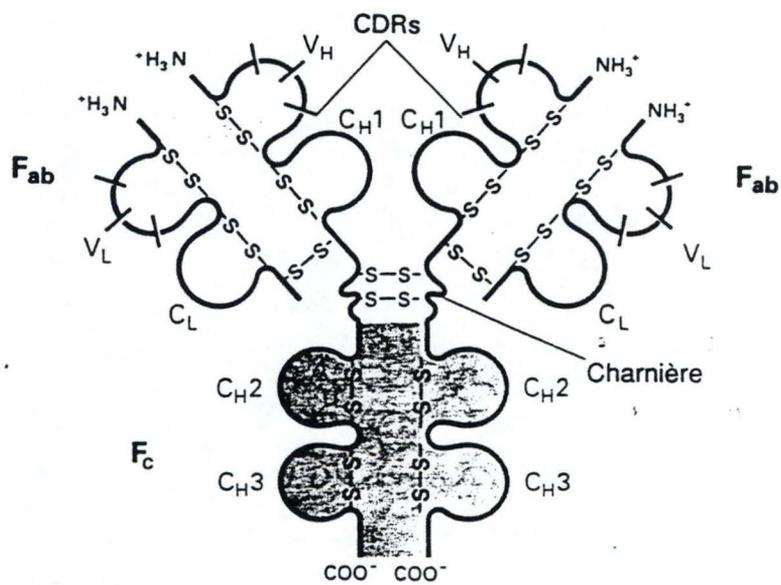
Un des mécanismes-clefs de l'immunité naturelle humorale repose sur le système du complément. Il s'agit d'un ensemble de protéines plasmatiques agissant de façon séquentielle les unes sur les autres. Il existe deux voies d'activation du complément. L'une dite "classique" est activée par des anticorps fixés sur un antigène tandis que l'autre, dite "alterne" consiste en une activation spontanée du complément en présence d'un corps étranger.

L'activation par la voie alterne ou par la voie classique aboutit aux mêmes résultats :

- Opsonisation de la cible
- Attraction des phagocytes
- Vasodilatation et augmentation de la perméabilité capillaire au site de l'activation.
- Lésions des membranes et lyse de la cible

Les différentes voies d'activation et leurs effets sont résumés dans la figure I.1.

Les interférons de type 1 jouent également un rôle important dans la réponse naturelle humorale. Ils sont synthétisés par les fibroblastes (interféron  $\alpha$ ) et par les leucocytes (interféron  $\beta$ ) et préviennent la réplication virale dans les cellules infectées. Ils sont particulièrement actifs sur les monocytes et les macrophages (Belardelli, 1995).



V<sub>H</sub>: région variable de la chaîne H  
 C<sub>H</sub>: région constante de la chaîne H  
 V<sub>L</sub>: région variable de la chaîne L  
 C<sub>L</sub>: région constante de la chaîne L

Figure I.2: Schéma général d'une immunoglobuline (Darnell, Lodish et Baltimore, 1993)

### 1.2.2 La réponse cellulaire

Certaines cellules circulantes du système immunitaire, comme les macrophages et les natural killer (NK), disposent de récepteurs leur permettant de reconnaître des carbohydrates étrangers. Un exemple bien connu est le récepteur aux lipopolysaccharides (LPS) des macrophages. La fixation du LPS à son récepteur stimule le macrophage et induit la synthèse de cytokines proinflammatoires. L'activation du macrophage par le LPS a aussi comme effet d'augmenter ses fonctions microbicides.

## **1.3 L'immunité adaptative (spécifique)**

Tout comme l'immunité naturelle, l'immunité spécifique est constituée d'un volet humoral et d'un volet cellulaire.

### 1.3.1 La réponse humorale

Pendant longtemps les immunologistes se sont interrogés sur la capacité du système immunitaire à reconnaître sélectivement une infinité d'antigènes différents. Une partie de la question fut élucidée en 1890 par von Behring avec la découverte des anticorps (Ac) aussi appelés immunoglobulines (Ig).

Les immunoglobulines sont des protéines tétramériques composées de deux régions distinctes (fig. I.2) : le site de fixation (Fab) de l'antigène qui existe en deux copies identiques, et le domaine effecteur (Fc), qui connecte l'anticorps aux mécanismes de destruction de la cible. Il existe plusieurs classes d'anticorps qui diffèrent par leur domaine effecteur.

Les cinq classes d'immunoglobulines et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau I.2. Les anticorps sont synthétisés par les lymphocytes B. Chaque lymphocyte B porte à sa surface des IgM spécifiques d'un motif antigénique donné.

Functional activity	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralization	+	-	■	■	■	++	+++	-
Opsonization	-	-	■	-	■	+	+	-
Sensitization for killing by natural killer cells	-	-	■	-	■	-	-	-
Sensitization of mast cells	-	-	-	-	-	-	-	■
Activates complement system	■	-	■	+	■	-	+	-

Distribution	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Transport across epithelium	+	-	-	-	-	-	■	-
Transport across placenta	-	-	■	■	■	■	-	-
Diffusion into extravascular sites	+/-	-	■	■	■	■	+	■
Serum level (mg ml <sup>-1</sup> )	1.5	0.04	9	3	1	0.5	2.1	0.00003

Tableau I.2: Types et caractéristiques des différentes immunoglobulines humaines (Janeway et Travers, 1996)

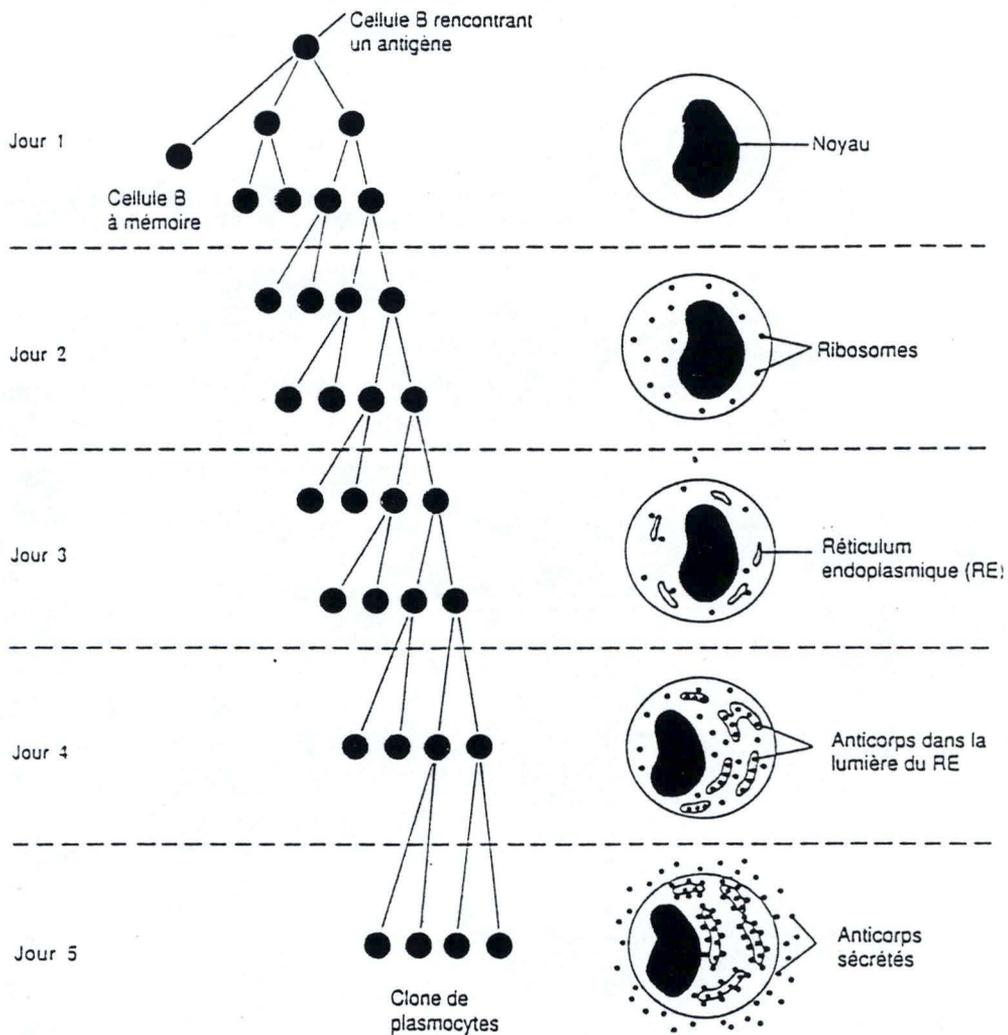


Figure I.3: La stimulation d'un lymphocyte B entraîne la prolifération et la synthèse d'anticorps. La cellule B se divise plusieurs fois et développe les structures nécessaires à la sécrétion d'une grande quantité d'anticorps (Darnell, Lodish et Baltimore, 1993)

Lorsqu'un antigène sera reconnu par une IgM de surface, le lymphocyte B va entrer en phase de prolifération puis de différenciation, il produira ainsi des clones qui vont se transformer en plasmocytes, cellules spécialisées dans la sécrétion d'anticorps ou en cellules-mémoires (fig. I.3). Comme seuls les LB stimulés par l'antigène entrent en phase de prolifération, on parle de sélection clonale.

L'ensemble de ces processus est sous le contrôle de facteurs humoraux synthétisés par les lymphocytes T (voir plus loin).

### 1.3.2 La réponse cellulaire

Les acteurs principaux du volet cellulaire sont les lymphocytes T, ils portent aussi à leur surface des molécules capables de reconnaître des antigènes mais contrairement aux LB, ils ne sécrètent jamais leurs récepteurs spécifiques. Les récepteurs des cellules T (TCR) ne réagissent qu'à des antigènes peptidiques présentés par des cellules infectées ou par certaines cellules spécialisées (voir plus loin).

On connaît deux types de lymphocytes T: les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les lymphocytes T auxiliaires (Th, h pour helper). Ces deux types de lymphocytes diffèrent tant par les antigènes membranaires que par leurs fonctions effectrices. Généralement, les lymphocytes possédant un marqueur CD8 ont une activité cytotoxique tandis que ceux qui possèdent un marqueur CD4 sont des T auxiliaires. Ainsi, les CTL reconnaîtront des antigènes présentés par toute cellule nucléée de l'organisme tandis que les Th ne seront activés que par des peptides présentés par des cellules spécialisées, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Cette dualité de fonctionnement est liée aux modalités de présentation des molécules du CMH. En effet, toute cellule nucléée possède un CMH de classe I. Lorsqu'une cellule est infectée, c'est via son CMH de classe I qu'elle pourra activer les CTL, on parle de restriction de classe I. Les CPA sont des cellules, qui après phagocytose et processing de l'antigène, vont le présenter aux Th via leur CMH de classe II.

Lorsqu'il est stimulé par un antigène, le Th va entrer en phase de prolifération et de sécrétion. Les facteurs produits par les Th (cytokines) vont contrôler la différenciation, la prolifération et l'activation de nombres de cellules du système immunitaire (LB, CTL, macrophages). On peut considérer que le Th est un pivot sur lequel s'articule la réponse immune spécifique, son rôle sera abordé plus en détail dans le chapitre suivant.

## **2 Le lymphocyte T helper, l'aiguilleur de la réponse immune**

Comme nous venons de le voir, la rencontre d'un hôte avec un antigène peut amener deux types de réponse, une réponse humorale ou cellulaire. Durant les années septante, il a été suggéré que ces différents types de réponses pouvaient être attribués aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cette hypothèse a été renforcée dans les années quatre-vingt par la découverte que des cellules T CD4<sup>+</sup> de souris pouvaient être séparées en deux sous-populations selon leur profil de sécrétion de cytokines (O'Garra, 1994). Ces deux types de cellules furent dès lors appelées les cellules T helper de type 1 (Th1) et de Type 2 (Th2).

### **2.1 Caractérisation des cellules Th1 et Th2**

On voit sur le tableau I.3 que seuls les Th1 synthétisent: l'interleukine-2 (IL-2), l'interféron  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) et le "Tumor Necrosis Factor  $\beta$ " (TNF- $\beta$ ) ou lymphotoxine (Lt); ces cytokines ne sont pas détectées chez les lymphocytes Th2. De même, seuls les Th2 synthétisent en quantité détectable: l'interleukine 4 (IL-4), l'interleukine 5 (IL-5) et l'interleukine 10 (IL-10) chez la souris. Ces deux populations de clones produisent des lymphokines communes telles que le "granulocytes macrophages-colony stimulating factor" (GM-CSF), le "tumor necrosis factor  $\alpha$ "(TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine 3 (IL-3).

Fonctionnellement, les cellules Th1 induiraient le volet cellulaire de la réponse immune et leur activation exacerbée serait responsable des réactions d'hypersensibilité retardée (DTH) tandis que les Th2 semblent responsables de l'orientation humorale de la réponse ainsi que des phénomènes allergiques lors d'une réponse excessive. (Pour revue voir (Mossman, 1989)).

Ces différentes populations ont été mises en évidence chez la souris, chez l'humain, chez les bovins, et chez les ovins. Cependant, au niveau de cellules isolées, il a été observé que les cellules T montraient une remarquable diversité dans leur profil de sécrétion et que ces cellules prises collectivement formaient un spectre continu de sécrétion dont les cellules Th1 et Th2 ne constitueraient que les deux phénotypes les plus extrêmes (Kelso, 1995).

La découverte de ces deux types de cellules T auxiliaires a suscité de nombreuses questions: comment ces cellules sont-elles régulées; ces cellules proviennent-elles d'un même précurseur; qu'est-ce qui détermine l'émergence de l'une ou de l'autre population; peut-on expliquer à partir de ce modèle certains phénomènes pathologiques... ?

## **2.2 Caractéristiques majeures des principales cytokines Th1/Th2**

### **2.2.1 L'interleukine-2 (IL-2)**

L'IL-2 est une glycoprotéine de 15.5 kDa produite par les cellules T et B activées. Le gène de l'IL-2 humaine se trouve sur le chromosome 4q au niveau des bandes 26-28.

La protéine mature de l'IL-2 humaine compte 133 acides aminés et possède un pourcentage d'identité de 62 et 66% avec l'IL-2 bovine et murine respectivement.

Au niveau de son activité biologique, l'IL-2 peut-être vue comme un facteur de croissance et de différenciation. Elle exerce son activité sur de nombreux types cellulaires dont les cellules T et B, les natural killer, les monocytes, les macrophages...

Bien que l'IL-2 soit produite par les cellules Th1, elle ne semble pas intervenir dans l'aiguillage de la réponse. Cependant, Ramsay (1993) a montré que l'IL-2 pourrait être responsable de l'induction de mécanismes antiviraux. Elle agirait notamment comme facteur chémotactique pour les cellules NK (pour une revue voir (Kuziel, 1992)).

### 2.2.2 L'interféron- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )

L'interféron- $\gamma$  est une glycoprotéine de 25 kDa chez l'homme et de 15,8 kDa chez la souris. Le pourcentage d'identités de l'interféron- $\gamma$  entre les deux espèces est de 40%. Il contribue à la défense antivirale par son action inhibitrice sur la réplication des virus, mais il possède également une activité biologique importante au niveau cellulaire: activation des macrophages, augmentation de l'expression des CMH de classe I et II (Ramsay, 1993), inhibition de la production d'IgE par les LB et induction de la sécrétion d'IgG2a par ceux-ci. Son implication dans l'orientation de la réponse est majeure comme nous le verrons plus tard. (pour une revue voir (Belardelli, 1995) et (De Maeyer, 1992))

### 2.2.3 L'interleukine-4 (IL-4)

L'interleukine 4 est une protéine de 153 acides aminés chez l'homme et de 140 chez la souris, le pourcentage d'identités est de 50%. L'IL-4 a été identifiée grâce à sa propriété d'induire la prolifération des LB, elle induit chez ceux-ci un changement isotypique qui privilégie la synthèse d'IgE (Kemeny, 1994). Elle constitue, avec l'INF- $\gamma$ , un des médiateurs-clefs dans l'orientation de la réponse; son effet sur les cellules Th1 et Th2 sera revu en détail. (Pour une revue voir (Banchereau, 1992))

#### 2.2.4 L'interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 est un polypeptide de 160 aminoacides et a un poids moléculaire de 18,7 kDa. L'IL-10 est produite par différents types cellulaires dont les cellules Th2, les LB, les macrophages et les kératinocytes activés.

Chez l'humain, il a été montré que des cellules Th1 pouvaient également produire de l'IL-10 (Del Prete, 1993). Cette cytokine, d'abord baptisée "le facteur inhibant la synthèse de cytokines" (CSIF), a été découverte grâce à sa capacité d'inhiber la synthèse de cytokines par les cellules de type Th1.

#### 2.2.5 Les cytokines et la régulation croisée

L'IL-2 bien qu'étant notamment produite par les cellules Th1, ne semble pas être impliquée dans la régulation croisée: elle permet de différencier les clones Th1 des Th2. Cependant sa capacité à recruter les NK peut influencer l'environnement cytokinique et donc influencer l'orientation de la réponse.

L'IL-4 agit comme facteur de croissance autocrine sur les cellules Th2; cependant elle peut, dans une moindre mesure, maintenir la croissance des cellules Th1 (Bachmann, 1995). Un des effets majeurs de l'IL-4 est sa capacité d'inhiber la production d'IL-2 et d'INF- $\gamma$  par les cellules Th1 (Tanaka, 1993). Elle apparaît donc comme étant un facteur essentiel de la régulation de la réponse immune.

Au niveau de l'orientation de la réponse immunitaire, l'effet le plus marquant de l'INF $\gamma$  est l'inhibition de la prolifération des cellules Th2. Cette inhibition semble être partielle et dose-dépendante (pour revue voir (Mossman, 1989), (Seder, 1994), (Fitch, 1993), (Belardelli, 1995)). Il est important de remarquer que bien que la prolifération des cellules Th2 soit partiellement inhibée, l'INF- $\gamma$  n'affecte pas la capacité de ces clones de sécréter un taux normal de cytokines. Les cellules Th1 sont dépourvues de la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'INF- $\gamma$  et sont donc insensibles à son action sur la prolifération (Pernis, 1995).

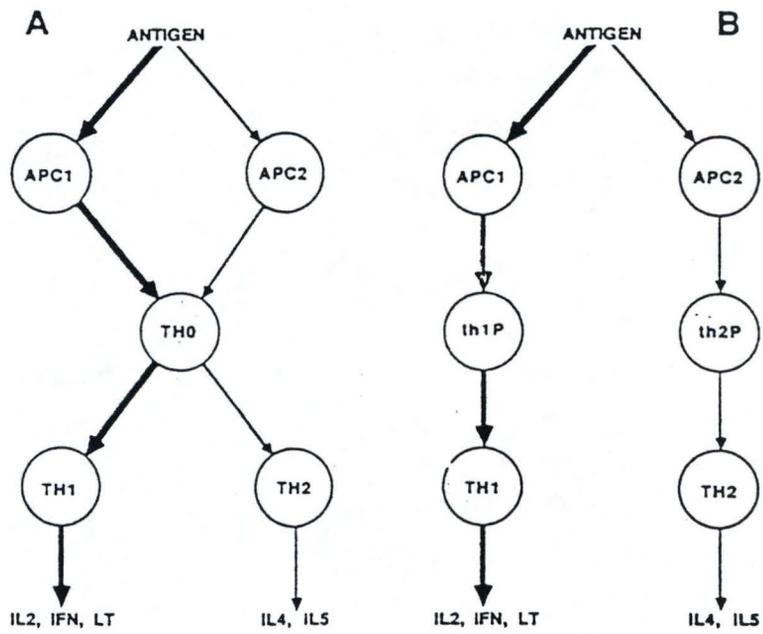


Figure I.4: Modes de différenciation possibles des cellules T auxiliaires (d'après Mosmann et Coffman, 1989)

L'IL-10 par sa capacité d'inhiber la sécrétion d'INF- $\gamma$  et parfois d'IL-2, de TNF $\beta$ , d'IL-3 et de GM-CSF, est un des antagonistes majeurs de la réponse à médiation cellulaire. De plus, il a été montré *in vivo* que l'IL-10 et l'IL-4 agissaient en synergie pour inhiber la réponse cellulaire (Powrie, 1993a). Cependant l'effet inhibiteur de l'IL-10 ne semble pas résulter d'un effet direct sur les cellules Th1 mais paraît provenir du fait que l'IL-10 réprime l'expression des molécules membranaires de co-stimulation B7-1 et B7-2 chez certaines APC (Nickoloff, 1994) (voir plus loin).

On voit donc que les cytokines de type Th1 ou Th2 ont des effets antagonistes ce qui permet une régulation négative entre les deux populations.

### **2.3 L'orientation de la réponse Th1/Th2**

L'orientation de la réponse immunitaire est sensible à de nombreux facteurs: nature et dose de l'antigène, état de santé de l'hôte, bagage génétique de l'hôte, ...(O'Garra, 1994) Nous verrons cependant que, en fin de compte, la plupart de ces facteurs influencent l'orientation de la réponse via l'environnement cytokinique initial qu'ils induisent. En effet cet environnement cytokinique est un déterminant majeur lors de la différenciation des précurseurs des cellules Th.

#### **2.3.1 La différenciation des T auxiliaires: des précurseurs aux cellules mémoires**

La question de l'origine des cellules auxiliaires de type 1 ou de type 2 laissait deux choix aux immunologistes. Soit chaque type de Th avait son propre précurseur, soit ils partageaient un précurseur commun (fig.I.4)((Mossman, 1989), (Mosmann, 1996)). En fin de compte, il s'est avéré que les cellules Th dérivait d'un précurseur commun capable de synthétiser de l'IL-2 (Bendelac, 1995). Les mécanismes conduisant à un type de Th plutôt qu'à un autre sont exposés dans les paragraphes suivants.

#### **2.3.2 Influence de l'environnement cytokinique sur la différenciation**

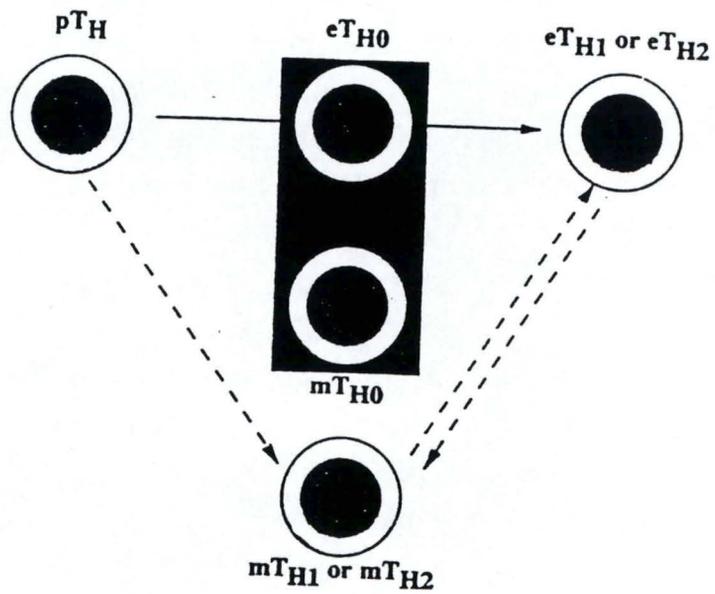


Figure I.5: Devenir des pTh après stimulation par un antigène (d'après Seder et Paul, 1994)

Nous reprendrons la nomenclature utilisée dans la revue de Seder et Paul (1994). Les cellules CD4<sup>+</sup> naïves, qui sont les précurseurs des cellules Th, seront dénommées les pTh. Ces cellules produisent essentiellement de l'IL-2; on n'a pas pu à ce jour mettre en évidence une production d'IL-4 ou d'INF- $\gamma$  dans ces cellules.

Le devenir de ces pTh, une fois qu'elles sont stimulées, est multiple (fig. I.5). Soit elles se différencient en cellules capables de synthétiser de l'IL-4 et de l'INF- $\gamma$ : nous appellerons ces cellules les Th0. Soit elles se différencient en cellules effectrices de type eTh1 ou eTh2 ou encore en cellules mémoires que nous nommerons les mTh1 ou mTh2 selon leur profil de sécrétion.

Dans des études menées *in vitro*, on n'a pas pu montrer clairement que l'INF- $\gamma$  était responsable de la différenciation des pTh en Th1. Par contre, on a mis en évidence qu'un des facteurs déterminants permettant cette différenciation était l'absence d'IL-4.

Différentes études ont assigné le rôle de différenciation des pTh en Th1 à l'interleukine 12 (IL-12) (pour une revue voir (Trinchieri, 1995)). L'IL-12 est une protéine hétérodimérique produite par les phagocytes lorsque ceux-ci sont activés par des bactéries, par des virus (Coutelier, 1995) ou par des parasites intracellulaires. Lorsqu'une cellule pTh est activée en présence d'IL-12 et d'INF- $\gamma$ , elle se différencie alors en Th1. L'IL-12 est aussi responsable de l'activation des NK et de la production d'INF- $\gamma$  par ceux-ci (Garside, 1995). On peut noter que l'augmentation de la concentration en INF- $\gamma$  aura un effet inhibiteur sur les cellules de type Th2. On voit donc que l'apparition d'une réponse de type Th1 est tributaire des premiers moments de l'infection et que, en quelque sorte, l'IL-12 fait le lien entre l'immunité naturelle et l'immunité adaptative.

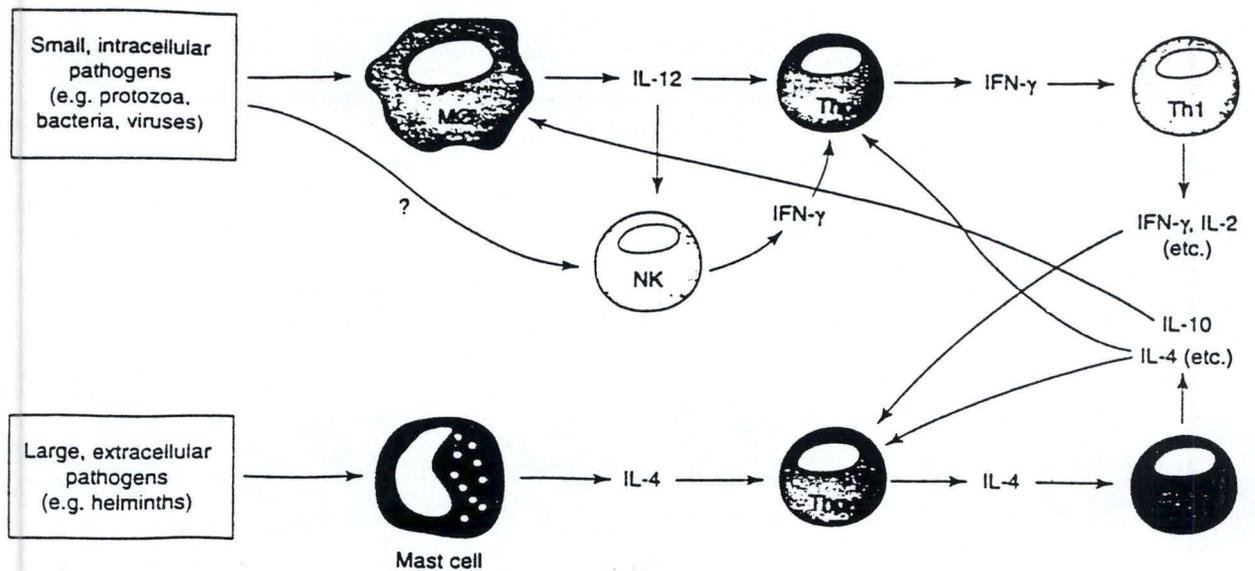


Figure I.6: La polarisation de la réponse serait une conséquence phylogénétique de la réponse non spécifique (d'après Garside et Mowat, 1995)

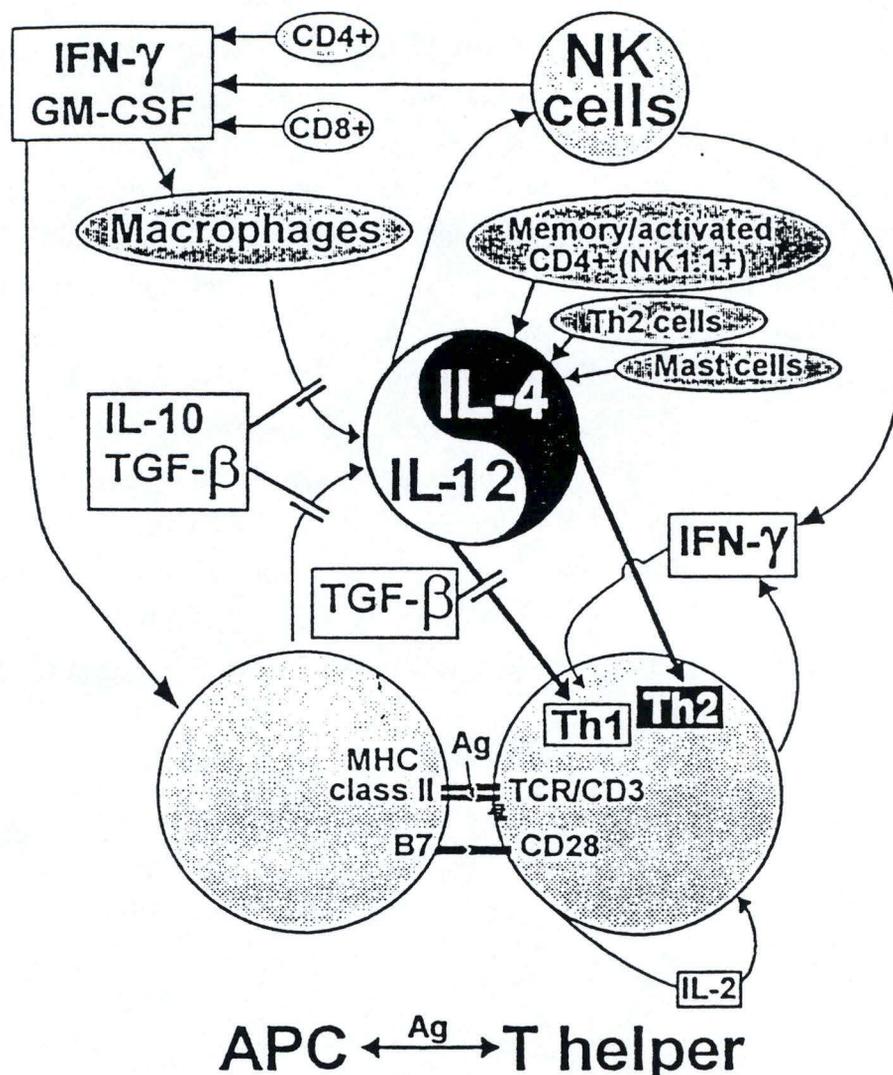


Figure I.7: Les effets antagonistes de l'IL-4 et de l'IL-12 dans l'orientation de la réponse (d'après Trinchieri, 1995)

L'émergence de clones de type Th2 est étroitement liée à la présence d'IL-4 dans le milieu. Cela a été montré tant *in vitro* qu'*in vivo*. On a, en effet, montré que l'administration d'anticorps anti-IL-4, lors d'une réponse immune, conduisait irrévocablement à l'apparition de clone de type Th1 (Garside, 1995). Il est maintenant clair qu'une sécrétion initiale d'IL-4 amène une polarisation de la réponse vers le type Th2 via une production autocrine d'IL-4 par les clones Th2 et par la sécrétion d'IL-10 qui supprime la production d'IL-12 par les macrophages, ce qui réduit donc le taux d'INF- $\gamma$ .

Les premiers producteurs d'IL-4 lors de l'invasion de l'organisme seraient les mastocytes; on a en effet pu mettre en évidence que 90% des cellules sécrétant de l'IL-4, dans des poumons d'humains normaux ou atopiques, étaient des mastocytes (Garside, 1995). On peut donc penser que les mastocytes joueraient pour l'orientation Th2 le même rôle que les macrophages dans l'initiation et la polarisation de la réponse immune de type 1 (fig. I.6). Cependant des cellules T exprimant des marqueurs membranaires de type NK et sécrétant de l'IL-4 après stimulation ont été isolées, il y a peu. Ces cellules baptisées cellules T NK<sup>1.1+</sup> pourraient jouer un rôle important dans la différenciation des pTh en eTh2 (Mosmann, 1996).

On est donc en droit de penser que l'orientation de la réponse est déterminée par les premiers contacts entre le pathogène et les composantes du système non spécifique dans le cas de souris naïves et que les deux principaux antagonistes de la réponse sont l'IL-4 et l'IL-12 (fig. I.7).

### 2.3.3 Importance des cellules présentatrices de l'antigène (APC)

Mis à part le rôle majeur tenu par l'IL-4 et l'IL-12 dans le développement des cellules Th, les APC jouent aussi un rôle primordial dans l'activation des Th (Reiner, 1995). En effet, l'activation d'une cellule T requiert au moins deux signaux. Le premier est fourni par la liaison du TCR d'une cellule T avec un peptide antigénique présenté par le CMH d'une APC.

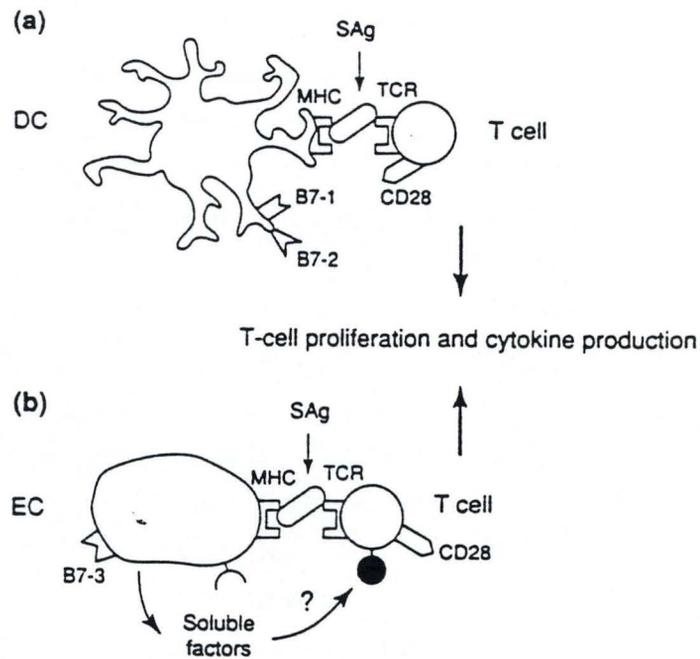


Figure I.8: Molécules membranaires de co-signal chez les cellules dendritiques (a) et chez les cellules épithéliales (b) (d'après Nickoloff et Turka, 1994).

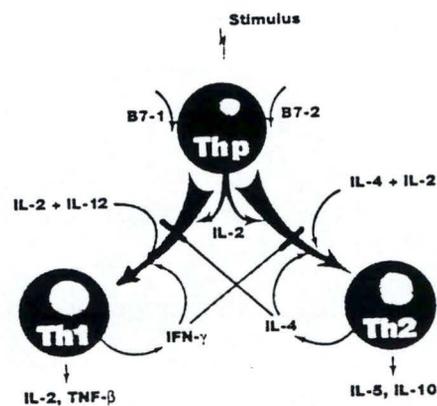


Figure I.9: Influence des molécules B7-1 et B7-2 sur l'orientation de la réponse (Cytokine bulletin, R&D systems, 1995)

Le deuxième signal aussi appelé "co-signal", n'est pas antigéno-spécifique mais résulte de l'interaction d'une protéine membranaire des cellules T, la protéine CD28, avec la molécule B7-1/B7-2 portée par l'APC (voir fig. 8 a). L'absence de co-signal entraîne l'anergie des cellules T (Nickoloff, 1994). L'expression des molécules B7-1 et B7-2 peut être induite chez certaines APC telles que les LB et les monocytes et est constitutive chez les cellules dendritiques.

On a pu mettre en évidence que la co-stimulation via le CD28 induisait la production d'IL-2 et qu'il était nécessaire pour l'activation tant des Th1 que des Th2 (Kuiper, 1994). Un des effets du co-signal en synergie avec l'IL-2 serait la stabilisation du mRNA des cytokines de type Th1 et Th2 (Kuiper, 1994).

Les immunologistes se sont longtemps posé la question de savoir si les APC, via le co-signal qu'elles fournissent, pouvaient orienter la réponse immune. Les molécules de type B7-2 semblent induire la production d'IL-4 ce qui conduit les pTh à se différencier en eTh2 tandis que les molécules B7-1 ne conduisent pas à la production d'IL-4 ce qui laisse les précurseurs activés sensibles à la présence d'autres cytokines dans le milieu (fig. I.9). Cependant la découverte de cellules non APC et exprimant tout de même un CMH de classe II a montré l'existence d'autres molécules de type B7 (Nickoloff, 1994).

En effet, ces APC "non-professionnelles"(ici des kératinocytes) étaient capables d'activer des pTh mais ces cellules T se différenciaient invariablement en cellules Th2, ces cellules exprimaient en membrane un nouveau type de molécule, la molécule B7-3 (fig. I.8 b). De plus il s'est avéré par la suite que ces kératinocytes produisaient de l'IL-10 ! On comprend donc l'apparition de clones de type 2. On sait de plus que des APC telles que les macrophages sont capables de synthétiser de l'IL-12 et ainsi d'activer les pTh en Th1. On voit donc que même si le co-signal joue un rôle primordial au niveau de l'activation des pTh, au niveau de leur différenciation, il a un rôle plus permissif que directif. Néanmoins, la découverte de nouveaux types de co-signaux, comme par exemple la liaison CD28-CTLA-4 pourrait amener à la constatation qu'il existe un co-signal particulier pour chaque type d'activation(Nickoloff, 1994).

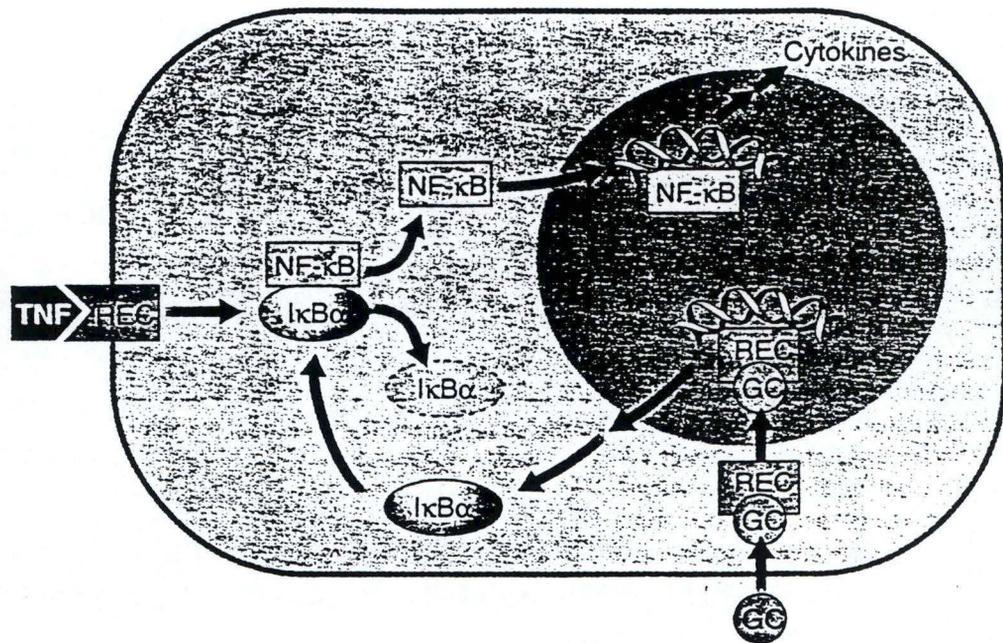


Figure I.10: Mécanisme moléculaire de l'immunorégulation induite par les glucocorticoïdes. (d'après Marx, 1995)

### 2.3.4 Influence de l'environnement sur l'orientation de la réponse

Il est évident que l'environnement immédiat des cellules Th peut grandement influencer leur différenciation. Un exemple intéressant de cette influence nous est fourni par certaines sécrétions endocrines. Depuis longtemps, on connaît l'effet immunomodulateur de stéroïdes. Les glucocorticoïdes (GC) sont des agents anti-inflammatoires qui suppriment la production d'INF- $\gamma$  et IL-2 tout en exacerbant la production d'IL-4 (Chappelli, 1994).

Le mécanisme moléculaire par lequel les GC bloquent la synthèse d'INF- $\gamma$  a été découvert il y a peu (Marx, 1995).

Les récepteurs de GC sont libres dans le cytoplasme de la cellule; lorsque le GC pénètre dans la cellule, il se fixe à son récepteur et forme le complexe GC-REC. Le récepteur des GC contient un domaine de liaison à l'ADN (Chappelli, 1994) qui reconnaît spécifiquement le promoteur du gène  $I\kappa B\alpha$ . Le produit de ce gène est un inhibiteur du facteur de transcription NF- $\kappa B$ , connu comme étant un activateur de la transcription de l'INF- $\gamma$  (fig. I.10).

Un autre stéroïde connu pour réguler la réponse immune est la déhydroépiandrostérone (DHEA). En effet, on a remarqué que des splénocytes en culture traités avec de la DHEA produisaient de façon préférentielle de l'IL-2 et de l'INF- $\gamma$ . Il est intéressant de remarquer que le DHEA sulfaté (DHEAs), un précurseur de la DHEA, ne possède pas cette capacité mais que les macrophages présentent une activité DHEAs sulphotase (Stam, 1993) et qu'ils peuvent donc via la métabolisation de la DHEAs en DHEA renforcer l'orientation Th1 de la réponse. On voit donc que le ratio entre les GC et la DHEA peut jouer un rôle important dans l'orientation de la réponse.

### 2.3.5 Les CD8<sup>+</sup> Th2 like

Nous savons que les CD8<sup>+</sup> sont les éléments majeurs de la défense contre les virus et les parasites intracellulaires. Ils sont connus comme étant activés par les Th1 et comme étant producteur d'INF $\gamma$  et de TNF- $\beta$ .

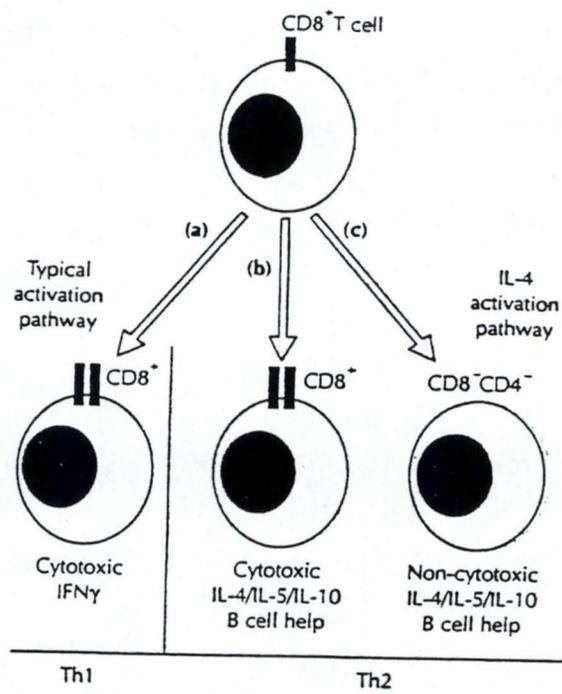


Figure I.11: Différenciation des cellules CD8<sup>+</sup> (d'après Le Gros et Erard, 1994)

Cependant, il y a peu, Erard et al. (1993) ont montré que des CD8<sup>+</sup> activés en présence d'IL-4 se transformaient en CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> qui ne présentaient plus aucune activité cytotoxique, qui ne sécrétaient plus d'INF $\gamma$  mais qui sécrétaient des cytokines de type Th2 à savoir: l'IL-4, l'IL-5, et l'IL-10. La perte de la cytotoxicité est due à une inhibition de la transcription du gène de la perforine (Erard, 1993). Les CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> étant toujours activés par des cellules infectées, ils peuvent dès lors initier une réponse de type Th2 alors que le pathogène est intracellulaire. Des CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et produisant des cytokines de type Th2 ont aussi été répertoriés (Le Gros, 1994), ces cellules sont parfois appelées cellules T suppressives et sont différenciables des CD8<sup>+</sup> normaux par des isoformes du CD45 (Inoue, 1993).

On voit donc que tout comme les CD4<sup>+</sup>, les CD8<sup>+</sup> peuvent être différenciés d'après leur profil de sécrétion (fig. I.11). Ces CD8<sup>+</sup> de type 2, semblent avoir une grande importance dans la régulation de la réponse immune puisqu'il semble qu'ils soient capables de favoriser la production d'IgE et de venir en aide aux LB (Kemeny, 1994).

On comprend évidemment que de telles cellules puissent avoir des effets désastreux lors de certaines pathologies telles que le SIDA. La découverte de ces cellules nous amène dès lors à parler de réponse immune de type 1 et de type 2 puisque l'orientation de celle-ci n'est pas due à la différenciation des seuls Th.

### 2.3.6 L'orientation de la réponse, le modèle intégré

Lorsqu'un pathogène envahit l'organisme, il pourra sur son parcours rencontrer différents types cellulaires. S'il est capturé par une APC produisant de l'IL-12, il y a de forte chance pour que la réponse qui s'ensuive soit de type 1. De même, si sur le lieu de l'activation il existe une concentration d'INF- $\gamma$ , de TNF, d'IL-12 ou de DHEA, la réaction sera vraisemblablement de type 1.

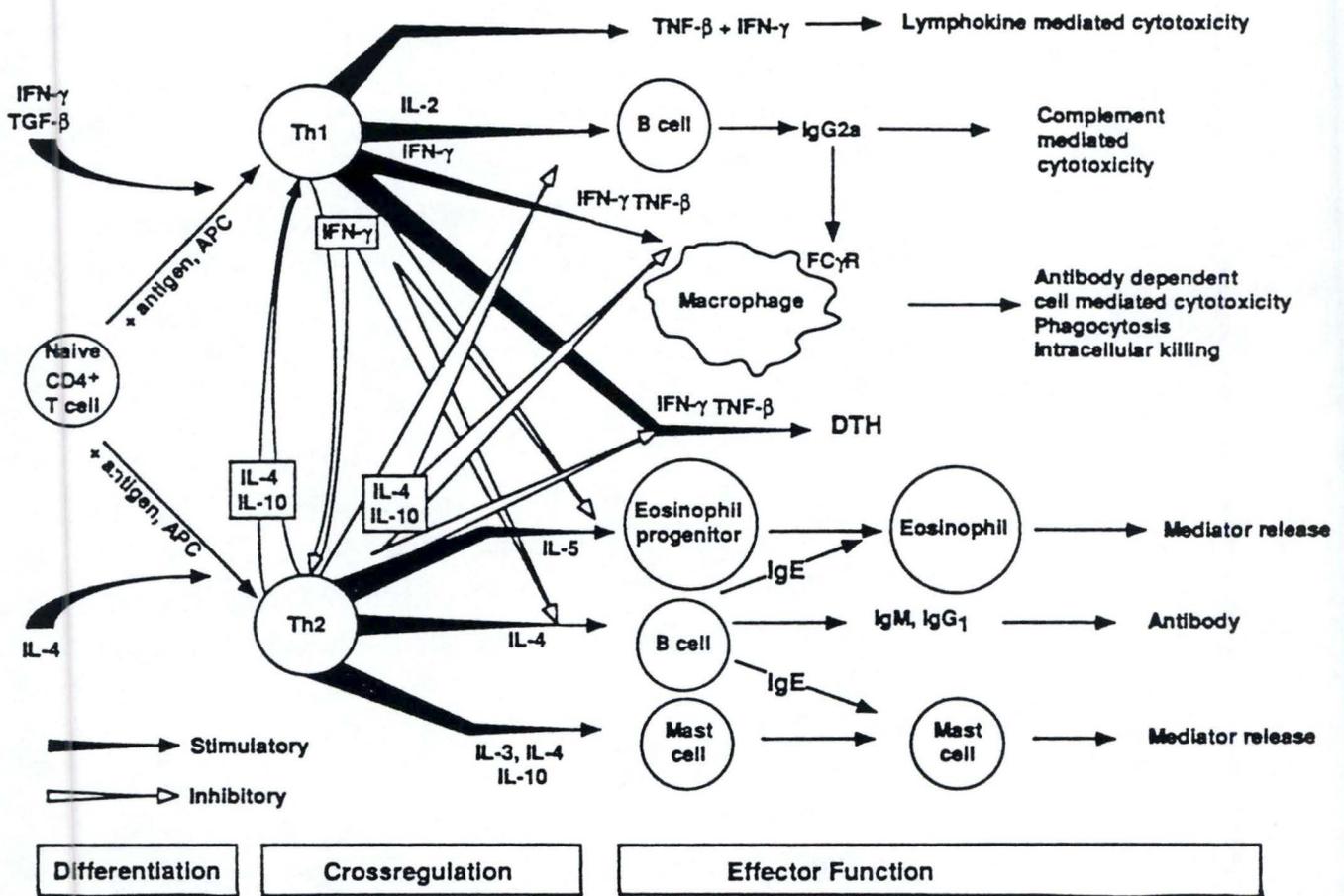


Figure I.12: Un modèle global de l'orientation de la réponse immunitaire (d'après Powrie et Coffman, 1993)

Par contre, s'il se trouve dans une APC non-professionnelle sécrétant de l'IL-10, ou qu'il est capturé par un mastocyte, la réponse sera de type 2. Ici aussi, s'il y a de l'IL-4 ou des GC sur le lieu de l'activation, la réponse sera de type 2. Cependant, il n'existe aucune certitude quant à l'influence du co-signal sur l'orientation de la réponse.

Si la réponse est de type 1, l'INF- $\gamma$  sécrété par les Th1 va induire l'activation des macrophages et des CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ainsi qu'un changement isotypique au niveau des anticorps qui seront essentiellement de type IgG2a. Les IgG2a sont "spécialisées" dans l'activation du complément; l'INF- $\gamma$  induisant l'expression chez les macrophages de récepteurs Fc spécifiques des IgG2a, on assiste à la mise en place d'un rétrocontrôle positif qui contribue à l'exacerbation de la réponse grâce à l'opsonisation et à la phagocytose des antigènes, ce qui active les macrophages qui sécrètent dès lors de l'IL-12 et de l'INF- $\gamma$  (fig. I.12).

Si la réponse est de type 2, l'IL-4 va induire une prolifération de LB et un changement d'isotype en faveur des IgE et des IgG1, l'IL-5 va activer les éosinophiles, l'IL-10 et l'IL-3 vont activer les mastocytes et on aura donc une réaction de type allergique.

Il faut cependant être conscient que dans le cas de réponse immune normale, on n'a jamais une réponse qui n'est que de type 1 ou de type 2, la réponse immune est en équilibre entre deux extrêmes et ce, afin de se débarrasser du pathogène le plus efficacement possible. D'ailleurs nous détaillerons plus loin que des réactions immunes complètement polarisées donnent souvent lieu à des phénomènes pathologiques.

## **2.4 Pathologies et thérapies associées au modèle Th1/Th2**

On imagine bien qu'en cas d'infection par un pathogène intracellulaire, la réponse adéquate est de type 1, tandis qu'en cas d'invasion par un parasite extracellulaire, une réponse de type 2 sera mieux à même de venir à bout du parasite. Quelques cas classiques illustrent bien l'importance de cette dichotomie immunitaire.

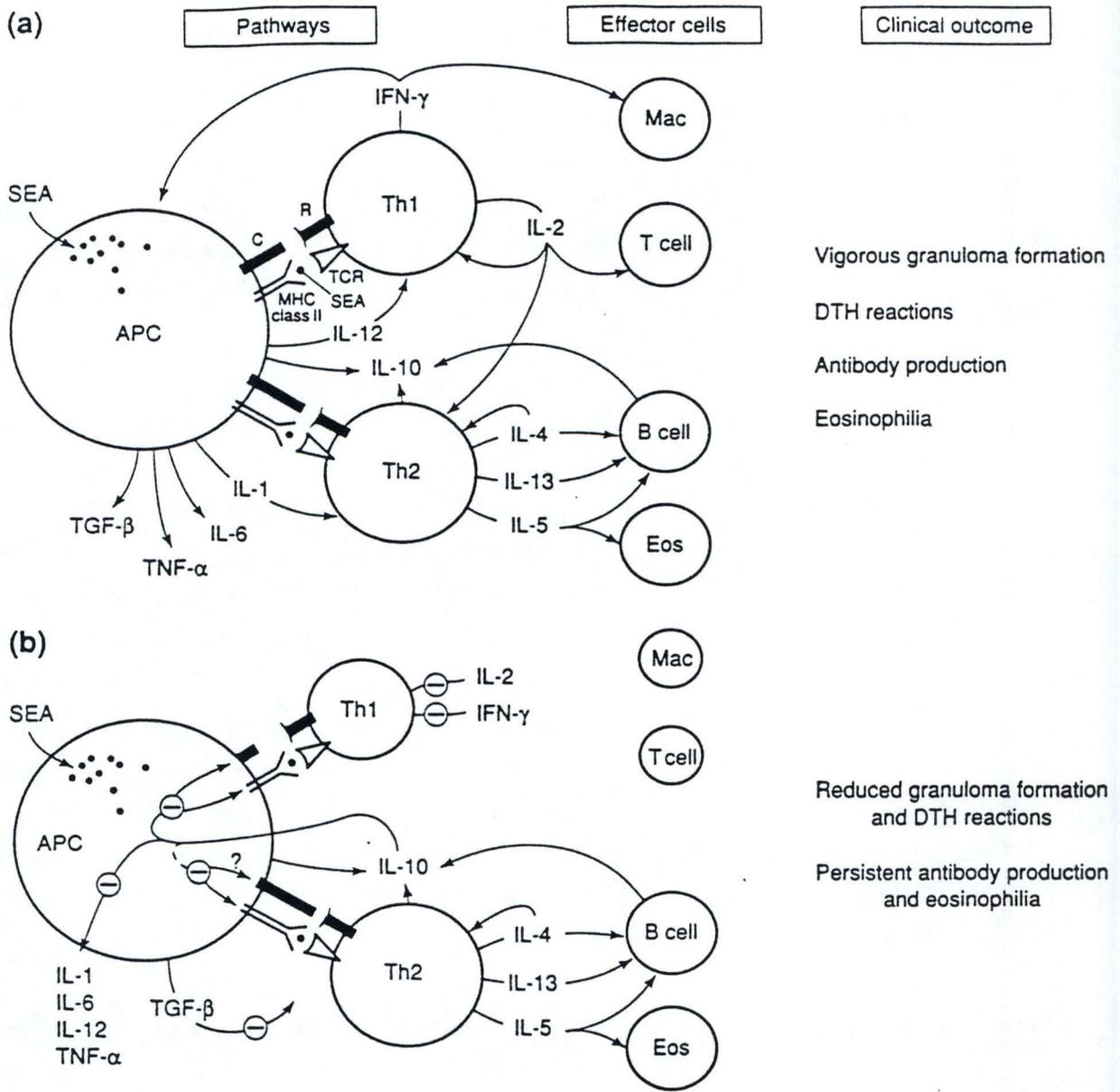


Figure I.13: Phénomène d'immunorégulation lors d'infection par *S. mansoni*, en a) phase aiguë, en b) phase de réduction du granulome (d'après Stadecker et Flores Villanueva, 1994). SEA: Antigènes des oeufs de *S. mansoni*.

Un exemple classique de pathologies associées à la réponse Th1/Th2, est celui de *Leishmania major*. On connaît en effet une souche de souris (C3H) résistante à ce parasite intracellulaire; par contre, les souris BALB/c succombent à une infection par *L. major*. En effet, la souche C3H développe une réponse de type Th1 tandis que les souris de type BALB/c développent une réponse de type Th2. Le bagage génétique influence donc l'orientation de la réponse immune. Si l'on injecte des anticorps anti-IL-4 aux souris BALB/C infectées par *L. major*, ces souris développent une réponse de type Th1 et résistent à l'infection. De même, l'injection d'IL-12 à ces souris, leur permet de résister à l'infection (Trinchieri, 1994). Inversement, des anticorps anti-INF- $\gamma$  injectés à des souris C3H infectées induisent une réponse de type Th2 et par conséquent la mort de la souris (Powrie, 1993b).

Un autre modèle largement étudié est celui de l'infection par *Schistosoma mansoni*. Le Schistosome est un helminthe qui inflige de sérieuses lésions et induit des granulomes autour des oeufs de celui-ci. Une des particularités de l'immunobiologie du schistosome, est que l'on peut assister à une réduction graduelle et spontanée du granulome; ce phénomène est connu sous le nom d'immunorégulation. Stadecker et Flores Villanueva (1994) proposent un modèle pour expliquer cette immunorégulation (fig. I.13). La phase aiguë, lorsque le granulome est le plus grand, est apparemment le fait des cellules Th1. En effet, les cellules continuellement stimulées par l'antigène synthétisent sans cesse de l'INF- $\gamma$  et de l'IL-2, ce qui exacerbe les phénomènes inflammatoires. Dans le même temps, les Th2 sont également stimulés par l'antigène et par l'IL-2 sécrétée par les Th1. Ces Th2 activés synthétisent de l'IL-10 qui a pour effet d'inhiber l'expression des molécules B7 par les macrophages. Les Th1, ne recevant plus de co-signal, rentrent alors en anergie et on assiste à une réduction du granulome.

Le cas du SIDA est aussi intéressant à considérer à travers le modèle Th1/Th2. Durant la phase subclinique de la maladie, les patients infectés par HIV possèdent beaucoup de LT CD8+ spécifiques de HIV-1. Chez les personnes où l'infection s'est transformée en SIDA, on note une nette réduction des CD8+ HIV-1 spécifique. Par contre, chez ces patients, le taux de CD8+ spécifiques du virus de Epstein-Barr (EBV) n'a pas diminué. Cette diminution du taux de CD8+ HIV-1 spécifiques correspond à une augmentation de l'activité des Th2 caractérisée par une augmentation du taux d'anticorps circulants. Le modèle, proposé par les auteurs (Le Gros, 1994) suggère que le HIV-1 induirait une conversion des CD8+ en CD8-CD4- "Th2-like". On a de fait pu observer chez des patients malades du SIDA un taux anormalement élevé de CD8-CD4-. L'effet immunorégulateur de l'IL-4 a été démontré chez la souris; en effet, des souris délétées pour le gène de l'IL-4 ne sont pas malades du SIDA bien qu'elles soient infectées.

### **3 Le virus respiratoire syncytial (RSV)**

De par leurs similarités tant antigéniques que symptomatiques et compte tenu que ces virus font partie de la même famille et du même genre, il est impossible d'aborder les problèmes suscités par le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) sans se référer au virus syncytial humain (HRSV).

#### **3.1 Généralités**

Le RSV appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, genre *pneumovirus*, c'est un virus enveloppé à ARN négatif et à nucléocapside de symétrie hélicoïdale. Ce virus est le principal agent responsable des infections des voies respiratoires inférieures chez les enfants en bas âge (HRSV) et chez les veaux (BRSV).

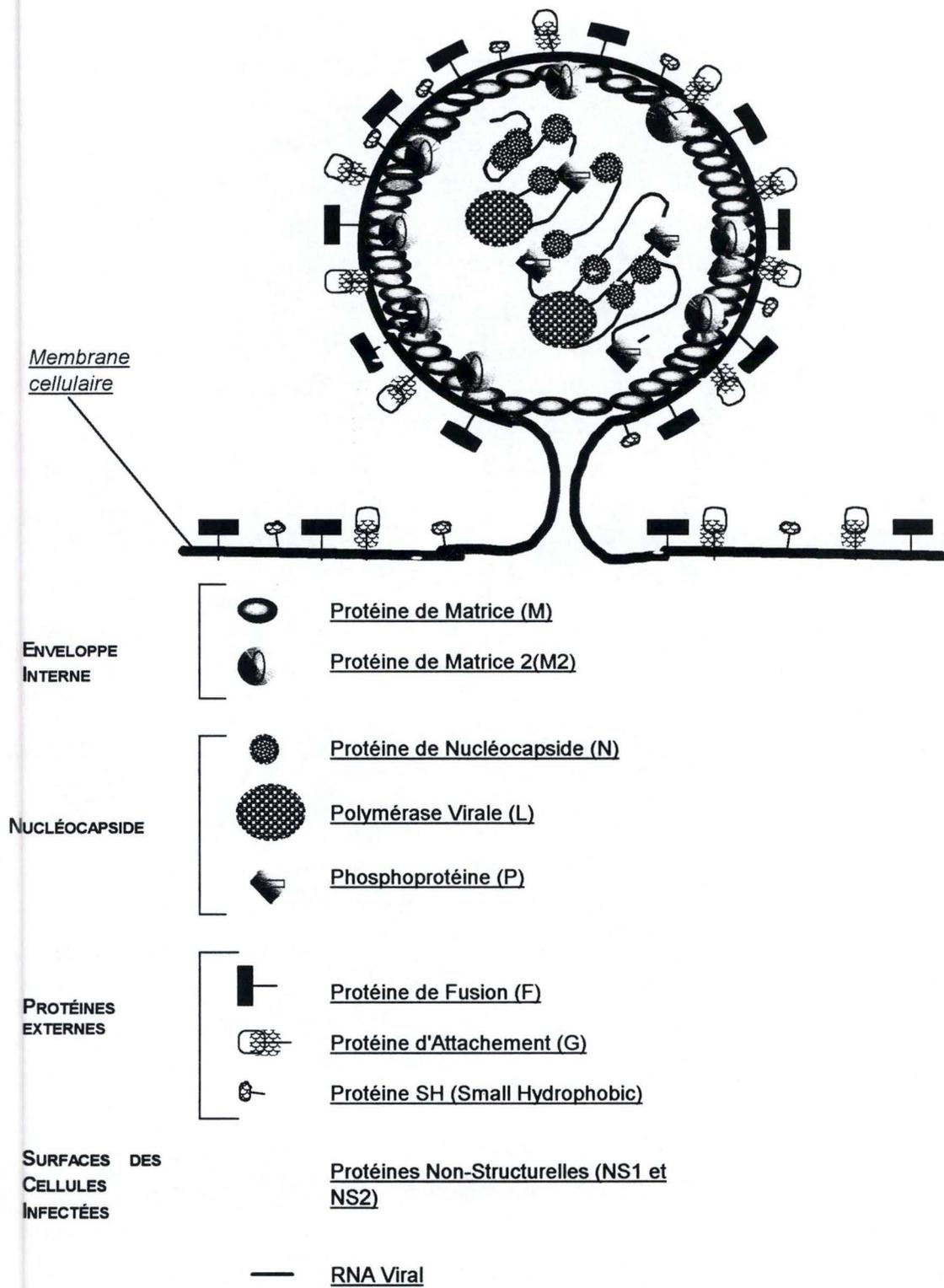


Figure I.14: Représentation schématique d'un bourgeonnement d'une particule de RSV.

La localisation des différentes protéines induites au cours d'un cycle infectieux est indiquée.

Le RSV est répandu dans le monde entier, et a un impact économique non négligeable. En effet on estime qu'aux USA, plus de 91000 enfants présentant des infections des voies respiratoires inférieures dues aux RSV sont hospitalisés chaque année, et que 4500 d'entre eux en meurent. Le coût annuel moyen des hospitalisations dues au RSV est de 300 millions de Dollars rien que pour les États-Unis (Meissner, 1994). En matière de BRSV, une étude européenne a montré que le coût imputable à une épidémie de BRSV était de 25 ECUS par tête de bétail, on estime qu'en cas d'épidémie de BRSV, la mortalité est de 1 à 20% . Néanmoins, l'essentiel du manque à gagner résulte des séquelles de l'infection (perte pondérale, diminution de la production laitière) (Wellemans, 1990)

Tant au niveau du HRSV que du BRSV, il existe des différences antigéniques et géniques au niveau de la protéine G, ce qui permet de classer les souches dans des groupes différents. Le HRSV compte les groupes A et B. En ce qui concerne le BRSV, (Furze J.; Wertz, 1994) et (Prozzi, 1996) (sous presse) proposent de classer les souches de BRSV en trois groupes: A, B et A/B (groupe intermédiaire).

### 3.1.1 Structure du virion

Le virus RSV est un virus à ARN négatif monocaténaire et est enveloppé. Son génome code pour 10 protéines . (fig. I.14).

La glycoprotéine F(pour fusion), formée de deux polypeptides F1 et F2; elle est ancrée dans l'enveloppe du virus et est responsable de la fusion de cette enveloppe avec la membrane plasmique des cellules-cibles, elle est en outre responsable de la fusion des membranes plasmiques ce qui provoque l'apparition de syncytia au sein du tissu infecté. D'autres protéines telles que les protéines SH(small hydrophobic aussi appelée protéine 1A) et M2 (M pour matrice) sont sans doute impliquées dans le processus de fusion (Heminway, 1994). F est un des déterminants antigéniques majeurs du RSV.

La glycoprotéine G est également présente sur l'enveloppe virale et est responsable de l'attachement du virus sur les récepteurs des cellules cibles, ces récepteurs ne sont pas encore identifiés. C'est un déterminant antigénique majeur. Il est à noter que cette protéine peut se trouver sous forme libre selon le mode d'initiation de sa traduction (Roberts, 1994).

Les protéines M et M2 (ou protéine 22K) sont accolées à la face interne de l'enveloppe virale.

La protéine N est la protéine de nucléocapside, support principal de l'ARN génomique.

Les protéines L et P sont impliquées dans la transcription de l'ARN génomique (Pour revue voir: (McIntosh, 1990), (Wellemans, 1990)).

Enfin deux protéines non structurales existent: NS1 (1B) et NS2 (1C) présentes uniquement dans les cellules infectées et non dans le virion.

### 3.1.2 Réplication et transcription

La réplication et la transcription de l'ARN négatif débute du côté 3', les protéines L, N et P sont les protéines minimales nécessaires à la réplication de l'ARN viral (Yu, 1995).

La protéine M2 semble jouer un rôle dans le contrôle de l'initiation de la réplication (Heminway, 1994). Des éléments cellulaires tels que l'actine semblent nécessaire à la réplication virale (Huang, 1993). Lors de la transcription, la polymérase est stoppée par les éléments cis ("gene end"), tandis qu'en phase de réplication, elle passe en mode "antiterminaison". L'ARN positif qui résulte de cette réplication (l'antigénome) est ensuite transcrit en ARN négatif et encapsidé (Samal, 1996).

### 3.1.3 Signes cliniques et pathologies

Les signes cliniques sont biphasiques, on note tout d'abord une tendance à l'anorexie, de l'hyperthermie, du jetage nasal, de la toux et une détresse respiratoire. L'emphysème respiratoire est audible à l'auscultation. Après 2 à 3 jours, on assiste à un retour à la normale. Ensuite la seconde phase apparaît: la fréquence respiratoire s'accélère, la température est normale, la toux est présente. Dans le cas du BRSV, les animaux restent couchés. A ce stade, la mortalité est très élevée. Certains animaux meurent brutalement en quelques heures. Le taux de mortalité globale lors d'une épidémie de RSV peut atteindre 20% (Wellemans, 1990).

Tant le HRSV que le BRSV induisent au niveau du tissu pulmonaire, la nécrose de l'épithélium bronchique, l'occlusion des bronchioles, l'inflammation du parenchyme et de l'exsudation alvéolaire; ces différentes manifestations sont généralement désignées par le nom de bronchiolite. On observe aussi des lésions pulmonaires dans des zones non infectées du tissu. Ces lésions seraient liées à la réponse de l'hôte.

## **3.2 Le RSV, un casse tête immunitaire**

Comme nous l'avons dit plus haut, la réponse immunitaire développée à l'encontre du RSV peut conduire à des phénomènes immunopathologiques dans le poumon. C'est en 1969, que l'on s'aperçut que l'immunité spécifique anti-RSV pouvait être dommageable.

En effet, des enfants vaccinés avec du virus inactivé à la formaline et présentant une forte séroconversion n'étaient cependant pas protégés du RSV. En effet, ils développèrent, lors d'une infection naturelle par le HRSV, une maladie sévère des voies respiratoires inférieures qui aboutit à la mort de plusieurs d'entre-eux. Le groupe contrôle n'ayant pas reçu de vaccin formolé, ne présenta pas de mortalité. Des phénomènes d'immunopathologies sont également observés chez des bovins immunisés avec un vaccin à base de BRSV formolé (Gerswin, 1996).

On également observé, qu'une infection naturelle ne protégeait pas systématiquement puisque des réinfections sont possible tant chez l'adulte que chez l'enfant (Baker, 1991). De même, les anticorps maternels présents chez les nourrissons semblent incapables d'offrir une protection à l'encontre du HRSV (McIntosh, 1990). Une connaissance détaillée des interactions du virus avec le système immunitaire de l'hôte est donc nécessaire pour la mise au point d'un vaccin qui soit à la fois sûr et efficace. Dans ce cadre, la mise au point de vaccin se heurte au choix d'un modèle expérimental.

Pour le HRSV, de nombreux animaux ont été pris comme modèle (singes cèbus, chimpanzés, furets, rats coton,...et la souris). La souris et le rat coton sont en général les modèles de référence. Dans le cadre de l'étude du BRSV des infections expérimentales ont été réalisées sur des bovins mais les signes cliniques sont généralement faibles ou inexistant, peu de lésions sont observées. On voit donc que les infections expérimentales ne reproduisent pas la pathologie observée lors d'infection naturelle (Belknap, 1995). Néanmoins, le grand avantage de l'étude du BRSV sur un modèle bovin réside dans le fait que le pathogène est étudié sur sa cible naturelle. Il a également été montré que la souris pouvait également servir de modèle pour le BRSV (Walravens, 1996). Les données concernant le modèle souris sont cependant bien plus complètes pour le HRSV.

### 3.2.1 Réponse immune anti-RSV

Diverses réponses humorales et cellulaires ont été observées chez des enfants infectés par le HRSV, chez des bovins infectés naturellement ou expérimentalement ainsi que dans divers modèles expérimentaux.

En ce qui concerne la réponse humorale, F, N et G sont les principales cibles de la réponse anticorps (Ward, 1983; Westenbrink, 1989). Seules les protéines F et G sont capables d'induire la synthèse d'Ac neutralisants (Anderson, 1991b; Matheise, 1995). Seuls des anticorps inhibiteurs de fusion sont observés à l'encontre de la protéine F (Beeler J.A. and Vanwyke Coelingh K., 1989).

En ce qui concerne la réponse cellulaire, une activité CTL a l'encontre des protéines N, M, SH, F, M2 et 1B a été observée chez l'homme (Pemberton, 1987). Chez la souris, M2, F et N sont les cibles majeures de la réponse cytotoxique (Cannon, 1989; Nicholas, 1990).

La réponse immune de type "T helper" a pour cible privilégiée la protéine F. Cependant des études menées chez l'homme et chez la souris ont montré qu'une réponse T helper était également observée entre les protéines N, P, M2, SH et G (Pemberton, 1987; Anderson, 1991a).

Bien qu'une réponse immune se développe après infection par le RSV, celle-ci ne s'avère pas nécessairement protectrice. Nous présenterons ici quelques facteurs importants dans la mise en place d'une protection efficace.

Les anticorps peuvent jouer un rôle protecteur comme le montrent des expériences de transferts passifs d'Ac monoclonaux ou sériques chez la souris, le rat cotton ou les enfants (Taylor, 1984).

La réponse T cytotoxique joue un rôle déterminant dans l'élimination du virus. En effet, la déplétion en T CD8<sup>+</sup> prolonge la durée de la réplication virale suite à une infection expérimentale chez le bovin (Taylor, 1995). Des résultats semblables ont été observés chez la souris. Un transfert passif de clones T CD8<sup>+</sup> anti-RSV conduit à l'élimination du virus mais induit également une augmentation de la pathologie pulmonaire (Cannon, 1988).

La réponse T helper jouerait un rôle dans la protection. Chez la souris, la déplétion en CD4+ augmente la réplication du HRSV (Graham, 1991). Chez des enfants infectés plusieurs fois, la réponse lymphoproliférative augmente et ceux-ci sont finalement protégés (Fernald, 1983). La déplétion en CD4+ ne retarde pas sensiblement l'élimination du BRSV (Taylor, 1995).

En résumé on peut conclure que le RSV possède des épitopes B et T capables d'initier une réponse protectrice. Mais ceci ne permet pas encore de comprendre l'exacerbation de la pathologie lors d'infection naturelle ou de vaccinations diverses.

### 3.2.2 La réponse Th1/ Th2

Bien que hautement instructives quant au pouvoir immunogène et protecteur de certains épitopes, les études décrites ci-avant ne nous renseignent guère sur l'orientation de la réponse. La plupart des études portant sur l'orientation de la réponse ont été menées sur des souris infectées par le HRSV, rien n'a encore été fait sur le BRSV.

Les techniques d'analyse de l'ARN messager des cellules eucaryotes ont permis d'avoir un accès direct au profil d'expression cytokinique des cellules immunitaires. Cela a permis une meilleure compréhension de la pathologie liée au HRSV.

On a ainsi pu mettre en évidence que la formule et la voie d'entrée d'un vaccin anti-HRSV pouvait jouer un rôle prépondérant dans l'orientation de la réponse. En effet, on a remarqué, chez la souris, que le vaccin inactivé à la formaline et injecté par voie intramusculaire induisait une réponse de type Th2, caractérisée par une augmentation de l'expression des messagers de l'IL-4, lors d'une infection d'épreuve avec du HRSV par voie intranasale (Waris, 1996). A contrario, des souris immunisées à l'aide de HRSV vivant par voie intranasale ou parentérale montraient une réponse de type Th1 (INF- $\gamma$ ) lors d'un challenge par du HRSV vivant par voie intranasale (Graham, 1993; Bright, 1995). Des traitements à base d'anticorps anti-IL-4 et d'IL-12 recombinante ont permis d'induire une réponse de type Th1 chez des souris immunisées avec du HRSV inactivé à la formaline (Graham, 1996).

(Connors, 1994) ont également pu montrer que la déplétion de l'IL-4 et de l'IL-10 chez des souris permettait d'abroger complètement les phénomènes histopathologiques liés au vaccin inactivé. La déplétion étant effectuée juste avant le challenge. Il est intéressant de noter que la déplétion de l'INF- $\gamma$  et de l'IL-2 n'a aucun effet sur les manifestations histopathologiques. On a observé le même type de réponse sur des cellules mononuclées sanguines humaines, ces études ont été menées sur des cellules mémoires provenant de jeunes enfants ayant été infectés une ou plusieurs fois par le RSV, ainsi que sur des adultes (Anderson, 1994).

En ce qui concerne l'orientation de la réponse vis à vis des différentes protéines du RSV, (Becker, 1991) et (Alwan, 1994) ont montré que la protéine F induit une réponse de type Th1 caractérisée par des hémorragies pulmonaires et un taux élevé de neutrophiles pulmonaires et une activation des CTL tandis que la glycoprotéine G induit une réponse de type Th2 et une éosinophilie pulmonaire élevée. Les protéines P et N induisent une réponse de type Th2, mais celle-ci semble assez faible. La protéine M2, n'induit que la synthèse d'IL-3 par les CD4<sup>+</sup>. L'injection conjointe de clones spécifiques des protéines G, F ou 22K a montré que la co-injection de cellules spécifiques des protéines G et 22K provoquait une aggravation de la maladie tandis que les cellules spécifiques de la protéine F pouvaient parfois induire une diminution de l'inflammation (Alwan, 1994).

On pourrait conclure de ces expériences que la réponse Th1 est moins préjudiciable que la réponse Th2. (Hussel, 1996) ont montré que la vaccination de souris avec de la protéine G accompagnée par l'injection d'IL-12 favorisait l'émergence d'une réponse de type Th1 liée à l'activation de CD4<sup>+</sup>. Néanmoins, la maladie n'est pas éliminée ou est, au contraire, augmentée et ce bien qu'il y ait une diminution de l'éosinophilie pulmonaire.

Paradoxalement, la réponse Th1 déclenchée chez les souris traitées avec des anticorps anti-IL-4 est liée à l'activation de cellules CD8<sup>+</sup>.

Ceci montre qu'un simple changement du profil cytokinique ou que la domination d'un type de cellules Th ne sont pas suffisants pour affecter les manifestations pathologiques induites par le RSV.

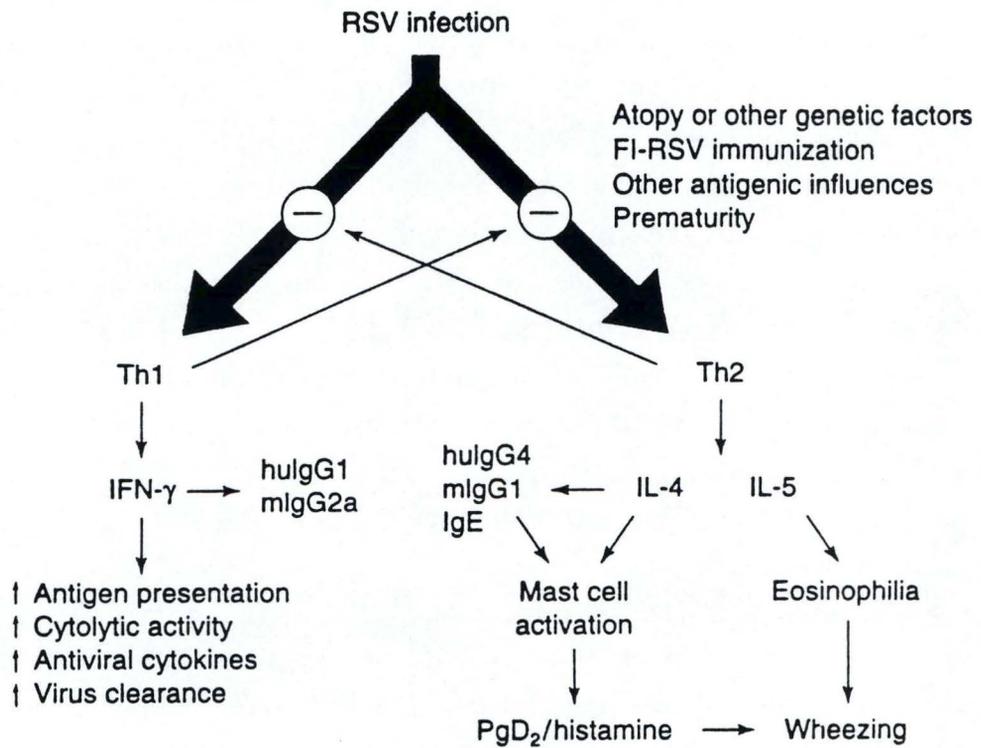


Figure I.15: Facteurs pouvant influencer l'orientation de la réponse lors d'une infection par le RSV. Abréviations: FI-RSV, RSV inactivé à la formaline; mIgG, immunoglobulines G de souris; huIgG, immunoglobulines G humaines, IFN- $\gamma$ , interféron- $\gamma$ ; PgD<sub>2</sub>, prostaglandine D<sub>2</sub> (d'après Graham, 1996)

Dès lors, si la réponse Th2 peut être "mauvaise", la réponse Th1 n'est pas nécessairement bonne ((Hussell, 1996),(Graham, 1996)). La figure I.15 montre les facteurs pouvant influencer l'équilibre Th1/Th2 lors d'une infection par le RSV.

La plupart de ces études ont été réalisées suite à une immunisation et ne permettent pas de préjuger de ce qui se passe lors d'une primo-infection. Une étude menée sur des souris a montré, lors d'une primo-infection, une production d'INF $\gamma$  principalement par les CD8+, des CD4+ sécrétant de l'INF $\gamma$  ont également été mis en évidence, cependant il s'est avéré que ces cellules produisaient également de l'IL-10 (Hussell, 1996). L'IL-10 pourrait avoir comme effet d'inhiber la présentation de l'antigène par les macrophages et ainsi de réduire l'inflammation, il a aussi été montré que les macrophages alvéolaires exprimaient peu ou pas les molécules B-7 qui sont nécessaires à l'activation des cellules T, ces mécanismes pourraient être à la base d'une immunorégulation du poumon (Chelen, 1995).

On peut faire remarquer que d'autres composants que ceux du système immunitaire sont impliqués dans la réponse anti-RSV. En effet, l'épithélium pulmonaire réagit aux infections par le BRSV. Il a été montré que les cellules épithéliales pouvaient synthétiser des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8, du GM-CSF ainsi que des récepteurs au TNF lors d'une infection par le RSV (Becker, 1991; Noah, 1993; Arnold, 1994).

#### **4 But du travail**

L'hypothèse généralement admise est que la réponse adéquate est de type Th1 et que la mise au point de vaccin induisant une réponse de type Th1 réduit les risques de maladie après challenge ou lors d'infections naturelles.

Une réponse de type Th2 semble être impliquée dans les complications post-vaccinales dues au RSV. Ces études ont été réalisées chez le HRSV.

En ce qui concerne le BRSV, aucune donnée n'est disponible sur l'orientation de la réponse, que ce soit chez le bovin ou chez la souris.

De plus la mise en évidence du profil Th1/Th2 chez le bovin est assez récente (Brown, 1993). Et les outils pour l'étude de ces cytokines sont peu développés (un seul kit ELISA commercial pour l'INF- $\gamma$ , pas de kit ELISA pour les autres cytokines). La RT-PCR de cytokines bovine a été décrite en 1995 (Covert, 1995). Nous avons donc privilégié l'étude du BRSV sur le modèle souris. Le but de ce travail est donc de caractériser l'orientation Th1/Th2 au niveau systémique lors d'une réponse anti-BRSV dans un modèle murin après plusieurs immunisations. Cet objectif nécessite la mise au point de techniques d'identification et de quantification des ARNm de cytokines. Une connaissance détaillée de la réponse dans le modèle murin pourra nous amener ensuite à étudier la réponse induite lors de primo-infection chez la souris. De plus l'étude de la réponse induite chez la souris devrait nous fournir des éléments utiles pour la compréhension des problèmes immunopathologiques chez le bovin ou à tout le moins, des hypothèses à tester dans le modèle bovin.

**MATERIEL ET  
METHODES**

## A Techniques de biologie moléculaire.

### 1 Extraction d'ARN

#### 1.1 Conditions RF

Toutes les manipulations d'ARN doivent se faire en absence des ribonucléases, on parle de conditions Rnase Free (RF). Pour cela, toute la verrerie est passée au four pasteur et ce durant 3 heures à 180°C. Les micropipettes et portoirs sont lavés au dodécyl sulfate de sodium (SDS, Sigma, USA) 2%. Les tips utilisés sont neufs et certifiés RF. Toutes les solutions se font à partir de solutés et de solvants certifiés RF, l'eau utilisée est traitée par 0,1% de diéthyl pyrocarbonate (DEPC), (Sigma, USA) pendant une demi-heure à température ambiante (RT) puis autoclavée.

#### 1.2 Extraction d'ARN messenger (ARNm)

Pour isoler l'ARNm, un kit d'extraction a été utilisé (Micro-Fast Track Kit (Invitrogen, Pays-Bas)). La méthode repose sur la présence de séquences PolyA sur l'ARNm. Les tissus ou les cellules sont lysées, et de l'Oligo(dT) cellulose est ajouté au lysat. La précipitation de l'Oligo(dT) cellulose sépare les ARNm des autres composants cellulaires.

##### 1.2.1 Préparation des cellules

Les cellules de rate sont préalablement lavées en PBS 1x (PBS 10x:;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11,49g, NaCl 80g, KCl 2g, porter à 1l avec de l'eau distillée), aliquotées par 10 millions de cellules et conservées à - 70°C en culot sec.

- Resuspendre les cellules dans 1 ml de tampon de lyse (Invitrogen, Pays-Bas).
- Homogénéiser la suspension en la passant trois fois au travers d'une seringue munie d'une aiguille 18-21 RF(Terumo, Belgique).

- Transférer le lysat dans un eppendorf de 1,5 ml RF

### 1.2.2 Isolement de l'ARNm

- Incuber la suspension pendant 15 minutes à 45°C.
- Ajouter 63 µl de NaCl 5 M RF et mélanger vigoureusement.
- Passer 3 fois au travers d'une aiguille 18-21 RF.
- Ajouter une tablette d'Oligo(dT)-cellulose (Invitrogen, Pays-Bas) au lysat et laisser gonfler durant 2 minutes.
- Mélanger doucement durant 20 minutes.
- Précipiter l'Oligo(dT)-cellulose par centrifugation à 4000 g durant 8 minutes.
- Prélever le surnageant et resuspendre le culot dans 1,3 ml de Binding Buffer (Invitrogen, Pays-Bas).
- Précipiter par centrifugation et laver trois fois le culot avec du Binding Buffer.
- Resuspendre le culot dans 0,3 ml de Binding Buffer.
- Prélever la solution et la mettre dans une colonne (Invitrogen, Pays-Bas). Placer la colonne dans un eppendorf.
- Centrifuger la colonne 10 secondes à 5000 g. Recommencer cette opération jusqu'à ce que tout l'Oligo(dT) cellulose se trouve dans la colonne.
- Changer d'eppendorf et laver au moins trois fois avec du Binding Buffer (Invitrogen, Pays-Bas)(centrifuger 10 secondes à 4000 g). La densité optique de l'éluat à 260 nm doit être inférieure à 0,05.
- Laver l'ARN non messager à l'aide de 200 µl de Low Salt Wash Buffer (Invitrogen, Pays-bas). Mélanger doucement à l'aide d'une pointe RF.
- Centrifuger 10 secondes à 4000 g. Laver une deuxième fois.
- Changer d'eppendorf et déposer sur la colonne 100 µl d'Elution Buffer (Invitrogen, Pays-Bas).
- Centrifuger 10 secondes à 4000 g et déposer de nouveau 100 µl d'Elution Buffer (Invitrogen, Pays-Bas).
- Centrifuger jusqu'à récupération complète des 200 µl déposés.

- Précipiter l'ARNm en ajoutant 10  $\mu$ l de glycogène (2 mg/ml), 30  $\mu$ l d'acétate de sodium 2M (Invitrogen, Pays-Bas), 600  $\mu$ l d'éthanol 100%, RF (UCB, Belgique).
- Centrifuger 15 minutes à 16000 g à 4°C.
- Retirer le surnageant et sécher sous vide.
- Resuspendre l'ARNm dans 50  $\mu$ l d'eau DEPC et quantifier.
- Conserver à -20°C.

### 1.3 Isolement d'ARN total (ARN)

L'extraction de l'ARN repose sur la propriété qu'a celui-ci de rester soluble dans une solution à pH 4 hautement concentrée en sels de guanidine en présence d'une phase organique de phénol/chloroforme. Les lipides membranaires ainsi que les protéines hydrophobes se retrouvent dans la phase organique, tandis que les protéines hydrophiles de haut poids moléculaire (PM) ainsi que l'ADN génomique sont précipités à l'interface par la force centrifuge. Seuls les ARN et les protéines de bas PM restent dans la phase aqueuse. La solution Ultraspec (Biotecx, USA) a été employée pour isoler l'ARN à partir de cellules spléniques purifiées et conservées à -70°C en culot sec ou directement à partir d'échantillons de tissus frais (rate et poumons) prélevés sur des souris.

#### 1.3.1 Préparation des cellules

- Resuspendre les culots cellulaires dans l'Ultraspec (1 ml pour 10 millions de cellules).
- Homogénéiser en passant plusieurs fois la suspension au travers d'une pointe de 1 ml RF et laisser 5 minutes sur glace.

#### 1.3.2 Préparation des tissus

- Déposer 100 mg de tissus frais dans 1 ml d'Ultraspec et déposer sur glace.
- Homogénéiser le tissu en passant au potter (Vel, Belgique).

- Transférer le lysat dans un eppendorf RF et laisser 5 minutes sur glace.

### 1.3.3 Isolement de l'ARN

- Ajouter 200 µl de chloroforme RF (UCB, Belgique).
- Mélanger vigoureusement et laisser 5 minutes sur glace.
- Centrifuger 20 minutes à 13000 tours par minute (rpm) à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter 1 volume d'isopropanol 100% RF (Sigma, USA) et mélanger jusqu'à homogénéisation.
- Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C.
- Retirer le surnageant.
- Laver trois fois avec 1 ml d'éthanol 70% RF (UCB, Belgique).
- Sécher le culot sous vide et resuspendre dans 50 µl d'eau DEPC.
- Quantifier et conserver à -20°C.

### 1.4 Quantification de l'ARN

La mesure de la densité optique (DO) à 260 nm permet de calculer la concentration en acide nucléiques d'une solution. Une DO de 1 correspond à une concentration de 40 µg d'ARN par ml. Afin de vérifier l'absence de protéines contaminantes, une DO à 280 nm est prise. Un rapport des DO (260/280) compris entre 1,8 et 2 atteste d'une bonne pureté de l'échantillon.

Le spectrophotomètre utilisé est l'Ultraspec II E de chez LKB (Suède).

## **2 Amplification et extraction de plasmides.**

### 2.1 Le plasmide pMus-3

Le plasmide pMus-3 que nous avons utilisé nous a été fourni par D. Shire (Sanofi Recherche, Labège, France). Il consiste en une construction permettant l'hybridation de différents primers spécifiques de certaines cytokines (voir RT-PCR quantitative).

La construction a été insérée dans un plasmide pTZ, entre un promoteur T7 et une séquence polyA. Le plasmide contient un site de restriction *EcoRI* unique. Ce plasmide contient également un marqueur de résistance à l'ampicilline (Amp). Les protocoles suivis sont basés sur ceux présentés par Legoux et al. (1992).

### 2.2 Amplification de pMus-3

Le plasmide pMus-3 a été introduit par choc thermique dans *Escherichia coli* XL-1 Blue. Les bactéries ayant intégré pMus-3 sont cultivées de la manière suivante:

- Prélever des bactéries à l'aide d'une anse de platine et ensemercer 10 ml de milieu LB liquide (4 g de Tryptone (Gibco, Belgique), 2 g de Yeast extract (Gibco, Belgique), 2 g de NaCl (Merck, Allemagne)) contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Boehringer, Allemagne).
- Incuber un jour à 37°C.
- Prélever 9 ml de la préculture et ensemercer 150 ml de LB/Amp.
- Cultiver une nuit à 37°C.

### 2.3 Extraction de pMus-3 par Midiprep

L'extraction du plasmide a été réalisée grâce au kit de purification Nucléobond AX (Marcherey-Nagel, Allemagne). Cette méthode permet la purification de plasmide grâce à un procédé de lyse alcaline couplé à une purification sur une colonne échangeuse d'anions.

- Récupérer la culture dans des tubes de centrifugation de 50 ml et centrifuger 15 minutes à 10000 rpm.
- Resuspendre les culots bactériens dans 12 ml de tampon S1(fourni dans le kit)
- Ajouter 12 ml de S2(fourni dans le kit) et mélanger doucement.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 12 ml de tampon S3(fourni dans le kit) et mélanger doucement.
- Incuber 5 minutes sur glace.

- Centrifuger pendant 15 minutes à 12000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant sans prendre d'ADN génomique.
- Équilibrer une colonne Nucleobond AX avec la solution N2(fourni dans le kit).
- Déposer le surnageant sur la colonne et laisser descendre par gravité.
- Laver la colonne deux fois avec la solution N3(fourni).
- Éluer le plasmide avec 6 ml de la solution N5(fourni). Ne pas récolter les premiers 1,5 ml qui constituent le volume mort.
- Partager l'éluat dans différents eppendorfs.
- Ajouter 0,7 volumes d'isopropanol (Sigma, USA) et centrifuger 20 minutes à 13000 rpm à 4°C.
- Laver trois fois avec 1 ml d'éthanol 70%.
- Sécher sous vide.
- Resuspendre dans 100 ul d'eau DEPC.
- L'estimation de la quantité d'ADN peut se faire par spectrophotométrie ou en déposant 1 ul de la solution dans 10 ul de tampon d'électrophorèse (Glycérol 5 ml, EDTA 1M 0,5 ml, bleu de bromophénol 25 mg, porter à 10 ml avec de l'eau) sur un gel d'agarose (voir gel ADN) en présence d'un marqueur de poids moléculaire.

### **3 Restriction**

L'enzyme que nous utiliserons est une endonucléase, l'enzyme *EcoRI*. Elle reconnaît la séquence palindromique -GAATTC- et clive l'ADN de manière à laisser des bouts protrudants. Nous avons utilisé celle-ci afin de linéariser le plasmide pMus-3.

- Dissoudre 4 µg de plasmide dans 30 µl de tampon *EcoRI* (Boehringer, Allemagne)
- Ajouter 2 µl d'*EcoRI* (10 unités/µl, Boehringer, Allemagne) et incubé 1 heure à 37°C.
- Ajouter 10 µl de tampon de restriction (Boehringer, Allemagne) et 2 µl d'*EcoRI* et incubé 1 heure à 37°C.
- Extraire avec 1 volume de phénol (Amresco, USA) saturé avec 10 mM Tris pH 8 et 1 mM EDTA. Puis avec 1 volume de chloroforme.

- Précipiter avec 2 volumes d'éthanol froid.
- Centrifuger 5 minutes à 13000 rpm.
- Retirer le surnageant et sécher le culot.
- Dissoudre dans 50  $\mu$ l d'eau DEPC et déposer 10  $\mu$ l sur gel d'agarose 1% pour vérifier la linéarisation (Voir gel ADN)

#### **4 Transcription et purification de pMus-3**

La transcription nécessite différents éléments: une ARN polymérase, de l'ADN sur lequel se trouve une séquence promotrice. Le plasmide pMus-3 contenant un promoteur T7, nous avons utilisé le kit Ampli Scribe T7 de l'Epicentre Technologies (TEBU, France).

##### 4.2 Transcription de pMus-3

- Prendre 1  $\mu$ g de pMus-3 et le placer dans un eppendorf RF
- Ajouter 25 mM d'ATP, CTP, GTP, UTP (6  $\mu$ l d'une mixture, 7,5 mM final) certifiés RF (Epicentre Technologies), 100 mM de dithiothreitol (DTT) (2  $\mu$ l, 10 mM final, Epicentre Technologies) et 2  $\mu$ l d'Ampli Scribe T7 RNA polymérase.
- Porter à 20  $\mu$ l avec de l'eau DEPC et incuber 2 heures à 37°C.
- Ajouter 1  $\mu$ l de DNase RF et incuber 15 minutes à 37°C.
- Mettre sur glace et extraire par phénol/chloroforme comme vu point 3.1.
- Dissoudre l'ARN dans 50  $\mu$ l d'eau DEPC et conserver à -20°C.

##### 4.2 Purification de l'ARN

La purification de pMus-3 est nécessaire pour éliminer les nucléotides non incorporés. En effet, la présence de ceux-ci pourrait interférer avec l'étape de RT-PCR quantitative (voir plus loin). La méthode utilisée suit les principes de la purification sur tamis moléculaire.

#### 4.3.1 Contrôle du pouvoir de résolution des colonnes

- Dissoudre 2 g de biogel P10 dans 100 ml de tampon Tris-EDTA (TE) RF (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).
- Laisser sédimenter et retirer le surnageant.
- Ajouter 100 ml de TE RF et stocker une suspension de 2/3 gel, 1/3 tampon dans des tubes de 50 ml à 4°C.
- Verser 1 ml de gel dans une colonne de chromatographie Poly-preb (Biorad, USA) RF.
- Centrifuger la colonne 5 minutes à 5000 rpm.
- Déposer 100 µl de tampon d'électrophorèse sur la colonne.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm. Le bleu doit être distribué de façon homogène dans le gel (en aucun cas, celui-ci ne peut sortir du gel, sinon recommencer les opérations ci-dessus).
- Déposer 100 µl d'eau sur la colonne et centrifuger 5 minutes à 5000 rpm. Le bleu doit être sorti du gel.

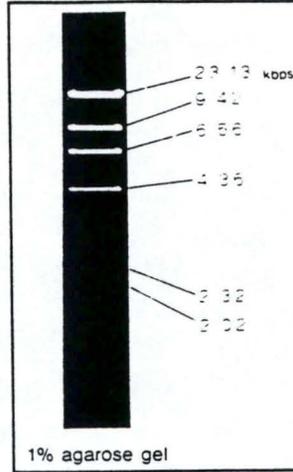
#### 4.3.2 Purification de pMus-3

- Prendre une nouvelle colonne RF et couler 1 ml de gel dedans.
- Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm.
- Déposer la solution d'ARN sur le gel.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes et récupérer l'éluat dans un eppendorf RF.
- Précipiter avec 1 volume d'acétate d'ammonium 3 M (UCB, Belgique) RF.
- Laisser 15 minutes à 4°C.
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C.
- Laver le culot à l'éthanol 70%.
- Sécher et resuspendre dans 100 µl d'eau DEPC.
- Quantifier au spectrophotomètre.
- Vérifier la qualité de l'ARN sur gel d'agarose 1,5 % (voir plus loin)

**FRAGMENT SIZE**  
 23.13 - 9.42 - 6.56 - 4.36 - 2.32, .02 Kb

**CONCENTRATION**  
 200-- 800 µg / ml

**STORAGE CONDITION**  
 10mM Tris-HCl (pH7.9), 1mM EDTA, 20mM NaCl, -20°C.



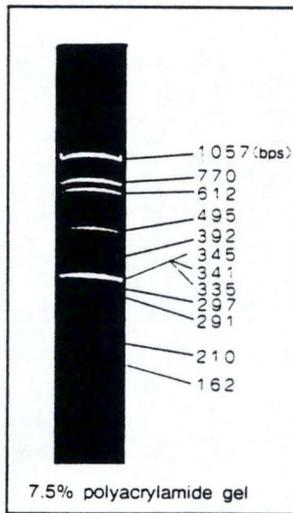
**MARKER I**  
 LAMBDA DNA /  
 HIND III DIGEST

120 µg  
 600 µg

**MW-0010-10**  
**MW-0010-50**

**MARKER 5**

ΦX174 DNA / HINC II DIGEST



**FRAGMENT SIZE**  
 1057 - 770 - 612 - 495 - 392 - 345 - 341 - 335 -  
 297 - 291 - 210 - 162 - 79 bps

**CONCENTRATION**  
 200-- 500 µg / ml

**STORAGE CONDITION**  
 10mM Tris-HCl (pH7.9), 1mM EDTA, 20mM NaCl, -20°C.

15 µg  
 75 µg

**MW-0050-10**  
**MW-0050-50**

Figure II.1: Marqueurs de poids moléculaire.

## 5 Gel d'agarose pour ADN OU ARN

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode largement répandue pour séparer, identifier et isoler des fragments d'ADN et d'ARN. Les brins d'ADN ou d'ARN sont soumis à un champ électrique continu se qui provoque leur migration vers l'anode. La vitesse de migration des brins est fonction de l'inverse du  $\log_{10}$  de leur taille en paires de bases, du taux d'agarose, de l'intensité du champ électrique, de la force ionique du tampon et de la forme de l'ADN.

La visualisation des fragments est rendue possible grâce au bromure d'éthidium. En effet, celui-ci a la propriété de se fixer entre les deux brins d'un fragment nucléotidique. Le bromure d'éthidium étant fluorescent à 365 nm, il est dès lors possible de voir les différents brins sur le gel. En fonction de la taille des fragments que l'on fait migrer, on utilisera un marqueur de poids moléculaire présentant un profil de migration adéquat. Les marqueurs que nous avons utilisés sont le Marker 3 et le Marker 5 (Eurogentec, Belgique) (fig. II.1).

### 5.1 Gel ADN.

#### 5.1.1 Préparation des échantillons.

- Resuspendre l'ADN dans de l'eau bidistillée.
- Ajouter du tampon d'électrophorèse (voir 2.3.2), concentré 1 fois en final.
- Déposer 10 à 50  $\mu$ l de ce mélange sur gel.

#### 5.1.2 Préparation du gel et électrophorèse.

- Dissoudre 2 g d'agarose (pour un gel 2%) dans 100 ml de TAE 1fois (la solution stock de TAE 50x est constituée de Tris 242 g, Acide acétique glacial 57,1 ml, porter à 100 ml avec EDTA 0,5M puis à 1 l avec de l'eau distillée) 1 fois.
- Chauffer avec agitation jusqu'à ébullition.
- Laisser refroidir jusqu'à 65°C.

- Déposer une goutte de bromure d'éthidium (Bromure d'éthidium (Sigma, USA) 2 g, TAE 1x 1 ml) dans un moule et couler le gel.
- Mélanger jusqu'à ce que le bromure d'éthidium soit distribué de manière homogène.
- Placer les peignes en évitant les bulles d'air
- Laisser solidifier 30 minutes.
- Enlever les peignes et placer le gel et son support dans une cuve d'électrophorèse remplie de TAE 1 fois.
- Charger le gel avec 10-50 µl des échantillons d'ADN.
- Appliquer un voltage de 70 volts et laisser migrer le front bleu jusqu'à 1 cm du bord du gel.
- Les gels sont photographiés à l'aide d'une caméra Vilber Lourmat, les images sont traitées à l'aide du logiciel Bio-profil 6.0 (New Brunswick, Pays-Bas)

## 5.2 Gel ARN

### 5.2.1 Préparation des échantillons.

- Resuspendre 1 à 10 µg d'ARN dans 5 volumes de tampon de chargement RF (Formamide 0,75 ml, MOPS 10x 0,15 ml, Formaldéhyde 0,24 ml, Glycérol 0,1 ml, Bleu de bromophénol à 10g/100 ml 0,08 ml, eau bidistillée RF 0,1 ml)
- Dénaturer 5 minutes à 65°C et refroidir rapidement sur glace.

### 5.2.2 Préparation du gel et électrophorèse

- Pour un gel 1%, dissoudre 1 g d'agarose RF dans 10 ml de MOPS 10 fois ( MOPS (Sigma, USA) 20,93 g, NaAc 2,05 g, EDTA 1,861 g, porter à 500 ml avec de l'eau bidistillée RF, pH 7) RF et ajouter 87 ml d'eau DEPC.
- Chauffer avec agitation jusqu'à l'obtention d'un liquide clair.
- Refroidir à 65°C.
- Ajouter 4 ml de formaldéhyde 37%.
- Déposer une goutte de bromure d'éthidium RF dans un moule RF et couler le gel.
- Placer des peignes RF et laisser refroidir.

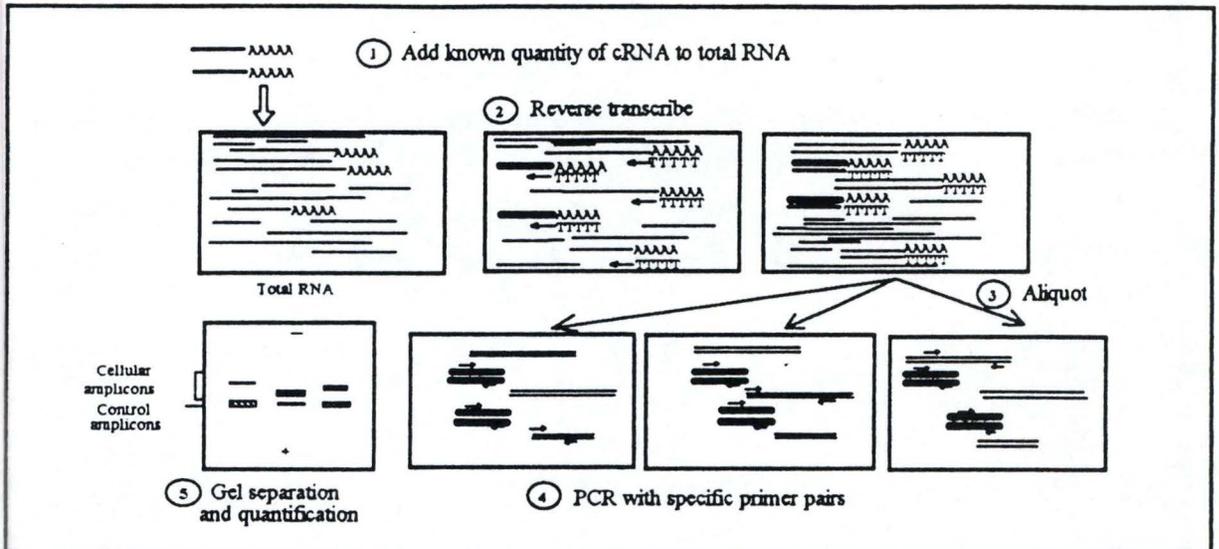


Figure II.2: Principe de la RT-PCR quantitative.

1) L'ARN cellulaire est mélangé à l'ARN du standard. 2) la réverse transcription se fait par l'élongation de l'extrémité 3'-OH d'une amorce poly(dT). 3-4) Les ADNc sont aliquotés et amplifiés par une réaction PCR avec des amorces spécifiques.) l'intensité du standard est comparée à celle de l'amplicon cellulaire. (d'après Shire, 1994)

- Mettre le gel et son moule dans une cuve RF remplie de MOPS.
- Appliquer un voltage de 50 volts et laisser migrer 30 minutes.

## **6 RT-PCR**

### **6.1 Généralités**

La RT-PCR permet l'amplification de très petites quantités d'un ARNm particulier. Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) au brin d'ARN d'intérêt. Cette étape est appelée la reverse transcription (RT). Ensuite, l'ADNc est amplifié au cours d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR, Polymerase Chain Reaction).

L'étape de RT se fait à l'aide d'une enzyme virale (Moloney Murine Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), Gibco, USA) qui synthétise un brin d'ADNc à partir d'un ARNm et d'une amorce Oligo(dT) (fig. II.2). La M-MLV RT allonge l'extrémité 3' de l'amorce par incorporation de nucléotides complémentaires. Tous les ARNm seront rétrotranscrits au cours de la réaction.

La réaction de PCR permettra l'amplification d'ADNc spécifiques. Cette technique repose sur l'action d'une ADN polymérase thermorésistante capable de copier une molécule d'ADN à haute température (72°C) (*Thermus Brokianus* ADN polymérase, Dynazyme™, Suède). Pour pouvoir démarrer la réaction, l'enzyme a besoin d'une amorce qui soit complémentaire à l'ADNc. C'est cette amorce qui permettra d'amplifier des messagers spécifiques. Elle va s'hybrider à son ADNc cible et sera allongée par son extrémité 3'-OH libre (fig. II.2). Afin d'amplifier des doubles brins d'ADN, deux amorces sont utilisées, une sur chaque brin de la séquence cible. Ces amorces ne peuvent être séparées par plus de 3000 nucléotides. La spécificité de l'amorce est assurée par des conditions stringentes. La réaction PCR amplifie l'ADN de façon exponentielle et ce jusqu'à atteindre un plateau dû à l'épuisement des réactifs. La séquence comprise entre les deux amorces d'une molécule d'ADNc peut-être amplifiée 4 millions de fois en 25 cycles (Lewin, 1994).

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

- Étape de dénaturation durant laquelle l'ADN est chauffé à 95°C.
- Étape d'hybridation où la température est diminuée afin de permettre l'hybridation des amorces avec l'ADN. La température dépend du T<sub>m</sub> (Température à laquelle 50% des brins d'une molécule d'ADN sont désappariés) des amorces.
- Étape de polymérisation qui avec la Dynazyme se passe à 72°C.

### 6.2 Étape de rétrotranscription

- Mélanger 1 µg d'ARN avec 100 ng de dT<sub>10</sub> (Boehringer, Allemagne) dans un volume total de 14 µl.
- Chauffer 15 minutes à 65°C.
- Refroidir rapidement sur glace.
- Ajouter 4 µl de tampon de RT (Gibco, Belgique)(Tris-HCl pH 8,3 250 mM, KCl 350 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 0,1 M DTT (2 µl, Gibco, USA), 20 mM finaux de dNTP (Boehringer, Allemagne), 2 µl de Rnase inhibitor (Solution de 10 unités/ µl, Gibco, USA), et 1 µl de M-MLV RT (Solution de 200 unités/µl, Gibco, USA).
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Stopper la réaction en chauffant 5 minutes à 95°C.
- Refroidir sur glace.

### 6.3 Amplification de l'ADNc

- Prendre 3 µl d'ADNc et les mettre dans un eppendorf de 500 µl.
- Ajouter 100 ng de chaque amorce, 5 µl de tampon PCR (Dynazyme™, Suède) (Tris-HCl pH 8,3 100 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, Gélatine 1 mg/ml), 10 mM finaux de dNTP (Boehringer, Allemagne), 1 µl de polymérase (solution de 2 unités/µl, Dynazyme™, Suède), porter à 50 µl avec de l'eau bidistillée.
- Couvrir la solution avec 40 µl d'huile minérale (Sigma)
- Chauffer 5 minutes à 94°C.
- Amplifier pendant 40 cycles définis comme suit:
  - 1 minute à 94°C
  - 1 minute à 55°C
  - 1 minute à 72°C

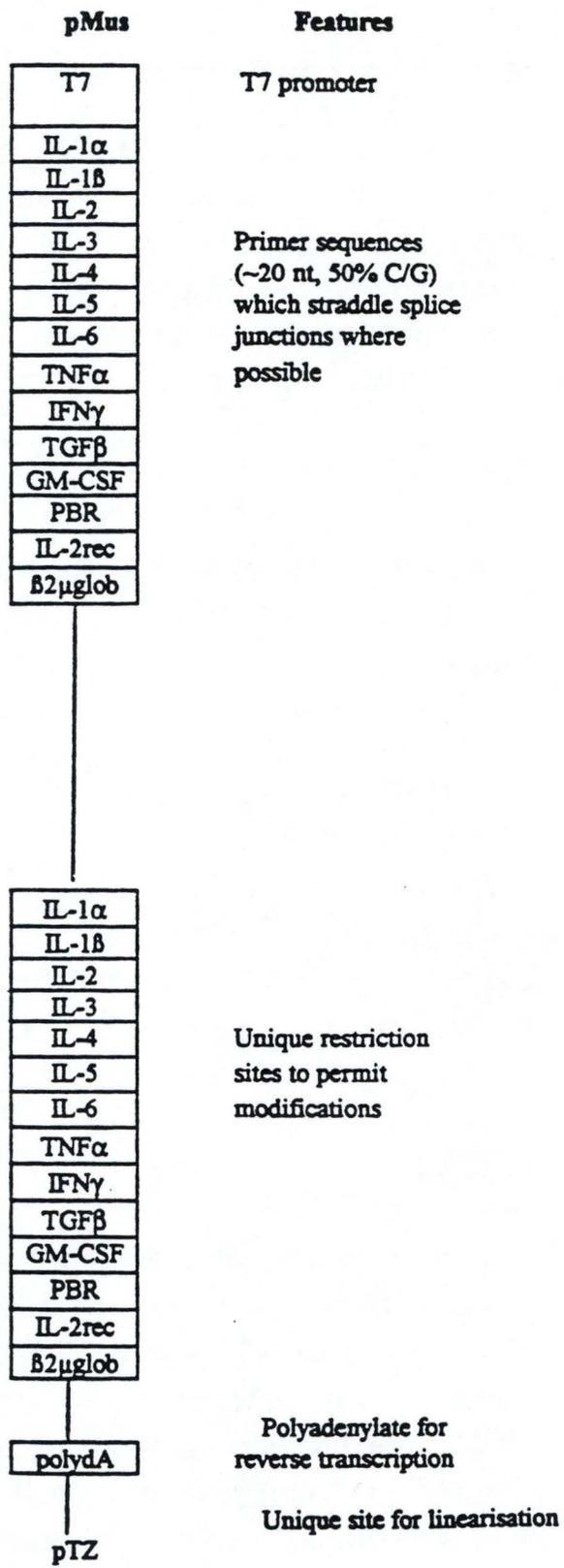


Figure II.3: Schéma du standard interne multi-spécifique, pMus. (d'après Shire, 1994)

L'appareil utilisé est le Thermal Cycler Gene E (Techne, New Brunswick Scientific, Pays-Bas)

- Congeler 5 minutes à  $-70^{\circ}\text{C}$ , et aspirer l'huile.
- Ajouter 5,5  $\mu\text{l}$  de tampon d'électrophorèse (voir 2.3.2).
- Déposer 50  $\mu\text{l}$  de la solution sur un gel d'agarose 2%.
- Faire migrer à 70 volts et inspecter à 365 nm.

## 7 Quantification d'ARNm par RT-PCR en présence d'un standard interne multispécifique (pMus-3)

### 7.1 Généralités

La technique utilisée pour la quantification des ARNm de cytokines est basée sur les réactions consécutives de transcription inverse et de PCR en présence d'un ARN standard multispécifique. Ainsi, après l'étape de la PCR on obtient pour chaque cytokine deux produits de taille différente qui, de ce fait, peuvent être séparés sur gel et quantifiés l'un par rapport à l'autre (fig II.2)( Pour une revue voir (Zimmermann, 1996), (Souazé, 1996)). La technique ainsi que le standard interne nous ont été fournis par David Shire (Sanofi Recherche, Labège, France). La méthode est une extension des méthodes originales présentées par Wang et al.(1992).

Le standard que nous avons utilisé est le plasmide pMus-3 (fig.II.3, voir (Shire, 1993) ). Les différentes boîtes représentent les sites d'amorçage pour les différentes amorces utilisées, les boîtes de chaque paire d'amorce sont séparées par le même nombre de paire de bases (370 pb). Les boîtes supérieures sont spécifiques des amorces sens tandis que les boîtes inférieures sont spécifiques des amorces antisens. Toutes les amorces utilisées font 20 nucléotides de long, et ont un rapport dC/dG de 50% et ont donc le même  $T_m$ . Les amorces recouvrent les sites d'épissage des séquences cibles. Au niveau des cibles cellulaires, chaque paire de sites d'amorçage est séparée par le même nombre de bases (227 pb à 5 bases près (fig. II.4)). La construction est insérée dans un plasmide pTZ entre un promoteur T7 et une queue polydA et contient un seul site de restriction *EcoRI*; la séquence de la construction est visible figure 6.

pMus-3 (mouse)

mRNA	Sense primer		Antisense primer		Amplicon length bp	Factor F
	5'	3'	5'	3'		
IL-1 $\alpha$	CAGTTCTGCCATTGACCATC		TCTCACTGAAACTCAGCCGT		218	1.08
IL-1 $\beta$	TTGACGGACCCCAAAGATG		AGAAGGTGCTCATGTCCTCA		204	0.96
IL-2	GACACTTGTGCTCCTTGCA		TCAATTCTGTGGCCTGCTTG		227	0.93 $\downarrow$
IL-3	GACCTCTCTGAGGAATAAG		CTCCAGATCGTTAAGGTGGA		232	1.06
IL-4	TCGGCATTTTGAACGAGGTC		GAAAAGCCCCGAAAGAGTCTC		216	1.03 $\downarrow$
IL-5	TCACCGAGCTCTGTTGACAA		CCACACTTCTCTTTTGGCG		201	1.15
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA		TGTACTCCAGGTAGCTATGG		208	1.29
TNF $\alpha$	TCTCATCAGTTCTATGGCCC		GGGAGTAGACAAGGTACAAC		212	0.90
IFN $\gamma$	GCTCTGAGACAATGAACGCT		AAAGAGATAATCTGGCTCTGC		227	1.12 $\downarrow$
TGF $\beta$	ACCGCAACAACGCCATCTAT		GTAACGCCAGGAATTGTTGC		200	1.08
GMCSF	TGAACCTCCTGGATGACATG		GTGTTTCACAGTCCGTTTCC		218	0.98
IL-2r	GCAACTCCCATGACAAATCG		ATCCCAGGAATACACTCGTAG		219	1.08
<sup>1</sup> PBR	TCTGGAAAGAGCTGGGAGG		AAGCCAGCCAGGCCAGG		237	0.82
<sup>2</sup> $\beta$ 2 $\mu$ glob	TGACCGGCTTGTATGCTATC		CAGTGTGAGCCAGGATATAG		222	1.09 $\downarrow$
IL-12p35	GATCATGAAGACATCACACGG		AGAATGATCTGCTGATGGTTG		258	
IL-12p40	CAGTACACCTGCCACAAAGGA		GTGTGACCTTCTCTGCAGACA		277	
IFN $\gamma$ rec	ATTTACCCTGAAGTCGTTGTGA		ATGGAAAGGAGGGATACAGACGT		289	
<sup>3</sup> IL-10	ATGCAGGACTTTAAGGGTTACTTG		TAGACACCTTGGTCTTGGAGCTTA		254	
<sup>4</sup> IL-13	GACCCAGAGGATATTGCATG		CCAGCAAAGTCTGATGTGAG		214	

1: PBR is the peripheral benzodiazepine receptor

2: pMus ends here; length of standard amplicon = -320 bp. Construction 100% correct.

3: pMus-2 ends here; length of standard amplicon = -420 bp. The construction has a G->A mutation in the IL-4 sense site (17th nt).

4: pMus-3 ends here; length of standard amplicon = -440 bp. The construction has a G->A mutation in the IL-4 sense site (17th nt).

Figure II.4: Séquences et tailles des amorces utilisées pour l'amplification du standard et de l'ADNc cellulaire. (d'après Shire, 1994)

L'ARN standard (ARNst) peut servir à: 1) vérifier l'efficacité de la RT-PCR (voir résultats), 2) déterminer de manière semi-quantitative la quantité d'ARN cellulaire de certaines cytokines (voir résultats) 3) déterminer la quantité précise d'ARN cellulaire.

### 7.1 RT-PCR semi-quantitative

- Dans un eppendorf mélanger 1 µg d'ARN cellulaire et différentes dilutions de l'ARN de pMus-3 (ARNst).
- Réaliser une rétrotranscription comme vu avant.
- Engager 3 µl du mélange de rétrotranscription en PCR comme vu précédemment.
- Déposer 50 µl sur gel et estimer la quantité d'ARN cellulaire en comparant son intensité avec l'intensité du standard par densimétrie.

## **B Techniques d'immunobiologie**

### **1 Immunisation expérimentale**

Les immunisations ont été pratiquées chez des souris BALB/c élevées à l'animalerie des Facultés Notre Dame de la Paix. Elles ont été manipulées selon les règles fixées par la Convention Européenne de Strasbourg (France, 1987). Les souris ont été immunisées par différents agents et en présence de différents adjuvants (voir résultats). Ces immunisations se font sous anesthésie et dans les conditions décrites par Walravens et al. ( in press).

#### 1.2 Anesthésie et immunisation.

- Dans un eppendorf stérile, mélanger 630 µl de PBS stérile, 170 µl de Rompun (20 mg/ml) (Bayer, Allemagne), 200 µl d'Imalgène (50 mg/ml) (Rhône-Mérieux, France).

- Pour une souris de 25 g, injecter 100 µl de la solution dans la cavité parentérale.
- Pour une immunisation par voie intranasale (IN), déposer 10 µl de la préparation antigénique sur chaque narine.
- Pour une immunisation sous-cutanée, la préparation antigénique est injectée dans le dos.
- Pour une immunisation péritonéale, la préparation antigénique est injectée dans le bas ventre.

## 1.2 Les antigènes, type et dose

### 1.2.1 Le BRSV

Nous avons immunisé les souris avec la souche RB94 cultivée sur une monocouche de cellules VERO (ATCC, CCL 81) dans du milieu DMEM (Dubelcco's minimal Eagle medium) (Biowhittaker, Belgique) contenant 2% de sérum de veau foetal (Gibco, Belgique). Le titre de la culture virale est de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml après concentration par le polyéthylène glycol (PEG)(Sigma, USA).

Pour concentrer:

- Ajouter à la culture virale clarifiée, à 4°C, un volume de la solution de PEG (PEG 6000 36% dans H<sub>2</sub>O distillée) pour obtenir une concentration finale de 6%.
- Incuber à 4°C pendant 2 heures.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 g à 4°C et récupérer le précipité.
- Laver le culot deux fois en PBS.
- Resuspendre dans du PBS de manière à concentrer le virus environ 100x.
- Aliquoter et stocker à -70°C.

Pour l'immunisation, le virus est dilué deux fois dans du PBS, ou dans du Quil A (0,33 mg/ml de PBS) (Spikoside, Iscotec product, Suède).

### 1.2.2 Erythrocytes bovins

Une prise de sang est réalisée sur un bovin sain, en ferme. Les globules rouges sont récoltés par centrifugation (10 minutes à 1000 rpm) et sont lavés trois fois avec du PBS. Ils sont fixés une nuit

dans une solution de paraformaldéhyde 2%, comptés grâce à une cellule de Thoma et aliquotés à une concentration de 10 millions de globules/ml. Les souris sont immunisées avec 1 ml de la solution par voie parentérale.

## **2 Mise en évidence de la production d'anticorps.**

### **2.1 Généralités**

La détection d'anticorps sériques anti-BRSV dans le sang des souris immunisées est réalisée à l'aide d'un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay). Les anticorps sériques sont reconnus par des anticorps biotinylés, une streptavidine couplée à la peroxydase se lie alors à la biotine. La révélation, grâce à l'activité peroxydase, donnera lieu à une coloration qui sera quantifiable par spectrométrie et qui permettra le calcul du titre en anticorps (voir résultats). Les anticorps dosés sont: les IgG totales, les IgG1 et les IgG2a.

#### 2.1.1 Récolte du sérum sanguin

- Laisser le sang coaguler à température ambiante pendant une demi-journée.
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes.
- Récolter le sérum sans prendre de globules rouges.
- Conserver à -20°C

#### 2.1.2 Préparation du virus en octyl. (selon Matheise et al, 1995)

- Clarifier la culture virale 10 minutes à 2000 rpm.
- Ultracentrifuger à 20.000 rpm pendant 18 heures.
- Resuspendre le culot dans 1/10 du volume de départ de PBS contenant 1% de N- octyl-B-D-Glycopyranoside (Sigma, USA) et 100 µM de PMSF (Phenyl sulphonyl fluoride).

## 2.2 ELISA

- Coater des plaques 96 puits (plaque MaxiSorp, NUNC, Danemark) pendant une nuit avec 75 µl de BRSV octyl dilué 200 fois en PBS à 4°C.
- Saturer 2 heures à température ambiante avec 100 µl PBS/HC (50/50). (HC: Caséine bovine (Fluka, Allemagne) 20 g, NaOH 0,3M 800 ml, incuber une nuit à 37°C, centrifuger 20' à 400 g, congeler à - 20°C).
- Laver cinq fois en PBS-Tween (Tween 20, Merck, Allemagne) 0,1% à l'aide du laveur automatique (Titertek Microplate Washer M96 Flow, ICM Biomedicals, Belgique).
- Diluer les séra 10 fois en PBS/HC, puis de 5 en 5.
- Déposer 50 µl par puits des séra dilués et incuber 1 heure à température ambiante.
- Laver 5 fois en PBS-Tween 0,1%.
- Déposer 50 µl d'anticorps de chèvre anti-souris (GAM) couplés à la biotine et dilués 1000 fois en PBS/HC (50/50) et incuber 1 heure à température ambiante.
- Laver 5 fois en PBS-Tween 0,1%.
- Déposer 50 µl de streptavidine-peroxydase diluée 1000 fois en PBS/HC (50/50) et incuber 1 heure à température ambiante.
- Laver 5 fois en PBS-Tween 0,1%.
- Révéler en déposant 100 µl de solution de révélation ( Tampon citrate-phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M, Acide citrique 0,1M) 9 ml, 1 ml de OPD (0-phénylènediamine) (Sigma, USA),  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 µl) par puits. Incuber 20' à température ambiante et dans l'obscurité.
- Stopper la réaction en déposant 25 µl d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N par puits.
- Lire à 430 et 690 nm (Biokinetics Reader EL 340, BIO-TEK Instruments, USA).

Les titres sont calculés à l'aide du programme Delta Soft II (version 30.3B, Biometallics inc., USA).

### 3 Splénocytes

#### 3.1 Isolement

- Prélever une rate sur une souris tuée par décapitation.
- Mettre la rate dans quelques ml de Hanks-FCS 5% ( Hanks: KCl 0,4 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06 g/l, NaCl 8g/l,  $\text{NaHCO}_3$  0,35 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,048, D glucose 1g/l, stériliser par filtration ).
- Passer la rate au potter(Broyeur Toenbroeck en verre Borosilicaté, VEL, Belgique).
- Compléter à 15 ml avec du Hanks-FCS 5%.
- Centrifuger à 1200 rpm pendant 10 minutes.
- Laver deux fois en Hanks-FCS 5%
- Resuspendre le culot dans 1 ml de Hanks-FCS 5%
- Ajouter 5 ml de solution hémolytique de Gey 1 fois (voir plus bas).
- Laisser 10 minutes à 4°C.
- Porter à 50 ml avec du Hanks-FCS 5%.
- Centrifuger 10 minutes à 1200 rpm.
- Laver 2 fois en Hanks-FCS 5%.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de milieu RPMI complet.
- Compter les cellules vivantes colorées par une solution d'Acridine orange-bromure d'ethidium sur une cellule de Thoma.
- Aliquoter en eppendorf par 10 millions de cellules.
- Laver une fois en PBS et stocker à -70°C en culot sec.
- Pour la solution hémolytique de Gey 1x mélanger 20 volumes de solution stock A ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  35,0 g, KCl 1,85 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,6 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,12 g, Glucose 5,0 g, Rouge de phénol 0,05 g, porter à 1 l avec de l'eau et autoclaver), 5 volumes de solution stock B ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,42 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,14 g,  $\text{CaCl}_2$  0,34 g, porter à 100 ml avec de l'eau et autoclaver), 5 volumes de solution stock C ( $\text{NaHCO}_3$  2,25 g, porter à 100 ml avec de l'eau et filtrer) et 70 volumes d'eau distillée stérile.

### 3.2 Culture de splénocytes

- Resuspendre, à la concentration de 2 millions de cellules/ml, les cellules en RPMI 1640 medium (Gibco, Belgique) supplémenté avec 2mM de glutamine (Gibco, Belgique), 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco, Belgique),  $5 \cdot 10^{-5}$  M de 2-mercaptoéthanol (Gibco, Belgique), 100 unités/ml de pénicilline-streptomycine (Gibco, Belgique), 2,5 µg/ml de fungizone et 10% de FCS.
- Déposer 100 µl dans les puits d'une microplaque de culture (NUNC, Danemark).
- Ajouter 100 µl de concanavaleine A (Sigma, USA) à une concentration finale de 2 µg/ml.

# RESULTATS

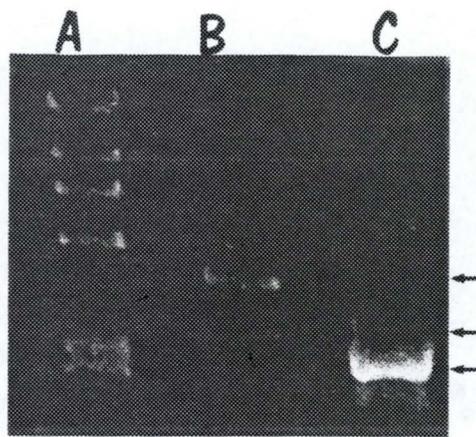


Photo III.1: Restriction de pMus-3.

On a piste A le marqueur de poids moléculaire, piste B les formes non restreintes de pMus-3, piste C le produit de restriction de pMus-3.

## **1 Quantification des ARNm de IL-2, de l'IL-4 et de l'INF $\gamma$ par RT-PCR compétitive.**

Ce travail, consiste en la mise au point d'une technique sensible et reproductible de détection de cytokines. Cette étude a pour but la caractérisation de l'orientation de la réponse immune lors d'une immunisation avec du BRSV (souche RB94) et ce dans un modèle murin. La caractérisation de la réponse sera établie à l'aide de l'étude de l'expression de l'IL-2, de l'INF- $\gamma$  et de l'IL-4.

### **1.1 Restriction, transcription et purification de pMus-3**

Le plasmide pMus-3 nous servira de standard interne lors de la quantification. Nous avons vu dans le chapitre matériels et méthodes que le plasmide pMus-3 contient un insert permettant l'hybridation d'amorces spécifiques de différentes cytokines. La distance entre les sites d'amorçages de chaque amorce est la même, ce qui fait de pMus-3 un standard interne multispécifique permettant la quantification de différentes cytokines. Ce plasmide nous a également servi de contrôle positif et a permis la mise au point des conditions de RT-PCR.

#### 1.1.1 Restriction

Le plasmide pMus-3 contient un seul site de restriction *EcoRI* situé juste après la queue PolyA. Le site s'étend des bases 852 à 857 (voir matériels et méthodes). Il est primordial que le plasmide soit bien restreint. En effet, s'il reste du plasmide non restreint, sa transcription donnera un mélange d'ARN de tailles différentes, ce qui induirait un biais dans la quantification. On peut voir que la restriction de pMus-3 dans les conditions décrites (matériels et méthodes) est bien complète (photo III.1).

Longueur d'onde (nm)	280	260	Quantité de pMus-3 (µg/ml)
DO pMus-3 non purifié	0,636 (dilué 10x)	1,205	482
DO pMus-3 purifié	0,473 (dilué 10x)	0,863	345,2

Tableau III.1: Quantification de pMus-3 par spectrophotométrie, les rapports des DO sont pour le plasmide non purifié de 1,89 et pour le plasmide purifié de 1,82.

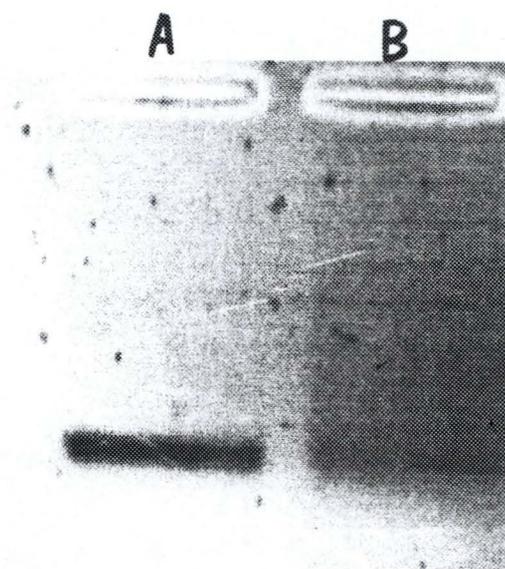


Photo III.2: Analyse l'ARN transcrit de pMus.

On a: piste A 1 µl d'ARN transcrit purifié, piste B 1 µl d'ARN transcrit purifié venant de P. Mertens, ICP. Cet ARN nous sert de marqueur de poids moléculaire. (La photographie a été prise en inversion de couleurs)

### 1.1.2 Transcription et purification de pMus-3

La transcription *in vitro* du plasmide permet l'obtention d'ARN standards. Nous avons engagé 1 µg de plasmide restreint. Après transcription, le traitement à la DNase permet d'éliminer l'ADN plasmidique afin d'éviter que celui-ci n'interfère avec la quantification de l'ARN produit. Une quantification par spectrométrie a été réalisée après purification de l'ARN sur tamis moléculaire. En effet, les nucléotides non incorporés sont également quantifiés lors d'une prise de DO sur un échantillon non purifié. On voit dans le tableau III.1 les valeurs de DO de l'ARN avant et après purification. La photo III.2 permet de voir que l'ARN transcrit est de bonne qualité, et qu'il ne contient aucun contaminant.

### 1.2 Mise au point de la RT-PCR sur le standard pMus-3

La réaction PCR est un phénomène exponentiel qui peut être décrit par la formule suivante :  $N = N_0 (1 + \text{eff})^n$ , N étant l'ampleur de l'amplification,  $N_0$  la quantité initiale de matériel, eff l'efficacité de l'amplification et n le nombre de cycle. Cependant, avec l'épuisement des réactifs la réaction perd ses propriétés exponentielles et atteint un plateau. Le calcul du plateau a été réalisé sur 100 ng de pMus-3 amplifiés à l'aide des amorces INF-γ durant 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 cycles. L'effet plateau apparaît après 35 cycles d'amplification pour 100 ng de pMus-3 (Photo III.3). Une PCR à ensuite été réalisée sur 50 pg de pMus-3 à l'aide des amorces de l'INF-γ, de l'IL-4, de l'IL-2 et de la β2m (photo III.4). Cette réaction donne bien les résultats attendus, on voit que les standards de l'IL-4, de l'IL-2, de l'INF-γ et de β2m ont bien tous la même taille, en ce qui concerne le seuil de détection de la PCR, l'amplification de différentes quantités de pMus-3, s'étendant de 50 pg à 0,05 pg, montre que 0,05 pg de pMus non restreint donnent encore un signal après 35 cycles d'amplification (photo III.4). Ces amplifications se sont faites à l'aide des amorces de l'INF-γ. Le seuil de détection de la RT-PCR a également été déterminé.

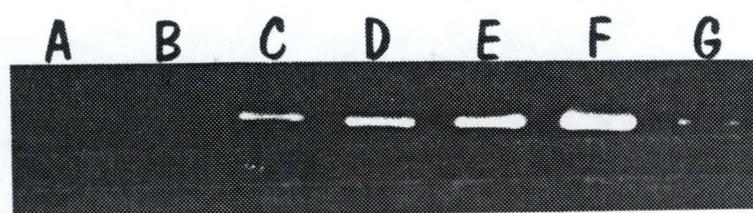


Photo III.3: Analyse du plateau PCR pour 100 ng d'ADN de pMus-3 amplifiés avec les amorces INF- $\gamma$ .

On a: les produits de PCR après 10 (piste A), 15 (piste B), 20 (piste C), 25 (piste D), 30 (piste E), 35 (piste F) et 40 (piste G) cycles d'amplification, 10  $\mu$ l de chaque réaction ont été déposés sur gel.

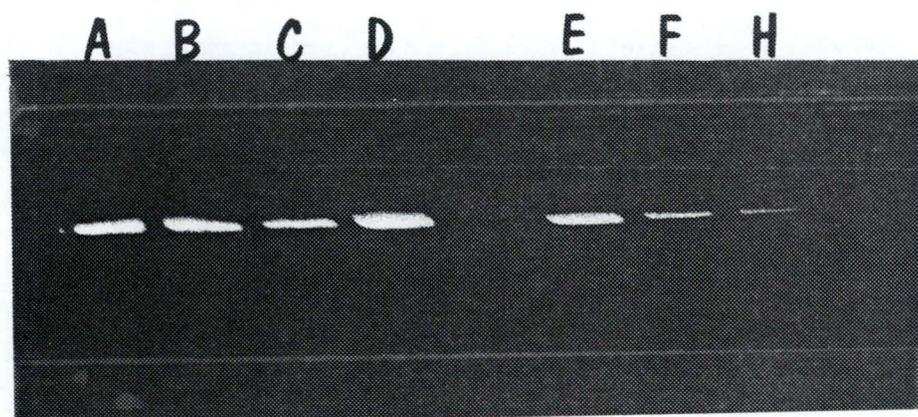


Photo III.4: Analyse du seuil de détection de pMus-3.

10  $\mu$ l des produits de PCR sur ADN plasmidique de pMus-3 ont été déposés sur gel. On a: 50 pg de plasmide amplifié avec les différents amorces utilisés ( de gauche à droite: INF- $\gamma$  (piste A), IL-4 (piste B), IL-2 (piste C) et  $\beta$ 2m (piste D)) pour les 4 premières pistes, puis le marqueur de poids moléculaire (Marker 5), ensuite 5 pg (piste E), 0,5 pg (piste F) et 0,05 pg (piste G) de pMus-3 amplifié pendant 35 cycles avec les amorces INF- $\gamma$ .

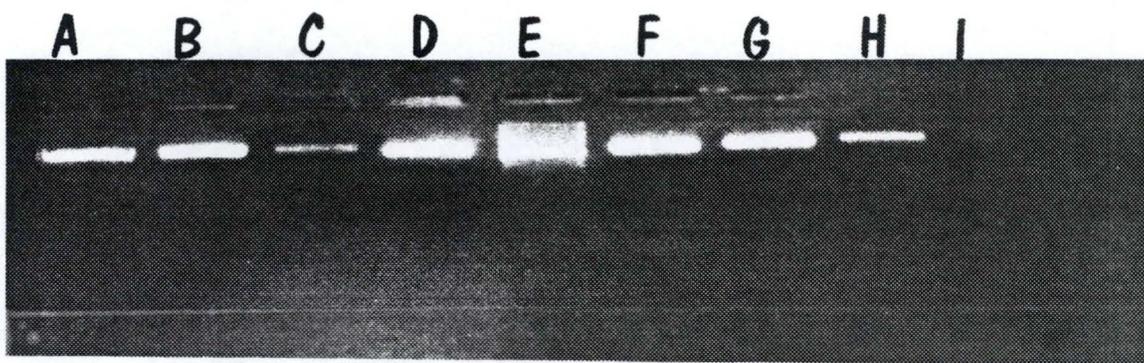


Photo III.5: Analyse des produits de RT-PCR réalisées sur différentes concentrations de l'ARN purifié de pMus-3.

On a de gauche à droite, 100 ng d'ARN amplifié avec quatre amorces différents (INF- $\gamma$ (piste A), IL-4(piste B), IL-2(piste C) et  $\beta$ 2m(piste D)) pour les quatre premières pistes, ensuite 10 ng (piste E), 1 ng(piste F), 100 pg(piste G), 10 pg(piste H) et 1 pg(piste I) d'ARN amplifié à l'aide des amorces INF- $\gamma$ .

Temps de stimulations	DO 260 nm	DO 280 nm	Rapport des DO	Conc. $\mu$ g/ml
T <sub>0</sub>	0,342	0,227	1,5	136,4
T <sub>6</sub>	0,709	0,315	2,25	283,6
T <sub>18</sub>	0,729	0,492	1,48	291,6
T <sub>24</sub>	1,120	0,474	2,36	448
T <sub>30</sub>	0,355	0,174	2,04	142

Tableau III.2: Concentrations d'ARN extraits de cellules stimulées avec de la Con A durant 0, 6, 18, 24 et 36 heures. Les échantillons d'ARN sont dilués 10 fois avant la quantification.

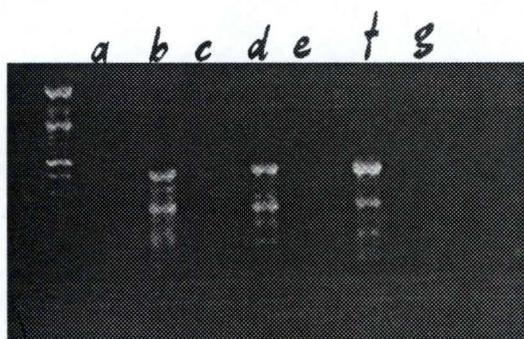


Photo III.6: Analyse des produits de RT-PCR obtenus avec les amorces d'IL-4, INF-g, IL-2 et  $\beta$ 2m sur l'ARN extrait après 6 heures de stimulation.

On voit de gauche à droite, blanc IL-4 (piste A), ARN T<sub>6</sub> amplifié avec les amorces IL-4 (piste B), blanc IL-2 (piste C), ARN T<sub>6</sub> amplifié avec amorces IL-2 (piste D), blanc INF- $\gamma$  (piste E), ARN T<sub>6</sub> amplifié avec amorces INF- $\gamma$  (piste F), blanc  $\beta$ 2m (piste G).

Différentes quantités d'ARN standard (ARNst), allant de 100 ng à 1 pg, ont été engagées en RT-PCR (photo III.5). On perçoit encore un faible signal pour la RT-PCR réalisée sur 1 pg d'ARN standard. Nous voyons donc que les conditions de PCR et de RT-PCR sont au point en ce qui concerne l'amplification du standard. La mise au point de la détection des messagers des cytokines se fera à partir des ces mêmes conditions.

### **1.3 Détection d'ARN de cytokines**

#### 1.3.1 Détection d'ARNm de cytokines à partir de cellules isolées

Des cellules spléniques isolées, provenant de souris naïves, ont été stimulées *in vitro* à l'aide d'un mitogène non spécifique (cf. Mat. Meth.) (concanavaleine A). Les cellules ont été stimulées durant 6, 18, 24 et 36 heures. Ces cellules ont ensuite été stockées en culots sec à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Les extractions d'ARN total ont été réalisées sur 10 millions de cellules à l'aide de la solution Ultraspec. Les résultats de ces extractions sont présentés au tableau III.2. La  $\beta 2$ -microglobuline ( $\beta 2\text{m}$ ) ayant un taux d'expression constant et ce quel que soit l'état d'activation des cellules, nous servira de contrôle positif pour la RT-PCR (Legoux, 1992). Les contrôles négatifs sont effectués sur de l'eau distillée. Des RT-PCR réalisées sur 1  $\mu\text{g}$  de l'ARN extrait des cellules stimulées pendant 0, 18, 24 et 30 heures ne donnaient pas de résultat (résultats non montrés) et ce quelque soient les amorces utilisés (INF- $\gamma$ , IL-4, IL-2,  $\beta 2\text{m}$ ). Des RT-PCR réalisées sur l'ARN de cellules stimulées pendant 6 heures ont donné lieu à des amplifications non spécifiques avec les amorces de l'IL-4, de l'IL-2, et l'INF- $\gamma$ , aucune amplification n'est visible avec les amorces de la  $\beta 2\text{m}$  (Photo III.6). Afin d'éliminer les contaminants, des oligos spécifiques de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-4, de l'IL-2 et de la  $\beta 2\text{m}$  furent utilisés lors de l'étape de transcription mais cette méthode ne donna pas de résultat. Lors de PCR réalisées directement sur l'ARN à l'aide des amorces de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-4, de l'IL-2 et de la  $\beta 2\text{m}$ , on a observé des amplifications pour les amorces INF- $\gamma$  et  $\beta 2\text{m}$  la présence d'ADN contaminant dans l'ARN extrait (résultats non montrés).

Antigènes administrés	Concentrations (µg/ml)	Rapport des DO
A2	680,0	2,48
A2	418,4	2,50
A2	338,0	2,160
A2	2728,0	1,80
A2	1753,2	2,13
A2	4197,6	1,74
A2 Quil A	585,6	3,50
A2 Quil A	384,8	2,30
A2 Quil A	264,0	2,90
A2 Quil A	139,6	1,50
A2 Quil A	722,2	2,60
A2 Quil A	200,8	2,70
RB94	465,2	2,30
RB94	386,4	2,43
RB94	580,8	2,29
RB94	428,0	2,54
RB94	475,6	2,15
RB94	485,2	2,37
RB94 Quil A	312,0	2,00
RB94 Quil A	522,8	2,40
RB94 Quil A	324,0	2,40
RB94 Quil A	358,0	1,34
RB94 Quil A	51,2	12,19
RB94 Quil A	700,4	2,52

Tableau III.3: Rendements des extractions d'ARN effectuées sur des rates de souris immunisées par: A2, RB94, A2 adjuvanté en Quil A, RB94 adjuvanté en Quil A. Chaque immunisation a été réalisée sur 6 souris.

Nous avons utilisé une méthode d'extraction de l'ARN messager afin de supprimer toute contamination de l'ARN (la nature de ces contaminations n'est pas bien comprise). Mais, le rendement obtenu à partir de culots contenant 10 millions de cellules était tellement faible qu' aucune RT-PCR n'a pu être effectuée sur ces échantillons. Dès lors, afin d'être sûr que les signaux détectés lors d'une RT-PCR proviennent bien de l'amplification d'ADNc, les témoins négatifs de PCR ne seront plus réalisés avec de l'eau mais bien avec l'ARN étudié.

Les RT-PCR sur cellules stimulées non spécifiquement ne donnant aucun résultat, nous sommes passés à l'étude des ARNm extraits de cellules de rates provenant de souris immunisées. dans le but d'obtenir une plus grande expression des cytokines. Vingt-quatre souris furent immunisées par voie intranasale et par différents antigènes. Le groupe 1 fut immunisé à l'aide de la souche A2 du HRSV (le HRSV étant connu pour induire une réponse cellulaire chez la souris, Graham et al, 1993, il nous servira de témoin positif), le groupe 2 avec la souche RB94 du BRSV les groupes 3 et 4 furent immunisés avec les mêmes antigènes respectivement que les groupes 1 et 2, adjuvantés en Quil A. Quand les souris sont immunisées avec du virus non adjuvanté, celui-ci est "vivant". Lorsqu'il est adjuvanté en Quil A, le virus est inactivé par l'adjuvant lui-même. Une moitié des souris sera sacrifiée quatre jour après la deuxième immunisation, l'autre 8 jours après cette immunisation. L'ARN des cellules spléniques fut isolé à partir de culot de 20 millions de cellules. Bien que les rendements de l'extraction soient meilleurs (tableau III.3), aucune des RT-PCR effectuées n'a donné de résultats positifs (résultats non montrés). Il est à souligner que même notre contrôle positif ( $\beta$ 2m) est négatif. Afin de vérifier la validité de notre PCR, de l'ADNc fournit par Mr Verlant et Mr Maisonneuve (Laboratoire de biologie moléculaire et d'immunologie, Pars Scientifique de la Province de Namur, Gembloux) fut utilisé. Cet ADNc a été obtenu à partir d'ARN messagers isolés d'appareils génitaux supérieurs de souris infectées par *Chlamidia trachéomatis*.

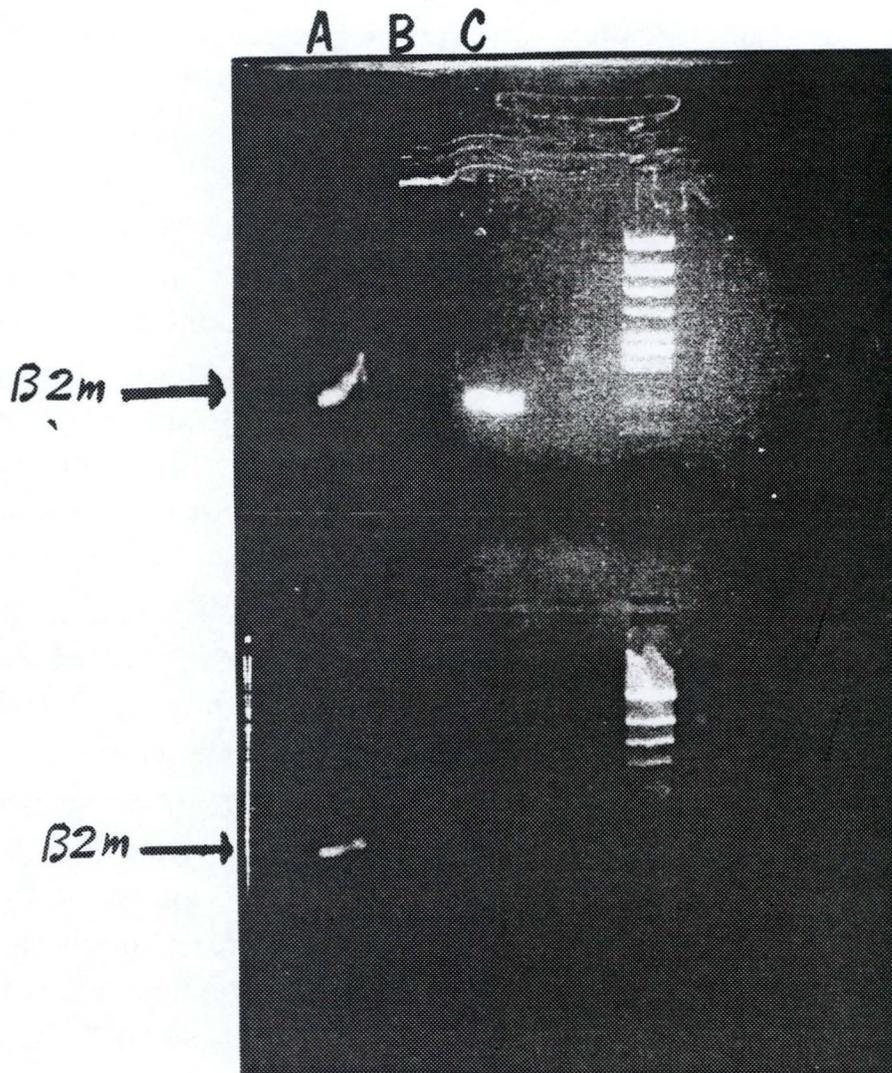


Photo III.7: Analyse des produits de RT-PCR sur ARN total de rates et de poumons provenant de souris naïves.

On a : RT-PCR sur ARN total de la rate avec amorces  $\beta 2m$  (pistes A et D), blanc (pistes B et E), ARN total des poumons amorces  $\beta 2m$  (piste C et F). Certaines bandes sont de travers, cela est du à une anomalie du gel.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Mr Verlant et Mr Maisonneuve (résultats non montrés). Pour la réaction de RT, un contrôle positif nous a été fourni par V. Weynants (Laboratoire de Microbiologie, FUNDP). Cette ARN provenait de cellules de myélomes, et a été extrait directement après culture cellulaire sans étape de congélation. On voit sur la photo III.6 une RT-PCR réalisée sur cet ARN avec les amorces de  $\beta 2m$ . La  $\beta 2m$  a bien été amplifiée, on voit en effet une bande de 222 paires de bases. Les conditions de RT-PCR étant au point, la méthode d'extraction doit être revue.

#### 1.3.2 Détection d'ARNm de cytokines à partir de rate

##### A) Détection de $\beta 2m$ chez des souris naïves

Deux souris naïves ont été utilisées. Les rates ont été isolées et l'ARN extrait directement à partir de l'organe à l'aide de la solution Ultraspec (Voir Matériels et méthodes, § 1.3) Les quantités d'ARN extraites figurent dans le tableau III.4. L'ARN total a été mis sur un gel afin d'en vérifier la qualité, aucune marque de dégradation n'a été mise en évidence (Résultats non montrés). Des RT-PCR ont été pratiquées sur la rate et les poumons des deux souris afin de mettre en évidence la présence d'ARNm de  $\beta 2m$ . La photo III.7 nous montre que tant au niveau de la rate qu'au niveau du poumon, les conditions de RT-PCR et l'extraction pratiquée directement sur les tissus nous permettent de mettre en évidence une bande de 222 paires de bases correspondant à  $\beta 2m$ . On note cependant, une contamination par une bande d'environ 495 paires de bases pour la RT-PCR réalisée sur l'ARN pulmonaire de la souris 2. On peut considérer que les méthodes d'extractions et d'amplifications sont au point. Dans les expériences suivantes toutes les extractions se feront donc à partir de tissus frais.

Souris naïves	Concentration en $\mu\text{g/ml}$	Rapport des DO
Souris 1	2007,6	1,97
Souris 2	3248,0	2,05

Tableau III.4: Rendements des extractions d'ARN pratiquées sur la rate de deux souris naïves.

Antigènes	Concentration en $\mu\text{g/ml}$	Rapport des DO
RB94 IN1	44,0	2,2
RB94 IN2	177,6	1,9
RB94 IN3	286,0	2,0
RB94 Quil A IN4	134,4	1,8
RB94 Quil A IN5	85,2	1,6
RB94 IM2	/	/
RB94 IM3	229,6	2,1
RB94 Quil A IM4	/	/
RB94 Quil A IM5	133,2	1,97

Tableau III.5: Rendements des extractions d'ARN totaux sur des rates de souris immunisées par du RB94 par voie IM ou par du RB94 adjuvanté en Quil A par voie IN. Le symbole / signifie que les échantillons ne contenaient pas de traces détectables d'ARN.

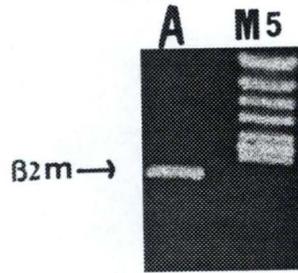


Photo III.6: Produit de la RT-PCR sur ARN de myélomes.  
 On a de droite à gauche l'ARN amplifié avec les amorces β2m (piste A), le marqueur.

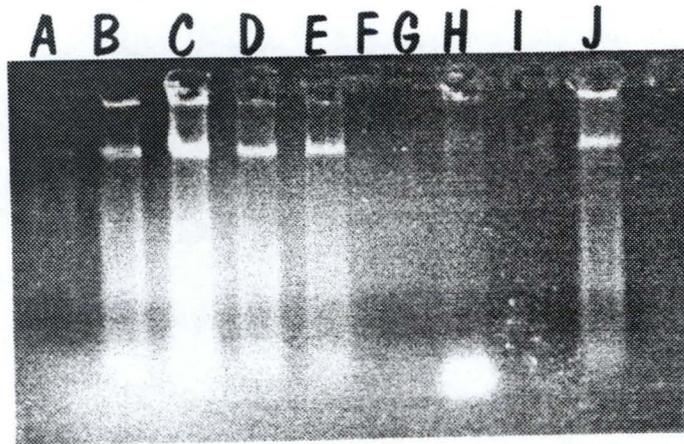


Photo III.8: Analyse de la qualité des ARN totaux de rates après purification par la solution Ultraspec.  
 On de gauche à droite, trois pistes avec de l'ARN de souris immunisées par voie IN avec du RB94 (pistes A, B, C), deux pistes avec de l'ARN de souris immunisées par voie IN avec du RB94/Quil A (pistes D, E), trois pistes avec de l'ARN de souris immunisées par voie IM avec du RB94 (pistes F, G, H), deux pistes avec de l'ARN de souris immunisées par voie IM avec du RB94/Quil A (pistes I, J).

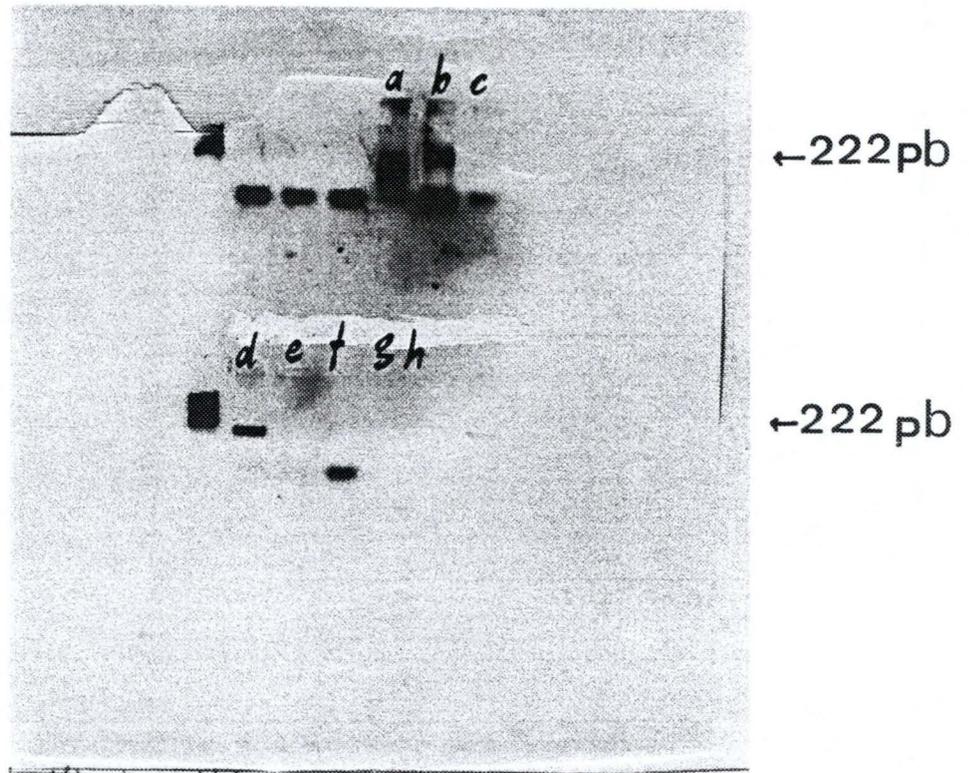


Photo III.9: Analyse des produits de RT-PCR sur ARN total d'une rate d'une souris immunisée par voie IN avec du RB94 adjuvanté en Quil A.

En haut, les pistes A, B et C montrent l'amplification des ARN de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-2 et de l'IL-4, respectivement. En bas, on a de gauche à droite,  $\beta$ 2m(piste D), blanc INF- $\gamma$  (piste E), blanc IL-2 (piste F), blanc IL-4 (piste G), blanc  $\beta$ 2m (piste H), contrôle positif de RT-PCR (piste I) (échantillon de V. Weynants).

Antigènes	Concentration en $\mu$ g/ml	Rapport des DO
Naïve 1	36,4	4,4
Naïve 2	83,0	1,8
Bac F1	116,4	1,9
Bac F2	1820,4	1,8
Bac F3	3276,0	2,1

Tableau III.6: Rendements des extractions d'ARN totaux sur des rates de deux souris naïves et de trois souris immunisées par voie IN avec du BacF.

### B) Immunisation de souris par voie intranasale ou intramusculaire avec du RB94 adjuvanté ou non

Graham et al. (1993) ayant montré l'importance de la voie d'immunisation et du conditionnement de l'antigène, nous avons immunisé 10 souris à l'aide de RB94 adjuvanté ou non (deux fois, à quinze jours d'intervalle) par voie intra-nasale (IN) ou intramusculaire (IM). L'ARN a été extrait 8 jours après la deuxième immunisation (tableau III.5). L'ARN a été déposé sur gel et paraît de bonne qualité (photo III.8). Malgré la bonne qualité de l'ARN, nous n'avons pu mettre en évidence la présence d'ARNm de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-2 et de l'IL-4 que chez une seule souris immunisée par voie IM à l'aide de RB94 adjuvanté en Quil A (photo III.9). La quantité d'ARN engagée était cependant importante (2  $\mu$ g). De plus il s'est avéré que ce résultat n'était pas reproductible. En effet, des RT-PCR pratiquées sur l'ARN de la même souris ne donnèrent plus rien par après. Pour toutes les souris testées, la  $\beta$ 2m a bien été amplifiée et les contrôles négatifs étaient négatifs. Nous verrons que les souris avaient bien répondu à l'immunisation puisqu'on a pu mettre en évidence une séroconversion (point 3) et la production d'INF- $\gamma$  et d'IL-2 par les splénocytes, de ces souris, restimulés *in vitro*.

### C) Mise au point de la détection d'ARNm cytokiniques à partir de rates de souris immunisées avec du baculovirus recombinant exprimant la protéine de fusion

Nous avons vu que la protéine F induisait une réponse de type Th1 (Alwan, 1993). Walravens et al.(sous presse) ont montré que des souris répondent à une immunisation avec du baculovirus exprimant la protéine F(BacF). De même, on a vu que dans le cas du HRSV, F est capable d'induire une bonne réponse cellulaire (Alwan & Openshaw, 1993). Cherchant toujours un antigène capable de susciter une forte réponse cellulaire, nous avons immunisé des souris à l'aide de Bac F (n=3) deux fois à quinze jours d'intervalle. Les rates étaient prélevées douze jours après la deuxième immunisation. Les résultats de l'extraction d'ARN sont visibles au tableau 6. Deux souris naïves nous ont servi de témoins négatifs

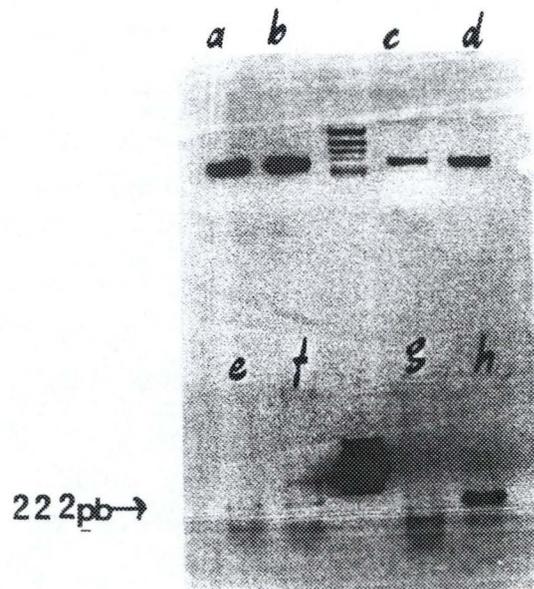


Photo III.10: Analyse des produits de RT-PCR sur ARN total d'une rate d'une souris immunisée à l'aide de BacF par voie IN.

En haut, témoin positif (pMus-3) pour les amorces INF- $\gamma$  (piste A), IL-4 (piste B), IL-2 (piste C), et  $\beta$ 2m (piste D) . En bas, amplification de l'ARN à l'aide des amorces INF- $\gamma$  (piste E), IL-4 (piste F), IL-2 (piste G) et  $\beta$ 2m (piste G). Les couleurs de la photo sont inversées.

Souris	Concentration en $\mu$ g/ml	Rapport des DO
1	9282	1,78
2	6649	1,80

Tableau III.7: Rendements d'extractions d'ARN effectuées sur des rates de souris immunisées par des globules rouges de bovins.

pour la détection de cytokines et de témoins positifs pour la détection de  $\beta 2m$ . Les témoins négatifs étaient négatifs et on a pu mettre en évidence la production de  $\beta 2m$  chez toutes ces souris naïves. Bien que la  $\beta 2m$  soit visible chez toutes les souris, nous n'avons pu mettre en évidence d'ARNm de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-4 que chez une seule des souris immunisées par BacF (photo III.10); et ce, quelle que soit la quantité d'ARN introduit dans la réaction de RT-PCR (jusqu'à 5  $\mu g$ ). Ces résultats n'étaient pas reproductibles. La certitude que les souris ont bel et bien répondu à l'immunisation nous a été fournie par les tests sérologiques (résultats non montrés). La non-reproductibilité des résultats a soulevé trois questions: a) la quantité de messenger est-elle en dessous du seuil de détection? b) les temps de prélèvement sont-ils compatibles avec la cinétique de la réponse au niveau des messagers? c) les antigènes (virus entier ou protéine recombinante) sont-ils suffisamment immunogènes pour induire une réponse détectable dans nos conditions expérimentales?

#### D) Mise au point de la détection d'ARNm cytokiniques à partir de souris immunisées avec des érythrocytes bovins

Dans le but de répondre à ces questions, nous avons immunisé des souris ( $n=2$ ) à l'aide d'érythrocytes de bovins fixés, puissant antigène xénogénique. Deux immunisations par voie péritonéale ont été opérées à 7 jours d'intervalle. Les résultats de l'extraction d'ARN sont présentés au tableau III.7. Les souris furent sacrifiées 5 jours après la deuxième immunisation. Des RT-PCR sur différentes quantités d'ARN ont été réalisées à l'aide de amorces spécifique de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-4, de l'IL-2 et de  $\beta 2m$ . A partir de 1  $\mu g$  d'ARN engagé, on détectait systématiquement l'expression des différentes cytokines étudiées à condition d'introduire 3  $\mu l$  de la RT dans la réaction PCR (Photo III.11). Ces expériences se sont avérées reproductibles, et ont servi de modèle pour les expériences suivantes.

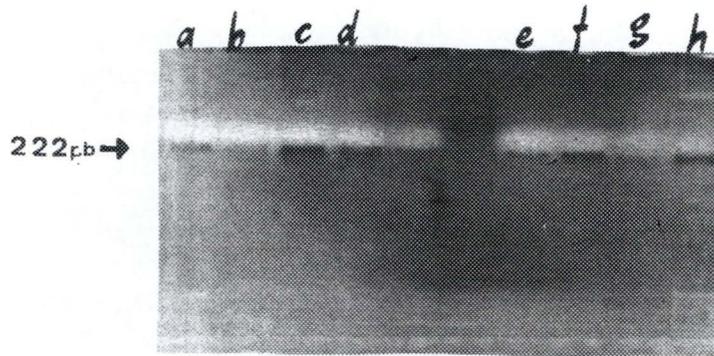


Photo III.11: Analyse des produits de RT-PCR sur de l'ARN extrait à partir d'une rate d'une souris immunisée avec 10 millions d'erythrocytes bovin.

On a: 3  $\mu$ g d'ARN rétrotranscrit puis amplifié par les amorces INF- $\gamma$  (piste A), IL-4 (piste B), IL-2 (piste C) et  $\beta$ 2m (piste D), le marqueur de PM, 1  $\mu$ g d'ARN rétrotranscrit puis amplifié par les amorces INF- $\gamma$  (piste E), IL-4 (piste F), IL-2 (piste G) et  $\beta$ 2m (piste H). Les couleurs sont inversées.

Antigènes	Concentration en $\mu$ g/ml	Rapport des DO
RB94 1	7532	1,8
RB94 2	6998	1,7
RB94 3	93	1,7
RB94/alun 1	3868	1,7
RB94/alun 2	136	1,6
RB94/alun 3	4776	1,8

Tableau III.8: Rendements des extractions d'ARN réalisées chez des souris immunisées par voie IN avec du RB94 ou par voie sous-cutanée avec du RB94 adjuvanté à l'alun.

E) Mise au point la détection d'ARNm chez des souris immunisées par du BRSV adjuvanté en alun ou non

Un lot de souris a été immunisé à l'aide de RB94 seul par voie intranasale ou avec du RB94 adjuvanté en alun par voie sous-cutanée. L'alun étant un adjuvant puissant qui a pour caractéristique de polariser la réponse immune vers un type Th2, nous devons nous attendre à mettre en évidence l'expression d'ARN de cytokine de type Th2, notamment l'IL-4. Les résultats des extractions sont présentés tableau III.8. Bien que la  $\beta$ 2m ait été amplifiée chez toutes les souris testées, aucune cytokine n'a pu être mise en évidence chez les souris immunisées par le RB94 seul malgré une séroconversion (voir plus loin). Par contre, de l'ARNm d'IL-4 a été détecté chez les souris adjuvantées en alun (Résultats non montrés).

De ces deux dernières expériences (point D et E), nous pouvons conclure, que les conditions de RT-PCR nous permettent bien de détecter l'expression des ARNm de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-4 et de l'IL-2. Cependant, lors d'immunisation à l'aide de BRSV non adjuvanté, nous nous trouvons peut-être en dehors de la cinétique de l'expression des différentes cytokines étudiées.

F) Étude de la cinétique de l'expression de l'INF- $\gamma$ , de l'IL-4 et de l'IL-2 après immunisation avec du BRSV adjuvanté ou non.

L'expérience menée sur la cinétique de la réponse a porté sur trois niveaux différents de la réponse immune: les ARNm des cytokines, les protéines cytokiniques, la sérologie. Nous n'aborderons dans ce paragraphe que l'étude des ARNm par RT-PCR. Deux immunisations par voie IN furent réalisées avec du RB94 adjuvanté ou non à 15 jours d'intervalle, les rates et les poumons ont été prélevés 1, 4, 8 et 12 jours après la deuxième immunisation. Seize jours après la deuxième immunisation, une troisième immunisation a eu lieu, les rates et les poumons ont été prélevés également après 1, 4, 8 et 12 jours (au jour 12, seules les souris immunisées en RB94 non adjuvanté ont été testées). Chaque groupe comprend deux souris. Seule une moitié de rate fut employée pour

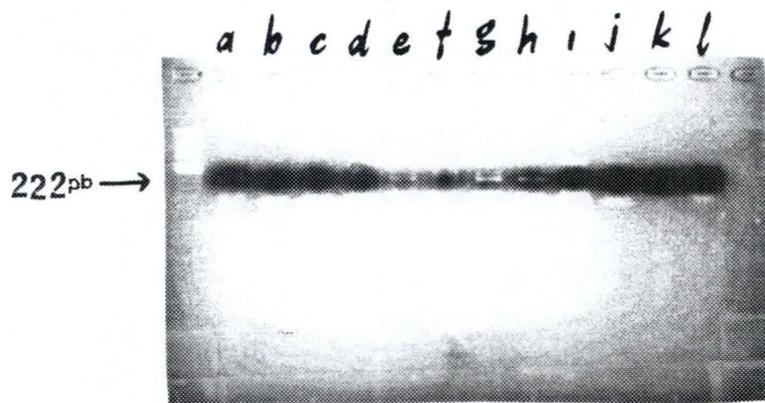


Photo III.12: Analyse des produits de RT-PCR réalisées sur les ARN totaux de la rate des souris du jour 1 et du jour 4 avec les amorces IL-4.

Pistes A et B: souris du jour 1 immunisées avec RB94.

Pistes C et D: souris du jour 1 immunisée avec RB94/ Quil A.

Pistes E et F: souris du jour 4 immunisées avec RB94.

Pistes G et H: souris immunisées avec RB94 Quil /A.

Piste I: Blanc INF- $\gamma$ .

Piste J: Blanc IL-4.

Piste K: Blanc IL-2.

Piste L: Blanc  $\beta$ 2m.

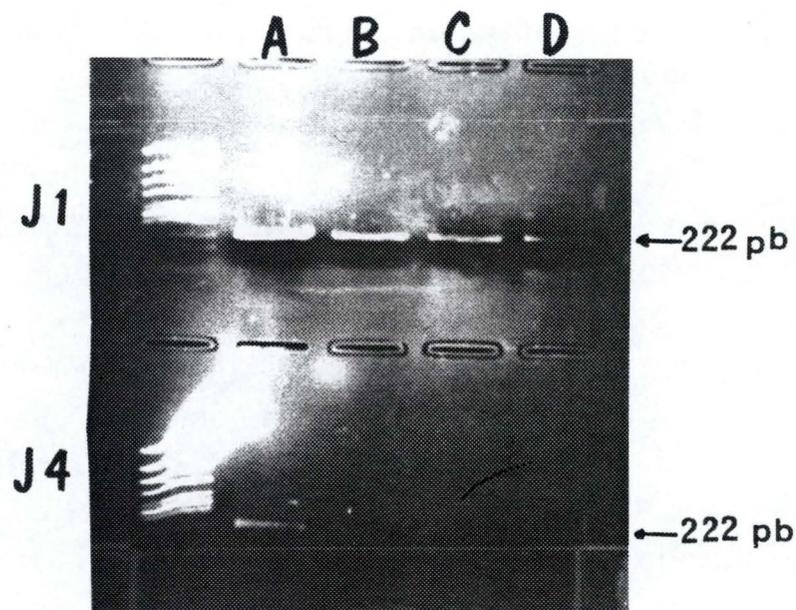


Photo III.13: RT-PCR avec amorces  $\beta$ 2m sur l'ARN de rate de souris du jours 1 et du jour 4 après deuxième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 1 immunisées avec RB94.

- pistes C et D souris du jour 1 immunisées avec RB94/ Q

En bas: - pistes A et B souris du jour 4 immunisées avec RB94.

- pistes C et D souris du jour 4 immunisées avec RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

l'extraction de l'ARN, l'autre moitié étant utilisée pour étudier la production de cytokines au niveau protéique lors de restimulations *in vitro*. Les résultats des extractions sont présentés au tableau 9.

Les premières tentatives de RT-PCR s'avérèrent infructueuses. Cependant, en augmentant le nombre de cycles (40), différentes cytokines furent mises en évidence. On notera que fréquemment, des contaminations, par une bande dont la taille correspond à celle de pMus-3, sont visibles dans les résultats. Cependant, dans la plupart des cas, les contrôles négatifs étaient bons (voir plus loin). Nous pensons donc, que nos réactifs ne sont pas contaminés mais que la manipulation de pMus-3 dans le même local que celui ou étaient préparées les RT-PCR a conduit à un phénomène de contaminations aléatoires. Les contrôles positifs sont également corrects quoique parfois contaminés par pMus-3. Dans les lignes qui suivent nous allons présenter les résultats des RT-PCR jour par jour.

Aux jours 1 et 4, les contrôles négatifs ont été effectués pour chaque paire d'amorces. On remarque que le contrôle négatif pour l'INF $\gamma$  est positif (photo III.12). D'après la taille du contaminant, il s'agirait de pMus-3 (370 pb). Les contrôles positifs ( $\beta$ 2m) quant à eux sont tous corrects (photo III.13). Les photos III.12, III.14 et III.15 présentent les RT-PCR réalisées sur des souris immunisées avec du BRSV adjuvanté ou non; les amorces utilisés lors de l'amplification sont respectivement spécifique de l'IL-4, de l'INF- $\gamma$  et de l'IL-2. Chez les souris immunisée en RB 94 seul, on note l'amplification d'INF- $\gamma$  pour une des deux souris du jour 4 et pour les deux souris du jour 4 immunisées en Quil A (photo III.14). La perte du marqueur de poids moléculaire pour les souris du jour 1 ne nous permet pas de tirer de conclusion quant aux bandes détectées (Photo III.14). L'IL-4 a été détectée chez toutes les souris, cependant le signal est peu visible sur la photo (Photo III.12). Seules les souris du jour 4 immunisées en RB 94 semblent exprimer des messagers de l'IL-2 (photo III.15). Le tableau ci-dessous résume les différents tests réalisés sur chaque souris du jour 1 et du jour 4 (n=2).

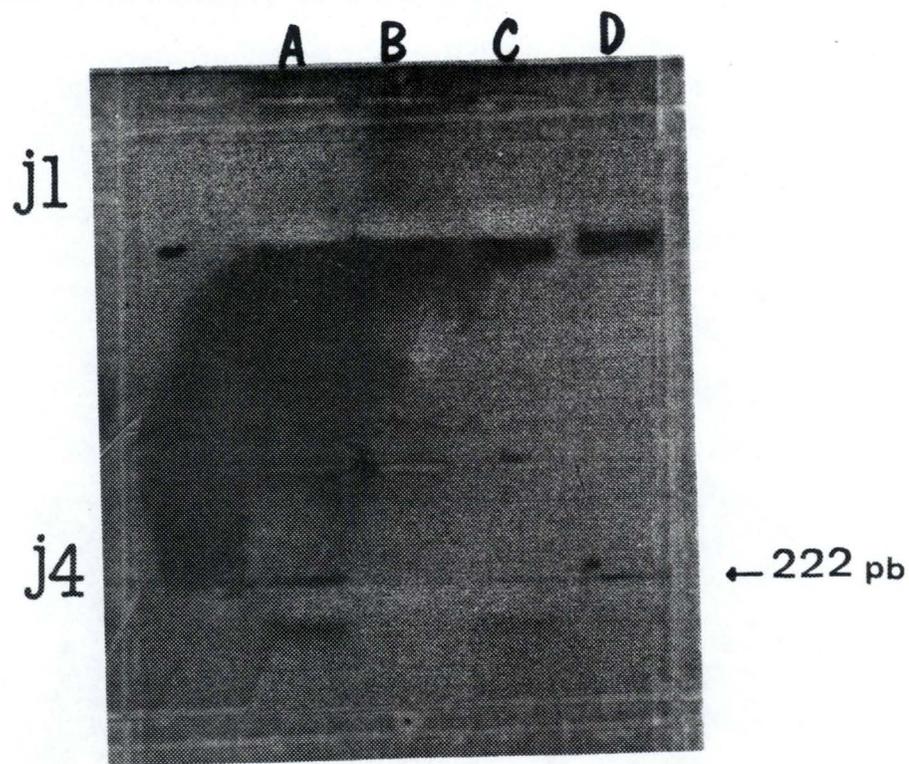


Photo III.14: RT-PCR avec amorces INF- $\gamma$  sur l'ARN de rate de souris du jours 1 et du jour 4 après deuxième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 1 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 1 immunisées avec RB94/ Q

En bas: - pistes A et B souris du jour 4 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 4 immunisées avec RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

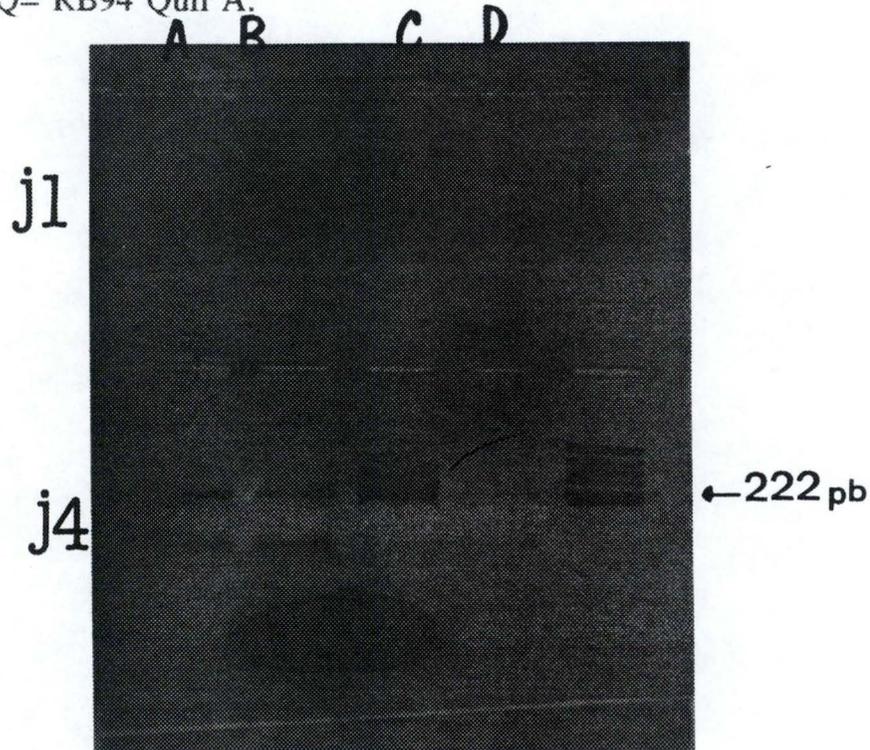


Photo III.15:RT-PCR avec amorces IL-2 sur l'ARN de rate de souris du jours 1 et du jour 4 après deuxième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 1 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 1 immunisées avec RB94/ Q

En bas: - pistes A et B souris du jour 4 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 4 immunisées avec RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

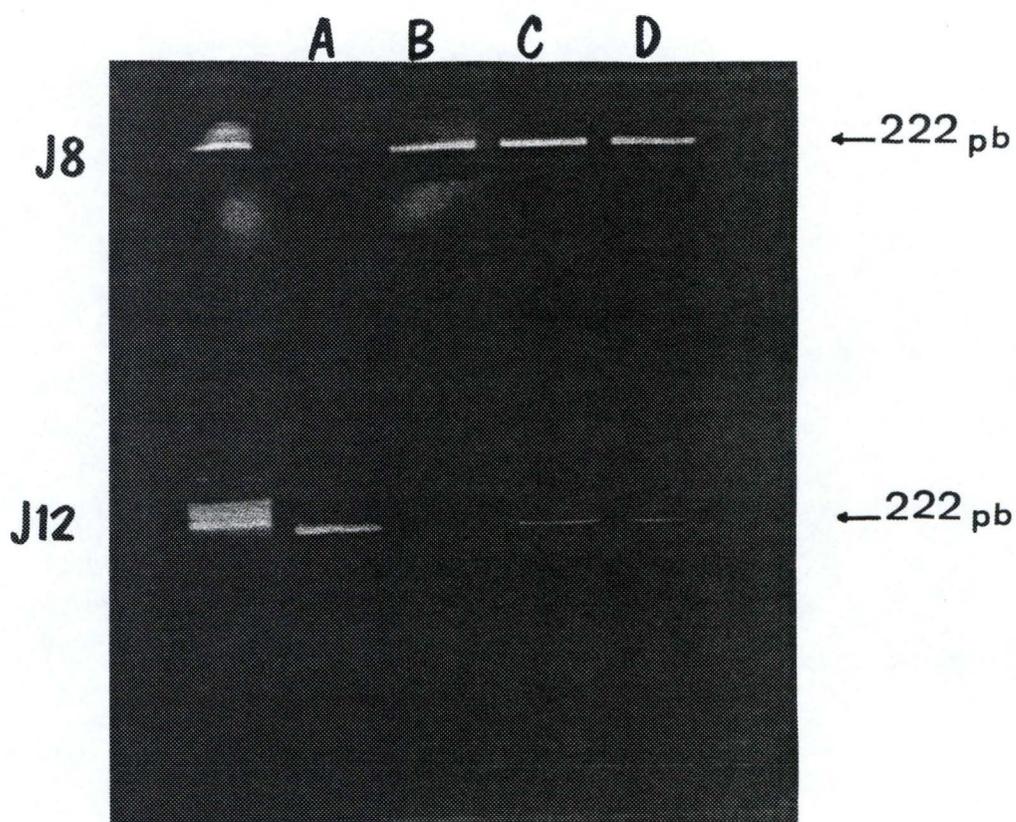


Photo III.16:RT-PCR avec amorces  $\beta$ 2m sur l'ARN de rate de souris du jours 8 et du jour 12 après deuxième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 8 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 8 immunisées avec RB94/ Q

En bas: - pistes A et B souris du jour 12 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 12 immunisées avec

RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

	RB94 J1	RB94 J4	RB94 J1 Q	RB94 J4 Q
INF- $\gamma$	- / -	+ / -	- / -	+ / +
IL-2	- / -	+ / +	- / -	+ / +
IL-4	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
$\beta$ 2 m	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +

NB: Q= Quil A

Aux jours 8 et 12, on ne détecte aucune contamination pour les contrôles négatifs (résultats non montrés). On note l'absence d'amplification de  $\beta$ 2m pour une souris du jour 8 et pour une souris du jour 12 toute deux immunisées à l'aide de BRSV non adjuvanté (photo III.16). La présence d'INF $\gamma$  a été détectée chez toutes les souris du jour 8 immunisées par le RB 94 seul, mais seulement une souris du jour 8 immunisée en Quil A montre un signal positif pour l'INF- $\gamma$ . Toutes les souris du jour 12 sont négatives pour l'INF $\gamma$  (photo III.17). La photo III.18 illustre la détection d'ARNm d'IL-4 chez toutes les souris du jour 8 alors que toutes les souris du jour 12 sont négatives. Au jour 8 et au jour 12, aucune trace d'IL-2 n'a pu être mise en évidence et ce chez aucune des souris testées (photo III.19). On note la présence d'un contaminant (voir \* sur photos) qui revient chez la même souris (souris du jour 8 immunisée avec du BRSV adjuvanté) lors des réactions de RT-PCR à l'aide des amorces INF- $\gamma$ , IL-4 et IL-2. Si l'ARN de cette souris était contaminé par de l'ADN de pMus-3, cette contamination se verrait aussi au niveau des contrôles négatifs et positifs. Ce cas illustre bien ce que nous avons décrit comme étant des contaminations aléatoires par de l'ADN de pMus-3. La compétition entre ce contaminant et la matrice peut expliquer l'absence de signal pour l'INF- $\gamma$  chez cette souris. Le tableau ci dessous résume les résultats obtenus pour les souris du jour 8 et du jour 12.

	RB94 J8	RB94 J12	RB94 J8 Q	RB94 J12 Q
INF- $\gamma$	+ / +	- / -	- / +	- / -
IL-2	+ / +	- / -	+ / +	- / -
IL-4	- / -	- / -	- / -	- / -
$\beta$ 2 m	+ / -	- / +	+ / +	+ / +

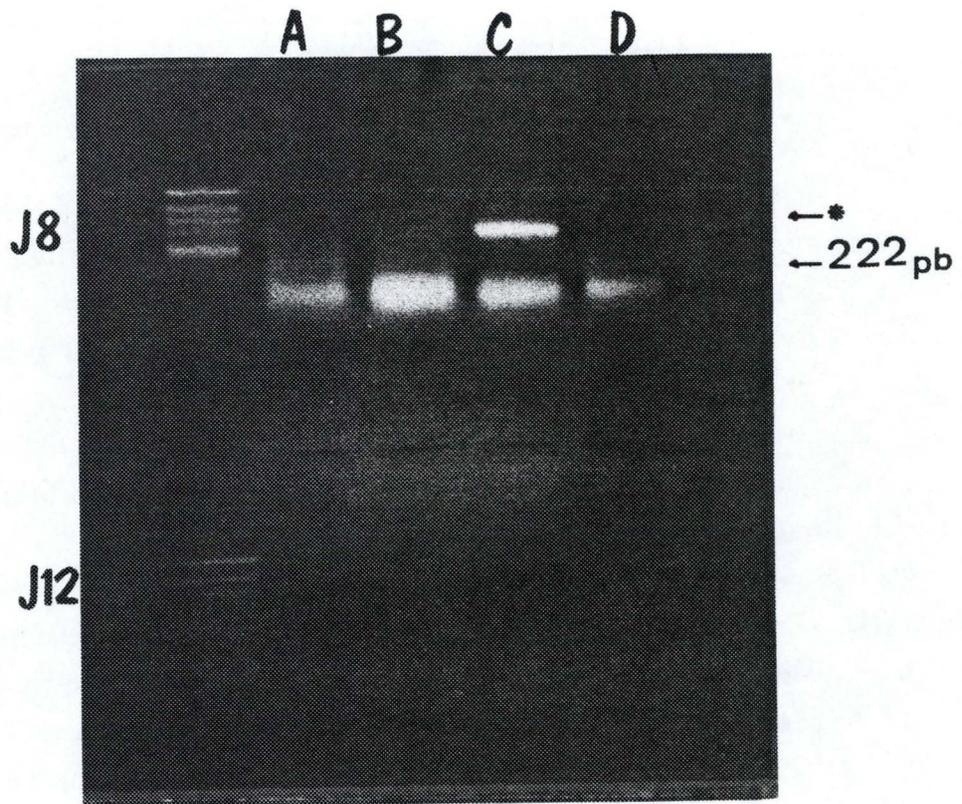


Photo III.17: RT-PCR avec amorces  $\text{INF-}\gamma$  sur l'ARN de rate de souris du jours 8 et du jour 12 après deuxième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 8 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 8 immunisées avec RB94/ Q

En bas: - pistes A et B souris du jour 12 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 12 immunisées avec

RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

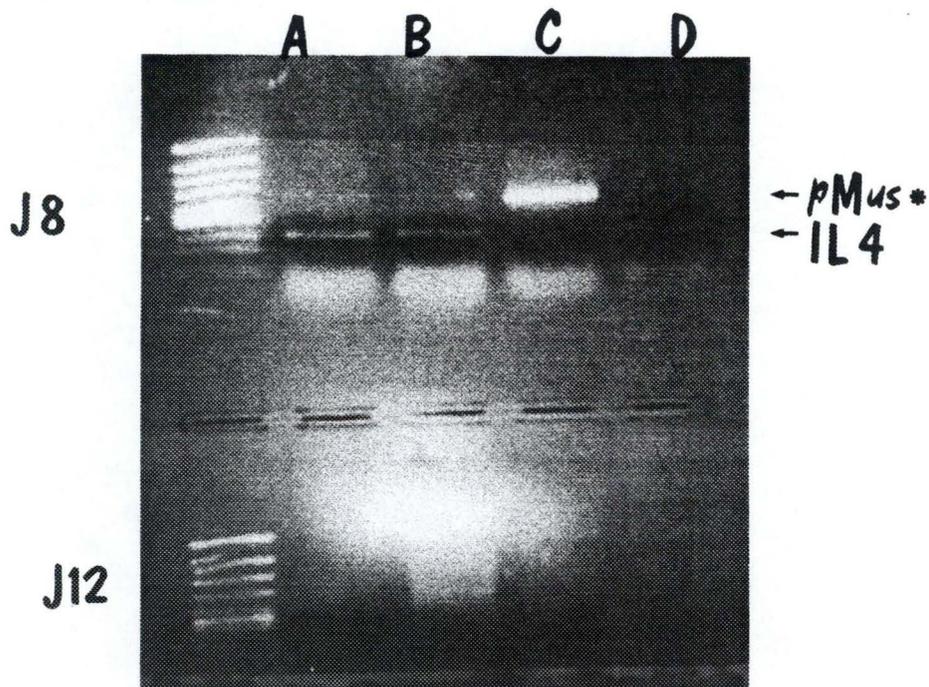


Photo III.18: RT-PCR avec amorces IL-4 sur l'ARN de rate de souris du jours 8 et du jour 12 après deuxième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 8 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 8 immunisées avec RB94/ Q  
 En bas: - pistes A et B souris du jour 12 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 12 immunisées avec

RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

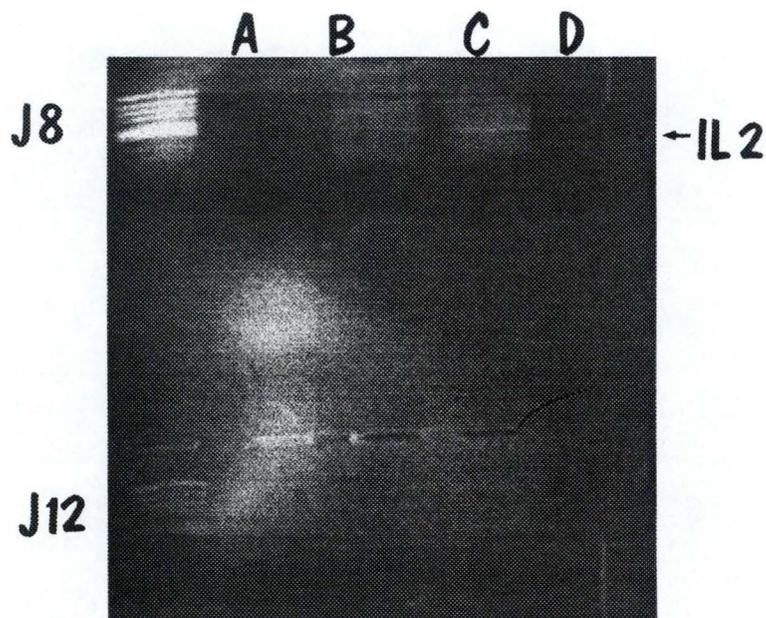


Photo III.19: RT-PCR avec amorces IL-2 sur l'ARN de rate de souris du jours 8 et du jour 12 après deuxième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 8 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 8 immunisées avec RB94/ Q  
 En bas: - pistes A et B souris du jour 12 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 12 immunisées avec

RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

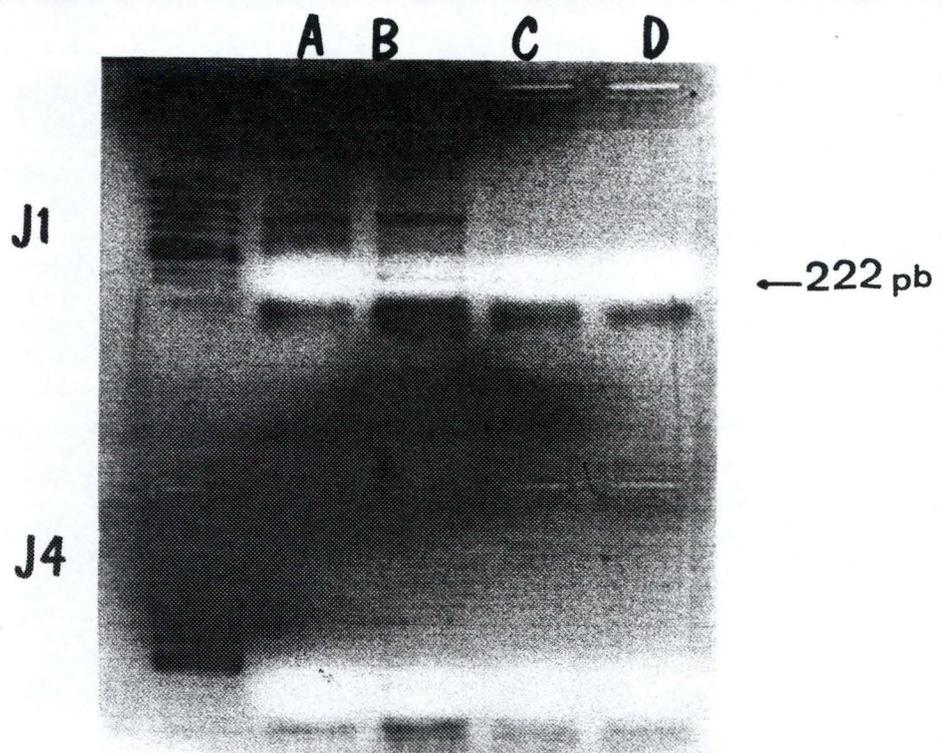


Photo III.20: RT-PCR avec amorces IL-4 sur l'ARN de rate de souris du jours 1 et du jour 4 après troisième immunsation.  
 En haut: - pistes A et B souris du jour 1 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 1 immunisées avec RB94/ Q  
 En bas: - pistes A et B souris du jour 4 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 4 immunisées avec RB94/Q  
 N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

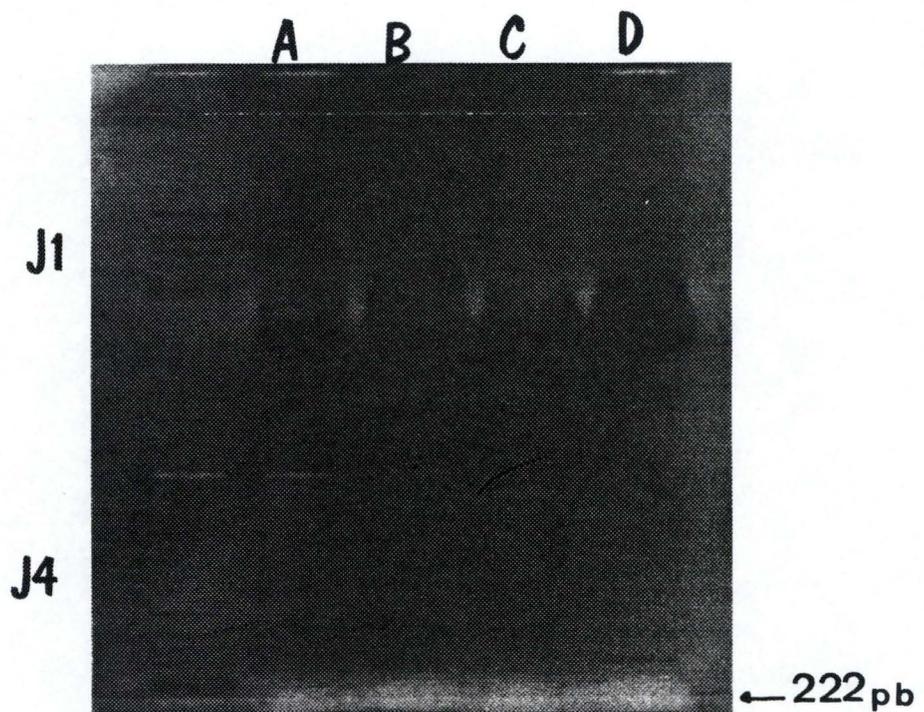


Photo III.21: RT-PCR avec amorces INF- $\gamma$  sur l'ARN de rate de souris du jours 1 et du jour 4 après troisième immunsation.  
 En haut: - pistes A et B souris du jour 1 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 1 immunisées avec RB94/ Q  
 En bas: - pistes A et B souris du jour 4 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 4 immunisées avec RB94/Q  
 N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

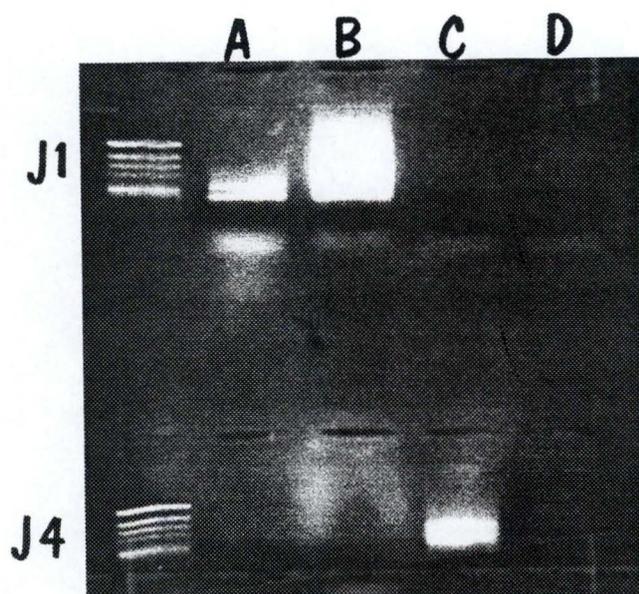


Photo III.22: RT-PCR avec amorces IL-2 sur l'ARN de rate de souris du jours 1 et du jour 4 après troisième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 1 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 1 immunisées avec RB94/ Q  
 En bas: - pistes A et B souris du jour 4 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 4 immunisées avec RB94/Q

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

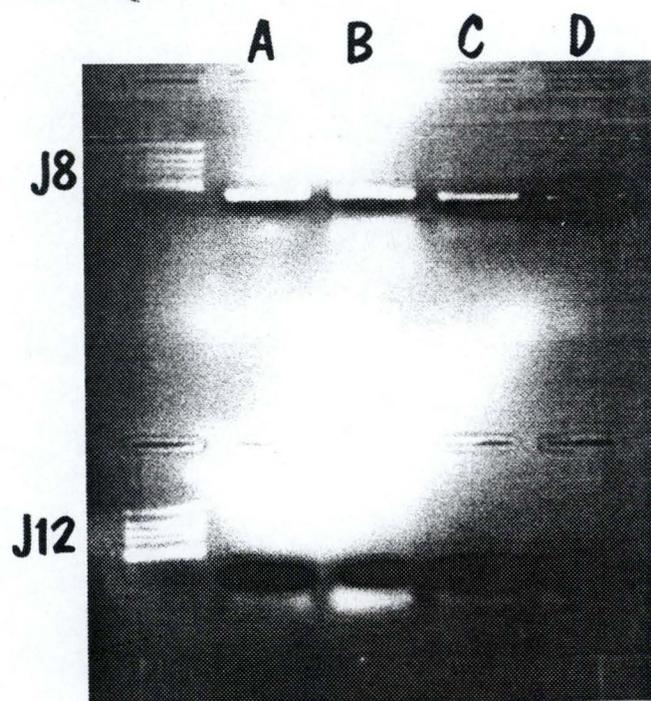


Photo III.23: RT-PCR avec amorces  $\beta 2m$  sur l'ARN de rate de souris du jours 8 et du jour 12 après troisième immunisation.

En haut: - pistes A et B souris du jour 8 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D souris du jour 8 immunisées avec RB94/ Q  
 En bas: - pistes A et B souris du jour 4 immunisées avec RB94.  
 - pistes C et D blancs PCR avec amorces  $\beta 2m$ .

N.B: RB94/Q= RB94 Quil A.

Aux jours 1 et 4 après la troisième immunisation, les contrôles positifs et négatifs sont corrects (résultats non montrés). Les photos III.20, III.21 et III.22 présentent les résultats obtenus respectivement avec les amorces IL-4, INF- $\gamma$  et IL-2. On a pu mettre en évidence la présence d'ARNm d'IL-4 chez toutes les souris du jour 1, quant au jour 4, seule une des souris immunisées par RB 94 et une de celles immunisées en Quil A sont positives (photo III.20). L'INF- $\gamma$  n'a été mis en évidence que chez deux souris du jour 4, une immunisée à l'aide de RB94 seul, l'autre à l'aide de RB94 Quil A (photo III.21). La présence de traînées au jour 1 pourrait être due à une activité DNase sur les amplicons de l'ADNc de l'INF $\gamma$  ou à une détérioration de l'activité de la polymérase donnant ainsi naissance à des amplicons de taille de plus en plus réduite. Aucune trace d'IL-2 n'a été détectée chez aucune des souris.(photo III.22). Le tableau ci-dessous reprend les résultats décrits pour les souris des jours 1 et 4 après la troisième immunisation.

	RB94 J1	RB94 J4	RB94 J1 Q	RB94 J4 Q
INF- $\gamma$	- / -	+ / -	- / -	+ / -
IL-2	- / -	- / -	- / -	- / -
IL-4	+ / +	+ / +	+ / +	- / +
$\beta$ 2 m	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +

Aux jours 8 et 12 après la troisième immunisation, les contrôles positifs n'ont donné un signal que pour les jours 8 (photo III.23). Aucune cytokine n'a été détectée pour ces deux jours chez aucune des souris testées (résultats non montrés).

En conclusion, un certain nombre d'ARNm cytokiniques ont pu être détectés. Ces RT-PCR ont été effectuées deux fois dans les mêmes conditions et ont donné des résultats semblables dans la plupart des cas. La PCR est une technique sensible à de nombreux facteurs extérieurs et il n'est dès lors pas étonnant que des variations dans les résultats puissent subvenir.

Nous pensons que ces résultats sont significatifs et attestent bien de la présence d'une activation de la transcription de certaines cytokines. Le tableau 10 récapitule les résultats. Il y a en général une bonne corrélation entre les deux souris testées pour une même cytokine. Les résultats obtenus pour la  $\beta 2m$  sont tous positifs sauf pour une souris du jour 8 et une du jour 12, immunisées deux fois avec du RB94 et pour les deux souris du jour 12 après la troisième immunisation avec du RB94. On note que ces souris sont négatives pour toutes les amorces testées, cela est probablement dû à un problème lors de la RT-PCR puisque les résultats de l'extraction sont bons pour les deux souris (Tableau III.9). Les ARNm transcrits le plus précocement sont ceux de l'IL-4 (au jour 1 après la deuxième immunisation) et ce quel que soit le mode d'immunisation. Les messagers de l'IL-2 et de l'INF- $\gamma$  n'apparaissent qu'au jour 4 après la deuxième immunisation. Dès le huitième jour après la deuxième immunisation, les ARNm de l'IL-4 disparaissent alors que l'on détecte encore ceux de l'IL-2 et de l'INF- $\gamma$ . Douze jours après la deuxième immunisation, plus aucun ARNm n'est détecté quel que soit le mode d'immunisation. Aucune trace de messagers de l'IL-2 n'est détectée après la troisième immunisation alors que l'on détecte des messagers de l'INF- $\gamma$  4 jours après la troisième immunisation. Comme pour les souris n'ayant subi que deux immunisations, les messagers de l'IL-4 apparaissent dès le premier jour après la troisième immunisation. Plus aucun messenger n'est détectable à partir du huitième jour après la troisième immunisation. Ces résultats seront comparés avec ceux obtenus en restimulation *in vitro* (point 2) et en sérologie (point 3) lors de la discussion générale.

#### **1.4 RT-PCR compétitive.**

Dans la littérature, des quantifications d'ARNm de cytokines ont été décrites dans divers modèles expérimentaux; cependant, elles ont été réalisées par rapport à un standard externe (la  $\beta$  actine) (Becker, 1993), (Rottman, 1995).

La quantification par rapport à un standard externe, se heurte à la difficulté d'avoir une efficacité identique dans deux réactions PCR différentes et ne permet donc qu'une approche semi-quantitative. L'utilisation d'un standard interne permet de contrôler les effets variables dus à des microvariations des échantillons et des conditions de reverse transcription et de PCR (Wang, 1989). En effet, la PCR étant de nature exponentielle, des variations minimales de l'efficacité de la réaction peuvent conduire à de grandes différences au niveau des résultats (Siebert, 1992). Certaines méthodes de RT-PCR compétitive, impliquaient que la quantification ne se fasse que quand la réaction était en phase exponentielle (Wang, 1989). La technique présentée ici, à l'aide d'un test de validation (voir plus loin) permet de quantifier même lorsque le plateau est atteint. La méthode que nous utilisons a été décrite et validée pour certaines amorces (Legoux, 1992), (Bouaboula, 1992). Les séquences de l'ADN cible et du standard étant différentes, l'efficacité de la réaction n'est pas tout à fait la même, c'est pourquoi lors de la quantification, un facteur correctif doit être appliqué. Ce facteur (F) est fonction de la longueur de la séquence de l'ADN cellulaire et de sa teneur en dC et dG, on a :

$$F = \frac{\text{longueur de l'amplicon de l'ADN cellulaire}}{\text{nombre de dC + dG dans l'ADN cellulaire}}$$

Des dilutions de pMus-3 sont mises en compétition avec 1 µg d'ARN cellulaire. Les quantités de pMus-3 engagées vont de 100 ng à 100 pg en diluant de 10 en 10. La quantification est faite sur gel en comparant le nombre de pixels des amplicons de pMus-3 avec ceux de l'ADN cellulaire. Le rapport est corrigé par le facteur F, on a :

$$R = \frac{\text{Nbr. de pixels de l'amplicon cellulaire} \times F}{\text{Nbr de pixels de l'amplicon standard}}$$

Lorsque R est égal à 1, la quantité d'ARN cellulaire engagée en RT-PCR est la même que celle d'ARN standard.

Des tests de compétitions ont été réalisés sur les souris du jour 4 après seconde immunisation en RB94 adjuvanté ou non.

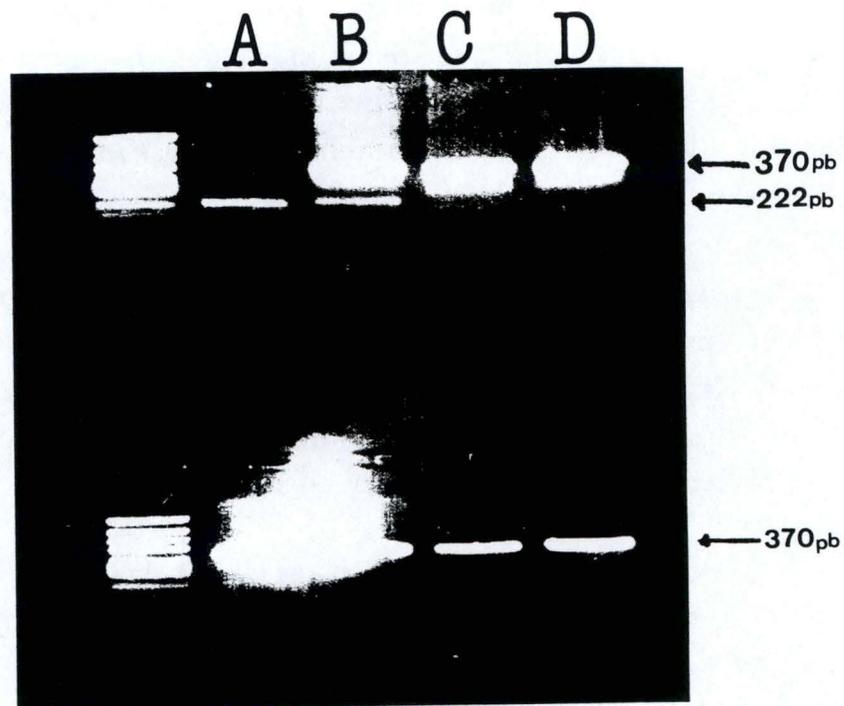


Photo III.24: RT-PCR compétitives avec les amorces IL-4 réalisées sur les deux souris du jour 4 immunisées deux fois avec du RB94.

En haut: - - pistes A: ARN de la souris 1 du jour 4 et 0,1 ng de

pMus-3

- pistes B: ARN de la souris 1 du jour 4 et 1 ng de pMus-3

- pistes C: ARN de la souris 1 du jour 4 et 10 ng de pMus-3

- pistes D: ARN de la souris 1 du jour 4 et 100 ng de pMus-3

En bas:

- pistes A: ARN de la souris 2 du jour 4 et 0,1 ng de pMus-3

- pistes B: ARN de la souris 2 du jour 4 et 1 ng de pMus-3

- pistes C: ARN de la souris 2 du jour 4 et 10 ng de pMus-3

- pistes D: ARN de la souris 2 du jour 4 et 100 ng de pMus-3

Les tentatives de compétition ont eu pour cible, l'IL-4 et l'INF $\gamma$ ; ces compétitions étaient réalisées avec 4 quantités différentes de pMus-3 (de 100 ng à 0,1 ng). La photo III.24 montre un test de compétition réalisé avec de l'ARN de deux immunisées par du RB94. On note que l'ARN de la première souris ne semble pas avoir été mélangé avec 0,1 ng de pMus (absence de signal à 370 paires de bases). On note une coamplification de l'IL-4 contre 1 ng de pMus. La deuxième souris ne montre aucune amplification d'ARN cellulaire. Les souris immunisées par du RB94/Quil A ne montrèrent pas d'amplification d'ARN cellulaire avec les amorces IL-4 (résultats non montrés). Seuls les ARNm d'une souris immunisée avec du RB94 et d'une souris immunisée avec du RB94/Quil A ont été amplifiés à l'aide des amorces INF- $\gamma$  (résultats non montrés). Cependant, dans tous les cas on remarque que malgré les différentes quantités de pMus-3 employées, les signaux semblent être de même intensité. En effet, le plateau calculé pour 100 ng de pMus-3 était de 35 cycles. On peut montrer que les conditions de PCR ne sont pas limitantes et que le plateau est dû à une compétition entre les amorces et les matrices. Lorsque la concentration de la matrice augmente, deux événements peuvent se produire lors de la phase d'hybridation: soit un simple brin s'hybride avec une amorce, soit il s'hybride avec un brin complémentaire, la concentration de matrice après trente cinq cycles devient telle que les brins ne s'hybrident plus qu'entre eux et on est donc au plateau. Cependant, pour arriver à amplifier les différents ARN cellulaires, nous avons dû passer à 40 cycles d'amplification. On peut considérer que malgré la différence de quantité de standard, tous ces échantillons ont atteint le plateau et qu'ils ont donc la même intensité sur gel. Les différences de quantités de standard n'étant pas visible sur gel, il nous a été impossible de quantifier l'ADN cellulaire. Ces expériences ont néanmoins montré qu'une coamplification était possible. Afin de réaliser des tests de compétitions quantifiable, nous proposons de diminuer la quantité de standard et travailler dans une gamme allant de 1 pg à 1 fg de standard. Un test de parallélisme de l'amplification est également à réaliser afin de montrer que les

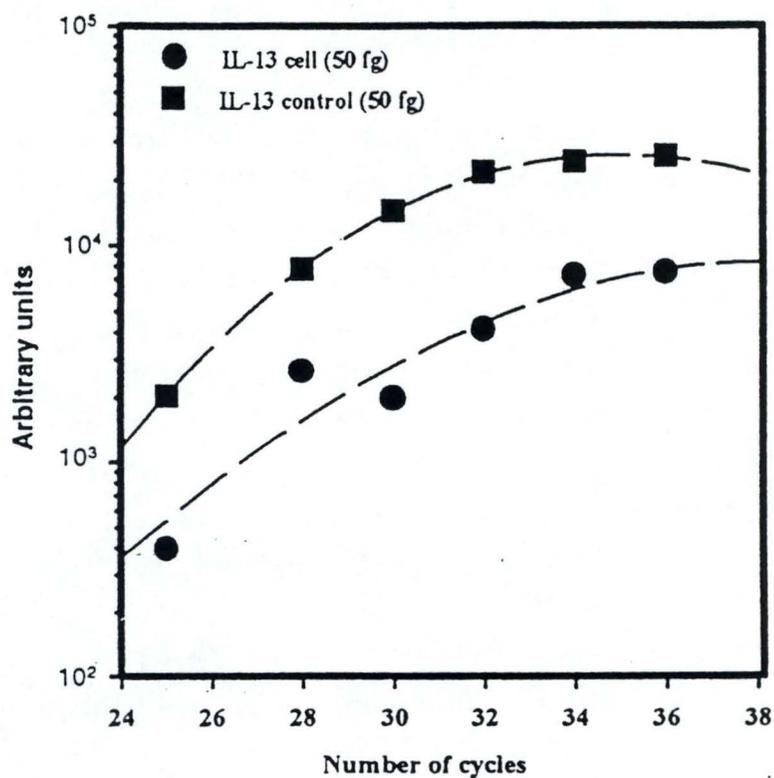


Figure III.1 : Test de parallélisme de l'amplification entre p-Mus-3 et l'IL-13. On voit que même au niveau du plateau l'efficacité est la même pour les deux cibles. (d'après Shire, 1994)

séquences du standard et de l'ARN cellulaire n'ont pas d'influence sur l'efficacité. Ce test doit être effectué pour chaque cytokine étudiée. Un exemple est montré à la figure III.1.

## **2 Synthèse de l'IL-4, de l'INF $\gamma$ et de l'IL-2 après restimulation *in vitro*.**

Les expériences décrites ci-dessous, ne concernent que les souris utilisées pour l'étude de l'effet de l'adjuvantation et de la voie d'entrée de l'antigène sur la réponse immune ( voir point 1.3.2, § B) et celles utilisées pour l'étude de la cinétique de la réponse immunitaire (voir point 1.3.2, § F). Les cellules utilisées proviennent de la demi-rate qui n'a pas été utilisée pour les RT-PCR. Ces expériences ont pour but de montrer que la détection d'ARNm de cytokines correspond bien à une expression protéique de celles-ci. Toutes ses expériences ont été réalisées par le Docteur I. Knott et par S. Vercammen qui font toutes les deux partie du laboratoire de Microbiologie des FUNDP.

Les cellules spléniques sont restimulées *in vitro* à l'aide de différentes concentrations de BRSV (1 TCDI<sub>50</sub>/cell. et 0,1 TCDI<sub>50</sub>/cell). Comme témoins positifs nous utilisons ces mêmes cellules stimulées à l'aide de deux mitogènes non spécifiques, la Con A et le Pokweed (Pok). Le Pok est connu pour induire une synthèse importante d'IL-4. Les témoins négatifs sont constitués par des cellules cultivées en RPMI (milieu de culture) ou en présence d'antigènes cellulaires provenant de cellules Vero non infectées par le virus (Mock).

### **2.1 Dosage de l'IL-4**

Les surnageants des cultures cellulaires ont été analysés à l'aide d'un test ELISA (Kit IL-4 murine, Boehringer, Belgique).

Dans le cadre de l'étude de l'effet de l'adjuvantation et de la voie d'entrée de l'antigène, bien que les contrôles positifs montrent une synthèse d'IL-4, aucune synthèse d'IL-4 par des splénocytes

restimulés *in vitro* par du BRSV (1 et 0,1 TCDI<sub>50</sub>/cellules) n'a pu être mise en évidence (résultats non montrés).

Lors de l'étude de la cinétique de l'expression de cytokines, seules les souris du jour 4 et du jour 12 après la deuxième immunisation ont été testées. Les contrôles positifs montrent une synthèse d'IL-4 d'environ 100 à 200 pg/ml et les contrôles négatifs étaient négatifs. Cependant aucune trace d'IL-4 n'a été détectée dans les surnageants de cellules restimulées par le BRSV (résultats non montrés).

L'IL-4 étant une cytokine à action autocrine (Banchereau, 1992), il est probable que celle-ci soit captée par les cellules au fur et à mesure de sa synthèse, ne laissant dans le surnageant que des quantités indécélables d'IL-4.

## 2.2 Dosage de l'INF $\gamma$

Le dosage de l'INF $\gamma$  a été effectué à l'aide de test ELISA (kit Genzyme, Belgique).

Les splénocytes des souris immunisées par voie IN ou IM à l'aide de BRSV adjuvanté ou non ont été restimulés à l'aide de deux quantités différentes de BRSV (1 et 0,1 TCDI<sub>50</sub>). Les résultats (fig. III.2 a et III.2 b)) montrent que l'immunisation par voie intranasale induit une faible production d'INF- $\gamma$ . Il n'y a pas de synthèse d'INF- $\gamma$  lorsque les souris ont été immunisées par voie intramusculaire.

Dans le cadre de l'étude de la cinétique de la réponse, les splénocytes des souris du jours 4 et 12 après la deuxième immunisation ont été restimulés. Les surnageants des témoins positifs stimulés en Con A contiennent une concentration allant de 100 à 700 pg/ml d'INF $\gamma$ . Tandis que ceux stimulés en Pok , contiennent une telle concentration en INF $\gamma$  que celle-ci n'est pas calculable ( $DO > 3.0$ ). Au niveau des témoins négatifs, les témoins RPMI et Mock d'une des souris du jour 12 sont positifs, on y calcule des concentrations de 85 et 95 pg/ml respectivement. Tous les autres témoins sont négatifs.

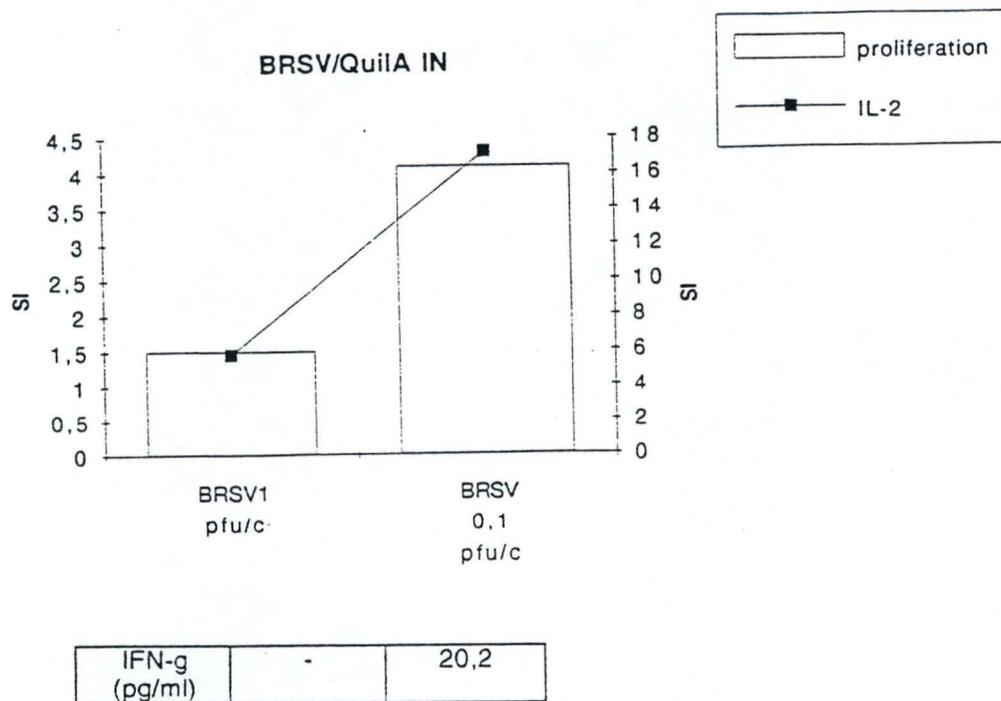
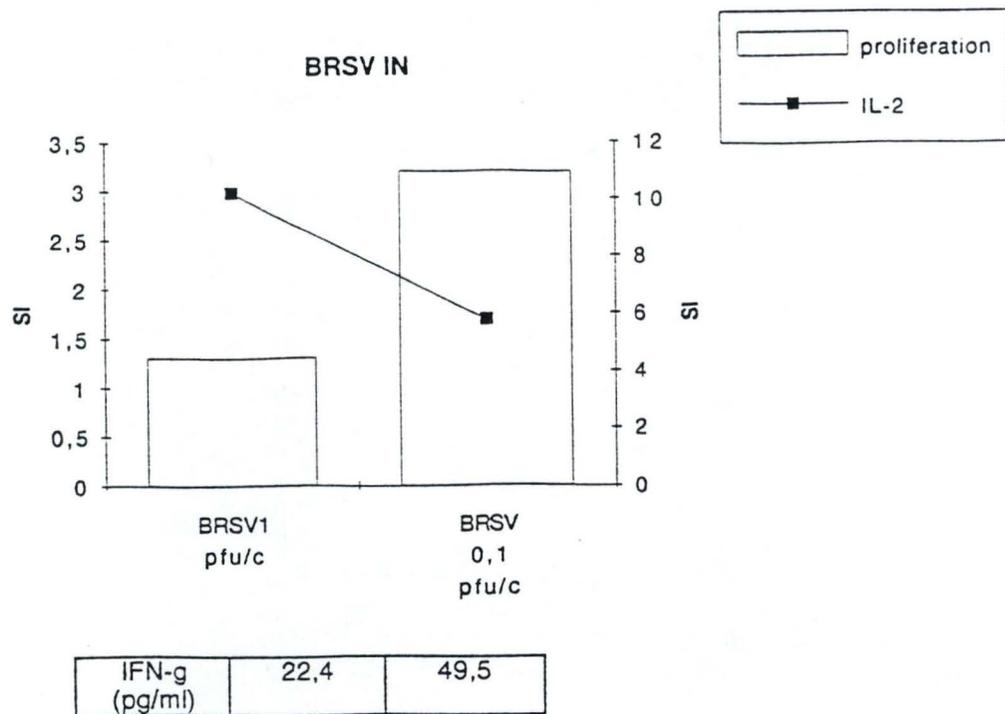


Figure III.2 a: Synthèse d'IL-2 par des splénocytes restimulés in vitro avec deux concentrations de BRSV (1, 0,1 TCDI<sub>50</sub>/cell). Les souris sont immunisées par voie IN avec de RB94 adjuvanté ou non. Les résultats de la prolifération des splénocytes sont exprimés par un indice de stimulation (IS). La quantité d'INF-g détectée après stimulation est exprimée en pg/ml.

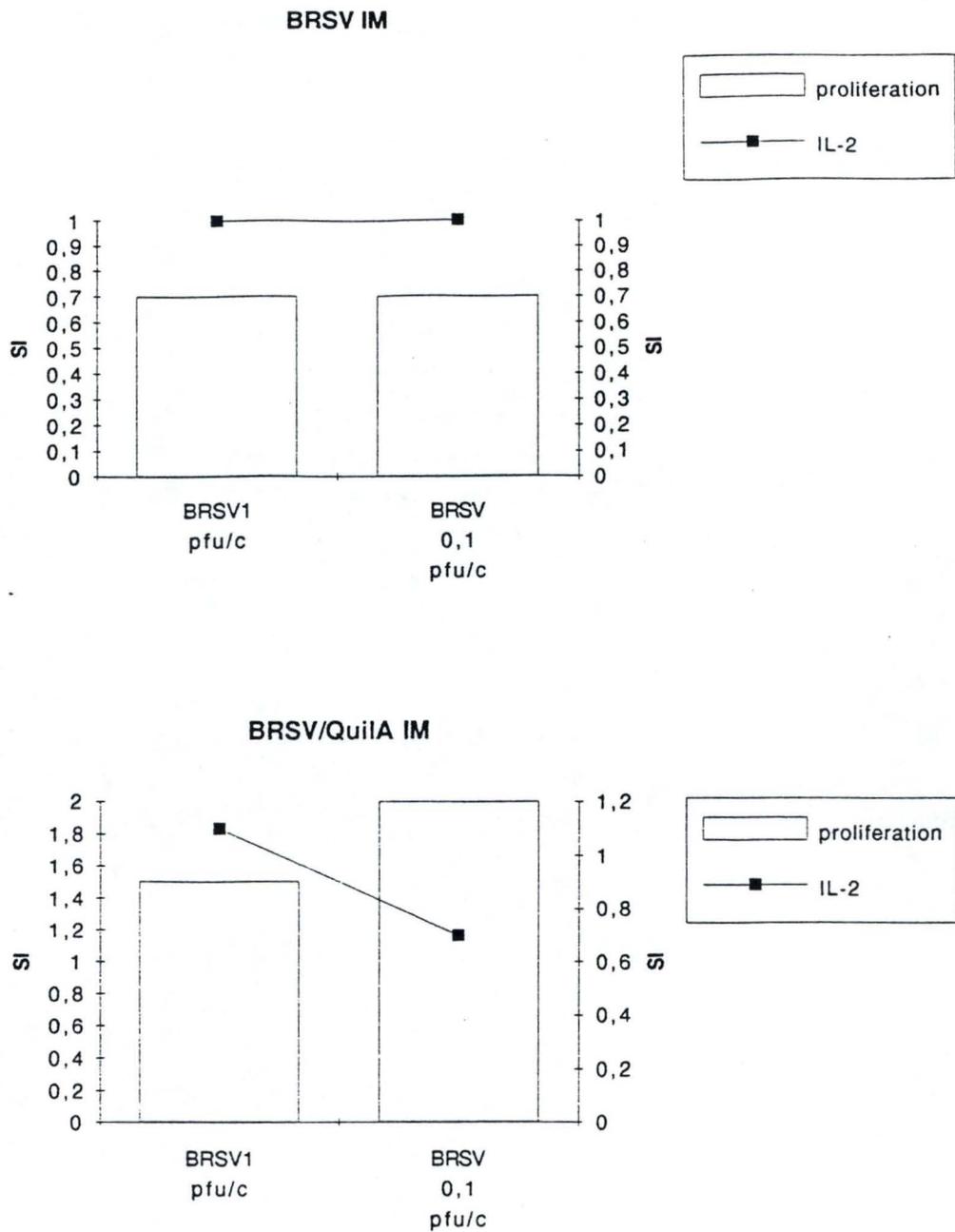


Figure III.2 b: Synthèse d'IL-2 par des splénocytes restimulés in vitro avec deux concentrations de BRSV (1, 0,1 TCDI<sub>50</sub>/cell). Les souris sont immunisées par voie IM avec de RB94 adjuvanté ou non. Les résultats de la prolifération des splénocytes sont exprimés par un indice de stimulation (IS).

Les résultats présentés tableau III.11 montrent qu'une seule souris du jour 4 stimulée par du RSV à 1 TCDI<sub>50</sub>/cellules synthétise de l'INF- $\gamma$ , toutes les souris du jour 12, stimulées par du BRSV à 0,1 et 1 TCDI<sub>50</sub>/cellules, produisent de l'INF $\gamma$ . Il faut cependant tenir compte des témoins négatifs pour une de celles-ci. Les résultats obtenus seront comparés à ceux obtenus avec les RT-PCR dans la discussion.

### **2.3 Mise en évidence de la synthèse d'IL-2.**

La méthode utilisée pour mettre en évidence la production d'IL-2 est un bio assay. Des cellules spléniques, sont cultivées en présence ou non de différents antigènes ou mitogènes ( RPMI, , Mock, BRSV 1 et 0,1 TCDI<sub>50</sub>, Pok et Con A). Le surnageant de ces cultures est ensuite déposé sur une lignée cellulaire de lymphocytes T dépendant de l'IL-2 pour leur prolifération (CTLL2). La prolifération des cellules est directement proportionnelle à la quantité d'IL-2. Cette prolifération est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée au niveau de l'ADN au cours des dernières heures de la culture. A partir des résultats bruts, il est possible de calculer un indice de stimulation (IS). Cet indice représente le rapport entre le résultat obtenu pour un antigène donné et le résultat du témoin négatif (Mock). On considère qu'un indice de stimulation supérieur à 2 pour les résultats calculés contre le Mock représente une prolifération significative en réponse à l'IL-2.

Les splénocytes provenant des souris pour les différents types d'immunisations ou adjuvantation ont été restimulés a l'aide de différentes quantités de BRSV (1 et 0,1 TCDI<sub>50</sub>/cellules). Les indices de stimulation sont visibles sur les figures III.2 a et III.2 b. On peut observer une synthèse importante d'IL-2 pour les souris immunisées par voie IN.

Les résultats, concernant l'étude de la cinétique chez des souris immunisée deux fois à l'aide de BRSV adjuvanté ou non, sont visibles dans le tableau III.12. Seules les souris des jours 4 et 12 après la seconde immunisation sont testées. Les IS du Pok et de la Con A sont toujours significativement supérieurs à 2, tandis que les

### Titres en IgG totales

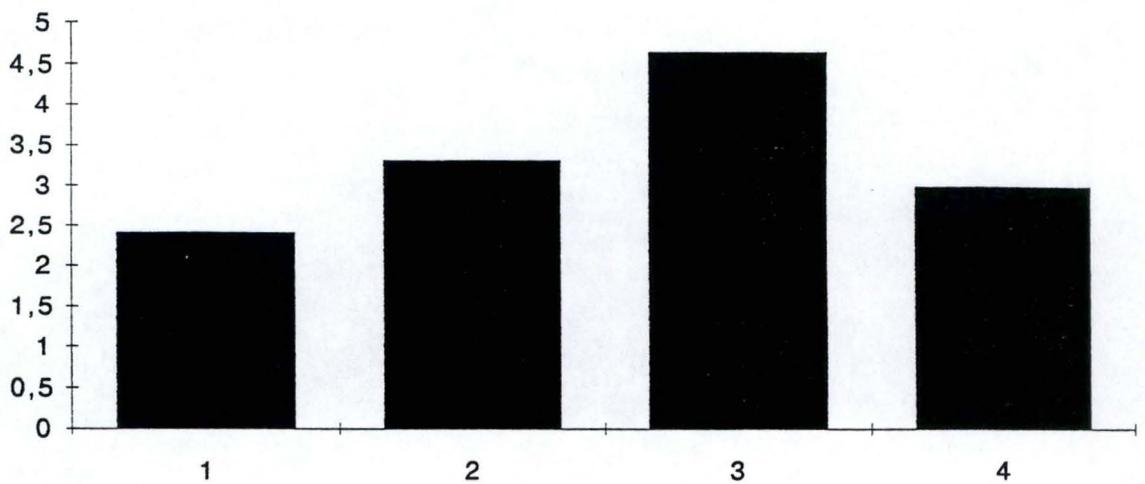


Figure III.3: Réponse isotypique des souris immunisées par voie intranasale avec RB94 (1) ou de RB94 Quil A (2) et de souris immunisée par voie intramusculaire à l'aide de RB94 (3) ou de RB94 Quil A (4). Les résultats représentent les titres en IgG totales calculés comme étant la dilution à laquelle on observe 50% de la DO plateau.

IS du milieu RPMI sont toujours négatifs. On voit que seules les souris du jour 12 ont des IS significatifs. Ces résultats seront confrontés à ceux obtenus en RT-PCR lors de la discussion.

### **3 Analyse sérologique**

Afin de vérifier que les souris ont bien répondu à l'immunisation et de caractériser l'orientation de la réponse, des dosages d'anticorps ont été effectués. La réponse humorale peut-être objectivée par un dosage des IgG totales. En ce qui concerne l'orientation de la réponse chez la souris, les IgG1 sont caractéristiques d'une réponse de type Th2 tandis que la synthèse d'IgG2a est privilégiée lors d'une réponse de type Th1 (Mossman, 1989). Le rapport des titres de ces deux immunoglobulines peut donc nous donner une idée de l'orientation de la réponse. Dans ce travail, le titre en anticorps représente la dilution d'anticorps donnant un signal équivalent à la moitié de la DO plateau.

La réponse humorale de souris infectées avec du RB94 adjuvanté ou non et injecté par voie IN ou IM (voir 1.3.2 C) a été caractérisée. Seuls les titres en IgG totaux ont été calculés, la figure III.3 représente les titres exprimés en  $\log_{10}$  en fonction des différents types d'adjuvantations et d'immunisations. Tous ces titres ont été calculés en double, les contrôles négatifs présentaient une DO nulle (résultats non montrés). On voit que les souris immunisées sans adjuvant par voie IM ont une réponse systémique supérieure à celle induite par des immunisations IN. De même, on voit que l'adjuvantation induit également une réponse systémique plus forte.

Les titres en IgG totales, en IgG1 et en IgG2a de souris immunisées à l'aide de RB94 IN et de RB94 adjuvanté en alun par voie sous-cutanée (voir 1.3.2 E) ont été déterminés. La figure III.4 représente la valeur des titres (en IgG1 et en IgG2a) en fonction du type adjuvantation. Tous les tests ELISA ont été effectués en double. Les contrôles négatifs étaient négatifs. On voit que comme dans le cas précédent, l'adjuvantation et la voie d'entrée de l'antigène ont une forte influence sur l'intensité de la réponse

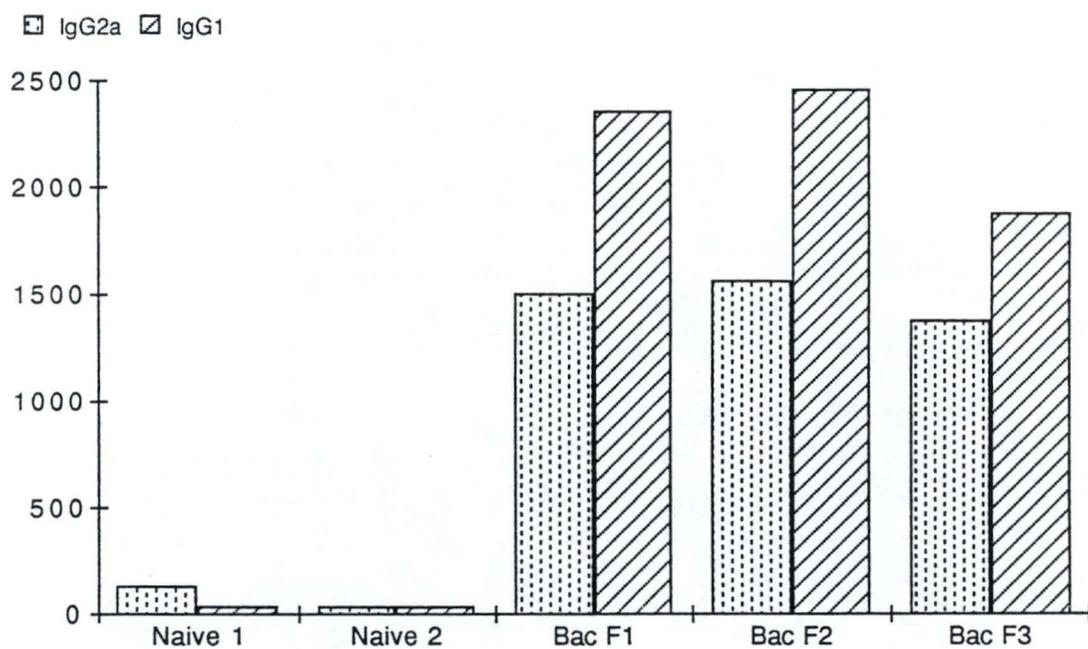


Figure III.4: Réponse isotypique des souris immunisées avec du RB94 par voie intranasale (IN1, IN2, IN3) et de souris immunisées par voie sous-cutanée avec du RB94 adjuvanté en alun. Les résultats représentent les titres en IgG2a et en IgG1 calculé comme étant la dilution à laquelle on observe 50% de la DO plateau.

Souris	IgG1	IgG2A	IgG2a/IgG1
RB94 J1	57	28	0,5
RB94 J1	55	67	0,8
RB94 J4	311	124	0,4
RB94 J4	63	58	0,9
RB94 J8	42	106	2,5
RB94 J8	93	137	1,5
RB94 J12	134	141	1,05
RB94 J12	10	34	3,4
RB94 Quil A J1	63	18	0,3
RB94 Quil A J1	12	25,	2,1
RB94 Quil A J4	53	32	0,6
RB94 Quil A J4	908	150	0,16
RB94 Quil A J8	386	45	0,11
RB94 Quil A J8	22	27	1,2
RB94 Quil A J12	141	84	0,6
RB94 Quil A J12	2101	78	0,03
RB94 J1'	191	34	0,18
RB94 J1'	34	176	05,17
RB94 J4'	269	257	0,95
RB94 J4'	855	718	0,8
RB94 J8'	968	1004	1,03
RB94 J8'	1839	1001	0,5
RB94 J12'	88	204	2,3
RB94 J12'	92	183	1,9
RB94 Quil A J1'	4321	307	0,7
RB94 Quil A J1'	4420	2305	0,5
RB94 Quil A J4'	8800	65	7 10 <sup>-3</sup>
RB94 Quil A J4'	31393	131	4 10 <sup>-3</sup>

Tableau III.13: Titres en IgG1 et en IgG2a de séra de souris immunisées deux ou trois fois à l'aide de RB94 adjuvanté ou non en Quil A. Le rapport IgG2a/IgG1 est donné dans la colonne 3, un rapport << 1 indique une réponse de type Th2. Les titres représentent la valeur de la dilution des séra qui donne la moitié de la DO plateau.

immunitaire. En effet comme attendu, les souris immunisées à l'aide de RB94 IN montrent une orientation peu marquée tandis que la réponse immune chez les souris immunisées par voie sous cutanée avec adjuvantation à l'alun est complètement orientée vers une réponse de type Th2.

Les sérums des souris utilisées pour l'étude de la cinétique de la réponse ont également été analysés. Le tableau III.13 montre les titres exacts des IgG2a et des IgG1 ainsi que les rapports de ceux-ci. On voit que pour les souris n'ayant eu que 2 immunisations la réponse est en moyenne plus forte lors du jour 4 et du jour 8. Les souris Quil A montrent une réponse dominée par les IgG1. La réponse des souris RB montre des titres plus faibles, et ne semble pas être dominée par un isotype particulier, ce qui est en corrélation avec les résultats de sérologie déjà décrits. Après la troisième immunisation, on note chez les deux types de souris que les titres sont plus élevés, ce qui correspondrait à une réponse plus forte. Chez les souris Quil A, on observe une synthèse d'anticorps dès le jour 1 tandis que chez les souris RB, il faut attendre le jour 4. La réponse des souris Quil A est toujours nettement dominée par les IgG1. Tandis que chez les souris RB, on ne peut mettre en évidence la domination d'un isotype particulier. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus en RT-PCR et en stimulation *in vitro* dans la discussion.

# **DISCUSSION**

## Discussion générale

Graham et al. (1993) ont montré l'importance de la voie d'entrée et de l'inactivation du HRSV sur l'orientation de la réponse chez la souris. Nous avons pratiqué des immunisations sur des souris naïves à l'aide de BRSV adjuvanté ou non en Quil A et ce par voie intranasale ou intramusculaire. Le BRSV non adjuvanté est une préparation de virus vivant, tandis que le virus adjuvanté en Quil A est inactivé par celui-ci. Le Quil A est un produit semi-purifié d'un extrait de la saponine de *Quillajia Saponia Molina*. Il est l'adjuvant des ISOMS (immunostimulating complex) qui induisent une bonne réponse tant au niveau cellulaire qu'humoral et ce avec différents pathogènes comme le virus de la grippe ou de la rage (Morein, 1987).

En ce qui concerne les souris immunisée par voie IN ou IM, les expériences de RT-PCR n'ont pas permis de mettre en évidence une différence au niveau de l'expression des ARNm cytokiniques étudiés (INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4) (voir résultats 1.3.2 B) les études de restimulation *in vitro* et de sérologie nous ont permis de faire les observations suivantes. L'immunisation par voie intranasale induit la production d'INF- $\gamma$  lors de restimulation *in vitro* tandis que l'immunisation par voie intramusculaire ne semble pas induire de production d'INF- $\gamma$  et ce, quel que soit l'adjuvantation du virus. De même, l'immunisation par voie intranasale induit une plus grande synthèse d'IL-2 ce qui n'est pas le cas pour les souris immunisées par voie IM. Nous n'avons obtenu aucun résultat pour l'IL-4. Comme nous l'avons vu, notre impossibilité à détecter l'IL-4 est sans doute liée à l'action autocrine de celle-ci. Un moyen de palier à cela serait de mettre en évidence la présence d'IL-5 qui elle ne possède pas d'action autocrine et qui est synthétisée conjointement à l'IL-4. Il semble néanmoins que l'immunisation par voie intranasale induirait une réponse de type Th1. Ces résultats sont loin d'être complets mais semblent corroborer ceux obtenus avec le HRSV (Graham et al., 1993).

Dans les études menées sur le HRSV, de nombreux auteurs soulignent l'importance de la cinétique de la réponse.

Il a, en effet, été montré que le profil cytokinique pouvait varier au cours du temps et ce, sur des études menées tant sur la réponse induite après immunisation et challenge qu'après primo-infection (Waris et al., (1996), Hussel et al. (1996)). Ces variations du profil de sécrétion ont pu être mises en évidence chez des souris immunisées par du BRSV adjuvanté ou non (point 1.3.2 F, tableau 10). On voit en effet que la réponse débute dès le premier jour par une synthèse d'IL-4 ce qui correspondrait à une réponse de type Th2. Cependant, dès le jour 4, après la deuxième immunisation, on note la production des messagers d'INF- $\gamma$  et d'IL-2 ce qui correspond à la mise en place d'une réponse de type Th1. Cette réponse se maintient plus longtemps que la réponse de type Th2. Ces résultats sont observés quel que soit le type d'immunisation. Bien que la synthèse d'ARN messagers de l'INF- $\gamma$  débute dès le jour 4, celui-ci n'est pas présent dans le milieu de culture; par contre, on note sa présence dans le milieu au jour 12 après la deuxième immunisation alors qu'aucun ARNm n'est plus détecté. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'IL-2 (voir résultats point 2.2 et 2.3). Une étude cinétique plus étroite nous permettrait de calculer le temps qui sépare la transcription de l'expression protéique de ces deux cytokines. Aucun résultat n'est disponible en ce qui concerne la présence d'IL-4 dans le milieu.

Les résultats obtenus après trois immunisations au niveau des ARNm indiquent que comme dans le cas de deux immunisations, la première cytokine à être transcrite est l'IL-4. Aucune trace d'ARNm de l'IL-2 n'a pu être mise en évidence. En ce qui concerne l'INF- $\gamma$ , il a été détecté chez une souris immunisée à l'aide de RB94 adjuvanté, quatre jours après la troisième immunisation et chez une souris immunisée par du RB94 non adjuvanté. Et il serait opportun de réaliser des restimulations *in vitro* pour toutes les souris étudiées afin de pouvoir valider la détection d'ARNm par la production de leurs cytokines respectives. Il faut noter que les études menées ne fournissent aucune indication quantitative. La quantification des messagers pourra nous renseigner sur les rapports IL-4/INF- $\gamma$  et ainsi nous éclairer sur l'équilibre Th1/Th2

Au niveau sérologique, les titres en anticorps après la deuxième immunisation, ne permettent pas de mettre en évidence une différence marquée, les rapports IgG2a et IgG1 varient autour de 1, chez les souris ayant reçu l'antigène seul et celles ayant reçu du BRSV adjuvanté. Les variations sont vraisemblablement liées à la variabilité au sein de chaque groupe de souris. Ce qui n'était pas le cas pour les souris immunisées par du BRSV adjuvanté en alun, ou l'on observe de manière évidente un déséquilibre dans le rapport IgG2a/IgG1 (voir graphe 3). Seule une des souris immunisées trois fois montre un rapport d'isotypie significativement orienté vers une réponse de type Th2, il s'agit d'une souris du jour 8 immunisée par du Quil A adjuvanté. Au niveau sérologique, la réponse ne semble pas être orientée vers une réponse de type Th2. En ce qui concerne les souris elle-mêmes, du point de vue technique il faut noter que les souris utilisées n'étant pas élevées en milieu stérile, les résultats présentés ne peuvent pas être tenus comme définitifs bien qu'ils soient en accord avec ceux décrits dans la littérature pour le HRSV. De plus, il pourrait être intéressant d'étudier la réponse Th1/Th2 sur une lignée de souris différente comme par exemple les C57 black. On pourrait ainsi voir si le bagage génétique influence l'orientation de la réponse lors d'immunisations/infections avec le BRSV.

Hussel et al. (1996) ont détecté dans un modèle HRSV lors de primo-infection de l'IL-10 (une cytokine Th2) et de l'INF- $\gamma$  un jour après l'infection; l'expression de l'IL-10 disparaît tandis que celle de l'INF- $\gamma$  perdure. L'orientation de la réponse induite par le RSV semble donc varier au cours du temps. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la production d'INF- $\gamma$  lors du premier jour. Par contre l'IL-4 a été détectée dès le premier jour après la deuxième immunisation. On voit donc que l'expression de cytokine de type Th2, que ce soit l'IL-4 ou l'IL-10, semble être privilégiée lors du début des réponses. Il serait intéressant d'étudier, en plus de l'IL-4, la production d'IL-10 lors de la réponse induite par le BRSV adjuvanté ou non. Une étude menée lors d'une primo-infection pourrait compléter les résultats obtenus.

Lors d'immunisations de souris à l'aide de HRSV inactivé au formol, une réponse de type Th2 a été mise en évidence (Graham et

al. (1993), Waris et al.(1996). Le maintien de cette réponse semble donc dépendant de la préparation de l'antigène. L'adjuvant que nous avons utilisé (le Quil A) ne semble pas dévier la réponse de manière significative et en tout cas ne permet pas le maintien d'une réponse de type Th2. Des études plus complètes notamment au niveau de la restimulation *in vitro* devraient nous permettre de confirmer ces résultats. Et ainsi de l'utiliser en toute connaissance de cause afin d'éviter une orientation de type Th2 qui à été décrite comme étant la réponse la plus préjudicable (Graham et al., 1996).

**CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES**

## Conclusions et perspectives

Nous avons au cours de ce mémoire mis au point une technique de détection des ARNm de l'IL-4, de l'INF- $\gamma$  et de l'IL-2 chez la souris. De même, les outils nécessaires à la mise en oeuvre de RT-PCR compétitive ont été développés. Ces techniques permettront la quantification des ARNm de cytokines murines et pourront donc servir à la caractérisation de la réponse immune lors d'infection de souris et ce avec n'importe quel pathogène. Cependant, afin d'avoir un panorama complet des cytokines impliquées dans l'orientation de la réponse immune la détection de l'IL-12 et de l'IL-10 par RT-PCR devrait être mise au point.

Avec les outils que nous avons mis au point, nous avons montré qu'il existait une variation dans l'expression des ARNm de cytokines au cours du temps lors d'une immunisation avec du BRSV, qu'il soit adjuvanté ou non. Notre étude ayant porté sur la réponse systémique, il serait intéressant de compléter nos résultats en utilisant les ARNm extraits des poumons des souris immunisées afin de caractériser la réponse au niveau local. On sait en effet que la réponse au niveau pulmonaire ne suit pas la même cinétique que la réponse humorale lors d'infection par certains paramyxoviridae (Doherty et al., 1990). Néanmoins, les résultats obtenus sur les souris immunisées à l'aide de BRSV nous fournissent un éclairage utile afin d'élaborer de nouvelles stratégies expérimentales (utilisation de souris stériles, adjuvantation, protéines recombinantes...).

La réponse immune Th1/Th2 pourrait être caractérisée vis-à-vis de plusieurs protéines du BRSV. En effet, outre la F exprimée par le baculovirus, nous disposons des protéines G, N et SH exprimées dans le système baculovirus (K. Walravens (FUNDP) et F. Dessy (CER, Marloie)).

La caractérisation de la réponse Th1/Th2 pourrait encore être affinée en caractérisant les cytokines produites par une population cellulaire donnée, come cela à été réalisé très récemment pour le HRSV (Husell et al., 1996).

Enfin, la caractérisation des divers aspects de l'orientation de la réponse chez la souris, nous permettra d'élaborer des stratégies pour l'étude de la réponse immune chez le bovin vis-à-vis du BRSV.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## **Bibliographie**

a: (1993). Life, death and the immune system. *Scientific American Special Issue*.

b:(1996). The elements of immunity. *Science* 272, 13-79.

Alwan, W.H.; Kozłowska,W.J. and Openshaw,P.J.M. (1994). Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *Journal of Experimental Medicine* 179, 81-89.

Alwan, W.H. and Openshaw,P.J.M. (1993). Distinct patterns of T- and B-cell immunity to respiratory syncytial virus induced by individual. *Vaccine* 11, 431-437.

Anderson, J.J.; Harrop,J.A.; Peers ,H.; Turnbull,T.; Toms,G.L. and Scott,R. (1991a). Recognition of respiratory syncytial (RS) virus proteins by human and BALB/c CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Journal of Medical Virology* 35, 165-173.

Anderson, J.J.; Harrop,J.A.; Peers,H.; Turnbull,T.; Toms,G.L. and Scott,R. (1991b). Recognition of respiratory syncytial virus proteins by human and BALB/C CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Journal of medical virology* 35, 165-173.

Anderson, J.J.; Tsou,C.; Potter,C.; Keyserling,H.L.; Smith,T.F.; Ananaba,G. and Bangham,C.R (1994). Cytokine response to respiratory syncytial virus stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Infectious Diseases* 170, 1201-1208.

Arnold, R.; Humbert,B.; Werchau,H.; Gallati,H. and König,W. (1994). Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumor necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunology* 82, 126-133.

Bachmann, M.F.; Shorle,H.; Kühn,R.; Müller,W.; Hengartner,H.Zinkernagel,R.M. and Horak,I. (1995). Antiviral immune responses in mice deficient for both interleukin-2 and interleukin-4. *Journal of Virology* 69, 4842-4846.

Baker, J.C.; Velicer, L.F. (1991). Bovine respiratory syncytial virus vaccination: current status and future vaccine development. *The Compendium North American Edition-Food Animal* 13, 1323-1334.

Banchereau, J. (1992). *The cytokine handbook* (London/San Diego: Academic Press).

Becker, S.; Koren, H.S. and Henke, D.C. (1993). Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 8, 20-27.

Becker, S.; Quay, J. and Soukup, J. (1991). Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6 and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *The Journal of Immunology* 147, 4307-4312.

Beeler J.A. and Vanwyke Coelingh K., (1989). Neutralisation epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *Journal of General Virology* 63, 2941-2950.

Belardelli, F. (1995). Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS* 103, 161-179.

Belknap, E.B.; Ciszewski, D.K.; Baker, J.C. (1995). Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7, 285-298.

Bendelac, A. (1995). Mouse NK1<sup>+</sup> T cells. *Current Opinion in Immunology* 7, 367-374.

Bouaboula, M.; Legoux, P.; Pességué, B.; Delpech, B.; Dumont, X.; Piechaczyk, M.; Casellast, P. and Shire, D. (1992). Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 21830-21838.

Bright, H.; Turnbull, T.; Toms, G.L. and Scott, R. (1995). Comparison of the T helper response induced by respiratory syncytial virus and its fusion protein in BALB/c mice. *Vaccine* 13, 915-922.

- Brown, W.C.; Zhao,S.; Woods,V.M.; Tripp,C.A.; Tetzlaff,C.L.; Heussler,V.T.; Dobbelaere, D.A.E. and Rice-Fitch, A.C. (1993). Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis*-encoded 77-kilodalton merozoite protein (Bb-1) by use of truncated recombinant fusion proteins. *Infection and Immunity* 61, 236-244.
- Cannon, M.J.; Openshaw,P.J.M. and Askonas,B.A. (1988). Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *Journal of Experimental Medecine* 168, 1163-1168.
- Cannon, M.J.and Bangham, C.R.M. (1989). Recognition of respiratory syncytial virus fusion protein by mouse cytotoxic T cell clones and human cytotoxic T cell line. *Journal of General Virology* 70, 79-87.
- Chappelli, F.; Manfrini,E.; Franceschi,C.; Cossarizza,A. and Black,K.L. (1994). Steroid regulation of cytokine. *Annals of The New York Academy of Sciences* 46, 204-215.
- Chelen, C.J.; Fang,Y.; Freeman,G.J.; Secost,H.; Marshall,J.D.; Hwang,P.T.; Frankel,L.R.; (1995). Human alveolar macrophages present antigen ineffectively due to defective expression of B7 costimulatory cell surface molecules. *Journal of Clinical Investigation* 95, 1415-1421.
- Connors, M.; Giese,N.A.; Kulkarni,A.B.; Firestone,C.Y.; Morse,III H.C and Murphy B.R. (1994). Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV immunized BALB/c mice is abroged by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *Journal of Virology* 68, 5321-5325.
- Coutelier, J.C.; Van Broeck,J. and Wolf,S.F. (1995). Interleukin-12 gene expression after viral infection. *Journal of Virology* 69, 1955-1958.
- Covert, J. and Splitter,G. (1995). Detection of cytokine transcriptional profiles from bovine peripheral blood mononuclear cells and CD4+ lymphocytes by reverse transcription polymerase chain reaction. *Veterinary Immonology and Immunopathology* 49, 39-50.
- De Maeyer, E.and De Maeyer-Guignard,J. (1992). The cytokine handbook (London/San Diego: Academic Press).

Del Prete, G.; De Carli, M.; Almerigogna, F.; Giudizi, M.G. Biagiotti, R. and Romagnani, S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *The Journal of Immunology* 150, 353-360.

Erard, F.; Wild, M.T.; Garcia-Sanz, J.A. and Graham Le Gros (1993). Switch of CD8 T cells to Noncytolytic CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> cells that make Th2 cytokines and help B cells. *Science* 260, 1802-1805.

Fernald, G.W.; Almond J.R. and Henderson, F.W. (1983). Cellular and humoral immunity in recurrent respiratory syncytial virus infections. *Pediatric Research* 17, 753-758.

Fitch, F.W.; McKisic, M.D.; Lancki, D.W.; and Gajewski, T.F. (1993). Differential regulation of murine lymphocyte subsets. *Annual Review of Immunology* 11, 29-48.

Furze J.; Wertz, G.; Lerch, R. and Taylor, G. (1994). Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 75, 363-370.

Garside, P. and A.McI.Mowat, P. (1995). Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunology Today* 16, 220-223.

Gershwin, L.; Schelegle, E.; Gunther, E.; Woolums, A.; Anderson, M.; Singer, R.; et al. (1996). Bovine respiratory syncytial virus infection is augmented in calves inoculated with formalin-inactivated vaccine. RSV after 40 Years, Symposium, Kiawah Island Resort, USA

Graham, B.S. (1996). Immunological determinants of disease caused by respiratory syncytial virus. *Trends in Microbiology* 4, 290-294.

Graham, B.S.; Henderson, G.S.; Tang, Y.W.; Lu, X.; Neuzil, K.M. and Colley, D.G. (1993). Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *The Journal of Immunology* 151, 2032-2040.

Graham, B.S.; Perkins, M.D.; Wright, P.F. and Karzon D.T. (1991). Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *Journal of Clinical Investigation* 88, 1026-1033.

Groothuis, J.R.; Levin, M.J.; Rodriguez, W.; Hall, C.B.; Long, C.E.; Kim H.M.; Lauer, B.A.; Hemming, V.G. and the RSVIG Study Group (1991). Use of intravenous gamma globulin to passively immunize high-risk children against respiratory syncytial virus: safety and pharmacokinetics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 1469-1473.

Heminway, B.R.; Yu, Y.; Tanaka, Y.; Perrine, K.G.; Gustafson, E.; Bernstein, J.M. and Galinski, S (1994). Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* 200, 801-805.

Huang, Y.T.; Romito, R.R.; De, B.P. and Banerjee, A.K. (1993). Characterization of the in Vitro system for the synthesis of mRNA from human respiratory syncytial virus. *Virology* 193, 862-867.

Hussel, T.; Sparer, T.; Spender, L.; Pala, P.; Werner, A.; Openshaw, P. (1996). IL-12 induces TH1 responses but does not prevent vaccine-enhanced illness during RSV challenge. RSV after 40 Years, Symposium, Kiawah Island, USA

Hussell, T.; Spender, L.C.; Georgiou, A.; O'Garra, A. and Openshaw, P.J.M. (1996). Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 77, 2447-2455.

Inoue, T.; Asano, Y.; Matsuoka, S.; Furutani-Seiki, M.; Aizawa, S.; Nishimura, H. and Shirai, T. (1993). Distinction of mouse CD8<sup>+</sup> suppressor effector cell clone from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. *The Journal of Immunology* 150, 2121-2128.

Janeway; Travers, (1995). *Immunobiology* (London: Current Biology Ltd.).

Kelso, A. (1995). Th1 and Th2 subsets: paradigm lost? *Immunology Today* 16, 374-379.

Kemeny, D.M.; Noble, A.; Holmes, B.J. and Diaz-Sanchez, D. (1994). Immune regulation: a new role for the CD8<sup>+</sup> T cell. *Immunology Today* 15, 107-110.

Kuiper, H.M.; De Jong,R.; Brouwer,M.; Lammers,K.; Wijdenes, and Van Lier,R.A.W. (1994). Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunology* 83, 38-44.

Kuziel, W.A. and Greene,W.C. (1992). *The cytokine handbook* (London/San Diego: Academic Press).

Le Gros, G. and Erard,F. (1994). Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8<sup>+</sup> T cells: their activation and effector functions. *Current Opinion in Immunology* 6, 453-457.

Legoux, P.; Minty,C.; Delpech,B.; Minty,A.J. and Shire,D. (1992). Simultaneous quantification of cytokine mRNAs in interleukin-1b stimulated U373 human astrocytoma cells by co-amplification with an internal multisoecific control. *European Cytokine Network* 3, 553-563.

Lewin, B. (1994). *Genes V* (Oxford:

Marx, J. (1995). How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 270, 232-233.

Matheise, J.P.; Walravens,K.; Collard,A.; Coppe,P. and Letesson,J.J. (1995). Antigenic analysis of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition. *Archives of Virology* 140, 993-1005.

McIntosh, K. and Chanock,R.M. (1990). *Virology* (New York: Raven Press Ltd.).

Meissner, H.C. (1994). Economic impact of viral respiratory disease in children. *The Journal of pediatrics* 124, S17-S21.

Morein, B.; Lövgren,K.;Höglund,S. and Sundquist,B. (1987). The ISCOM: an immunostimulating complex. *Immunology Today* 8, 333-338.

Mosmann, T.R. and Sad,S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17, 138-146.

Mossman, T R; and Coffman,RL (1989). Th1 and Th2 cells : Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7, 145-173.

- Nicholas, J.A.; Rubino, K.L.; Lively, M.E.; Adams, E.G. and Collins, P.L. (1990). Cytolytic T-lymphocyte response to respiratory syncytial virus: effector cell phenotype and target proteins. *Journal of Virology* 64, 4232-4241.
- Nickoloff, B.J. and Turka, L.A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology Today* 15, 464-469.
- Noah, T.L. and Becker, S. (1993). Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by human bronchial epithelial cell line. *American Journal of Physiology* 265, L472-L478.
- O'Garra, A. and Murphy, K. (1994). Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current Opinion in Immunology* 6, 458-466.
- Pemberton, R.M.; Cannon, M.J.; Openshaw, P.J.M.; Ball, L.A.; Wertz, G.W. and Askonas, B.A. (1987). Cytotoxic T cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: fusion protein is an important target antigen. *Journal of General Virology* 68, 2177-2182.
- Pernis, A.; Gupta, S.; Gollob, K.J.; Garfein, E.; Coffman, R.L. Schindler, C.; Rothman, P. (1995). Lack of interferon  $\gamma$  receptor  $\beta$  chain and the prevention of interferon  $\gamma$  signaling in TH1 cells. *Science* 269, 245-247.
- Powrie, F.; Menon, S. and Coffman, R.L. (1993a). Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity *in vivo*. *European Journal of Immunology* 23, 3043-3049.
- Powrie, F. and Coffman, R.L. (1993b). Cytokine regulation of T-cell function; potential for therapeutic intervention. *Immunology Today* 14, 270-274.
- Prozzi, D.; Walravens, K.; Langedijk, J.P.M.; Daus, F.; Kramps, J.A. and Letesson J.J. (1996). Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Journal of Virology* (in press)
- Ramsay, A.J.; Ruby, J. and Ramshaw, I.A. (1993). A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunology Today* 14, 155-157.

Reiner, S.L. and Seder, R.A. (1995). T helper cell differentiation in immune response. *Current Opinion in Immunology* 7, 360-366.

Roberts, S.R.; Lichtenstein, D.; Ball, L.A. and Wertz, G.W. (1994). The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *Journal of Virology* 68, 4538-4546.

Roitt, I.M.; Brostoff, J.; Male, D.K. (1993). *Immunologie* (Mosby Year Book Europe Ltd).

Rottman, J.B.; Freeman, E.B.; Tonkonogy, S.; Tompkins, M.B. (1995). A reverse transcription-polymerase chain reaction technique to detect feline cytokine genes. *Veterinary Immunology and Immunotherapy* 45, 1-18.

Samal, S.K. and Collins, P.L. (1996). RNA replication by a respiratory syncytial virus RNA analog does not obey the rule of six and retains a nonviral trinucleotide extension at the leader end. *Journal of Virology* 70, 5075-5082.

Seder, R.A.; and Paul, W.E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annual Review of Immunology* 12, 635-673.

Shire, D. (1993). An invitation to an open exchange of reagents and information useful for the measurement of cytokine mRNA levels by PCR. *European Cytokine Network* 4, 161-162.

Siber, G.R.; Leszczynski, J.; Pena-Cruz, V.; Ferren-Gardner, C.; Anderson, R.; Hemming, V.G.; Walsh, E.E.; Burns, J.; McIntosh, K.; Gonin, R. and Anderson, L.J. (1992). Protective activity of a human respiratory syncytial virus immune globulin prepared from donors screened by microneutralization assay. *The Journal of Infectious Diseases* 165, 456-463.

Siebert, P.D. and Larrick, J.W. (1992). Competitive PCR. *Nature* 359, 557-558.

Souazé, F.; Ntodou-Thomé, A.; Tran, C.Y.; Rostène, W. and Forgez, P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *BioTechniques* 21, 280-285.

Stam, W.B.; Van Oosterhout, A.J.M. and Nijkamp, F.P. (1993). Pharmacological Modulation of TH1- and TH2- associated Lymphokine production. *Life Sciences* 53, 1921-1934.

Tanaka, T.; Hu-Li, J.; Seder, R.A.; Fazekas de St. Groth, B. and Williams, E.P. (1993). Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon  $\gamma$  production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA* 90, 5914-5918.

Taylor, G.; Stott, E.J.; Bew, M.; Fernie, B.F.; Cote, P.J.; Collins, A.P.; Hughes, M. and Jebbe (1984). Monoclonal Antibodies protect against respiratory syncytial infection in mice. *Immunology* 52, 137-142.

Taylor, G.; Thomas, L.H.; Wyld, S.G.; Furze, J.; Sopp, P. and Howard, C.J. (1995). Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. *Journal of Virology* 69, 6658-6664.

Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* 13, 251-276.

Trinchieri, G. and Scott, P. (1994). The role of interleukin 12 in immune response, disease and therapy. *Immunology Today* 15, 460-463.

Walravens, K.; Matheise, J.P.; Knott, I.; Coppe, P.; Collard, A.; Didembourg, C.; Dessy, F.; Kettman, R. and Letesson, J.J. (1996). Immunological response of mice to the bovine respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in recombinant baculovirus infected insect cell. *Journal of Virology* (in press)

Wang, A.M.; Doyle, M.V. and Mark, D.F. (1989). Quantification of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the USA* 86, 9717-9721.

Ward, K.A.; Lambden P.R.; Ogilvie, M.M. and Watt P.J. (1983). Antibodies to respiratory syncytial virus polypeptides and their significance in human infection. *Journal of General Virology* 64, 1867-1876.

Waris, M.E.; Tsou,C.; Erdman,D.D; Zaki,S.R. and Anderson,L.J. (1996). Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induced enhanced pulmonary inflammatory response with predominant Th2-like cytokine pattern. *Journal of Virology* 70, 2852-2860.

Wellemans, G. (1990). *Virus infections of ruminants* (Elsevier Sciences Publishers).

Westenbrink, F.; Kimman,T.G. and Brinkhof J.M.A. (1989). Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus in calves. *Journal of General Virology* 70, 591-601.

Yu, Q.; Hardy,R.W. and Wertz,G.W. (1995). Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirement for RNA replication. *Journal of Virology* 69, 2412-2419.

Zimmermann, K. and Mannhalter J.W. (1996). Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques* 21, 268-279.